

審議結果報告書

平成 19 年 3 月 6 日
医薬食品局審査管理課

[販 売 名] アリクストラ皮下注 1.5mg⁽¹⁾、同 2.5mg⁽²⁾
[一 般 名] フォンダパリヌクスナトリウム
[申 請 者] グラクソ・スミスクライン株式会社
[申請年月日] 平成 18 年 10 月 10 日⁽¹⁾、平成 17 年 11 月 22 日⁽²⁾

[審 議 結 果]

平成 19 年 2 月 23 日に開催された医薬品第一部会において、本品目を承認して差し支えないとされ、薬事・食品衛生審議会薬事分科会に報告することとされた。

なお、本品目は生物由来製品及び特定生物由来製品に該当せず、再審査期間は 8 年とし、原体及び製剤ともに毒薬又は劇薬に該当しないとされた。

本剤のプレフィルドシリンジについて、医療事故防止の観点から、無色のものとすることを検討するよう申請者を指導することとした。

なお、用法・用量について、以下のとおり記載を整備することとした。

「通常、成人には、フォンダパリヌクスナトリウムとして 2.5mg を 1 日 1 回皮下投与する。なお、腎障害のある患者に対しては、腎機能の程度に応じて 1.5mg 1 日 1 回に減量する。」

審査報告書

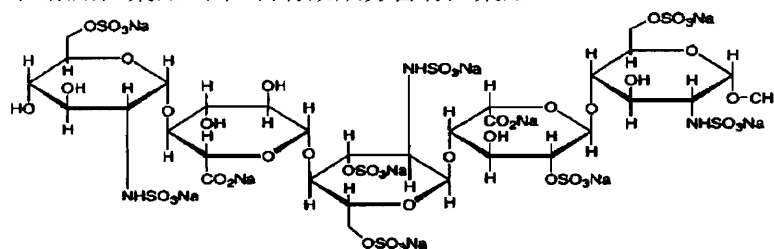
平成 19 年 2 月 15 日

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] 1. アリクストラ皮下注 1.5mg
2. アリクストラ皮下注 2.5mg
- [一 般 名] フォンダパリヌクスナトリウム
- [申 請 者] グラクソ・スミスクライン株式会社
- [申請年月日] 1. 平成 18 年 10 月 10 日
2. 平成 17 年 11 月 22 日
- [剤型・含量] 注射剤：1 シリンジ中、フォンダパリヌクスナトリウムとして 1.5 又は 2.5mg 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：C₃₁H₄₃N₃Na₁₀O₄₉S₈

分子量：1728.08

化学名：(日本名) メチル*O*-(2-デオキシ-6-*O*-スルホ-2-スルホアミノ- α -D-グルコピラノシル) - (1 → 4) -*O*-(β -D-グルコピラノシルウロン酸) - (1 → 4) -*O*-(2-デオキシ-3,6-ジ-*O*-スルホ-2-スルホアミノ- α -D-グルコピラノシル) - (1 → 4) -*O*-(2-*O*-スルホ- α -L-イドピラノシルウロン酸) - (1 → 4) -2-デオキシ-6-*O*-スルホ-2-スルホアミノ- α -D-グルコピラノシド・十ナトリウム塩

(英名) Decasodium methyl *O*-(2-deoxy-6-*O*-sulfo-2-sulfoamino- α -D-glucopyranosyl)-(1→4)-*O*-(β -D-glucopyranosyluronic acid)-(1→4)-*O*-(2-deoxy-3,6-di-*O*-sulfo-2-sulfoamino- α -D-glucopyranosyl)-(1→4)-*O*-(2-*O*-sulfo- α -L-idopyranosyluronic acid)-(1→4)-2-deoxy-6-*O*-sulfo-2-sulfoamino- α -D-glucopyranoside

- [特記事項] 優先審査
- [審査担当部] 新薬審査第二部

審査結果

平成 19 年 2 月 15 日

- [販 売 名] 1. アリクストラ皮下注 1.5mg
2. アリクストラ皮下注 2.5mg
- [一 般 名] フォンダパリヌクスナトリウム
- [申 請 者] グラクソ・スミスクライン株式会社
- [申請年月日] 1. 平成 18 年 10 月 10 日 (医薬品製造販売承認申請)
2. 平成 17 年 11 月 22 日 (医薬品製造販売承認申請)

[審査結果]

本剤による静脈血栓塞栓症の発症抑制に関し、術後の静脈血栓塞栓症の発現リスクの高い、下肢整形外科手術（膝関節全置換術、股関節全置換術及び股関節骨折手術）施行患者を対象とした国内各臨床試験において、本剤 2.5mg 群における静脈血栓塞栓症の発現率は 2.2～21.6%であり、いずれの術式においても本剤 2.5mg/日投与の有効性は示されたと判断した。一方、本剤により出血等の副作用が懸念され、また、腎障害の程度により、本剤を禁忌あるいは減量（1.5mg/日）投与すべきであるが、本剤の薬効のモニタリングに適した指標は知られておらず、投与中は出血等の臨床症状を注意深く観察する必要がある。これらについては、添付文書において注意喚起されており、対象患者の選択も含め、本剤が適正に使用された場合には、承認の可否に影響するような重大な懸念は認められないと判断した。

本剤は海外では標準的薬剤の一つとして広く使用されている実績もあり、静脈血栓塞栓症の発現リスクの高い、下肢整形外科手術施行患者における静脈血栓塞栓症の発症抑制に関し、本剤の臨床的な有用性は認められると判断した。なお、製造販売後に、手術の術式等の違いによる有効性及び安全性に関する検討、及び腎障害や低体重の患者への投与量等に関する適切な情報収集が必要であると判断した。

以上、医薬品医療機器総合機構における審査の結果、本品目は、下記の効能・効果、用法・用量のもとで承認して差し支えないと考え、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]

静脈血栓塞栓症の発現リスクの高い、下肢整形外科手術施行患者における静脈血栓塞栓症の発症抑制

[用法・用量]

通常、成人には、フォンダパリヌクスナトリウムとして 2.5mg を 1 日 1 回皮下投与する。
なお、腎障害のある患者に対しては、腎機能の程度に応じて減量 (1.5mg 1 日 1 回皮下投与) する。

審査報告（1）

平成19年1月23日

I. 申請品目

- [販売名] 1. アリクストラ皮下注 1.5mg
2. アリクストラ皮下注 2.5mg
- [一般名] フォンダパリヌクスナトリウム
- [申請者名] グラクソ・スミスクライン株式会社
- [申請年月日] 1. 平成18年10月10日
2. 平成17年11月22日
- [剤型・含量] 注射剤：1シリンジ中、フォンダパリヌクスナトリウムとして1.5mg又は2.5mg含有
- [申請時効能・効果] 静脈血栓塞栓症の発現リスクの高い、下肢整形外科手術施行患者における静脈血栓塞栓症の予防
- [申請時用法・用量] 通常、成人には、フォンダパリヌクスナトリウムとして2.5mgを1日1回皮下投与する。

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

本申請において、申請者が提出した資料及び独立行政法人医薬品医療機器総合機構（以下、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。

1. 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

フォンダパリヌクスナトリウム（以下、本薬）は、化学合成された硫酸ペンタサッカライドのナトリウム塩であり、アンチトロンビンⅢ（以下、ATⅢ）に結合し、ATⅢの抗活性型血液凝固第X因子活性を選択的に増強し、プロトロンビンの活性化を阻害することにより、フィブリン生成を抑制する抗凝固薬である。本薬は、米国において、股関節骨折手術、膝関節手術及び股関節置換術等の下肢整形外科手術施行患者における静脈血栓塞栓症（以下、VTE）の予防を適応として平成13年12月に承認され、平成18年12月現在、欧州、カナダ等65ヵ国以上で承認されている。本邦における開発は、平成■年に日本サノフィ株式会社（一時、日本オルガノン株式会社との共同開発）により開始され、その後、グラクソ・スミスクライン株式会社に引き継がれ、今般、本薬2.5mgが専用の針付き注射筒に予め充填された注射剤キットの承認申請がなされ、また、低用量投与の必要性から本薬1.5mgの注射剤キットが追加申請された。なお、平成16年8月に、日本血栓止血学会等から本薬及び低分子ヘパリンの早期承認を求める要望書が厚生労働大臣に提出されている。

2. 物理的・化学的性質並びに規格及び試験方法に関する資料

<提出された資料の概略>

本薬は、5個の糖ユニット（D、E、F、G及びH）により構成される合成ペンタサッカライドで分子式は $C_{31}H_{43}N_3Na_{10}O_{49}S_8$ 、分子量は1728.08である。

(1) 原薬

原薬は、光学的に純粋な糖類より得られる誘導体()、()、()及び() ()) を出発原料とし、以下の工程により製造された。 のアノマー炭素を 化した を で活性化し、 とし、 の活性化したアノマー炭素と のユニット の 位にある水酸基を 化 () し、得られた のユニット の 無水結合を 分解し を得 (第一工程)、シリカゲルを用いたクロマトグラフ法により精製した (第二工程)。 のユニット のアノマー炭素を 化した を で活性化し、 とし、 の活性化したアノマー炭素と のユニット の 位にある水酸基を 化し、得られた の 及び を加水分解して を得た (第三工程)。 の水酸基を 化した後、 基を で中和し、 を得た (第四工程)。 を 化することにより 基及び 基の 分解並びに 基を し、 を得 (第五工程)、一級アミノ基を 化し、 とした (第六工程)。 を活性炭フィルターによりろ過した後、イオン交換クロマトグラフ法により精製し、濃縮液から析出により本薬を単離した (第七工程)。本薬をガラス製容器に入れ、密封した (第八工程)。第一、三及び七工程を重要工程とし、 を重要中間体とし、各工程における工程管理方法及び中間体の管理値を設定した。

原薬の構造は、水素及び炭素核磁気共鳴スペクトル (以下、 ^1H -及び ^{13}C -NMR)、赤外吸収スペクトル (以下、IR)、質量スペクトル、紫外可視吸収スペクトル及びナトリウム含量 (原子吸光スペクトル) により確認された。また、本薬の が非常に ため元素分析は実施せず、高分解能質量分析により分子式を確認した。

規格及び試験方法として、性状 (肉眼観察)、確認試験 (^{13}C -NMR)、旋光度、pH、純度試験 (塩化物、遊離硫酸塩、重金属、類縁物質及び残留溶媒)、水分、エンドトキシン、ナトリウム及び含量が設定された。

安定性試験は、旧ロット (第 工程で、 をしていないロット) で、ガラスビン (ガラスビンに ゴムの内蓋をし、金属製キャップで圧着) 保存下における長期保存試験 (25°C、60%RH、36 ヶ月)、中間的試験 (30°C、60%RH、18 ヶ月) 及び加速試験 (40°C、75%RH、6 ヶ月)、開封保存下における温度に対する苛酷試験 (80°C (湿度未調整)、15 日間) 及び温度/湿度に対する苛酷試験 (80°C、80%RH、15 日間)、ガラス製皿 (ガラス製皿に試料を広げ、石英製の蓋で覆う) 保存下における光に対する苛酷試験 (昼光色蛍光ランプ、ID65 光源、総照度: 120 万 lx·hr、総近紫外放射エネルギー: 200W·hr/m²、遮光した試料を対照) が実施され、新ロット (申請製造方法によるロット) で、ガラスビン保存下における長期保存試験 (30°C、65%RH、12 ヶ月) 及び加速試験 (40°C、75%RH、6 ヶ月) が実施され、性状 (肉眼観察)、確認試験 (^{13}C -NMR)、pH、水分、遊離硫酸塩、残留溶媒 (エタノール)、純度試験及び含量が測定された。旧ロットの長期保存試験、中間的試験及び加速試験、並びに新ロットの長期保存試験及び加速試験では、いずれの試験項目においても経時変化は認められなかった。旧ロットの温度及び温度/湿度に対する苛酷試験では、分解による遊離硫酸塩及び分解生成物の増加並びに含量の低下が認められ、

温度/湿度に対する苛酷試験では、白色の粉末が褐色の油状の液に変化した。光に対する苛酷試験では、遮光した対照品と比較して変化は認められなかった。以上より、本薬は吸湿性が非常に高いが、気密容器に保存する限り、室温で3年間安定であり、リテスト期間を 〇 年間と設定した。なお、新ロットの長期保存試験は 〇 カ月まで継続する。

