

アクチバシン注 600 万・1200 万・2400 万
グ ル ト パ 注 600 万・1200 万・2400 万

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

協和醗酵工業株式会社
三菱ウェルファーマ株式会社

目 次

2.6.1 緒言	1
2.6.2 薬理試験の概要文	3
2.6.2.1 まとめ	4
2.6.2.1.1 ラット光増感反応誘発中大脳動脈血栓モデルにおけるアルテプラーゼの 血栓溶解作用の検討	4
2.6.2.1.2 検索抽出論文	4
2.6.2.2 効力を裏付ける試験	5
2.6.2.2.1 ラット光増感反応誘発中大脳動脈血栓モデルにおけるアルテプラーゼの 血栓溶解作用の検討	5
2.6.2.2.2 検索抽出論文	7
2.6.2.3 副次的薬理試験	15
2.6.2.4 安全性薬理試験	15
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用	15
2.6.2.6 考察及び結論	15
2.6.2.7 図表	16
2.6.3 薬理試験概要表	17
2.6.3.1 薬理試験：一覧表	17
2.6.3.2 効力を裏付ける試験	18
2.6.3.2.1 ラット光増感反応誘発中大脳動脈血栓モデルにおけるアルテプラーゼの 血栓溶解作用の検討	18
2.6.3.2.2 検索抽出論文	19
2.6.4 薬物動態試験の概要文	20
2.6.5 薬物動態試験概要表	20
2.6.6 毒性試験の概要文	20
2.6.7 毒性試験概要表	20
2.6.8 参考文献	20

2.6.1 緒言

虚血性脳血管障害は脳の血管に血栓・塞栓が生成し、血流が途絶することにより引き起こされる。虚血性脳血管障害が生じた際に血栓の除去が遅れると、閉塞した血管が支配する脳神経細胞が時間の経過とともに不可逆的に変性し、細胞死に至る。従って、いまだ不可逆的な変性に至っていない神経細胞の壊死を防ぐために血栓の溶解あるいは除去による血管の再開通を速やかに達成する必要がある。この目的のために、組織プラスミノゲン活性化因子(t-PA)の投与による血栓溶解療法が適していると考えられる。

t-PA は、循環血液中あるいは血栓内に取り込まれているプラスミノゲンを分解・活性化し、プラスミンに変換する作用を有し、生じたプラスミンがフィブリンを分解することで血栓を溶解する作用を有する^[資料 4.2.1.1-11]。

アルテプラゼは以下の効能・効果および用法・用量において開発された遺伝子組換え組織プラスミノゲン活性化因子(rt-PA)製剤である。今回の効能追加申請で変更する部分を下線で示した。

【効能・効果】

1. 急性心筋梗塞における冠動脈血栓の溶解（発症後 6 時間以内）
2. 虚血性脳血管障害急性期に伴う機能障害の改善（発症後 3 時間以内）

【用法・用量】

1. 急性心筋梗塞における冠動脈血栓の溶解（発症後 6 時間以内）

通常、成人には体重 kg 当たりアルテプラゼ（遺伝子組換え）として 29 万～43.5 万国際単位（0.5mg/kg～0.75mg/kg）を静脈内投与する。総量の 10%は急速投与（1～2 分間）し、その後残りを 1 時間で投与する。

なお、本薬の投与は発症後できるだけ早期に行う。

[投与に際しては、添付の溶解液に溶解し、必要に応じて日局生理食塩液にて希釈する。]

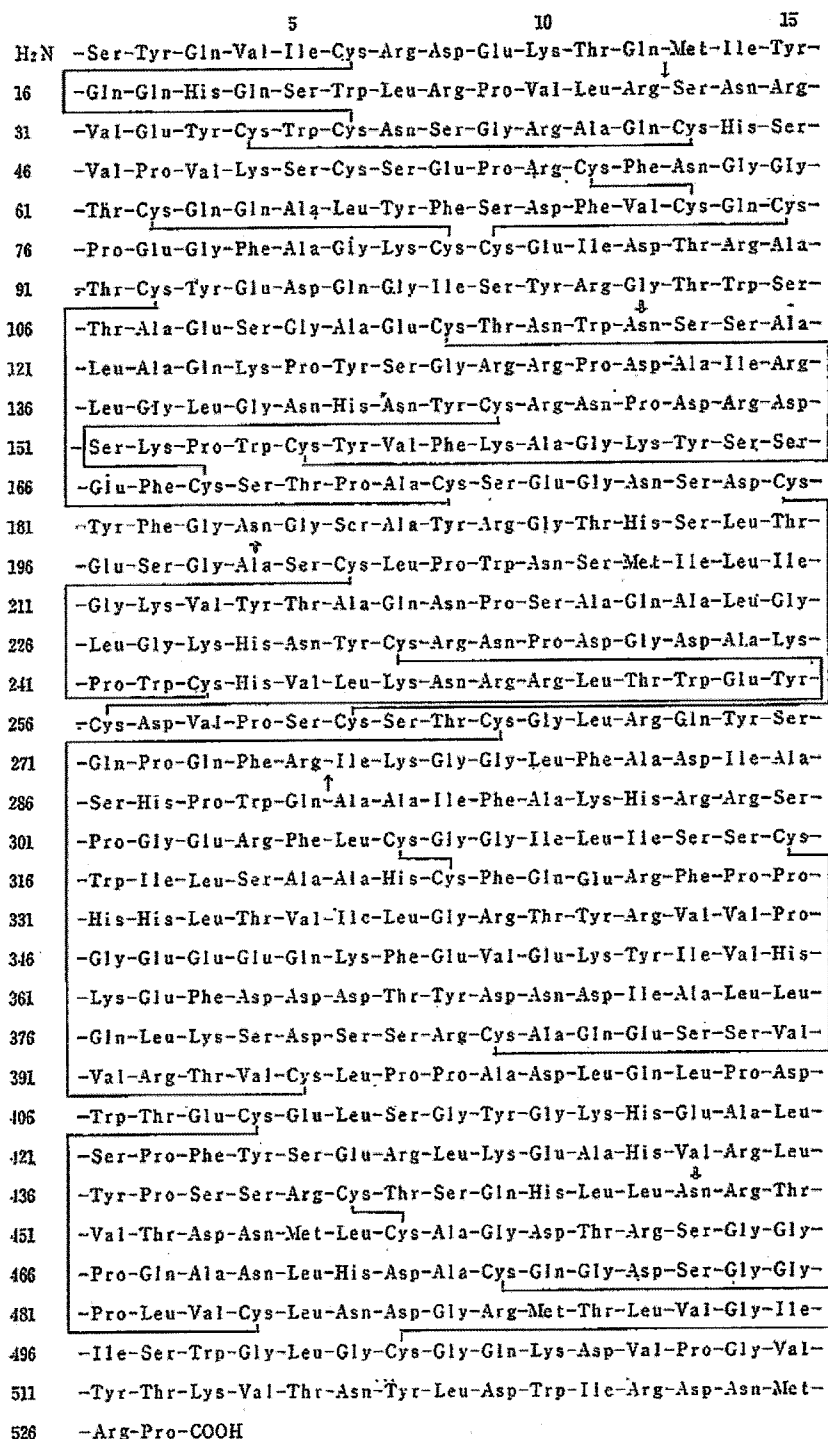
2. 虚血性脳血管障害急性期に伴う機能障害の改善（発症後 3 時間以内）

通常、成人には体重 kg 当たりアルテプラゼ（遺伝子組換え）として 34.8 万国際単位（0.6mg/kg）を静脈内投与する。ただし、投与量の上限は 3,480 万国際単位（60mg）までとする。投与は総量の 10%を急速投与（1～2 分間）し、その後残りを 1 時間で投与する。

なお、本薬の投与は発症後できるだけ早期に行う。

[投与に際しては、添付の溶解液に溶解し、必要に応じて日局生理食塩液にて希釈する。]