(2) 製剤

製剤として、充てん量のみが異なるアリクストラ皮下注（以下、本剤）1.5mg 及び 2.5mg があり、下記の工程により製造された。ガラス生地管を適当な長さに切断し、成形して注射筒とした（第一工程（切断・成形）。注射筒と注射針を 〇 で接着し、製造用ステンレス鋼製注射針付きガラス注射筒を製した（第二工程（組み立て））。充てんに関わるすべての装置及びシリコン油を塗布した 〇 ゴム製プランジャーストッパーを 〇℃、〇分間、高圧蒸気滅菌した。また、洗浄した製造用ステンレス鋼製注射針付きガラス注射筒の 〇 にシリコン油を塗布し、天然ゴム- 〇 ・ 〇 ゴム製ニードルシールドを装着した後、 〇℃、 〇分間、高圧蒸気滅菌した（第三工程（準備））。ミキシングタンクに注射用水を入れ、 〇～ 〇℃とし、塩化ナトリウムを溶解した後、本薬を溶解した。pH を測定し、必要に応じて 〇 mol/L 水酸化ナトリウム溶液又は 〇 mol/L 塩酸溶液にて pH6.0～8.0 に調整後、注射用水適量を加え、5mg/mL 注射剤とした。（第四工程（溶解・pH調整・定容））。得られた注射剤を窒素加圧下で孔径 〇 μ m のカートリッジフィルター（浄化用フィルター）でろ過後、 〇孔径 〇 μ m のカートリッジフィルター（滅菌用フィルター）でろ過滅菌した（第五工程（ろ過滅菌））。更に、注射剤を充てん装置に移し、ニードルシールドを装着した注射針付き注射筒に本剤 1.5mg では内容量 0.30mL 以上を担保するよう 〇 mL 充てんし、本剤 2.5mg では内容量 0.50mL 以上を担保するよう 〇 mL 充てんし、プランジャーストッパーを装栓した（第六工程（充てん・装栓））。注射剤を充てんしたシリンジをオートクレーブにて、品温 〇℃、 〇分間を担保するよう、 〇℃、 〇分間、高圧蒸気滅菌し（第七工程（最終滅菌））、シリンジのニードルシールドに 〇 を装着した後、予め組み立てたプレアセンブル Automatic Needle Protection System（以下 ANPS）に挿入した。プランジャーストッパーにプランジャーを装着し、プランジャーキャップをセーフティボディに装着し、ANPS シリンジとし、セーフティボディ部分にラベルを貼付した後（第八工程（組み立て・表示））、紙箱に包装した（第九工程（包装））。なお、第 〇 及び 〇 工程を重要工程と位置付け、検査項目及び管理値を設定した。

規格及び試験方法として、性状（肉眼観察）、確認試験（液体クロマトグラフ法（以下、HPLC）（紫外吸光検出器及び旋光検出器））、pH、純度試験（遊離硫酸塩、分解生成物）、エンドトキシン、不溶性異物検査、不溶性微粒子試験、無菌試験、採取容量試験及び含量が設定された。

安定性試験は、旧ロット及び新ロットの原薬から製造された製剤を用いて行われた。シリンジ（直接容器）保存下、旧ロット製剤で、長期保存試験（25℃、60%RH、36 カ月及び 30℃、65%RH、36 カ月）及び加速試験（40℃、75%RH、6 カ月）が、新ロット製剤で、長期保存試験（25℃、60%RH、12 カ月（本剤 1.5mg は 3 ロット中 2 ロットで 24 カ月）及び 30℃、65%RH、12 カ月（本剤 1.5mg は 3 ロット中 2 ロットで 24 カ月））及び加速試験（40℃、75%RH、6 カ月）が実施され、ANPS シリンジ保存下、新ロット製剤で、温度に対する苛酷試験（凍結/融解サイクル、 〇 サイクル（1 サイクル：凍結ステージ（ 〇～ 〇℃）48 時間+融解ステージ（ 〇± 〇℃）

48時間)及び光に対する苛酷試験(総照度:120万lx・hr以上、総近紫外放射エネルギー:200W・hr/m²以上、温度約25℃)が実施され、性状、溶液の透明度及び色、pH、遊離硫酸塩、分解生成物、エンドトキシン、採取用量試験、不溶性微粒子試験、無菌試験並びに含量が測定された。本剤1.5mgにおいて、旧ロット製剤では、長期保存試験(25℃/60%RH)で36ヵ月の安定性が確認され、長期保存試験(30℃/65%RH)で18ヵ月以降に分解生成物の規格を逸脱する増加が認められたが、12ヵ月までの安定性に問題は認められず、加速試験(40℃/75%RH)で6ヵ月までに、一つの分解生成物の規格を逸脱する増加が認められたが、その他の項目に変化は認められなかった。新ロット製剤では、長期保存試験(25℃/60%RH、2ロット)で24ヵ月間の安定性が確認され、長期保存試験(30℃/65%RH)で18ヵ月以降に分解生成物の規格を逸脱する増加が認められたが、12ヵ月までの安定性に問題は認められず、加速試験(40℃/75%RH)で6ヵ月までに、一部の分解生成物の増減が規格の範囲内で認められたが、その他の項目に変化は認められなかった。本剤2.5mgにおいて、旧ロット製剤では、長期保存試験(25℃/60%RH)36ヵ月までの安定性が確認され、長期保存試験(30℃/65%RH)36ヵ月まで及び加速試験(40℃/75%RH)6ヵ月までの結果、一部の分解生成物の増減が規格の範囲内で認められたが、その他の項目に変化はなく、新ロット製剤では、いずれの保存条件においても旧ロット製剤と同様の結果が得られた。本剤1.5mgの旧ロット製剤の試験結果より25℃/60%RHにおいて36ヵ月間の安定性が確認されており、新ロット製剤の試験結果より25℃/60%RHにおいて2ロットで24ヵ月間及び加速試験において6ヵ月間の安定性が確認されており、旧ロットと同等の安定性を有するものと考えられること、本剤2.5mgの旧ロット製剤の試験結果より25℃/60%RH及び30℃/65%RHにおける36ヵ月間の安定性が確認されており、新ロット製剤も12ヵ月まで同等の安定性が確認されたことから、本剤の貯蔵方法は「容器、密封容器」とし、有効期間は設定しなかった。なお、新ロットを用いた長期保存試験は、36ヵ月まで継続するとともに、本剤1.5mgでは、実生産スケールで製造した3ロットにつき、本剤2.5mgでは、新たに製造した1ロットにつき同様に安定性試験を実施する。

<審査の概要>

機構は、新旧ロットの原薬及び製剤の安定性が同様であるのか、各原薬及び各製剤の安定性試験結果も踏まえ説明するよう求めた。

申請者は、以下のように回答した。保存温度が一致する■条件(■℃及び■℃)で、気密容器(原薬の容器:ガラスビン)中の新旧ロット原薬の安定性試験成績を比較検討したが、性状、確認試験、pH、遊離硫酸塩及びエタノールに明らかな経時変化は認められなかった。水分については、旧ロット原薬において、水分値が一時的に高値を示したが、容器の施栓が不完全であったためと考えられ、高い水分値が認められた前後の測定では変化しておらず、それを除けば、保存期間中に見られた増減の幅に差はなく、また、いずれの原薬にも明らかな経時変化は認められなかったことから、新旧ロットによる原薬の安定性に違いはないと判断した。類縁物質について、Rrt0.93及びRrt1.2DS(合成過程の副生成物)並びに類縁物質の総量に明らかな経時変化は認められなかった。含量について、旧ロット原薬では経時変化は認められず、新ロット原薬では、40℃で6ヵ月保存したとき、測定開始時と比較して約■%低かったが、新ロット原薬中の類縁物質総量に明確な増加が認められていないこと及び30℃で12ヵ月保存したときには経時変化は認められていないことから、新旧ロット原薬間に差はないと判断した。以上から、新旧ロットの原薬間で、類縁

物質質量及び本薬の含量に多少の違いはあるものの、安定性は同様であると判断した。

新旧ロット製剤において、製剤の性状、溶液の透明度、溶液の色、遊離硫酸塩、pH 及び含量のいずれの試験項目でも経時変化は認められず、保存温度及び期間に応じて認められた各分解生成物の増減の傾向は同様であった。以上から、新旧ロット製剤の安定性は同様であると判断した。なお、新旧ロット製剤は製造に用いた原薬の精製方法が異なるのみで、製造方法に違いはないことから、不溶性微粒子、採取容量試験、無菌試験及びエンドトキシンについては比較しなかった。

機構は、製剤の製造方法の第一工程には高圧蒸気滅菌、第二工程には pH 調整の過程が含まれるにもかかわらず、これらを重要工程に設定しなかった理由を説明するよう求めた。

申請者は、以下のように回答した。製剤の製造方法の第一工程では、製造前の準備工程として製造機器類及び直接容器に用いる容器部材について、高圧蒸気滅菌を施している。この操作は、製造に要するすべての未滅菌品を無菌室に搬入する前に実施している滅菌操作であり、最終製品の無菌性保証のために行っているものではない。第二工程では、必要に応じて薬液の pH 調整を行うが、最新 ■ ロットの薬液溶解後の pH の測定結果 (■ ~ ■) は、いずれも規格値 ■ ~ ■ の範囲内であり、pH を調整した実績はない。以上から、第一及び二工程を重要工程とする必要はないと判断した。

機構は、確認試験について、HPLC の保持時間は特異性が低いことから、原理が異なる方法による確認試験を設定することを求めた。

申請者は、以下のように回答した。製剤の確認試験として、現在の定量法を準用した試験方法に加えて、旋光検出器を用いた HPLC により確認する方法を採用する。

また、機構は、容器の完全性試験により、直接容器（注射針付き注射筒、プランジャーストッパー及びニードルシールド）の適格性が確認されていることから、市販予定の直接容器に特段の問題はないと判断した

以上の審査の結果、機構は、本剤の品質及び容器について特段の問題は見られないと判断した。

3. 非臨床に関する資料

(i) 薬理試験成績の概要

<提出された資料の概要>

(1) 効力を裏付ける試験

1) 作用機序

① ATⅢへの結合親和性

ヒト、ヒヒ、ウサギ及びラットの血漿より精製したATⅢに対する本薬（最終濃度5～1,400nmol/L）の解離定数（以下、 K_d ）及び結合量（ B_{max} ）を結合時のATⅢのコンフォメーション変化に起因する蛍光強度変化量のScatchard plots解析により算出した。本薬のヒトATⅢに対する K_d は57.84nmol/Lで、他の動物種のATⅢに対する K_d は47.06～129.97nmol/Lと大きな差はみられなかった。また、各ATⅢと本薬の結合比は1に近似したことから、本薬分子はATⅢ分子に1：1の比で結合することが示唆された。

② ATⅢの活性化作用

②-1活性型血液凝固第X因子（以下、第Xa因子）に対する阻害様式

ヒトATⅢと本薬（最終濃度0.016～33.3 μ g/mL）をpH8.4又は7.4でインキュベートし、第Xa因子を加えて更にインキュベートした後、第Xa因子の基質S2765を添加し、1、3、5 及

び7分後に405nmでの吸光度を測定した。本薬・ATⅢ複合体の第Xa因子に対するKd及び第Xa因子阻害反応の二次速度定数 (K_2^+/K_z^+) は、pH 8.4で754nmol/L及び $7.56 \times 10^5 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、pH7.4で82.1nmol/L及び $1.04 \times 10^6 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であった。

②-2 選択的Xa因子阻害作用

ヒト α -トロンビンあるいはヒト第Xa因子をヒトATⅢ、*p*-aminobenzamidine及び本薬又はヘパリンとともにインキュベートし、Stopped-flow fluorometerで測定した蛍光強度を指標に、第Xa因子及びトロンビン阻害反応の K_2^+/K_z^+ を算出した。本薬はATⅢによる第Xa因子阻害反応の K_2^+/K_z^+ を約270倍に増加させたが、ATⅢによるトロンビン阻害反応の K_2^+/K_z^+ はほとんど増加させなかった。一方、ヘパリンはATⅢによる第Xa因子及びトロンビン阻害反応の K_2^+/K_z^+ をそれぞれ約570及び4,300倍に増加させた。

②-3 抗第Xa因子活性

アミド分解法

ヒト血漿又はATⅢ添加緩衝液に本薬を加えた10分後に第Xa因子を添加し、その2分後に第Xa因子の発色基質S2222を添加し、室温でインキュベート後、405nmでの吸光度を測定した。抗第Xa因子活性の検量線は国際標準ヘパリン (176抗XaU/mg) 又はダナパロイド (11.4抗XaU/mg) を用いて作成した。緩衝液中での本薬の抗第Xa因子活性は、国際標準ヘパリンに比べて約4倍、ダナパロイドに比べて約50倍であり、ヒト血漿中ではダナパロイドに比べて約67倍であった (それぞれ本薬最終濃度0.03~0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。また、緩衝液中にATⅢが0.5U/mL存在するときの抗第Xa因子活性における本薬の50%阻止濃度 (以下、 IC_{50}) は0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であったが、ATⅢ濃度の低下に従って高くなり、ATⅢ濃度0.008U/mLでは約50倍であった。ヘパリンの IC_{50} はATⅢ濃度0.5U/mLで0.112 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、同様にATⅢ濃度の低下に従って高くなったものの、ATⅢ濃度0.008U/mLでは約6倍であった。

凝固法 (Heptest)

ヒト血漿と本薬0.03~0.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 又は国際標準ヘパリン0.125~3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (いずれも最終濃度) を37°Cでインキュベート後、第Xa因子溶液を加え、その120秒後にウシ血漿、塩化カルシウム及び脳由来のセファリンを添加して、凝固時間を測定した。本薬は0.02抗XaU/mL以上で濃度依存的に凝固時間を延長し、抗第Xa因子活性によって示される濃度と凝固時間の間に直線性が認められた。ヘパリンは0.06抗XaU/mL以上の濃度で濃度依存的に凝固時間を延長したものの、抗第Xa因子活性によって示される濃度と凝固時間との間に乖離がみられ、他の凝固因子に対する作用が示唆された。

③ 第Xa因子の産生阻害作用

本薬0.26~13.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 又はヘパリン0.21~1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (いずれも最終濃度) をヒト血漿及びH-Gly-Pro-Arg-Pro-OHとともに37°Cでインキュベートし、活性化物質混合液 (活性化セファロプラスチン試薬、 Ca^{2+} 、以下、活性化物質混合液A) を添加してインキュベート後、1/200に緩衝液で希釈し、活性型血液凝固第V因子 (以下、第Va因子、以降、同様に血液凝固第o因子を第o因子、その活性型を第oa因子と表記する)、プロトロンビン及び活性化物質混合液Aを添加してインキュベートし、トロンビンの発色基質S2238を添加と反応させた後、波長405nmにおける吸光度を測定した。トロンビン生成量から第Xa因子活性-時間曲線下面積を求め、第Xa因子産生に対する被験物質の IC_{50} を算出した。本薬及びヘパリンは第Xa因子産生を濃度依存的に阻害し、その IC_{50} はそれぞれ0.43及び0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と同程度であった。

④ 抗トロンビン活性

④-1 アミド分解法

ヒト血漿に本薬28~2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 又はヘパリン0.0625~1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (いずれも最終濃度) とトロンビンを添加して室温でインキュベートした後、S2238を添加し、更にインキュベートして405nmにおける吸光度から IC_{50} を算出した。また、ATⅢあるいはヘパリンコファクターⅡ (以下、HCⅡ) を添加した本薬0.025~2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 又はヘパリン0.003~11.43 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (いずれも最終濃度) に、トロンビンを添加してインキュベート後、S2238を添加して405nmにおける吸光度からトロンビン活性の抑制率を算出した。ヒト血漿中において、本薬は抗トロンビン活性を示し、 IC_{50} は156 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ヘパリンの約1/1,400) であった。また、ATⅢ添加緩衝液中で、本薬は3.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で抗トロンビン活性を示したが、その最大抑制率は2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ においても40.5%であった。一方、ヘパリンは0.003 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で抗トロンビン活性を示し、0.038 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上では50%以上抑制した。HCⅡ添加緩衝液中では、本薬及びヘパリンはそれぞれ1,333.33及び2.26 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上でトロンビン活性を50%以上抑制した。

④-2 Fibrin polymerisation assay

フィブリノゲン溶液に本薬0.18~184 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 又はヘパリン0.78~7.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (いずれも最終濃度) 及びATⅢ又はHCⅡを添加し、37°Cでインキュベート後、トロンビンを添加した。トロンビン添加1分後より405nmにおける吸光度からフィブリンの不溶化を検出し、60分後のトロンビン活性抑制率及び IC_{50} を算出した。本薬はATⅢ又はHCⅡ存在下のいずれの存在下においても184 $\mu\text{g}/\text{mL}$ まで抗トロンビン活性を示さなかったが、ヘパリンは濃度依存的にATⅢ及びHCⅡ存在下のトロンビン活性を阻害し、 IC_{50} はそれぞれ1.56及び10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、本薬の抗トロンビン活性は、ATⅢ及びHCⅡいずれの存在下においてもヘパリンに比較して著しく低かった。

⑤ トロンビンの産生阻害作用

⑤-1 第Xa因子誘発トロンビン産生に対する作用

ヒト血漿

本薬 (最終濃度2~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を試験開始の5分及び24時間前に添加したヒト血漿にウシ第Xa因子、活性化物質混合液Aを添加し、トロンビン産生反応を開始させた。37°Cでインキュベート後、EDTAで反応を停止させ、発色基質S2238を加え、室温でインキュベートし、405nmにおける吸光度からトロンビン産生量を算出した。本薬は、試験開始24時間前にヒト血漿に添加することにより、外因性第Xa因子によるトロンビン産生を阻害した (IC_{50} : 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。一方、試験開始5分前の添加では、トロンビン産生は阻害されなかった (IC_{50} > 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。以上より、第Xa因子誘発トロンビン産生における本薬の阻害作用には、少なくとも5分を超える血漿中でのインキュベーションが必要と考えられた。

トロンビン産生阻害の経時的変化

本薬0.010~2.632 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 又はヘパリン0.049~6.250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (いずれも最終濃度) をヒト血漿、ATⅢ及びフィブリノゲンと共に37°Cでプレインキュベートした。活性化物質混合液 (ウシ第Xa因子、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、 Ca^{2+} 、以下、活性化物質混合液B) を加えて更にインキュベートし、405nmにおける吸光度を指標にフィブリン生成を測定して、緩衝液対照群での最大吸光度の50%の値になるまでに要する時間 (以下、T-50) を算出した。本薬及びヘパリンはトロンビン産生阻害作用に起因した濃度依存的なT-50の

延長作用を示し、T-50が30分以上となる用量はそれぞれ0.164及び0.391 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、本薬のトロンビン産生阻害作用はヘパリンと同程度であることが示唆された。

プロトロンビナーゼ複合体の産生阻害作用

本薬0.0033~1.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 又はヘパリン0.0013~0.63 $\mu\text{g}/\text{mL}$ （いずれも最終濃度）、プロトロンビン、ATⅢ及びS2238に第V因子あるいは第Va因子を添加し、37°Cでプレインキュベートした。活性化物質混合液Bを加えて更にインキュベートし、405nmの吸光度から20分後のトロンビン活性抑制率及びIC₅₀を算出した。また、本薬0.005~2.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 又はヘパリン0.002~0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ （いずれも最終濃度）をS2288の代わりにフィブリノゲンを添加した同様の試験に供した。本薬及びヘパリンは第V因子存在下で誘発されるトロンビン産生を濃度依存的に阻害し、そのIC₅₀はそれぞれ0.0043及び0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。一方、第Va因子存在下ではヘパリンはトロンビン産生を阻害したが、本薬は阻害作用を示さなかった。また、フィブリノゲンを用いた試験でも同様に、本薬は第V因子存在下で誘発されるトロンビン産生を阻害し、IC₅₀は132 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。以上より、本薬はプロトロンビナーゼ複合体の活性は阻害せず、プロトロンビナーゼ複合体の産生を阻害すると考えられた。

⑤-2 ヒト血小板誘発トロンビン産生に対する作用

本薬0.006~2.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 又はヘパリン0.008~0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ （いずれも最終濃度）、プロトロンビン、ATⅢ及びフィブリノゲンにカルシウムイオノフォアで活性化した洗浄ヒト血小板を添加し、37°Cでプレインキュベートした。活性化物質混合液Bを加えて更にインキュベートし、405nmにおける吸光度から20分後におけるトロンビン活性の抑制率及びIC₅₀を算出した。本薬及びヘパリンは活性化ヒト血小板によるトロンビン産生を用量依存的に阻害し、IC₅₀はそれぞれ0.08及び0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。最大抑制率は、ヘパリンで約100%、本薬で約60%であった。

⑤-3 外因系及び内因系凝固経路を介したトロンビン産生の阻害作用

脱フィブリンヒト血漿に本薬（トロンボプラスチン添加時：0.125~5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、カオリン添加時：0.5~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、いずれも最終濃度）、セファリン及びトロンボプラスチンあるいはカオリンを添加し、37°Cでインキュベートした。S2238を加えて37°Cでインキュベートし、405nmにおける吸光度からトロンビン濃度を測定し、最大産生濃度及びIC₅₀を算出した。本薬は、外因系凝固経路（トロンボプラスチン添加時）及び内因系凝固経路（カオリン添加時）を介するトロンビン最大産生濃度を濃度依存的に低下させ、IC₅₀はそれぞれ0.42及び1.39 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。また、本薬の内因系凝固経路を介するトロンビン産生阻害作用は最高濃度でも50%程度であり、本薬は外因系経路を介するトロンビン産生をより強く阻害することが示唆された。

⑤-4 抗第Xa因子活性と外因系凝固経路を介したトロンビン産生阻害活性の相関

健康成人（n=4）に本薬（6、12又は18mg（4,000、8,000又は12,000抗Xa units））を皮下投与し、血漿中の抗第Xa因子活性を測定した。レプチラーゼによりフィブリンを除いた貧血小板血漿にトロンボプラスチン、セファリン及びS2238を添加し、外因系凝固経路を介するトロンビン産生量を測定した（*ex vivo*試験）。また、抗第Xa因子活性より算出した血漿中本薬濃度と同濃度の本薬を薬剤非投与ヒト血漿に加えて、同様の*in vitro*試験を実施した。本薬投与48時間後までの各時点のヒト血漿を用いた*ex vivo*試験及びヒト血漿を用いた*in vitro*試験において、抗第Xa因子活性から換算される本薬濃度と外因系凝固経路を介するト

ロンビン産生の抑制率との間には、本薬濃度が0~3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で高い正の相関が認められ ($r=0.94$)、本薬は抗第IXa因子活性により外因系凝固経路を介するトロンビン産生を阻害することが示唆された。

⑥ 抗第IXa因子活性

ヒトATIIIと本薬0.01~10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 又はヘパリン0.025~5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ (いずれも最終濃度)を37°C、でインキュベートした後、第IXa因子の発色基質Pefachrome IXaを加え、更にヒト第IXa因子を添加した。405nmにおける吸光度を抗第IXa因子活性の指標とした。本薬及びヘパリンは、ATIII存在下で第IXa因子活性を阻害し、 IC_{50} はそれぞれ 9.8×10^{-8} 及び $2.1 \times 10^{-7} \text{mol}/\text{L}$ と同程度であった。

⑦ 第VIIa因子・組織因子 (以下、TF) 複合体の阻害活性

本薬2.5及び5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 又はヘパリン12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (いずれも最終濃度)、第VIIa因子、TF及びATIIIを37°Cでインキュベートし、EDTAを添加し希釈した後、第VII因子欠乏血漿を添加してインキュベートした。塩化カルシウム溶液で調整したTFを加えて凝固を惹起させ、凝固活性を指標に、残存する第VIIa因子濃度を定量した。ATIII及び本薬5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ は、それぞれ単独では第VIIa因子・TF複合体の活性を阻害しなかった。一方、ATIII存在下では、本薬2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及びヘパリン12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ は反応時間依存的に第VIIa因子・TF複合体活性を阻害した。

2) 静脈血栓症モデルにおける作用

① マウスTF誘発血栓塞栓症モデル (DICモデル)

雄Swissマウスに本薬1~15 mg/kg 又はヘパリン0.025~0.5 mg/kg を静脈内投与し、5分後に遺伝子組換えヒトTF 1 ng を静脈内投与した。本薬及びヘパリンはTF誘発血栓塞栓症による死亡率を用量依存的に低下させ、24時間後の死亡率が対照群の50%となる用量は、本薬で2.6 mg/kg であり、ヘパリンの0.085 mg/kg の約30倍であった ($n=10\sim 20$)。

② ラットTF誘発あるいはヒト血清誘発静脈血栓症モデル

②-1 静脈内投与と皮下投与における血栓形成抑制作用

ペントバルビタール麻酔下の雄Wistarラット大静脈の左腎静脈と腸骨静脈分岐の間の側枝をすべて結紮した後、TFを陰茎背静脈内投与し、10秒後に左腎静脈下を結紮して閉腹した。10分後に開腹し、腸骨静脈分岐の近傍で大静脈を結紮し、大静脈内に形成された血栓の湿重量を測定した。同時に腹部大動脈から採血し、血漿中の本薬の第IXa因子阻害活性をATIII及び第IXa因子の存在下で、S2222を用いたアミド分解法により測定し、血漿中濃度に換算した。本薬は、TF投与5分前に0.028~0.15 mg/kg を陰茎背静脈内に、あるいは25分前に0.086~0.263 mg/kg を頸部皮下に投与された。また、TFの代わりにヒト血清を用いて同じ試験 (本薬0.026~0.105 mg/kg) を実施した。TFで血栓形成を惹起したとき、本薬は静脈内及び皮下投与のいずれにおいても、投与量及び血漿中本薬濃度に依存して血栓重量を低下させ、血栓重量を50%に低下させる用量 (50%有効用量、以下、 ED_{50}) は、それぞれ0.04及び0.20 mg/kg であった。本薬のTF誘発血栓形成抑制作用の強さは、静脈内投与及び皮下投与のいずれにおいても、ヘパリンの約2倍であった。一方、ヒト血清で血栓形成を惹起したときも、本薬は静脈内投与により血栓重量を低下させ、血栓形成抑制作用の強さはヘパリンの約1/2であった ($n=8$)。