【構造式】



Ⓔ：糖鎖結合位置

Cys-Cys : ジスルフィド結合

↓ : ペプチド鎖開始位置

2.6.2 薬理試験の概要文

アルテプラゼの脳梗塞に対する薬理効果を示す論文の中で、多く用いられている動物モデルは、血栓や血塊を塞栓子として脳血管に注入して脳梗塞を形成させるモデルである。これらのモデルは作製が容易である反面、主幹動脈の閉塞による病態が形成されるとは限らず、末梢の小動脈に微小血栓による塞栓が形成されてしまうことも多い。また、これらのモデルはその性格上、血管の一定部位を閉塞することが困難であるため、血栓溶解剤の薬理効果を正確に評価できない可能性がある。

一方で、今回実施した試験^[資料 4.2.1.1-1]で用いた光増感反応誘発中大脳動脈血栓モデル¹⁾は、主幹動脈である中大脳動脈に血栓を生成させて血管を閉塞させるモデルである。本モデルでは、動脈の血流量を計測可能であり血管の閉塞あるいは血流の開通が確認できること、一定の部位に一定量の梗塞が得られることから、血栓溶解剤の薬理効果を正確に評価できると考え、本モデルを効力を裏付ける薬理試験の評価モデルとして選択した。また、臨床においてアルテプラゼの血栓溶解療法の対象の一つとなる中等症の脳梗塞における主な病態は、血栓あるいは塞栓による主幹動脈の閉塞であり、さらに、本モデルにおいて生成する血栓は血小板とフィブリンが混在する臨床の病態を反映したものであることから、本モデルはアルテプラゼの薬理効果の検出に最適であると考えた。

今回実施した試験では、ヒトの有効 t-PA 血漿中濃度との比較を目的として、サテライト群を設けて、t-PA 血漿中濃度測定を実施した。

アルテプラゼの薬理効果を示す論文の検索は、tissue plasminogen activator×brain×stroke という検索式を用いて、19■■年から現在(20■■年■■月■■日)までの期間を対象に Medline により実施し、その中から下記の論文を除いた 9 報の論文を抽出して資料 4.2.1.1-2~10 とした。

- ・ t-PA の薬理効果を示すことを目的としていない論文
- ・ t-PA と他剤を併用することで、併用効果を示すことを目的としている論文
- ・ 半減期を延長させた改変型 t-PA 製剤、アルテプラゼであると特定できない t-PA 製剤およびアルテプラゼ以外の t-PA 製剤を用いた論文
- ・ 学会抄録
- ・ t-PA を動脈内投与しているモデルを用いている論文
- ・ 頸動脈血栓(塞栓)モデルを用いている論文(全脳虚血によるモデルであるため)
- ・ 出血のみをエンドポイントにしている論文

2.6.2.1 まとめ

2.6.2.1.1 ラット光増感反応誘発中大脳動脈血栓モデルにおけるアルテプラザーの血栓溶解作用の検討

光増感反応誘発中大脳動脈血栓モデル(雄性 Sprague-Dawley ラット、以下 SD ラット)に、血栓生成直後から 3 mg/kg のアルテプラザーを 30 分かけて静脈内持続注入すると、血栓溶解作用による梗塞容量の低減および梗塞率の減少が認められ、神経症状が軽減された。本投与量における循環血漿中 t-PA 濃度は 2.24~2.47 $\mu\text{g/mL}$ であった。

2.6.2.1.2 検索抽出論文

(1) ラット

自家血塞栓性脳虚血モデル(雄性 SD ラット)、自家血塞栓性脳卒中モデル(雄性 SD ラット)あるいはドナー血(同種)塞栓性脳卒中モデル(雄性 Wistar ラット)に、脳虚血惹起(塞栓性閉塞)の 1 時間後あるいは 2 時間後から、10 mg/kg のアルテプラザーを 30 分間かけて静脈内持続注入すると、対照群と比較して梗塞率の減少あるいは梗塞容積の低減が認められた。自家血塞栓性脳卒中モデル(雄性 SD ラット)に、脳虚血惹起の 6 時間後から 10 mg/kg のアルテプラザーを 30 分間かけて静脈内持続注入しても、梗塞容積の低減は認められなかった。ドナー血(異種:ヒト)塞栓性脳卒中モデル(雄性 SD ラット)あるいは自家フィブリン血栓注入モデル(雄性 Wistar ラット)に、脳虚血(脳卒中)惹起 2 時間後から、1.5 mg/kg あるいは 10 mg/kg のアルテプラザーを、それぞれ 60 分間および 30 分間かけて静脈内持続注入すると、脳血流量の回復が認められた。

自家血塞栓性脳卒中モデル(雄性 SD ラット)に、脳虚血惹起 2 時間後から 10 mg/kg のアルテプラザーを 30 分間かけて静脈内持続注入しても出血は認められなかったが、6 時間後から 10 mg/kg のアルテプラザーを 30 分間かけて静脈内持続注入すると出血が認められた。ドナー血(同種)塞栓性脳卒中モデル(雄性 Wistar ラット)に、脳虚血惹起(塞栓性閉塞)の 1 時間後から 10 mg/kg のアルテプラザーを 30 分間かけて静脈内持続注入しても、対照群と比較して出血性変化(出血量、出血率)は認められなかった。ドナー血(異種:ヒト)塞栓性脳卒中モデル(雄性 SD ラット)に、脳虚血(脳卒中)惹起 2 時間後から 1.5 mg/kg のアルテプラザーを 60 分間かけて静脈内持続注入しても、対照群、アルテプラザー投与群の両群で出血が認められなかった。

(2) ウサギ

ドナー血(同種)塞栓性脳卒中モデルに、脳虚血(脳卒中)惹起の直後からアルテプラザーを 2 時間あるいは 3 時間かけて静脈内持続注入すると、0.93 mg/kg で弱い血栓溶解作用が、3.1、6.3 mg/kg で用量増加に伴う強力な血栓溶解作用が認められた。同モデルに、脳虚血(脳卒中)惹起の直後からアルテプラザーを 30 分間かけて静脈内持続注入すると、1.0、3.3 mg/kg で用量増加に伴った強力な血栓溶解作用が認められた。自家白色血栓注入モデルに、脳虚血(脳卒中)惹起の 1 時間後あるいは 2 時間後から 2 mg/kg のアルテプラザーを 30 分間かけて静脈内持続注入すると、梗塞容量の低減が認められた。

ドナー血(同種)小血塊注入モデルに、脳虚血惹起(塞栓性閉塞)の 15 分後あるいは 30 分後から 1 mg/kg のアルテプラザーを 30 分間かけて静脈内持続注入すると神経症状が軽減し、脳虚血惹起(塞栓性閉塞)の 60 分後に投与しても神経症状は軽減しなかった。同モデルにおいて、脳虚血惹起(塞栓性閉塞)の 45 分後から 2 mg/kg のアルテプラザーを 30 分かけて静脈内持続注入すると神経症状が軽減し、脳虚血惹起(塞栓性閉塞)の 60 分後に投与しても神経症状は軽減しなかつ

った。ドナー血(同種)塞栓性脳卒中モデルにおいて、脳虚血(脳卒中)を惹起して2分以内に1 mg/kg のアルテプラゼを30分かけて静脈内持続注入すると神経症状が軽減した。

ドナー血(同種)大血塊注入モデルに、脳虚血惹起(塞栓性閉塞)の30分後あるいは4時間後から、1 mg/kg のアルテプラゼを30分かけて静脈内持続注入しても、出血率に変化は認められなかった。ドナー血(同種)塞栓性脳卒中モデルに、脳虚血(脳卒中)惹起直後から0.93~6.3 mg/kg のアルテプラゼを2時間あるいは3時間かけて静脈内持続注入、あるいは、1~6.65 mg/kg のアルテプラゼを30分かけて静脈内持続注入しても、出血頻度に変化はなく、逆に0.93(3時間持続注入)および3.3 mg/kg(30分間持続注入)においては出血領域の程度が减弱した。さらに、自家白色血栓注入モデルに脳虚血(脳卒中)惹起1時間後あるいは2時間後から2 mg/kg のアルテプラゼを30分かけて静脈内持続注入、あるいは、ドナー血(同種)塞栓性脳卒中モデルに脳虚血(脳卒中)惹起2分以内に1 mg/kg のアルテプラゼを30分かけて静脈内持続注入しても、出血はほとんど認められなかった。