②-2 血栓形成抑制効果と抗第IXa因子活性との関連性

②-1と同じモデルを用いて検討した。本薬0.29、0.88及び2.63mg/kg又はヘパリン1.25mg/kgはTF投与の0.75～6時間前にエーテル軽麻酔下で陰茎背静脈内に投与された。本薬の血栓形成抑制作用は、静脈内投与後の時間に依存して減弱し、血栓形成抑制率が50%に低下するまでの時間は、0.29mg/kg投与時で1.6時間、0.88mg/kg投与時で2.4時間、2.63mg/kg投与時で3.6時間であった。これらの血栓形成抑制作用の消失曲線は、それぞれの投与量における抗第Xa因子活性の消失曲線と類似していた。ヘパリン1.25mg/kg投与後の血栓形成抑制率が50%に低下するまでの時間は1.9時間であった（n=8）。

③ ラット大静脈狭窄血栓症モデル

ペントバルビタール麻酔下の雄Wistarラットの左大腿静脈の側枝をすべて結紮し、上腹壁静脈近傍で結紮した後、大腿静脈、腸骨静脈を介して大静脈内に5.5cm長の絹糸を留置した。大腿静脈を遠位で結紮した後、更に左腎静脈下で大静脈を軽く結紮し部分的な狭窄を作成した。15分間後に、絹糸を回収洗浄し、大静脈内にあった3.5cm長の絹糸に付着した血栓の重量を測定した。本薬0.011～0.086mg/kg、ヘパリン0.125～1.0mg/kg、並びに低分子ヘパリンnadroparin 0.47～4.2mg/kg及びenoxaparin 0.26～2.4mg/kgは、絹糸を挿入する2分前に静脈内投与された。本薬は用量依存的に血栓形成を抑制し、ED₅₀は0.028mg/kgであり、ヘパリン、nadroparin及びenoxaparinの1/14、1/50及び1/24であった（n=4～6）。

④ ラット大静脈非狭窄血栓症モデル

ペントバルビタール麻酔下の雄Wistarラットの左大腿静脈の側枝をすべて結紮し、上腹壁静脈近傍で結紮した後、大腿静脈、腸骨静脈を介して大静脈内に7cm長の絹糸を留置した。大腿静脈を遠位で結紮した後、22.5分間後に絹糸を回収洗浄し、大静脈内にあった5cm長の絹糸に付着した血栓の重量を測定した。本薬0.029～0.230mg/kg、ヘパリン0.25～2.00mg/kg、nadroparin 0.312～5.00mg/kg及びenoxaparin 0.35～2.83mg/kgは、絹糸を挿入する2分前に静脈内投与された。本薬は用量依存的に血栓形成を抑制し、ED₅₀は0.074mg/kgであり、ヘパリン、nadroparin及びenoxaparinの1/12、1/34及び1/22であった。また、本モデルにおける本薬の効果は、大静脈狭窄血栓症モデルラットの約1/3であった（n=4～6）。

⑤ ウサギWessler うっ血性血栓症モデル

ペントバルビタール麻酔下の雄New Zealandウサギに組換えヒトTFを頸静脈内投与し、30秒後に左右頸静脈をそれぞれ2.5cm間隔で遠位及び近位の2カ所ずつ結紮した。15分後に両頸静脈の結紮部分を摘出し、形成された血栓重量を測定した。また、TF投与の直前に頸動脈より採血し、血漿中抗第Xa因子活性をウシ第Xa因子、ヒトATⅢ及びS2222を用いて、アミド分解法により測定した。本薬0.051～1.02mg/kg又はヘパリン0.3～3.0mg/kgは、頸静脈結紮の1、2、6又は16時間前に皮下投与した。本薬及びヘパリンは0.17及び2.0mg/kg以上の皮下投与により血栓形成を抑制した。本薬の血栓形成抑制作用は0.17mg/kgでほぼプラトーとなり、そのときの血漿中抗第Xa因子活性は0.51抗XaU/mLであった。また、本薬0.17mg/kgを皮下投与した6時間後の血栓形成抑制率は35%であったのに対し、ヘパリン2.0mg/kg投与では13%であり、本薬の血栓形成抑制効果はヘパリンに比較して長時間持続した（n=4～35）。

(2) 副次的薬理試験

1) 動脈血栓症モデルにおける作用

ラット動静脈シャントモデルにおいて、本薬の静脈内投与は絹糸によって誘発される血栓形成を抑制し (ED₅₀: 1.0~2.29mg/kg)、血小板及びフィブリンの沈着も抑制した。ラット大動脈血栓症モデルにおいて、本薬の静脈内投与は絹糸によって誘発される血栓形成を抑制した (ED₅₀: 0.24mg/kg)。ラットステンレススチール動静脈シャントモデルにおいて、本薬0.14及び0.28mg/kgの静脈内投与は血小板及びフィブリンのステントへの沈着を抑制した。ウサギ頸動脈狭窄・傷害モデルにおいて、本薬0.86mg/kgの静脈内投与は急性動脈閉塞によるcyclic flow variations (以下、CFVs) 及び閉塞性血栓形成を抑制した。モルモット頸動脈傷害モデルにおいて、本薬0.62及び0.92mg/kgの静脈内投与はCFVsを抑制した。イヌ冠状動脈狭窄・傷害モデルにおいて、本薬1.83mg/kgの静脈内投与はCFVsを抑制した。

2) 止血に及ぼす影響

① 出血に及ぼす影響

①-1 ラット皮下出血モデル

ペントバルビタール麻酔下の雄Wistarラットの頸部皮膚を1cm切開し、皮下に作成した空洞にガーゼを挿入した。30分後にガーゼに含まれる赤血球を溶血させ、ヘモグロビン (以下、Hb) を自動分析装置で比色定量して出血率を算出した。本薬0.31~20.0mg/kg及びヘパリン0.3~2.0mg/kgはガーゼ挿入の1分前に静脈内投与した。本薬により用量依存的な出血率の増加は認められず、20.0mg/kgにおいても出血率は媒体投与群の約3倍であり、ヘパリン1.27mg/kg投与時の出血率より低かった。一方、ヘパリンは0.5~2.0mg/kgで用量依存的に出血率を増加させ、2.0mg/kgにおける出血率は媒体投与群の約5倍であった (n=8~16)。

①-2 ラット皮下出血モデル及び静脈血栓症モデル

①-1のラット皮下出血モデルにおける出血率を測定し、出血率を300%に増加させる用量 (以下、ED₃₀₀) を算出した。また、(1) 2) ②-1と同じラットTF誘発静脈血栓症モデルにおける血栓形成抑制作用のED₅₀を測定し、治療係数 (ED₃₀₀/ED₅₀) を算出した。被験物質はいずれの試験においても静脈内に投与した。本薬は3.86mg/kgでも出血率を150%に増加させたのみで、出血増大作用のED₃₀₀は>3.86mg/kgであった。一方、ヘパリンは0.75mg/kg以上で、enoxaparinは4.38mg/kgで出血率を200%以上に増加させ、ヘパリンのED₃₀₀は0.81及び1.31mg/kg (2試験)、enoxaparinのED₃₀₀は3.00mg/kgであった。ラットTF誘発静脈血栓症モデルにおける血栓形成抑制作用のED₅₀は本薬で0.061mg/kg、ヘパリンで0.1mg/kg、enoxaparinで0.19mg/kgであった。本薬の治療係数は>63.3 と、ヘパリン (8.1及び13.1) 及びenoxaparin (15.8) に比べて高かった (n=6~14)。

①-3 ATⅢ補充ラット及び腎機能停止ラットでの皮下出血に及ぼす影響

①-1のラット皮下出血モデルにおいて、ガーゼ挿入15分前にヒトATⅢ100U/kgを静脈内投与 (ATⅢ補充群) 後、出血率を測定した。また、血漿中の本薬の抗第Xa因子活性をATⅢ及び第Xa因子の存在下で、S2222を用いたアミド分解法により測定し、血漿中濃度に換算した。活性化部分トロンボプラスチン時間 (以下、APTT) は血液凝固測定装置で測定した。また、①-1のラット皮下出血モデルにおいて、左右の腎動脈及び腎静脈を結紮した (腎機能停止群) 後、ガーゼを挿入し出血率を測定した。本薬0.43~1.73mg/kgはガーゼ挿入の1分前に静脈内投与した。ATⅢ補充群及び腎機能停止群では、抗第Xa因子活性 (本薬血中濃度に換算) は無処置群と比較して約2倍に上昇したが、いずれの処置によっても本薬によ

る出血量及びAPTTの増加率は、無処置群と比較して変化しなかった (n=4~6)。

①-4 ウサギ耳出血モデル

ペントバルビタール麻酔下の雄New Zealandウサギの左耳に本薬1.7mg/kgを静脈内投与し、直後に右耳の5ヵ所を小切開し、37°Cの生理食塩液に浸した。10分後に生理食塩液中の赤血球を溶血させ、Hb濃度を比色定量し、出血量の指標とした。本薬群 (n=5) での10分間の出血量は 0.026 ± 0.01 mL (平均値 \pm 標準誤差、以下同様) であり、媒体投与群 (n=6) での出血量 0.038 ± 0.01 mLと比べて増加しなかった。また、投与10分後の本薬の血漿中濃度は $2.4 \mu\text{g/mL}$ であった。

② 硫酸プロタミンによる出血抑制

②-1 マウス尾出血に及ぼす影響

ペントバルビタール麻酔下の雄Swissマウスの尾先端を4mm切断し、生理食塩液に20分間浸した。生理食塩液中の赤血球を溶血させ、Hbを定量し、出血量の指標とした。本薬1~15mg/kg又はヘパリン0.6~3mg/kgは尾切断の5分前に、硫酸プロタミンは6分前にそれぞれ静脈内投与した。また、被験物質投与5分後に採血し、アミド分解法で血漿中抗第Xa因子活性を測定した。血栓形成抑制作用は(1) 2) ①のマウスTF誘発血栓塞栓症モデルにおける死亡率を指標として検討した。本薬は10及び15mg/kgで、ヘパリンは1及び3mg/kgで、媒体投与群に比べて、出血量を増加させた。硫酸プロタミン10mg/kgは、本薬10mg/kgの出血量増加作用を抑制したが、抗第Xa因子活性及び血栓形成抑制作用に対して影響を及ぼさなかった。一方、ヘパリン3mg/kgの出血量増加作用及び抗第Xa因子活性は、硫酸プロタミン10mg/kgによって抑制され、ヘパリン0.5mg/kgの血栓形成抑制作用も硫酸プロタミン10mg/kgにより消失した (n=5~20)。なお、本薬による出血量増加は、第VII因子、第VIIa因子及び第IX因子、あるいは血小板第4因子 (以下、PF4) の前投与に影響を受けなかったが、ヒトプロトロンビン複合体の前投与によって抑制された (n=7~10)。

②-2 ラット尾出血に及ぼす影響

出血時間

ペントバルビタール麻酔下の雄SDラットの尾先端5mmを切断し、15秒毎にろ紙を出血部位にあて、1分間以上出血が確認できない場合に止血とした。本薬1~15mg/kg又はヘパリン0.3~0.6mg/kgは、尾切断の直前に静脈内投与した。硫酸プロタミン (3、10及び30mg/kg) は尾切断15分後に静脈内投与した。本薬は10及び15mg/kgで、ヘパリンは0.5及び0.6mg/kgでそれぞれ出血時間を延長し、硫酸プロタミン10及び30mg/kgは本薬15mg/kg及びヘパリン0.6mg/kgによる出血時間の延長を用量依存的に抑制した (n=5~10)。

抗第Xa因子活性

雄SDラットに本薬15mg/kgを単独又は硫酸プロタミン10mg/kgと併用投与した。5分後に採血し、アミド分解法で血漿中抗第Xa因子活性を測定した。硫酸プロタミン10mg/kgは、本薬15mg/kgによる血漿中抗第Xa因子活性を約30%低下させた (n=4)。

血栓形成抑制作用

ペントバルビタール麻酔下の雄SDラットの陰茎背静脈内に遺伝子組換えヒトTFを投与し、10秒後に下大静脈を0.7cm間隔で2ヵ所結紮 (先に近位) し、10分後に結紮部分を摘出し、形成された血栓の乾燥量を測定した。本薬及び硫酸プロタミンは血管閉塞のそれぞれ15及び1分前に静脈内投与した。硫酸プロタミン10mg/kgは、本薬0.16mg/kgによる血栓形成

抑制作用に影響を及ぼさなかった (n=5)。

3) 血小板凝集に及ぼす影響

健康成人から得た多血小板血漿に、本薬0.015~150 μ g/mL又はヘパリン0.25~250 μ g/mL (いずれも最終濃度) を加え、37 $^{\circ}$ Cでインキュベート後、アデノシン5'-二リン酸 (以下、ADP) 又はコラーゲンを添加して更にインキュベートし、血小板凝集の指標として609nmの吸光度を連続的に測定した。また、雄ウサギから得たゲルろ過血小板にATⅢ及び本薬又はヘパリンを加え、37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。 α -トロンビンを添加して更にインキュベートし、610nmの吸光度を連続的に測定した。本薬は150 μ g/mLまで、ADP及びコラーゲン誘発ヒト血小板凝集に対してほとんど影響を及ぼさなかった。一方、ヘパリンはADP及びコラーゲン誘発ヒト血小板凝集をそれぞれ1及び0.25 μ g/mL以上で促進した (n=1~5)。本薬は α -トロンビンによるウサギ血小板凝集を用量依存的に抑制し、IC₅₀はATⅢの存在下で4.5 μ g/mL、非存在下で3.1 μ g/mLとATⅢに非依存的であった。一方、ヘパリンも α -トロンビンによる血小板凝集を用量依存的に抑制したが、抑制作用はATⅢに依存的で、ATⅢ存在下のIC₅₀ (0.16 μ g/mL) は、非存在下 (4.8 μ g/mL) の1/30であった。また、本薬による血小板凝集の抑制率は、 α -トロンビン濃度が高くなるとともに低下した (n=2)。

4) その他の試験

① PF4との結合親和性及びヘパリン起因性血小板減少症 (以下、HIT) 抗体に対する交差反応性

PF4は活性化された血小板から遊離され、ヘパリンと結合して抗凝固活性を中和する。また、ヘパリンとPF4の複合体は抗原と認識され、動静脈血栓を合併したHIT発症の原因となるHIT抗体が産生される (Thromb Haemost 79: 1-7, 1998)。

³H標識ヘパリンとPF4の結合試験

³H標識ヘパリンとPF4を本薬又はヘパリン (いずれの最終濃度も3~100 μ g/mL) 存在下、37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした後、ニトロセルロース膜でろ過し、膜上に残った放射能をヘパリンのPF4への結合量の指標とした。³H標識ヘパリンは濃度依存的にPF4と結合し、そのKdは85.4nmol/Lであった。また、ヘパリンは濃度依存的に³H標識ヘパリンとPF4の結合を阻害したが (IC₅₀: 5.3 μ g/mL)、本薬はほとんど影響を及ぼさなかった (n=3)。

HIT抗体に対する交差反応性

ヒトの多血小板血漿と¹⁴C標識セロトニンを室温でインキュベートして、血小板に¹⁴C標識セロトニンを取り込ませた。この血小板懸濁液にHIT患者血清と本薬0.00012~12 μ g/mL又はヘパリン0.00055~55 μ g/mL (いずれも最終濃度) を加えて、室温で更にインキュベート後、血小板から上清中に遊離された¹⁴C標識セロトニン量を検討した。ヘパリン0.055~5.5 μ g/mL (0.01~1抗XaU/mL) はHIT患者血清の共存下で、濃度依存的にヒト血小板から¹⁴C標識セロトニンを放出させた。一方、本薬は12 μ g/mL (10抗XaU/mL) まで¹⁴C標識セロトニンを放出させず、HIT抗体と交差反応性を示さなかった (n=3)。

② リポプロテイン代謝に対する影響

雄SDラットに、単回投与試験では、本薬0.3~3mg/kg、ヘパリン0.03~3mg/kg又はnadroparin 0.3~3mg/kgを静脈内投与し、反復投与試験では、本薬1mg/kg又はヘパリン1mg/kg

を9日間皮下投与した後、10日目に同用量を麻酔下で静脈内投与した。静脈内投与の10分後に麻酔下で腹部大動脈から採血し、その血漿とtri[1-¹⁴C]oleylglycerolを28°Cでインキュベートした後、加水分解された¹⁴C標識脂肪酸を抽出し、放射能を血漿中トリグリセリド(以下、TG)リパーゼ活性の指標とした。単回投与試験において、ヘパリン及びnadroparinは、用量依存的に血漿中TGリパーゼ活性を誘導したのに対し、本薬は3mg/kg投与でもTGリパーゼ活性を誘導しなかった(n=5)。反復投与試験においても、ヘパリンはTGリパーゼ活性を誘導したが、本薬はTGリパーゼ活性を誘導せず、また、本薬1mg/kgを9日間反復投与後にヘパリン1mg/kgを単回投与しても、ヘパリン単回投与によるTGリパーゼ活性誘導に対して影響を及ぼさなかった(n=4~5)。

(3) 安全性薬理試験

1) 一般症状に及ぼす影響

雄SDラットに本薬0.3、3及び30mg/kgを静脈内単回投与しても、投与後24時間まで一般症状・行動及び体重に影響を及ぼさなかったが、いずれの用量においても投与2時間後に一過性の軽度の体温上昇(投与前値の3.2~3.7%、媒体投与群では1.1%)がみられた(n=5)。

2) 中枢神経系に及ぼす影響

雄CD-1マウスに本薬10mg/kgを皮下投与しても、投与後2時間まで自発運動量に影響を及ぼさず(n=9)、味覚嫌悪条件付けを誘発しなかった(n=14~15)。

3) 呼吸器・循環器系に及ぼす影響

① 呼吸器系・循環器系・血液系パラメータに及ぼす影響

麻酔下のビーグル犬において、本薬3.57mg/kgの単回静脈内投与は、呼吸器系(呼吸数、呼吸流量、呼吸量、1回換気量、分時換気量、呼気CO₂濃度)、循環器系(心拍数、血圧、右心房圧、左心室圧、左心室内圧最大立ち上り速度、拍出量、心係数、全末梢血管抵抗、血管脈圧、心筋収縮力、心電図)及び血液系(血液ガス、白血球数、赤血球数、血小板数、Hb濃度、ヘマトクリット値)の各パラメータに対して影響を及ぼさなかった(n=5~7)。

② 摘出心筋の活動電位に及ぼす影響

本薬0.01、0.1、1、10及び30μmol/Lの処置は、ブタ摘出プルキンエ線維の静止電位、活動電位幅、最大脱分極速度及び90%活動電位維持時間に対し影響を及ぼさなかったが、10及び30μmol/L(17.28及び51.84μg/mL)において、0mV活動電位維持時間を7.4及び9.3%短縮させ、30μmol/Lにおいて50%活動電位維持時間をそれぞれ4.1%短縮させた(n=6)。

4) 消化器系に及ぼす影響

雄Wistarラットにおいて、本薬3.6mg/kgの5日間(1~4日目に1日2回、最終日は1回)皮下投与は、胃腸管運動能、体重増加及び直腸温に影響を及ぼさなかった(n=4~5)。

5) 水及び電解質代謝に及ぼす影響

雌雄Wistarラットに本薬3.6mg/kgを単回静脈内投与したとき、雌のみで軽度な尿量及び血漿中クレアチニンの減少がみられたが、Na⁺、K⁺、Cl⁻及びCa²⁺の尿中排泄量及び血漿中濃度に

は影響はみられなかった。また、雄のみで尿中アルブミン排泄量の増加傾向がみられた (n=8)。麻酔イヌに本薬3.57mg/kgを単回静脈内投与しても、4時間後まで尿量に影響はみられなかった (n=5~7)。

(4) 薬力学的薬物相互作用試験

1) ラットにおけるアスピリン及びチクロピジンとの併用による血栓形成抑制作用

ペントバルビタール麻酔下の雄Wistarラットに⁵¹Cr標識血小板及び¹²⁵I標識フィブリノゲンを投与後、ステント挿入カニューレ（頸静脈側）を用いて頸動脈-頸静脈間にシャントを作製し、血液を45分間又はカニューレが閉塞するまで灌流した。ステント挿入部分の放射能を連続的に測定し、また、血液灌流終了後、ステントに形成された血栓及び血液中の放射能を測定し、⁵¹Cr標識血小板及び¹²⁵I標識フィブリンの沈着率を算出した。本薬0.14mg/kg又はヘパリン0.625mg/kgはシャント内を血液で灌流する2分前にカニューレ内に投与した。なお、アスピリン100mg/kgはシャント作製の1時間前、チクロピジン50mg/kgはシャント作製の42、18及び1時間前にそれぞれ経口投与した。本薬及びヘパリンは、⁵¹Cr標識血小板及び¹²⁵I標識フィブリンのステントへの沈着を抑制し、アスピリン及びチクロピジンの併用で、その抑制作用は増強された (n=5)。

2) ウサギにおけるストレプトキナーゼとの併用による血栓溶解作用

ペントバルビタール麻酔下の雄New Zealandウサギの右大腿動脈に血流量測定用プローブを装着し、その下流を狭窄させた。プローブと狭窄部位間の血管壁に傷害を与えた後、プローブの遠位で血管を結紮し、30分間うっ血させて閉塞性血栓を形成させた。血管の結紮を解除すると同時にストレプトキナーゼを静脈内投与（ボラス投与5,000U/kg＋持続投与400U/kg/minを1時間）した。その直後から、本薬（ボラス投与0.43mg/kg＋持続投与0.26mg/kg/hr又はボラス投与0.86mg/kg＋持続投与0.43mg/kg/hr）又はヘパリン（ボラス投与1.0mg/kg＋持続投与0.25mg/kg/hr又はボラス投与2.0mg/kg＋持続投与0.5mg/kg/hr）を静脈内投与した。ストレプトキナーゼの単独投与では、血管の結紮を解除後、試験終了時までには持続的な血流が回復したのは1/10例のみであった。一方、本薬併用では、低用量群の3/8例、高用量群の7/8例で、ヘパリン併用では、低用量群の4/8例、高用量群の6/8例で持続的な血流の回復がみられた。

3) ウサギにおける組織プラスミノゲンアクチベータ（以下、t-PA）との併用による血栓溶解作用

ペントバルビタール麻酔下の雄New Zealandウサギの外頸静脈と顔面静脈の分岐から4cm間にある分枝を結紮した。頸静脈内に絹糸を挿入し、挿入部分の両端を閉塞させた。閉塞部の血液を¹²⁵I標識ヒトフィブリノゲン及びヒトトロンビンを添加したウサギクエン酸加血液と置換し、30分間放置した後、血流を再開させた。その直後から、遺伝子組換えt-PA（以下、rt-PA）0.5mg/kgを4時間かけて耳静脈内に持続静注した後、頸静脈内に残存した血栓の重量及び放射能を測定した。本薬0.051~0.51mg/kgはrt-PA投与開始時に静脈内投与した。rt-PAにより、媒体投与時の2倍程度のフィブリノゲン溶解活性が認められ、頸静脈に形成された血栓重量は56%減少した。本薬0.51mg/kgの単独投与は、フィブリノゲン溶解活性及び血栓溶解作用

を示さなかったが、rt-PAのフィブリノゲン溶解活性及び血栓溶解作用は増強した (n=5~12)。

4) ラットにおける血小板凝集阻害薬及び抗凝固薬との併用による出血に及ぼす影響 (資料 4.2.1.1.12)

本薬 0.86mg/kg 又はヘパリン 0.76mg/kg をガーゼ挿入の 1 分前に静脈内投与したラット皮下出血モデル (「(2) 2) ①-1 ラット皮下出血モデル」参照) において、血小板凝集阻害薬 (アスピリン 30mg/kg 及びクロピドグレル 3mg/kg) をガーゼ挿入の 16 及び 1 時間前の計 2 回、抗凝固薬 (dicumoxane 15 mg/kg) を 48、40、24 及び 16 時間前の計 4 回それぞれ経口投与した。アスピリン以外の各被験物質は単独投与により、出血量を増加させた。クロピドグレル及び dicumoxane による出血量は、本薬 0.86mg/kg の併用で増加した。一方、アスピリン及びヘパリンによる出血量は本薬 0.86mg/kg を併用してもほとんど変化しなかった (n=6)。

<審査の概要>

機構は、効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験毎に本薬を含む被験薬の投与時間並びに投与量又は添加量 (対照薬との投与量比を含む) が多様であったことから、それらの設定理由又は根拠を尋ね、申請者から、試験毎にそれぞれの設定理由の説明がなされた。機構は、申請者の説明を踏まえると、被験薬の投与時間及び投与量等に、必要に応じて一貫性を持たせ、本薬の各薬理作用の関連等を更に明確にすることは可能であったと考えるが、個々の試験における設定は薬理的に妥当な範囲であると判断した。

機構は、トロンビン産生阻害の経時的変化の検討で、単位重量あたりの ATⅢ結合サイト数が異なる本薬とヘパリンのトロンビン産生阻害作用が同程度 (T-50 が 30 分以上となる用量はそれぞれ 0.164 及び 0.391 μ g/mL) となった理由を尋ねた。