ドナー血(同種)塞栓性脳卒中モデルに、脳虚血(脳卒中)惹起の直後から1、3.3および6.65 mg/kg のアルテプラゼを30分かけて静脈内持続注入した後の定常状態における血漿中 tPA 濃度は、それぞれ0.26、0.89および2.77 µg/mLであった。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 ラット光増感反応誘発中大脳動脈血栓モデルにおけるアルテプラゼの血栓溶解作用の検討[資料4.2.1.1-1, 概要表2.6.3.2.1]

【方法】

ローズベンガルを静脈内投与した後、左中大脳動脈へ緑色光を10分間照射して血栓を生成させた雄性SDラット(n=22-23)に、3 mg/kg のアルテプラゼもしくはアルテプラゼ溶媒(注射用水にL-アルギニン、リン酸、ポリソルベート80をそれぞれ105 mg/mL、32 mg/mL、0.4 mg/mLとなるように溶解した溶液)を、照射終了直後から30分かけて頸静脈内に持続注入した。血流量が投与前値の90%以上まで回復し、その後の観察期間中において血流量が投与前値の50%未満まで減少しない個体を開通と定義し、照射終了後から60分間血流量を測定して、再開通したラット数の全例数に対する割合を血栓開通率として算出した。血流量が明らかに回復し、回復後の値が以後の観察期間において維持された個体を血栓が溶解した個体と定義し、血栓溶解したラット数のラット全例数に対する割合を血栓溶解率として算出した。

照射終了24時間後に表1に示した基準²⁾に基づいて神経症状の評点を判定した。その後、屠殺して摘出した脳の、塩化2, 3, 5-トリフェニルテトラゾリウム染色した約2 mm厚切片から梗塞容積および梗塞率を求めた。

さらに、3 mg/kg のアルテプラゼを投与した正常ラット(n=13)において、持続注入開始15分および30分後に大腿動脈から採血して、t-PAの血漿中濃度を測定した。

表1 神経症状の評点判定基準

評点	神経症状
0	神経症状がみられない
1	尾を持ち上げた時に右に頭を向けるが、立ち上がりはしない
2	尾を持ち上げた時にゆっくりとした右の立ち上がりをする
3	尾を持ち上げた時に直ちに右への立ち上がりをする

【成績】

本試験の成績を表 2 に示した。血栓溶解率はアルテプラザー溶媒投与群、GMK-527 3 mg/kg 投与群でそれぞれ 36.4% (22 例中 8 例)、69.6% (23 例中 16 例) であり、アルテプラザーによる血栓溶解作用が認められた。血栓開通率はアルテプラザー溶媒投与群、アルテプラザー 3 mg/kg 投与群でそれぞれ 31.8% (22 例中 7 例)、56.5% (23 例中 13 例) であり有意差は認められなかった。神経症状の評点は、アルテプラザー溶媒投与群で 2.9 ± 0.3 であったのに対し、アルテプラザー 3 mg/kg 投与群では 2.0 ± 1.0 であり、神経症状の軽減が認められた。アルテプラザー投与群では、アルテプラザー溶媒投与群と比較して、梗塞容積の低減および梗塞率の減少が認められた。血漿中濃度は、投与後 15 分および 30 分で、 $2.47 \mu\text{g/mL}$ および $2.24 \mu\text{g/mL}$ であった。

表 2 ラット光増感反応誘発中大脳動脈血栓モデルにおける
血栓生成後のアルテプラザーの作用

	アルテプラザー投与群 (3 mg/kg)	アルテプラザー溶媒投与群
動物数	23	22
血栓開通率 (%)	56.5	31.8
血栓溶解率 (%)	69.6 * 1)	36.4
神経症状 (評点)	2.0 ± 1.0 ** 2)	2.9 ± 0.3
梗塞容積 (mm ³)	111.72 ± 51.08 ** 3)	175.57 ± 56.86
梗塞率 (%)	11.98 ± 5.31 ** 3)	18.24 ± 5.39
血漿中濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	投与 15 分後; 2.47 ± 0.31 投与 30 分後; 2.24 ± 0.43	— 4)

1) Fisher 検定、2) Wilcoxon の順位和検定、3) アルテプラザー溶媒投与群を対照とした Student's t 検定

4) 測定を実施していない、* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$

[資料 4.2.1.1-1 より作成]

【結論】

ローズベンガル投与後の緑色光照射によって中大脳動脈に血栓を生成させた光増感反応誘発血栓モデルに 3 mg/kg のアルテプラザーを投与すると血栓溶解作用が認められ、照射終了 24 時間後において、梗塞容積の低減、梗塞率の減少および神経症状の軽減が認められた。

3 mg/kg のアルテプラザーを投与後の t-PA 血漿中濃度は $2.24 \sim 2.47 \mu\text{g/mL}$ であった。ヒト型 t-PA をラットに投与していること、プラスミノゲン・アクチベーター・インヒビター-1 の活性がヒトと比較してラットで高いこと (約 2.5 倍)³⁾ から、アルテプラザーのラットにおける有効血漿中濃度は、ヒト有効血漿中濃度よりも高いと予測された。しかし、本試験でのラット t-PA 血漿中濃度は、臨床において心筋梗塞の治療で用いられる $0.5 \sim 0.75 \text{ mg/kg}$ 投与時のヒト t-PA 血漿中濃度 (約 $0.8^4) \sim 2.2^5) \mu\text{g/mL}$) と比較して、大きな差異は認められなかった。

2.6.2.2.2 検索抽出論文

(1) 自家血塞栓性脳虚血モデル(ラット)における梗塞容積低減作用[資料 4.2.1.1-2, 概要表 2.6.3.2.2]

【方法】

[実験 1]

200 μ L の自家血で作製した血栓 (粒子径 50 μ m) を、塞栓子として雄性ラット (SD ラット、n=8) の外頸動脈から中大脳動脈領域へ注入して、局所的に脳虚血を惹起した⁶⁾。塞栓による虚血惹起 2 時間後から 10 mg/kg のアルテプラザーを 30 分かけて静脈内に持続注入した。

[実験 2]

雄性ラット (SD ラット、n=8) の外頸動脈から挿入した単繊維縫合糸により、機械的に中大脳動脈起点を 2 時間閉塞して、局所的に一過性脳虚血を惹起した^{7) 8)}。単繊維縫合糸を除去直後から 10 mg/kg のアルテプラザーを 30 分かけて静脈内に持続注入した。

虚血惹起開始 24 時間後に摘出した脳の 2 mm 厚切片を、塩化 2, 3, 5-トリフェニルテトラゾリウムで染色して、梗塞容積を算出した。

【成績】

[実験 1]

塞栓による虚血惹起 24 時間後の梗塞容積は 10 mg/kg のアルテプラザー投与により対照群と比較して低減した (図 1)。

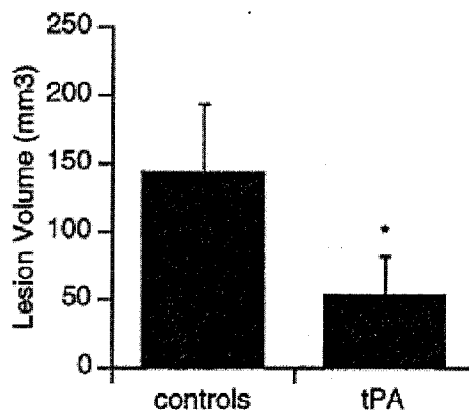


図 1 雄性 SD ラットを用いた自家血塞栓性脳虚血モデル (n=8) における脳虚血惹起後の梗塞容積に対するアルテプラザー (10 mg/kg) の効果 (平均値 + 標準偏差)

*: 対照群と比較した Student's-t 検定 $p < 0.05$

[資料 4.2.1.1-2 FIG. 2. B]

[実験 2]

虚血惹起開始 24 時間後において、アルテプラザー投与群では対照群と比較して梗塞容積に差は認められなかった。単繊維縫合糸を除去しなかった群における梗塞容積はアルテプラザー投与群あるいは対照群と比較して増大した。

【結論】

アルテプラゼの投与が血栓性閉塞に対して有効な治療法である可能性が示された(実験 1)。また、本試験では、機械的および一過的に惹起した虚血による脳梗塞に対して、梗塞容積をアルテプラゼは増大させず、アルテプラゼの直接的な脳組織への悪影響は検出されなかった(実験 2)。

(2) 自家血塞栓性脳卒中モデル(ラット)における梗塞容積低減作用[資料 4.2.1.1-3, 概要表 2.6.3.2.2]

【方法】

自家血で作製した微粒血栓を、塞栓子として雄性ラット(SD ラット、 $n=8-10$)の内頸動脈内に注入して、脳動脈閉塞による虚血を惹起した⁶⁾。微粒血栓による塞栓性閉塞 2 時間後あるいは 6 時間後から 10 mg/kg のアルテプラゼを大腿静脈内に 30 分間かけて持続注入した。対照群には同容量の生理食塩液を閉塞 2 時間後から投与した。微粒血栓注入 24 時間後にラットを屠殺し、摘出した脳の 2 mm 厚切片を塩化 2, 3, 5-トリフェニルテトラゾリウムで染色して梗塞容積を測定した。

これらのラットとは別の個体を用いて、同様の群構成($n=5-6$)で微粒血栓注入 24 時間後に脳切片中の梗塞領域に浸潤している多形核白血球数を測定した。

【成績】

閉塞 2 時間後からのアルテプラゼ投与では、対照群と比較して梗塞容積の低減が認められたが、閉塞 6 時間後からのアルテプラゼ投与では、対照群と比較して梗塞容積の低減は認められなかった(図 2)。

閉塞 2 時間後からのアルテプラゼ投与では、梗塞領域に浸潤している多形核白血球数は対照群と比較して差が認められなかった。閉塞 6 時間後からのアルテプラゼ投与では、多形核白血球数が対照群と比較して増加した。さらに、閉塞 6 時間後からのアルテプラゼ投与では 50% の動物に出血が認められた。

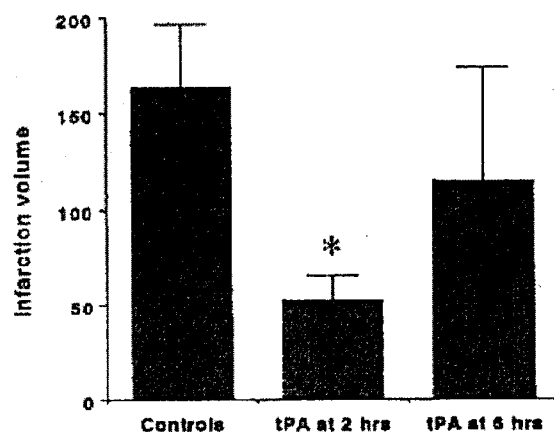


図2 雄性SDラットを用いた自家血塞栓性脳卒中モデル($n=8-10$)における塞栓性閉塞後の梗塞容積に対するアルテプラゼの効果(平均値±標準誤差)

単位: mm^3 、*: $p < 0.05$ (対照群に対する多重比較の補正をかけた t 検定)

[資料 4.2.1.1-3 Fig. 1. を改変]

【結論】

閉塞 2 時間後からのアルテプラザー投与における梗塞容積は対照群と比較して低減したが、閉塞 6 時間後からの投与では差がなかった。閉塞 6 時間後からのアルテプラザー投与では、梗塞領域の出血とともに多形核白血球数の浸潤が顕著に認められた。

(3) ドナー血(異種:ヒト)塞栓性脳卒中モデル(ラット)における脳血流量回復および脳波活動低下抑制作用[資料 4.2.1.1-4, 概要表 2.6.3.2.2]

【方法】

ヒト全血で作製⁶⁾した血塊(100-300 μm)を、塞栓子として雄性ラット(SD ラット、n=8)の内頸動脈内に注入して、中大脳動脈の塞栓性脳卒中を惹起した⁹⁾。脳卒中惹起 2 時間後から 1.5 mg/kg のアルテプラザーを 60 分間かけて静脈内持続注入した。局所(塞栓子を注入した中大脳動脈)脳血流量を水素クリアランス法で測定し、脳波はパワースペクトル解析により評価した。脳卒中惹起 5 時間後に動物を屠殺し、血中フィブリノーゲンおよびフィブリン分解物の濃度を測定した。

【成績】

対照群では、5 時間の実験中、脳卒中惹起によって低下した脳血流量は回復しなかった。アルテプラザー投与群では投与開始 30 分以内に血流量の回復が認められ、60 分以内に脳卒中惹起前値に回復した(図 3-1)。対照群では脳波低下が認められ、アルテプラザー投与群では脳波の回復が認められた(図 3-2)。フィブリノーゲン濃度およびフィブリン分解物濃度は対照群とアルテプラザー投与群と比較して有意差が認められず、さらに、対照群、アルテプラザー投与群において脳組織における出血は認められなかった。

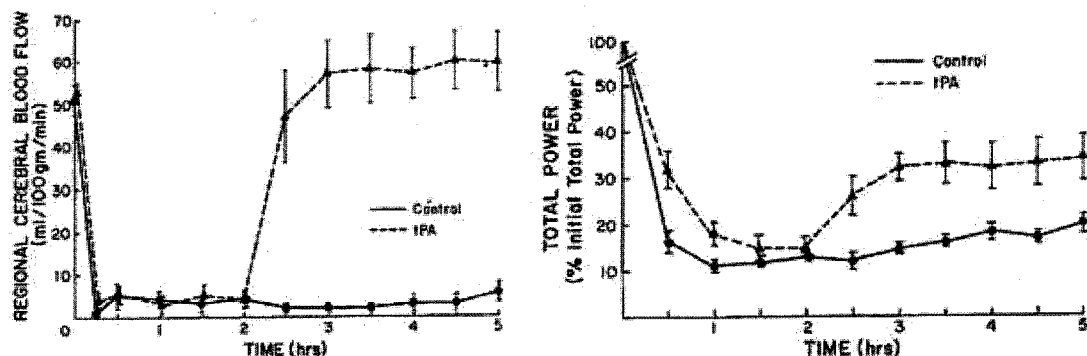


図 3-1(左) 雄性 SD ラットを用いたドナー血(異種:ヒト)塞栓性脳卒中モデル(n=8)における脳卒中惹起後の局所(塞栓子を注入した中大脳動脈)脳血流量に対するアルテプラザーの効果(平均値±標準誤差)

150 分以降の時点で対照群と比較して $p < 0.05$ で有意(当該資料に統計解析方法が記載されていない)

図 3-2(右) 雄性 SD ラットを用いたドナー血(異種:ヒト)塞栓性脳卒中モデル(n=8)における脳卒中惹起後の脳波に対するアルテプラザーの効果(平均値±標準誤差)

pre 値 : 100%、150 分時点でのみ $p < 0.05$ で有意(当該資料に統計解析方法が記載されていない)

TOTAL POWER : 電子脳造影スペクトル解析による脳波

[資料 4.2.1.1-4 FIG. 2. を改変]

【結論】

1.5 mg/kg のアルテプラゼを静脈内投与すると、塞栓が溶解し、全身性の線溶系活性化作用および出血を伴わずに、虚血に伴って低下した脳血流量・脳波活動の回復が認められた。

(4) ドナー血(同種)塞栓性脳卒中モデル(ラット)における梗塞率減少および神経症状軽減作用[資料 4.2.1.1-5, 概要表 2.6.3.2.2]