申請者は、以下のように回答した。本薬は単位重量当たりヘパリンの約 8 倍の ATⅢ結合サイトを有し、T-50 が 30 分以上となる用量の比を ATⅢ結合サイト数で補正すると、本薬 1 に対しヘパリンは 0.286 となり、同じ効力を示すのに必要な本薬濃度はヘパリンの約 3.5 倍と算出される。しかしながら、実際のヘパリン分子量は 3,000~30,000 の範囲でばらつくため、単位重量あたりの ATⅢ結合サイトも 10 倍の範囲でばらつくことから、本薬とヘパリンのトロンビン産生阻害作用は同程度であると考えられる。

機構は、静脈血栓モデルにおける本薬とヘパリンの効力比が試験系により異なる理由を尋ねた。

申請者は、以下のように回答した。本薬とヘパリンの効力を検討した静脈血栓モデルの各試験について、本薬とヘパリンの補正 ED₅₀ (単位重量あたりの ATⅢ結合サイトで補正した ED₅₀) を比較した。また、各静脈血栓症モデルは、外因性に血液凝固の促進因子を添加して血栓を誘発するか否かで分けられ、マウス及びラットの TF 誘発血栓症モデル並びにラットのヒト血清誘発静脈血栓症モデルでは、外因性に血液凝固の促進因子を添加したが、いずれのモデルでもヘパリンは本薬より低い補正 ED₅₀ で血栓形成抑制作用を示した。一方、静脈内に絹糸を挿入し、内因性に血液凝固系を活性化させ、血栓を誘発するラット大静脈狭窄及び非狭窄血栓症モデルでは、血管狭窄の有無に関わらず、本薬とヘパリンは同程度の補正 ED₅₀ で血栓形成抑制作用を示した。ラット大静脈狭窄及び非狭窄血栓症モデルでは、静脈内に挿入した絹糸がトリガーとなって血液凝固系カスケードが進行し、最初に生ずる少量の第 Xa 因子の活性を本薬が阻害することで血液凝固系カスケード全体の進行を阻止できるため、本薬とヘパリンの第 Xa 因子阻害活性には大きな差は生じなかったと考

えられた。これに対し、マウス及びラットの TF 誘発血栓症モデル並びにラットのヒト血清誘発静脈血栓症モデルでは、外因性に血液凝固の促進因子が添加され血液凝固カスケードが急速に進行し、大量の第 Xa 因子及びトロンビンが産生されるため、第 Xa 因子阻害薬である本薬よりも、第 Xa 因子とトロンビンの両活性を阻害するヘパリンの方が強く血栓形成を阻害したものと推察された。

機構は、以上の回答も踏まえ、本薬の有効性を説明するための適切な条件内で薬効薬理試験成績は示されていること、並びに安全性薬理試験において、臨床上特に懸念される事象は確認されていないことから、提出された資料に基づき本薬の薬理的有用性は推定できると判断した。

(ii) 薬物動態試験成績の概要

<提出された資料の概略>

生体試料中本薬濃度の分析は、試料に ATⅢ及び第 Xa 因子の既知量を加えて本薬-ATⅢ-第 Xa 因子複合体を生成させ、第 Xa 因子の残存活性を発色基質の加水分解により生成する *p*-ニトロアニリンの 405nm における吸光度から算出した。

(1) 吸収

雄ラットに本薬 0.17 及び 0.35mg/kg、雄ウサギに 0.17mg/kg、雌雄カニクイザルに 10mg/kg、雌雄アカゲザルに 0.1~0.5mg/kg、ヒヒに 0.17 (雄) 及び 0.27 (雌雄) mg/kg を単回皮下投与した時の最高血中濃度到達時間 (以下、 t_{max}) はラット及びウサギで 1 時間以内、カニクイザル、アカゲザル及びヒヒで 3.4 時間以内であり、吸収は速やかであった。ラット及びウサギでの消失半減期 (以下、 $t_{1/2}$) は 1.0~1.9 時間、カニクイザル、アカゲザル及びヒヒでは 4.4~6.3 時間であった。ラット、ウサギ及びアカゲザルにおける本薬の皮下投与時の絶対的バイオアベイラビリティ (以下、*F*) は 101~130% であり、カニクイザル及びヒヒでは 71~77% であった。

雄ラットに本薬 0.17 及び 0.35mg/kg、雄ウサギに 0.17mg/kg、並びに雌雄アカゲザルに 0.1~0.5mg/kg を単回静脈内投与した時の全身クリアランス (以下、*CL*) は、146 及び 161、68 並びに 12~16mL/hr/kg といずれも肝血流量よりも低く、分布容積 (以下、*Vd*) はそれぞれ 143~178、165 並びに 80~136mL/kg といずれも総体液量よりも小さかったことから、組織移行性は低いと考えられた。

雌雄ラット、雌ウサギ及び雌雄カニクイザルに本薬 0.4~10mg/kg/日をそれぞれ 12 週間 (静脈内)、11 日間 (皮下) 及び 2 又は 13 週間 (静脈内) 反復投与した時、単回投与時と比較して薬物動態の変化はみられず、蓄積性はないと考えられた。ラット及びウサギ 10mg/kg/日群の血中濃度-時間曲線下面積 (以下、*AUC*) は、それぞれ 0.4mg/kg/日群の 6~7.5 倍及び約 10 倍であり、また、カニクイザルの血漿中濃度は投与 15 日目に定常状態に達すると推定され、10mg/kg/日群における投与 94 日目の投与 1 時間後の血漿中濃度は、0.4mg/kg/日群の約 5~10 倍であった。雌雄カニクイザルに本薬 10mg/kg/日を 8~10 日間皮下反復投与した時、皮下単回投与と比較して薬物動態の変化はみられず、蓄積性はないと考えられた。

(2) 分布

雄ラットに本薬の ³⁵S 標識体 0.4mg/kg を単回皮下投与した時、放射能は血液及び血漿を含むほとんどの組織で投与 0.25 時間後 (初回測定時) に最大となり、特に膀胱内容物 (尿)、血液、腎髄質で高く、次いで肺、肝臓及びリンパ節で高かった。その後、放射能は時間の経過に伴い低下し、投与 48 時間後までにほとんどの組織で消失したが、腎髄質、肝臓、骨髄、消化管内容

物（糞）及び膀胱内容物（尿）でわずかに確認された（0.004～0.012mg eq./kg）。なお、軟骨の放射能は投与 6 時間後以降に検出され、投与 48 時間後には軟骨及び腎皮質で放射能（0.055 及び 0.107 mg eq./kg）が確認された。

妊娠ラットに本薬の ^{35}S 標識体 10mg/kg/日を妊娠 9～17 日の 9 日間静脈内投与した時、最終投与 0.5 時間後の子宮及び胎盤での放射能は投与量の 0.284 及び 0.233%であった。この時、胎児血液中放射能は投与量の 0.027%以下とわずかであったことから、本薬の胎児移行性は低いと考えられた。

雄ラット及びカニクイザルの血漿に本薬の ^{35}S 標識体 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ （最終濃度、以下同様）を添加した時の血漿蛋白結合率は、89.6 及び 87.7%であり、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ までほぼ一定の結合率を示したが、10 及び 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の添加では 59.8～72.4%に低下した。雄ラット及びカニクイザルの血液に本薬の ^{35}S -標識体 0.05～50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を添加した時の血球分配率は 10%以下であり、血球移行性は低いと推察された。

(3) 代謝

雄ラット、雌ウサギ及び雄カニクイザルの *in vitro* 代謝試験では、本薬の ^{35}S 標識体を肝ホモジネート上清画分及び肝細胞と 37 $^{\circ}\text{C}$ でそれぞれ 60 及び 180 分間インキュベートし、本薬濃度及び放射能を測定したが、本薬の代謝は認められなかった。また、雄ラットの *in situ* 代謝試験では、肝臓に本薬を含む灌流液を 2 時間灌流し、灌流液及び胆汁中放射能を測定したが、本薬の代謝は認められず、胆汁中に回収された放射能は 0.1%以下であった。

雌雄ラット及び雄カニクイザルの *in vivo* 試験において、本薬の ^{35}S 標識体 0.4mg/kg を単回皮下及び静脈内投与した時の投与 24 時間後までの尿中放射能は主に未変化体に由来し、 ^{35}S -硫酸イオンも雄で 5.9%、雌で 10.3%検出されたが、脱硫酸体は確認されなかった。

雌雄ラット及びカニクイザルに本薬 0.4、2 及び 10mg/kg/日を 1 日 1 回 15 日間静脈内投与し、肝重量、総チトクローム P-450（以下、CYP）含量並びに CYP1A、CYP2C、CYP2E 及び CYP3A 活性を測定した結果、雄ラットの 0.4 及び 10mg/kg/日群で CYP1A 活性がそれぞれ約 22 及び 26% 低下した以外は、いずれにも影響はみられなかった。

(4) 排泄

雌雄ラット及び雄カニクイザルにおける本薬の ^{35}S 標識体 0.4mg/kg 単回皮下及び静脈内投与 168 時間後までの尿中放射能排泄率は、ラットで投与量のそれぞれ 80.5～87.6 及び 83.8～92.3%、カニクイザルでいずれも約 72%であり、糞中放射能排泄率は、ラットで 7.0～7.7 及び 4.4～7.6%、カニクイザルで約 0.4 及び 0.2%であった。放射能の総回収率は、ラットで投与量の 88.2～94.6 及び 91.4～96.7%、カニクイザルで 81.9 及び 81.4%であり、大部分（総回収量の約 90%）が投与 24 時間以内に尿中に排泄された。放射能の尿糞中排泄率は、ラットで雌雄差及び投与経路による違いはみられず、カニクイザルでも投与経路による違いはみられなかった。

<審査の概要>

本薬の薬物動態に特段の種差は認められず、本薬の皮下投与時の吸収はいずれの動物種においても良好で、静脈内投与時と同程度の量が循環血中に移行すると考えられた。また、本薬の主な消失経路は、未変化体の腎排泄であると考えられた。

機構は、本剤の用法・用量では反復投与が想定されるが、非臨床試験において反復投与時の組織分布を確認しなくても、ヒトにおける安全性評価の上で問題ないとする根拠を説明するよう求めた。

申請者は、以下のように回答した。ラットに本薬の ^{35}S -標識体を単回静脈内投与した後の主排泄経路は尿中であり、投与24時間後までには投与量の約80%が尿中に排泄されたことから、本薬の排泄は速やかであると考えられる。また、投与168時間後までの放射能の総回収率は96.7%であったことから、本薬は体内に蓄積しないと考えられる。ラットに ^{35}S -標識体を単回皮下投与した後の組織内放射能分布試験において、放射能は投与24~48時間後までにほとんどの組織で消失し、腎臓、肝臓、骨髄、消化管内容物及び膀胱内容物でわずかに確認された。また、投与48時間後の軟骨及び腎皮質では、血漿中放射能の C_{\max} (1.751mg eq./kg) の3.1及び6.1%の放射能が検出されたが、これらの組織での放射能はいずれも経時的に低下したことから、本薬は組織に蓄積しないと考えられる。本薬の0.4、2及び10mg/kg/日をラット及びカニクイザルに4週間反復皮下及び13週間反復静脈内投与した時、いずれも造血器官・組織以外に毒性変化は認められなかった。なお、本薬の国内臨床試験ではMajor bleeding及びMinor bleedingが認められ、その他の比較的発現頻度の高かった便秘、不眠症、肝機能異常、貧血及び血小板血症などの有害事象は、手術後の回復期によくみられる事象や併用薬との関連が考えられている。以上のことから、本薬の組織内分布は単回投与試験より予測可能であり、非臨床試験において反復投与時の組織分布を確認しなくても、ヒトにおける安全性評価の上で問題ないとする。

機構は、反復投与薬物動態試験において血漿中本薬濃度の蓄積性を示唆する知見は得られていないこと、反復投与毒性試験において組織中への蓄積を示唆する知見が得られていないこと及び海外において反復投与における使用実績が既に集積されていること等から、提出された試験成績に基づく非臨床薬物動態の評価については特に問題はないと判断し、回答を了承した。

(iii) 毒性試験成績の概要

<提出された資料の概略>

(1) 単回投与毒性試験

単回投与毒性試験はマウス、ラット及びカニクイザルを用いて実施された。いずれの試験の本薬投与量も臨床推定用量(2.5mg/日：0.05mg/kg/日)の800倍に相当する40mg/kgとされた。

雌雄マウス各5例に本薬40mg/kgを皮下又は静脈内投与した結果、いずれの投与経路においても死亡例はみられず、一般状態及び体重に特記すべき変化は認められなかった。皮下投与では、剖検時に雄1例及び雌2例の投与部位皮下に、投与時の外傷と本薬の薬理作用に関連した軽度な血腫がみられた。以上より、概略の致死量は皮下及び静脈内投与のいずれも40mg/kg超と判断された。

雌雄ラット各5例に本薬40mg/kgを皮下又は静脈内投与した結果、いずれの投与経路においても死亡例は認められなかった。皮下投与では、特記すべき所見は観察されなかったが、静脈内投与では、病理組織学的検査において、雌1例に投与時の外傷と本薬の薬理作用に関連した尾静脈周囲の出血が認められた。以上より、概略の致死量は皮下及び静脈内投与のいずれも40mg/kg超と判断された。