【方法】

ドナーラット血液で作製した¹⁰⁾血塊 1 μ L を、塞栓子として雄性ラット(Wistar ラット、n=10)の内頸動脈内に注入して、中大脳動脈を閉塞した¹¹⁾。塞栓性閉塞 1 時間後から 10 mg/kg のアルテプラゼを静脈内注入(10% bolus + 90% infusion(30 分間))した。対照群として、溶媒(200 mmol/L の L-アルギニンを含むアルテプラゼの溶媒)あるいは生理食塩液を同容量投与した。閉塞 24 時間後または 168 時間後に屠殺して摘出した脳の 2 mm 厚各切片をヘマトキシリン/エオジン染色して測定した梗塞容積から、梗塞率を算出した。閉塞 24 時間後または 168 時間後に中大脳動脈起点に血栓が残存しているか否かを確認した。さらに、出血率および出血量を測定した。神経症状検査は閉塞 1 時間後、24 時間後、168 時間後に実施した。

【成績】

塞栓性閉塞 24 時間後および 168 時間後の梗塞率は、アルテプラゼ投与群ではそれぞれ $19.4 \pm 3.3\%$ 、 $19.8 \pm 3.0\%$ 、溶媒投与群ではそれぞれ $31.4 \pm 5.6\%$ 、 $28.1 \pm 4.6\%$ 、生理食塩液投与群ではそれぞれ $33.2 \pm 3.7\%$ 、 $34.6 \pm 5.0\%$ であり(図 4)、生理食塩液投与群に対してアルテプラゼ投与群で梗塞率の減少が認められた。

閉塞 24 時間後における血栓の残存率は、アルテプラゼ投与群、溶媒投与群、生理食塩液投与群で、それぞれ 30%(10 例中 3 例)、80%(10 例中 8 例)、100%(10 例中 10 例)であり、アルテプラゼ投与群では対照群(溶媒投与群、生理食塩液投与群)に対して差が認められた。閉塞 168 時間後における血栓の残存率は、アルテプラゼ投与群、溶媒投与群、生理食塩液投与群で、それぞれ 20%(10 例中 2 例)、30%(10 例中 3 例)、50%(10 例中 5 例)であり、投与群間で差が認められなかった。

出血率および出血量、虚血に伴う神経症状軽減に投与群間で差が認められなかった。

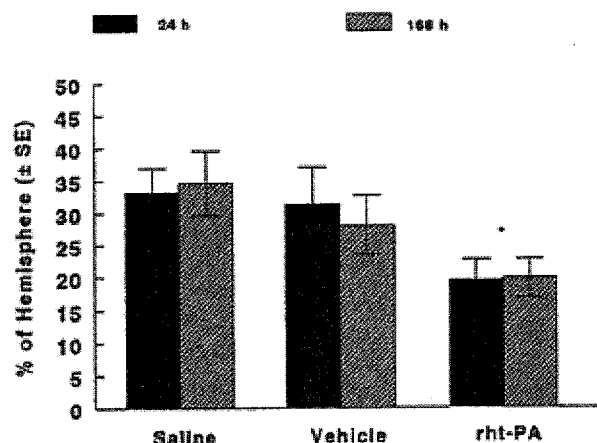


図 4 雄性 Wistar ラットを用いたドナー血(同種)塞栓性脳卒中モデル(n=10)における塞栓性閉塞後の梗塞率に対するアルテプラゼの効果(平均値±標準誤差)

対照群:生理食塩液、* $p < 0.05$ (対照群に対する Wilcoxon の順位和検定)

[資料 4.2.1.1-5 Fig. 2]

【結論】

塞栓性閉塞 1 時間後から 10 mg/kg のアルテプラゼを投与すると、出血が増大することなく血栓が溶解して梗塞率が減少した。

(5) 自家フィブリン血栓注入モデル(ラット)における脳血流量回復作用[資料 4.2.1.1-6, 概要表 2.6.3.2.2]

【方法】

内頸動脈から吸引した自家動脈血 10 μ L をトロンビンを含むカテーテル内で 10 分間放置して作製したフィブリン血栓を、塞栓子として雄性ラット(Wistar ラット、n=3)の中大脳動脈起点に注入して、血栓形成による虚血を惹起した。血栓形成 2 時間後から、10 mg/kg のアルテプラゼを静脈内注入(10% bolus + 90% infusion(30 分間))して、レーザードップラー血流計により脳血流量を測定した。

【成績および結論】

アルテプラゼを持続注入すると血栓形成により低下した脳血流量は回復を開始し、持続注入開始 3 時間後には虚血前の値に回復した。

(6) ドナー血(同種)血塊注入モデル(ウサギ)およびミクロスフェア注入モデル(ウサギ)における神経障害軽減作用[資料 4.2.1.1-7, 概要表 2.6.3.2.2]

【方法】

① 小血塊注入モデル

ドナーウサギ血液で作製した小血塊(104 μ m² ナイロンネットでろ過したもの)^[資料 4.2.2.1-9]と¹²⁵I で標識した 15 μ m ミクロスフェアとの懸濁液を、塞栓子としてニュージーランド白色ウサギの外頸動脈内に注入して、脳血管を閉塞させた。閉塞 15 分～60 分後から、1 mg/kg あるいは 2 mg/kg のアルテプラゼを静脈内注入(20%bolus+80%infusion(30 分間))した。神経症状の認められたウサギはアルテプラゼ投与 24 時間後に、認められなかったウサギは 1 週間後に屠殺した。様々な重量の血塊を注入し、その時に神経症状を示した動物の割合を縦軸に、注入した血塊の重量を横軸にプロットした散布図の近似曲線より、50%の動物に神経症状を与える血栓の重量を算出してその値を ES₅₀ とした。ES₅₀ の値が大きいとき血栓溶解作用により神経障害が軽減されたと判断した。

② ミクロスフェア注入モデル

¹²⁵I で標識した 50 μ m のミクロスフェア¹²⁾を頸動脈内に注入した 2 分後に、1 mg/kg のアルテプラゼを静脈内注入(20%bolus+80%infusion(30 分間))した。投与 24 時間後の脳放射活性から算出されたミクロスフェア重量から ES₅₀ を算出した。

③ 大血塊注入モデル

ドナーウサギ血液で作製した 1.0 mm³ の大血塊を外頸動脈内に注入したウサギに¹³⁾、1 mg/kg のアルテプラゼを注入 30 分後または 4 時間後に静脈内注入(20%bolus+80%infusion(30 分間))した後、投与 6 日後のウサギの脳からの出血の有無を確認した。

【成績】

小血塊モデルに、塞栓性閉塞 15 分後あるいは 30 分後から、1 mg/kg のアルテプラーゼを投与すると ES_{50} は増加した。閉塞 45 分後から、2 mg/kg のアルテプラーゼを投与すると ES_{50} は増加した。閉塞 60 分後から、1 mg/kg あるいは 2 mg/kg のアルテプラーゼを投与しても、 ES_{50} は増加しなかった(表 3)。

ミクロスフェアモデルにおいて、アルテプラーゼ投与群における ES_{50} は対照群と比較して有意差が認められなかった。

大血塊モデルにおいて、血塊注入 30 分後あるいは 4 時間後からアルテプラーゼを投与した群と対照群で、出血が認められた動物数に差は認められなかった。

表 3 ニュージーランド白色ウサギを用いたドナー血(同種)小血塊注入モデルにおける塞栓性閉塞後の神経症状に対するアルテプラーゼの効果(平均値±標準誤差)

投与濃度	投与時間 ¹⁾	ES_{50} (mg)	動物数
対照群		3.56±0.68	66
1.0 mg/kg	15 分	10.69±2.85*	14
	30 分	13.36±2.85*	13
	60 分	8.74±2.42	18
2.0 mg/kg	45 分	11.69±2.81*	16
	60 分	4.64±2.55	9

1) 塞栓性閉塞後から投与までの時間

*: $p < 0.05$ (対照群に対する多重比較の Bonferroni による補正をかけた t 検定)

[資料 4.2.1.1-7 Table を改変]

【結論】

アルテプラーゼを塞栓性閉塞 45 分以内に投与すると神経障害が軽減された。また、ミクロスフェア投与による神経症状にアルテプラーゼは何ら影響を及ぼさなかった。以上の結果より、アルテプラーゼは血栓溶解に基づいて薬理作用を示すことが示唆された。大血塊投与 4 時間後からのアルテプラーゼ投与は、大血塊投与による脳実質への出血を悪化させなかった。

(7) ドナー血(同種)塞栓性脳卒中モデル(ウサギ)における血栓溶解作用[資料 4.2.1.1-8, 概要表 2.6.3.2.2]

【方法】

ドナーウサギ全血を ^{99m}Tc でラベルして作製した血塊を、塞栓子として雄性ニュージーランド白色ウサギ($n=6-8$)の頸動脈内に注入して、中大脳動脈の塞栓による脳卒中を惹起した。塞栓直後から、投与量、持続注入時間を変えてアルテプラーゼを投与し、脳の ^{99m}Tc 放射活性により血栓溶解を測定した。持続注入終了 24 時間後に、脳を摘出して出血率および出血領域の程度を評価した。別の動物を用いて、血漿中 t-PA 濃度および凝固線溶系因子(プラスミノゲン、フィブリノーゲン、 α_2 -アンチプラスミン)の血漿中変動を測定した。

【成績】

2 時間あるいは 3 時間の静脈内持続注入(0.93~21 mg/kg)では、6.3 mg/kg のアルテプラーゼを 2 時間注入すると、最も高い血栓溶解作用が認められた。0.93 mg/kg(3 時間持続)では血栓

溶解作用は弱く、3.1 mg/kg(3 時間持続)、6.3 mg/kg(2 時間持続)では投与量増加に伴い効果が増強した(図 5-1)。10.5 mg/kg(2 時間)、21 mg/kg(2 時間)では、投与量増加に伴い血栓溶解作用が減弱した。全身の線溶系は投与量増加に伴い活性化され、6.3 mg/kg(2 時間)では末梢血の凝固線溶系因子が約 50%低下した。

30 分間の静脈内持続注入(1~6.65 mg/kg)では、1 mg/kg から血栓溶解作用が認められ、3.3 mg/kg で最も高い効果が認められた(図 5-2)。3.3 mg/kg では末梢血の凝固線溶系因子が約 50%低下した。

2 時間あるいは 3 時間の静脈内持続注入、30 分間の静脈内持続注入のいずれの用量でも出血頻度に影響はなかったが、0.93 mg/kg(3 時間持続)および 3.3 mg/kg(30 分間持続)では、出血の程度が対照群と比較して軽減した。

アルテプラゼを投与後の t-PA 血漿中濃度は速やかに定常状態に達し、1、3.3 および 6.65 mg/kg のアルテプラゼを 30 分間かけて静脈内持続注入した後の定常状態における t-PA 血漿中濃度は、それぞれ 0.26、0.89 および 2.77 $\mu\text{g/mL}$ であった。

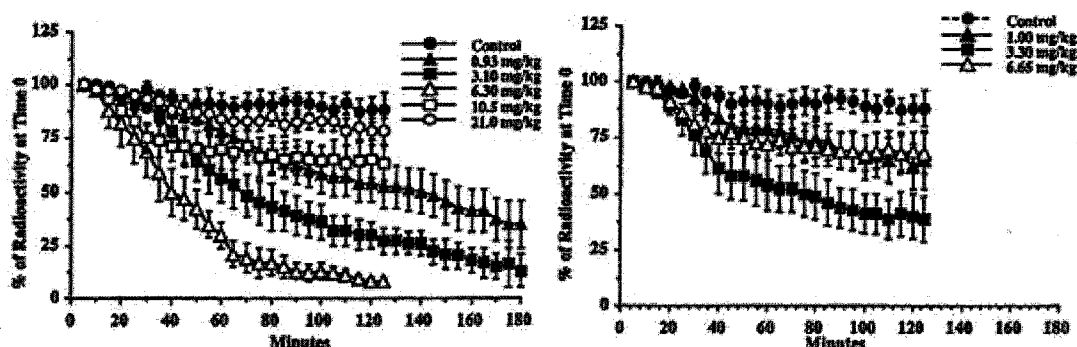


図 5-1(左) 雄性ニュージールランド白色ウサギを用いたドナー血(同種)塞栓性脳卒中モデル(n=6, 8)における脳卒中惹起後のアルテプラゼ2 時間あるいは3 時間持続注入による血栓溶解作用(平均値±標準誤差)

図 5-2(右) 雄性ニュージールランド白色ウサギを用いたドナー血(同種)塞栓性脳卒中モデル(n=6)における脳卒中惹起後のアルテプラゼ 30 分間持続注入による血栓溶解作用(平均値±標準誤差)

[資料 4.2.1.1-8 Fig. 2 を改変]

【結論】

6.3 mg/kg(2 時間持続)、3.3 mg/kg(30 分間持続)で、最も高い血栓溶解作用が認められた。これらの投与量では、末梢血中のプラスミノゲン、フィブリノーゲン、 α_2 -アンチプラスミンがいずれも約 50%低下した。10.5 mg/kg(2 時間持続)、21 mg/kg(2 時間持続)では、末梢血中のプラスミノゲン濃度の低下により、平衡を保つために血栓中のプラスミノゲンが血液中に引き出され、血栓中の結合プラスミノゲンが低下してプラスミン生成が減少したために、血栓溶解作用が減弱したと考えられる¹⁴⁾。

(8) ドナー血(同種)塞栓性脳卒中モデル(ウサギ)における神経症状軽減作用[資料 4.2.1.1-9, 概要表 2.6.3.2.2]

【方法】

ドナーウサギ血液で作製した微小血塊(104 μm^2 のメッシュで濾過した微小血塊懸濁液)を、塞栓子としてニュージーランド白色ウサギ(n=12)の頸動脈内に注入し、塞栓による脳卒中を惹起した。脳卒中惹起2分以内に1 mg/kg のアルテプラゼを耳静脈より投与(20% bolus + 80% infusion(30 分間))した。神経症状を正常、異常、死亡(24 時間以内)に分類した。異常を示した動物は試験開始24 時間後に、正常な動物は試験開始7 日後に屠殺して、脳組織検査を実施して出血の有無を確認した。

【成績】

対照群(n=12)では、正常が5 例、異常が3 例、死亡が4 例であったのに対して、アルテプラゼ投与群(n=11: 1 匹は実験操作上のミスのため除外)では、正常が10 例、死亡が1 例であり、アルテプラゼ投与群において、対照群と比較して神経症状の軽減作用が認められた。脳組織検査において、アルテプラゼ投与群および対照群ともに、脳卒中惹起24 時間以内に死亡した動物において脳実質に微小な出血が認められたが、大きな出血は全ての動物において認められなかった。

【結論】

1 mg/kg のアルテプラゼは大きな出血を起こすことなく血栓を溶解し、虚血に伴う神経症状を軽減した。

(9) 自家白色血栓注入モデル(ウサギ)における梗塞容積低減作用[資料 4.2.1.1-10, 概要表 2.6.3.2.2]

【方法】

自家血で作製した白色血栓を、塞栓子として雌雄ニュージーランド白色ウサギ(n=5)の内頸動脈起点に注入して、中大脳動脈塞栓による脳卒中を惹起した^{15) 16)}。脳卒中惹起1 時間後あるいは2 時間後から頸静脈内に、生理食塩液投与、ヘパリンの単独持続投与(200 mg/kg bolus + 200 mg/kg/hr を infusion(屠殺時点まで))、2 mg/kg のアルテプラゼの30 分間かけた持続注入、あるいは、ヘパリンおよびアルテプラゼの併用投与を行った。投与終了5 時間後に屠殺して摘出した脳の切片を塩化2, 3, 5-トリフェニルテトラゾリウム染色し、梗塞容積を測定した。

【成績】

脳卒中惹起1 時間後および2 時間後から2 mg/kg のアルテプラゼを投与すると、梗塞容積が低減した(表 4)。ヘパリンを単独投与しても梗塞容積は低減しなかった。アルテプラゼとヘパリンの単独投与および併用投与は出血に影響を及ぼさなかった。

表 4 雌雄ニュージーランド白色ウサギを用いた自家白色血栓注入モデル(n=5)における脳卒中惹起後のヘパリンおよびアルテプラゼ(2 mg/kg)の梗塞容積(mm³)に対する作用(平均値±標準偏差)