雌雄カニクイザル各2例に本薬40mg/kgを皮下投与した結果、死亡例はみられず、一般状態及

び体重に特記すべき変化は認められなかった。投与のストレスによると考えられる軽度な摂餌量の減少が投与後1週間にみられ、剖検では、雌1例に投与時の外傷と本薬の薬理作用に関連した投与部皮下血腫が認められた。以上より、概略の致死量は40mg/kg超と判断された。

(2) 反復投与毒性試験

反復投与毒性試験はラット及びカニクイザルを用いて実施され、本薬の0.4、2及び10mg/kg/が4週間及び13週間反復皮下又は静脈内投与された。最高投与量10mg/kg/日は臨床推定用量(2.5mg/日：0.05mg/kg/日)の200倍に相当する。

ラット4週間皮下投与試験では、0.4mg/kg/日群の雌1例が投与3日目の投与直後に強直性攣縮を示した後に死亡した。死因は、投与時の保定の際に動物が暴れたこと、投与直後に強直性攣縮がみられたこと、頸部の器官・組織(下垂体、脳・脊髄髄膜及び顎下リンパ節)に出血が観察されたことから、保定時に受けたと考えられる頸部外傷によるものと推察された。体重、摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査及び尿検査において、本薬投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。

血液生化学的検査では、10mg/kg/日群の雄にNa⁺及びCl⁻の低値が、すべての本薬投与群にグルコースの低値並びに2mg/kg/日以上雌にTGの低値がみられたが、いずれのパラメータの変動も軽度であり、背景値の範囲内であった。また、10mg/kg/日群の雄に腎臓重量の高値がみられたが、病理組織学的変化を伴っておらず、腎機能関連パラメータにも影響が認められなかったことから、本薬に関連した変化ではないと考えられた。剖検及び病理組織学的検査において、10mg/kg/日群の雌1例では投与部位に小さな血腫がみられたが、休薬期間終了時には観察されなかった。以上より、無毒性量は10mg/kg/日群と推定された。

ラット13週間静脈内投与毒性試験では、死亡例は認められず、一般状態として、投与時の物理的損傷によると考えられる軽微な出血又は血腫がすべての群にみられ、特に10mg/kg/日群の雄1例では顕著であり、本薬の薬理作用に関連した変化と考えられた。10mg/kg/日群の雄では、主に投与30日以降に体重増加抑制がみられたが(最終体重は対照群に比べ4.3%低値)、摂餌量の低下を伴わず(対照群との差は1.2g以下)、軽度であり毒性学的意義はないと考えられた。また、10mg/kg/日群の雄に血小板数の高値がみられたが、軽度な変動であり、局所出血に対する反応性変化と考えられた。

サル4週間皮下投与毒性試験では、死亡例は認められなかったが、10mg/kg/日群の雄2例及び雌1例に投与部位の腫脹、0.4mg/kg/日群の雌1例に心電図検査のために麻酔剤を筋肉内注射した右大腿部の腫脹がみられ、これらは投与による物理的損傷と本薬の薬理作用に関連した変化と考えられた。投与4週間後の血液学的検査において、10mg/kg/日群の雄1例で赤血球系パラメータ(赤血球、Hb及びヘマトクリット)の低値がみられたが、休薬2週間後にはほぼ回復した。投与期間終了後に剖検しておらず、本所見が発現した原因は不明であったが、後述のサル13週間静脈内投与毒性試験では同所見は認められなかったことから、毒性学的意義はないものと考えられた。血液凝固検査では、0.4mg/kg/日以上群でAPTTの延長及び10mg/kg/日群の雌1例でトロンビン時間の軽度延長が投与4週の投与2時間後にみられ、いずれも本薬の薬理作用に関連したものと考えられた。投与期間中に観察されたいずれの変化も休薬期間終了時には認められなかった。

サル13週間静脈内投与毒性試験では、0.4及び2mg/kg/日群の各雄1例が投与73日及び64日にそ

れぞれ死亡した。死因は、前者は本薬に関連しない自然発生的な急性胃拡張と判断され、後者は左腋窩に大きな血腫、貧血及び一般状態の悪化がみられたことから、保定の際に生じた外傷から出血し、本薬の薬理作用により止血が阻害されたために生じた失血死と考えられた。全投薬群で投与部位の発赤又は硬結の発現頻度・程度の増加が認められた。0.4mg/kg/日群の雄1例、2mg/kg/日群の雄2例、10mg/kg/日群の雄3例及び雌2例では、保定部位、採血部位又は自傷行動（ケージへの衝突・打撲）による外傷部位（前肢、後肢及び頭部）に広範囲にわたる発赤又は腫脹が観察された。これらの動物では、0.4mg/kg/日群を除き、可視粘膜蒼白化、冷感、自発運動減少、脱力、一過性の体重若しくは摂餌量の低値、赤血球系パラメータの低値、網状赤血球率の高値、血漿ビリルビン又は乳酸脱水素酵素（以下、LDH）の高値等がみられた。発赤又は腫脹が広汎に観察された部位には血腫又は出血がみられ、骨髄の造血亢進、脾臓の重量高値を伴う髄外造血も観察された。10mg/kg/日群の雌1例では、一般状態の悪化に関連すると考えられる脂肪組織の萎縮、胸腺の重量低値を伴う慢性萎縮及び脾臓萎縮が認められた。本薬投与群のその他の動物においても、LDH高値又は骨髄等の造血亢進、外傷に伴う血腫と考えられる小規模な発赤、腫脹又は腫瘤（尾、前肢、後肢）が散見された。また、2mg/kg/日群の雄1例では後肢外傷と同時期（投与1ヵ月後）に出血によると考えられる貧血がみられた。投与1時間後の血液凝固検査では、全投薬群で本薬の薬理作用によるAPTT及びプロトロンビン時間（以下、PT）の延長が観察された。血液凝固系（サル）に対しては、APTT 及びPT の延長が0.4mg/kg/日以上に、トロンビン時間の延長が10mg/kg/日に認められ、本薬の薬理作用に起因した変化と考えられた。免疫機能に対する影響は認められなかった。

以上のように、各試験で観察された出血性の変化は、外傷により出血し、本薬の薬理作用により止血が阻害された結果と考えられ、本薬の薬理作用に直接基づく変化のほか、出血性の変化及び出血に付随すると考えられる変化は、本薬の毒性と判断されなかった。したがって、いずれの試験においても、本薬に関連する毒性は認められず、無毒性量は10mg/kg/日群と推定された。なお、ラット及びサルの無毒性量における曝露量（AUC又は投与1時間後の血漿中本薬濃度（以下、 C_{1hr} ）は、臨床推定用量2.5mg/日における曝露量のそれぞれ約6倍及び44倍に相当する。

(3) 遺伝毒性試験

遺伝毒性試験は*in vitro*試験として細菌を用いる復帰突然変異試験、染色体異常試験及びマウスリンフォーマ試験、*in vivo*試験として小核試験が実施され、遺伝毒性は認められなかった。

(4) がん原性試験

がん原性試験は、予定臨床投与期間は1ヵ月未満であること、また、化学構造及び遺伝毒性試験成績より、本薬ががん原性を有する懸念はないと考えられたことから、実施されなかった。

(5) 生殖発生毒性試験

生殖発生毒性試験として、ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、ラット及びウサギ胚・胎児発生に関する試験、ラット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が実施され、いずれの試験においても本薬0.4、2及び10mg/kg/日が皮下投与された。

1) ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試(Seg.I)

雌雄ラット各群25例を用い、本薬を雄には交配4週間前より50～52日間、雌には交配2週間前より妊娠7日（妊娠0日＝交尾成立日、以下同様）まで皮下投与し、雌は妊娠14日に帝王切開された。10mg/kg/日群の雌1例は投与19日に一般状態の悪化により切迫屠殺された。死因は自然発生的なリンパ肉腫であった。親動物では、10mg/kg/日群の雌雄各5例に投与による外傷と本薬の薬理作用に関連すると考えられる血腫が認められた。2mg/kg/日以上投与された雄では、投与3週まで体重増加量の低値が散見されたが、2mg/kg/日群のその後の体重増加量は対照群と同程度であり、体重及び摂餌量は試験期間を通じて対照群と同程度であった。また、10mg/kg/日群では体重の低値が散見され、摂餌量の低値を伴ったが、いずれの変化も軽度（最終体重は対照群に比べ3.3%低値、摂餌量は対照群に比べ最大1.4g低値）であった。雌雄親動物の生殖能（交尾率及び受胎能）、精子検査、雄性生殖器重量及び性周期に本薬投与の影響はみられず、胚の生存性にも影響は認められなかった。投与部位の外傷と本薬の薬理作用に関連した出血性変化は、反復投与毒性試験と同様に毒性とは判断せず、投与前半にみられた体重増加抑制についても13週間静脈内投与毒性試験においてみられた変化と同程度であることから、同様に毒性学的意義のある変化を伴う所見ではないと判断された（「(2) 反復投与毒性試験」参照）。以上より、雌雄親動物の一般毒性学的な無毒性量及び生殖能、並びに胚に対する無毒性量は10mg/kg/日と推定された。

2) ラット胚・胎児発生に関する試験 (Seg. II)

妊娠ラット (n=23～24) に、本薬を妊娠6～17日まで皮下投与し、妊娠20日に帝王切開した。母動物では、死亡及び流産例はみられず、一般状態、体重及び摂餌量に本薬投与による影響は認められなかった。剖検において、10mg/kg/日群で投与部位に赤色又は暗赤色斑の発現頻度の増加がみられたが、投与部位の外傷と本薬の薬理作用に関連するものと考えられた。胚・胎児では、生存胎児数及び体重に影響はみられず、特異な外形、内臓及び骨格奇形及び奇形・変異発現頻度の有意な増加も認められなかった。以上より、母動物及び胚・胎児に対する無毒性量はともに10mg/kg/日と推定され、本薬は催奇形性を示さないと判断された。

3) ウサギ胚・胎児発生に関する試験 (Seg. II)

妊娠ウサギ (n=19～20) に、本薬を妊娠6～18日まで皮下投与し、妊娠29日に帝王切開した。母動物では、死亡及び流産例はみられず、一般状態、体重、摂餌量及び剖検においても本薬投与による影響は認められなかった。0.4mg/kg/日群の1例に早産（妊娠29日）がみられたが、2mg/kg/日以上の群ではみられなかったことから、本薬との関連性はないと考えられた。胚・胎児では、生存胎児数及び体重に影響はみられず、特異な外形、内臓及び骨格奇形及び奇形・変異発現頻度の有意な増加も認められなかった。以上より、母動物及び胚・胎児に対する無毒性量はともに10mg/kg/日と推定され、本薬は催奇形性を示さないと判断された。

4) ラット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 (Seg. III)

妊娠ラット (n=20～22) に、本薬を妊娠7日から分娩後20日（分娩1日＝出産日）まで皮下投与し、分娩後21日に剖検した。F₁雌親動物は妊娠20日に帝王切開した。F₀母動物では、2mg/kg/日群の1例が分娩後13日に死亡し、死因は盲腸粘膜下の重度の出血と考えられた。0.4及び10mg/kg/日群の各1例で、結腸又は盲腸（粘膜又は漿膜下）の出血がみられたが、用量依

存性がなく、動物の取扱いによる外傷を伴っていたことから、偶発的外傷と本薬の薬理作用によるものと考えられた。F₁出生児では、0.4及び2mg/kg/日群の各1例に頭部又は鼻部に血腫がみられたが、低頻度で用量依存性はないことから、いずれも本薬との関連性はないと考えられた。F₂胎児では、いずれの群においても異常は認められなかった。以上より、F₀母動物及びF₁出生児に対する無毒性量は、いずれも10mg/kg/日と推定された。

(6) 局所刺激性試験

皮下又は静脈内投与による単回及び反復投与毒性試験並びに生殖発生毒性試験において、投与部位の剖検あるいは病理組織学的検査により局所刺激性が検討された結果、投与部位の発赤、出血、腫脹又は血腫がみられたが、これらの出血性変化は投与による血管損傷と本薬の薬理作用に関連した変化であり、反復投与毒性試験において炎症細胞浸潤等の刺激性を示唆する病理組織学的変化は認められなかったことから、本薬は局所刺激性を示さないと判断された。

(7) 抗原性試験

モルモットを用いた能動的全身性アナフィラキシー（以下、ASA）反応及び4時間受身皮膚アナフィラキシー（以下、PCA）反応試験、並びにマウス及びラットを用いた48時間PCA反応試験の感作量を本薬0.4及び4mg/kg（それぞれ臨床推定用量（2.5mg/日：0.05mg/kg/日）の8及び80倍に相当）、誘発量を10mg/mL/bodyとして検討した結果、本薬投与群では、ASA反応試験においてアナフィラキシー反応はみられず、4及び48時間PCA反応試験においても陽性反応はみられなかったことから、本薬が抗原性を示す可能性は低いと判断された。