ヘパリン投与時間	アルテプラゼ投与時間		
	非投与(対照群)	1 時間後	2 時間後
非投与	1500.9±1123.7	313.3±277.3	758.2±402.4
1 時間後	1200.4±754.4	172.6±178.3	—
2 時間後	763.5±834.6	—	429.6±495.0

投与時間：塞栓性脳卒中惹起後から投与までの時間，—：実施していない

対数変換後 ANOVA による検定を実施し、非投与群とアルテプラゼ投与群間に有意差あり (p=0.008)

[資料 4.2.1.1-10 Table 1 を改変]

【結論】

脳卒中惹起 2 時間以内に 2 mg/kg のアルテプラゼを投与すると、血栓溶解作用により梗塞容積が低減することが示された。

2.6.2.3 副次的薬理試験

該当なし

2.6.2.4 安全性薬理試験

該当なし

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用

該当なし

2.6.2.6 考察及び結論

「ラット光増感反応誘発中大脳動脈血栓モデルにおける血栓溶解作用の検討」では、3 mg/kg のアルテプラゼ投与において、血栓溶解作用、梗塞容積の低減、梗塞率の減少および神経症状の軽減が認められた。当該動物試験におけるラット循環血 t-PA 血漿中濃度 (2.24~2.47 µg/mL) は、臨床における心筋梗塞治療時のヒト有効血漿中濃度 (0.5~0.75 mg/kg 投与時で約 0.8⁴⁾~2.2⁵⁾ µg/mL) と比較して、同程度か若干高い濃度を示した。アルテプラゼがヒト型 t-PA であることによる t-PA の活性種差や、t-PA の阻害酵素であるプラスミノゲン・アクチベーター・インヒビター-1 (PAI-1) のラットで 2.5 倍高い活性種差³⁾から、アルテプラゼのラットにおける有効 t-PA 血漿中濃度はヒト有効 t-PA 血漿中濃度よりも高いことが予測されたが、血漿中濃度に大きな差異はなくアルテプラゼの薬理効果が示された。

検索抽出論文による報告では、脳梗塞動物モデルにおいて、アルテプラゼは、脳虚血惹起 (脳卒中惹起、塞栓性閉塞) 2 時間以内に投与された場合に、0.93 mg/kg 以上の用量で、塞栓性脳梗塞および神経症状悪化に対して薬理効果を示した。これらの報告は、今回実施した光増感反応によるラット脳血栓モデルを用いた結果が妥当であることを示すとともに、アルテプラゼの「発症後 3 時間以内の虚血性脳血管障害急性期に伴う機能障害の改善」に対する有効性を期待させるものである。

検索抽出論文による報告では、脳虚血惹起 6 時間後から 10 mg/kg のアルテプラゼを投与すると出血が認められた。一方、ドナー血(同種)大血塊注入モデルに、脳虚血惹起 4 時間後から 1 mg/kg のアルテプラゼを投与しても、対照群と比較して出血の認められた動物数に差は認められなかったという報告、および、種々の脳梗塞動物モデルに、脳虚血惹起 2 時間以内に 10 mg/kg 以下のアルテプラゼを投与しても、対照群と比較して出血性変化は認められなかったという報告があった。以上の報告から、虚血後から投与までの時間が長くなることにより、アルテプラゼによる出血リスクが高まると考えられた。

以上の知見から、発症後 3 時間以内の虚血性脳血管障害急性期において、発症 3 時間以内にアルテプラゼを投与することにより、出血のリスクを高めることなく血栓溶解作用による機能障害改善が得られる可能性が示唆された。

2.6.2.7 図表

概要文中に記載した。

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	資料番号
光増感反応誘発 中大脳動脈血栓モデル (今回実施した試験)	ラット	持続静脈内	日本バイオリサーチセンター	4.2.1.1-1
自家血塞栓性 脳虚血モデル (検索抽出論文)	ラット	持続静脈内	Neuroprotection Research Laboratory, Harvard Medical School	4.2.1.1-2
自家血塞栓性 脳卒中モデル (検索抽出論文)	ラット	持続静脈内	Neuroprotection Research Laboratory, Harvard Medical School	4.2.1.1-3
ドナー血(異種:ヒト)塞 栓性脳卒中モデル (検索抽出論文)	ラット	持続静脈内	University of Michigan	4.2.1.1-4
ドナー血(同種)塞栓性 脳卒中モデル (検索抽出論文)	ラット	bolus+ infusion	Henry Ford Health Sciences Center	4.2.1.1-5
自家血フィブリン 血栓注入モデル (検索抽出論文)	ラット	bolus+ infusion	Henry Ford Health Sciences Center	4.2.1.1-6
ドナー血(同種)血塊 およびミクロスフェア 注入モデル (検索抽出論文)	ウサギ	bolus+ infusion	University of California, School of Medicine	4.2.1.1-7
ドナー血(同種)塞栓性 脳卒中モデル (検索抽出論文)	ウサギ	bolus+ infusion	Department of Cardiovascular Research, Genentech Inc.	4.2.1.1-8
ドナー血(同種)塞栓性 脳卒中モデル (検索抽出論文)	ウサギ	bolus+ infusion	University of Massachusetts Medical Center	4.2.1.1-9
自家白色血栓 注入モデル (検索抽出論文)	ウサギ	持続静脈内	University of Arizona	4.2.1.1-10

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

2.6.3.2.1 ラット光増感反応誘発中大脳動脈血栓モデルにおけるアルテプラザーの血栓溶解作用の検討

報告書の題名	GMK-527 のラット光増感反応誘発中大脳動脈血栓モデルにおける血栓溶解作用の検討試験(試験番号：020223)	
資料番号	4.2.1.1-1	
動物種	雄性 Slc Sprague-Dawley ラット(以下、SD ラット)	
投与方法	血栓生成後から 30 分間持続静脈内投与	
被験物質	GMK-527 (Lot 001A 使用期限:2005 年 1 月 31 日)	
陽性対照	なし	
試験時週齢および体重	7 週齢 (279～300 g)	
溶媒	注射用水に L-アルギニン、リン酸、ポリソルベート 80 をそれぞれ 105 mg/mL、32 mg/mL、0.4 mg/mL となるように溶解した溶液	
試験方法	ローズベンガルを静脈内投与した後、左中大脳動脈へ緑色光を 10 分間照射して血栓を生成させた雄性 SD ラット (n=22-23) において、3 mg/kg のアルテプララーゼもしくはアルテプララーゼ溶媒を、照射終了直後から 30 分かけて頸静脈内に持続注入した。照射終了後から 60 分間血流量を測定して、血流量が投与前値の 90%以上まで回復し、その後血流量が投与前値の 50%未満まで減少しない個体を開通と定義し、再開通したラット数の全例数に対する割合を血栓開通率として算出した。血流量が明らかに回復し、回復後の値が以後の観察期間において維持された個体を血栓が溶解した個体と定義し、血栓溶解したラット数のラット全例数に対する割合を血栓溶解率として算出した。照射終了 24 時間後に神経症状の評点を判定した。その後、屠殺して摘出した脳の約 2 mm 厚切片を塩化 2, 3, 5-トリフェニルテトラゾリウム染色し、各脳切片から梗塞容積および梗塞率を求めた。さらに、3 mg/kg のアルテプララーゼを投与した正常ラット (n=13) において、持続注入開始 15 分および 30 分後に大腿動脈から採血して、t-PA の血漿中濃度を測定した。	
試験結果		
	アルテプララーゼ投与群 (3 mg/kg)	アルテプララーゼ溶媒投与群
動物数	23	22
血栓開通率 (%)	56.5	31.8
血栓溶解率 (%)	69.6 * 1)	36.4
神経症状	2.0±1.0 ** 2)	2.9±0.3
梗塞容積 (mm ³)	111.72±51.08 ** 3)	175.57±56.86
梗塞率 (%)	11.98±5.31 ** 3)	18.24±5.39
血漿中濃度 (μg/mL)	投与 15 分後; 2.47±0.31 投与 30 分後; 2.24±0.43	— 4)

1) Fisher 検定、2) Wilcoxon の順位和検定、3) アルテプラザー溶媒投与群を対照とした Student's t 検定

4) 測定を実施していない、* : p<0.05、** : p<0.01

2.6.3.2.2 検索抽出論文

被験物質 アルテプラゼ

モデル	動物種	投与量	投与時間 ¹⁾	指標	効果	出血	資料番号
自家血塞栓性脳虚血モデル	雄性SDラット	10 mg/kg 30 分間持続静脈内注入	2 時間後	梗塞容積	低減	評価してない	4.2.1.1-2
自家血塞栓性脳卒中モデル		10 mg/kg 30 分間持続静脈内注入	2 時間後	梗塞容積	低減	多形核白血球数変化なし 出血なし	4.2.1.1-3
			6 時間後		変化なし	多形核白血球数増加 薬物投与群で 50%の動物に出血 (対照群の記載なし)	
ドナー血 (異種: ヒト) 塞栓性脳卒中モデル		1.5 mg/kg 60 分間持続静脈内注入	2 時間	脳血流量	回復	対照群、薬物投与群で出血なし	4.2.1.1-4
脳波活動				低下抑制			
ドナー血 (同種) 塞栓性脳卒中モデル	雄性 Wistar ラット	10 mg/kg 10% bolus + 90% infusion (30 分間)	1 時間後	梗塞率	減少	出血率、出血量に変化なし	4.2.1.1-5
				神経症状	変化なし		
自家フィブリン血栓注入モデル	雄性 Wistar ラット	10 mg/kg 10% bolus + 90% infusion (30 分間)	2 時間後	脳血流量	回復	評価してない	4.2.1.1-6
ドナー血 (同種) 小血塊注入モデル	ニュージーランド白色ウサギ	1 mg/kg 20%bolus+80% infusion (30 分間)	15 分後	ES ₅₀ ²⁾	増加	評価してない	4.2.1.1-7
			30 分後		増加		
			60 分後		変化なし		
		2 mg/kg 20%bolus+80% infusion (30 分間)	45 分後		増加		
			60 分後		変化なし		
ドナー血 (同種) 大血塊注入モデル		1 mg/kg 20%bolus+80% infusion (30 分間)	30 分後	出血有無		出血を認めた動物数に変化なし	
			4 時間後				
ドナー血 (同種) 塞栓性脳卒中モデル	雄性ニュージーランド白色ウサギ	0.93 mg/kg 3 時間持続静脈内注入	直後	血栓溶解	弱い作用あり	出血頻度に変化なし 出血領域の程度は 0.93 mg/kg, 3.3 mg/kg で減少	4.2.1.1-8
		3.1 mg/kg 3 時間持続静脈内注入			作用あり		
		6.3 mg/kg 2 時間持続静脈内注入			強い作用あり		
		1, 3.3, 6.65 mg/kg 30 分間持続静脈内注入			作用あり (3.3 mg/kg で最も高い作用)		
		ニュージーランド白色ウサギ	1 mg/kg 20% bolus + 80% infusion (30 分間)	2 分以内	神経症状	軽減	対照群、薬物投与群で大きな出血なし (脳実質に微小な出血)
自家白色血栓注入モデル	雌雄ニュージーランド白色ウサギ	2 mg/kg 30 分間持続静脈内注入	1 時間後	梗塞容積	低減	出血なし	4.2.1.1-10
2 時間後	低減						

1) 投与時間: 虚血惹起後、脳卒中惹起後、あるいは塞栓性閉塞後の投与開始時間を示した。

2) ES₅₀: 50% のウサギに神経症状を与える血栓重量。ES₅₀が増加すれば、血栓溶解作用により神経障害が軽減されたと考える。

2.6.4 薬物動態試験の概要文

該当なし

2.6.5 薬物動態試験概要表

該当なし

2.6.6 毒性試験の概要文

該当なし

2.6.7 毒性試験概要表

該当なし

2.6.8 参考文献

- 1) Matsuno H, Uematsu T, Umemura K, Takiguchi Y, Asai Y, Muranaka Y, et al. A simple and reproducible cerebral thrombosis model in rats induced by a photochemical reaction and the effect of a plasminogen-plasminogen activator chimera in this model. J Pharmacol Toxicol Methods 1993; 29: 165-173. (資料番号:4.3-1)
- 2) Kawai H, Yuki S, Sugimoto J, Tamao Y. Effects of a thrombin inhibitor, argatroban, on ischemic brain damage in the rat distal middle cerebral artery occlusion model. J Pharmacol Exp Ther 1996; 278: 780-785. (資料番号:4.3-2)
- 3) van Giezen JJJ, Nerme V, Abrahamsson T. PAI-1 inhibition enhances the lysis of the platelet-rich part of arterial-like thrombi formed in vitro. A comparative study using thrombi prepared from rat and human blood. Blood Coagulation and Fibrinolysis 1998;9: 11-18. (資料番号:4.3-3)
- 4) 小川久雄, 泰江弘文, 緒方康博, 荒井英和, 斉藤太郎, 中村夏樹. SUN9216 静注法による急性心筋梗塞患者の PAI 活性を中心とした凝固線溶系への影響に関する検討. 新薬と臨床 1997; 46: 98-112. (資料番号:4.3-4)
- 5) 駒村和雄, 児玉和久, 山本登志弘, 玉尾嘉邦, 俵谷信一, 小林智. 急性心筋梗塞患者における GMK-527(rt-PA)持続静脈内投与時の体内動態. アルテプラゼ承認申請時資料(資料番号:4.3-5)
- 6) Kudo M, Aoyama A, Ichimori S, Fukunaga N. An animal model of cerebral infarction. Homologous blood clot emboli in rats. Stroke 1982; 13: 505-508. (資料番号:4.3-6)
- 7) Lo EH, Boscue-Hamilton P, Meng W. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase -Reduction of ischemic injury and attenuation of *N*-methyl-D-aspartate-induced neurotransmitter dysregulation-. Stroke 1998; 29: 830-836. (資料番号:4.3-7)
- 8) Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke 1989; 20: 84-91. (資料番号:4.3-8)
- 9) Kaneko D, Nakamura N, Ogawa T. Cerebral infarction in rats using homologous blood emboli : Development of a new experimental model. Stroke 1985; 16: 76-84. (資料番号:4.3-9)
- 10) Overgaard K, Sereghy T, Boysen G, Pedersen H, Diemer NH. Reduction of infarct volume by thrombolysis with rt-PA in an embolic rat stroke model. Scand J Clin Lab Invest

1993; 53: 383-393. (資料番号:4.3-10)

- 11) Zhang RL, Chopp M, Zhang ZG, Jiang Q, Ewing JR. A rat model of focal embolic cerebral ischemia. Brain Res 1997; 766: 83-92. (資料番号:4.3-11)
- 12) Zivin JA, DeGirolami U, Kochhar A, Lyden PD, Mazzarella V, Hemenway CC, et al. A model for quantitative evaluation of embolic stroke therapy. Brain Res 1987; 435: 305-309. (資料番号:4.3-12)
- 13) Lyden PD, Seelig J, Martin RP, Yoshida S, Bailey M, Rothrock JF, et al. A new model of focal cerebral ischemia: Validation and utility. Bull Clin Neurosci 1985; 50: 69-75. (資料番号:4.3-13)
- 14) Sobel BE, Nachowiak DA, Fry ETA, Bergmann SR, Torr SR. Paradoxical attenuation of fibrinolysis attributable to " plasminogen steal" and its implication for coronary thrombolysis. Coronary Artery Dis 1990; 1: 111-119. (資料番号:4.3-14)
- 15) Benes V, Zabramski JM, Boston M, Puca A, Spetzler RF. Effect of intra-arterial antifibrinolytic agents on autologous arterial emboli in the cerebral circulation of rabbits. Stroke 1990; 21: 1594-1599. (資料番号:4.3-15)
- 16) Rigamonti D, Uebe T, Johnson PC, Bojanowski WM, Awad IA, Micheal KT, et al. A new model of cerebral embolic ischemia using autologous arterial thrombus. Barrow Neurol Inst Q 1989; 5: 2-7. (資料番号:4.3-16)