(8) 不純物の毒性試験

安全性の確認が必要となる閾値を超えて個別に規格が設定されている原薬の不純物（Rrt=0.93（水素化又は硫酸化工程の副生成物）及びRrt1.2DS（合成由来の副生成物、分解生成物、同一相対保持時間に少なくとも2つの構造未知物質））及び製剤の不純物（Rrt1.2DP（製剤で確認された不純物、同一相対保持時間に複数の構造未知物質））の毒性を評価するために、本薬の熱分解品を用いてラット2週間静脈内投与試験及び遺伝毒性試験（復帰突然変異及びマウスリンフォーマTK試験）が実施された。ラット2週間投与試験では、最高用量の10mg/kg/日においても投与による血管損傷と本薬の薬理作用に起因した出血関連の所見以外に特記すべき変化はみられず、無毒性量（10mg/kg/日）投与時の各不純物の推定曝露量は、Rrt0.93で30µg/kg/日、Rrt1.2DSで120µg/kg/日及びRrt1.2DPで70µg/kg/日となり、臨床推定用量（2.5mg/日）投与時のヒトにおける推定曝露量が、Rrt0.93で0.4µg/kg/日、Rrt1.2DSで0.3µg/kg/日及びRrt=1.2DPで1.0µg/kg/日であることから、70倍以上の安全係数となる。また、遺伝毒性試験の結果、いずれの不純物も陰性であった。

<審査の概要>

機構は、単回投与毒性試験について、臨床推定用量 0.05mg/kg/日の 800 倍に相当する 40mg/kg のみの用量設定を妥当と考える理由を尋ねた。

申請者は以下のように回答した。ヒトに臨床推定用量である本薬 2.5mg を 7 日間皮下投与したときの本薬の最高血漿中濃度（以下、C_{max}）は約 0.5µg/mL であり、ATⅢとの結合が飽和する 2µg/mL

を下回っていた。一方、カニクイザルに本薬 10mg/kg/日を単回皮下又は 8.8mg/kg を静脈内投与したときの、血漿中本薬濃度（それぞれ C_{max} : 13 μ g/mL 及び推定投与時濃度 (C_0) : 62 μ g/mL) は飽和濃度である 2 μ g/mL の 6.5~31 倍であったことから(ヒトの C_{max} に対しては 26~124 倍)、40mg/kg の皮下及び静脈内投与時の血漿中濃度は本薬と ATⅢとの結合の飽和濃度を更に上回ると予想され、飽和濃度を大きく上回る量の本薬を投与しても、投与による外傷と本薬の薬理作用に関連した投与部位の血腫以外、特記すべき変化及び毒性兆候が認められなかったことから、40mg/kg は臨床推定用量及び薬効量のいずれに対しても十分な高用量であり、他の用量段階を設けなかったことは妥当と考える。

機構は、反復投与毒性試験について、高用量でも本薬の毒性による変化が認められなかったことから、用量設定の妥当性について尋ねた。

申請者は以下のように回答した。すべての反復投与毒性試験の用量は、ED₅₀ 値と臨床推定用量から設定した 0.4、2 及び 10mg/kg/日の 3 用量を用いた。サルでは保定、採血又は自傷行動による外傷部位の出血・血腫が強くみられ 2mg/kg/日群で死亡（失血死）が発現していること、反復投与試験では採血や麻酔剤注射等、動物に外傷を生じさせる処置を実施すること、本薬の薬理作用により血液凝固能が低下すること及び試験の継続性を考慮すると、10mg/kg/日が倫理的に許容される最大投与量であると考えられる。また、ラット及びサルの反復静脈内投与毒性試験で、投与量が 25 倍増加したとき、ラットの AUC 及びサルの血漿中濃度はそれぞれ 6~7.5 及び 5~10 倍しか増加しなかった（「(ii) <提出された資料の概略> (1) 吸収」参照）ことは、血漿蛋白結合の飽和に起因するものと考えられる。本薬と ATⅢとの結合は血漿中本薬濃度 2 μ g/mL 以上で飽和すると考えられており（「(ii) <提出された資料の概略> (2) 分布」参照）、10mg/kg/日を静脈内投与した時の血漿中本薬濃度（ラット： C_{5min} 、サル： C_{1hr} ）は、ラットでは少なくとも飽和濃度の 20 倍（45.1~74.1 μ g/mL）、サルでは 9 倍以上（18.6~27.3 μ g/mL）、サルへの皮下投与時の C_{max} においても 8 倍以上（16.8~49.0 μ g/mL）上回っていたことから、投与量を上げると腎臓から排泄される遊離分画が血漿中に増えることが予想される。本薬は血漿中の ATⅢと結合して活性を示すことから、遊離分画が血漿中に増えても作用を示さないと推察され、反復投与毒性試験においても本薬の薬理作用に関連した影響以外に特記すべき毒性は認められなかった。以上の薬物動態的な観点からも、10mg/kg/日は毒性試験の高用量として妥当な投与量であったと考える。

機構は、ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（Seg.I）において、2mg/kg/日以上の雄動物で体重増加抑制（体重増加量の低値）が有意にみられているにもかかわらず、一般毒性的な無毒性量を 2mg/kg/日としていることから、本所見の毒性学的意義を尋ねた。

申請者は以下のように回答した。雄の 2mg/kg/日以上での体重増加量の低値は一過性（投与 3 週まで）で、その後の投与期間（約 4 週間）の体重増加量は対照群と同程度であり、2mg/kg/日群で摂餌量の低下を伴わなかったが、一方の 10mg/kg/日群では、ほぼ投与期間を通じて体重増加量の低値がみられ、摂餌量の低値も伴っていたことから、毒性所見とし、無毒性量を 2mg/kg/日と推定した。

機構は、投与 3 週まで体重増加量の低値が続いたことは一過性とは判断し難く、また、摂餌量の低値を伴うかどうかを基準に毒性学的意義を判断することは合理性に乏しいため、再度無毒性量の判断根拠について説明を求めた。

申請者は以下のように回答した。雄の 2mg/kg/日以上で体重増加量の低値が投与 3 週まで有意にみられたが、体重及び摂餌量の低値は対照群に比べ、それぞれ最大 3.3%及び 4.6%（1.4g）と軽度

な変化であり、Seg.I 試験と同投与経路のラット 4 週間皮下投与毒性試験では同様な変化はみられなかった。また、本所見は 13 週間静脈内投与毒性試験で認められたが、最終体重は対照群に比べ 4.3%と軽度な変化で、摂餌量の低値をほとんど伴わず（対照群との差は 6%（1.2g 以下））、臨床検査（血液・血液生化学的検査及び尿検査）、病理学的変化（剖検及び病理組織学的検査）のいずれにおいても特記すべき所見は認められなかったことから、無毒性量を 10mg/kg/日と推定した。以上より、Seg.I 試験の全投与群において、ラット反復投与試験成績も考慮すると、本所見の毒性学的意義はないものと判断し、申請時の無毒性量 2mg/kg/日を 10mg/kg/日に修正した。

申請者は体重増加量の低値は一過性であり、軽度と判断しているが、その判断基準が明確ではなく、本所見は 13 週間静脈内投与毒性試験の 10mg/kg/日群では投与 30 日以降に、ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験の 2mg/kg/日群では投与 3 週まで、10mg/kg/日群では投与期間を通じて認められており、最終報告書では 2mg/kg/日群以上で有意に低い体重増加がみられていることが記載されている。また、サル 13 週間静脈内投与試験では 2 mg/kg/日以上で一過性の体重若しくは摂餌量の低値が認められており、機構は、体重増加量の低値を毒性と捉えない合理的な根拠は回答されていないことから、申請者の回答は合理性に乏しいと判断した。ただし、本所見の発現機序は明確ではなく、臨床推定用量 0.05mg/kg/日の 40~200 倍に相当する用量での所見であり、その毒性学的評価をヒトでの安全性に外挿することは現時点では困難と考える。

以上のように、本薬の毒性試験全般で認められた本薬投与に関連する明確な毒性所見は出血性変化であり、臨床使用において、本薬が出血症状の増長及び出血を生じるおそれのあることは明確であることから、注意を要すると考える。（「4 (ii) <審査の概要> (5) 安全性について」参照）

4. 臨床に関する資料

(i) 臨床薬物動態及び臨床薬理の概要

<提出された資料の概略>

(1) 製剤間での生物学的同等性

濃度の異なる2種類の注射剤の生物学的同等性を検討する目的で、欧米人健康成人男性16例を対象に非盲検2期クロスオーバー試験が実施された（休薬期間：7日間）。本薬2.5mgが単回皮下投与され、標準製剤（臨床試験で使用した本薬10mg/mL注射剤：投与容量0.25mL）に対する試験製剤（市販予定の本薬5mg/mL注射剤：投与容量0.5mL）の平均値の比は、対数変換した本薬の C_{max} で1.07（90%信頼区間：1.03~1.11、以下同様）、定量可能な最終時点までのAUC（以下、 AUC_{0-last} ）で1.08（1.04~1.12）、 $AUC_{0-\infty}$ で1.06（1.03~1.09）であり、それぞれ幾何平均比の90%信頼区間が生物学的同等性の許容範囲内（0.8~1.25）であったため、生物学的に同等と判定された。

(2) ヒト生体試料を用いた *in vitro* 試験

1) 血漿蛋白結合

本薬の血漿蛋白結合率は 2 μ g/mL 以下では 97.0~98.6%であったが、本薬濃度の上昇に伴い低下し、50 μ g/mL では 80.7%であった。主な結合蛋白は ATIII で、本薬 0.5 μ g/mL での結合率は 97.4%であったが、5 μ g/mL では 72.2%以下となり、濃度の上昇に伴い低下した。一方、 α_1 -酸性糖蛋白質に対する結合率は 30.4~43.6%、 γ -グロブリンでは 32.1~40.8%、血清アルブミンでは 49.2~59.1%、ATIII を除去した血漿蛋白では 73.5~77.4%であり、いずれも結合率は

本薬濃度に依存しなかった。

2) ヒト胎盤・胎児移行性

正常満期ヒト胎盤の母体側動脈及び胎児側静脈から 37°C の Earle 液を 90 分間灌流し、本薬の胎盤・胎児移行性が検討された。本薬の母体側の灌流液中濃度が 2 μ g/mL の時、胎児側の静脈灌流液中の本薬濃度は定量限界 (0.032 μ g/mL) 未満であった。一方、胎盤を通過するアンチピリンでは、本薬の母体側の灌流液中濃度が 20 μ g/mL の時の胎盤移行率は 37% 以上であった。本試験における本薬濃度は、ヒトに本薬 10mg を反復皮下投与した時の C_{max} (1.52 μ g/mL) とほぼ同程度であったことから、臨床用量投与時に本薬はヒト胎盤を通過せず、胎児に移行しないと考えられた。

3) ヒト肝における *in vitro* 代謝

① ヒト肝ホモジネート上清での代謝

ヒト (男性 2 例、女性 1 例) の肝ホモジネート上清に本薬の 35 S 標識体 5.9 μ g/mL を添加し、37°C でインキュベートした時、上清中の抗 Xa 活性は 60 分後まで変化せず、本薬の 35 S 標識体の添加 60 分後の上清中には未変化体のみが認められ、代謝物は検出されなかった。以上から、ヒトでも動物と同様に本薬は肝ホモジネート上清で代謝されないことが示された。

② ヒト肝細胞での代謝

ヒト (男性 1 例) の肝細胞に本薬の 35 S 標識体 23.4 μ g eq./mL を添加し、37°C でインキュベートした時、培養液中の抗 Xa 活性は 180 分後まで変化せず、培養液中には未変化体のみが検出された。細胞抽出液中には未変化体及び 35 S 標識硫酸イオンが検出されたが、未変化体の脱硫酸体は検出されなかった。以上から、ヒト肝細胞で本薬はほとんど代謝されないと考えられた。

③ CYP の阻害作用

ヒト肝ミクロソームに CYP1A2、CYP2A6、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1 及び CYP3A4 分子種の基質を添加し、CYP の選択的阻害剤の存在下又は非存在下で本薬 200 μ mol/L (346 μ g/mL) を加えてインキュベートし、CYP 分子種に対する阻害作用を検討した結果、本薬は CYP2A6 活性のみを 17~28% 阻害した。本試験での本薬濃度はヒトに 10mg を皮下反復投与した時の C_{max} (1.52 μ g/mL) の約 230 倍であったことから、本薬が臨床で CYP に関連する薬物動態学的薬物相互作用を惹起する可能性は低いと考えられた。

(3) 健康成人における薬物動態

本薬の薬物動態試験は欧米人及び日本人を対象として単回投与試験 (皮下及び静脈内投与) 8 試験、反復投与試験 3 試験、薬物相互作用試験 6 試験の計 17 試験が実施された。以下に、日本人を対象とした試験を中心に示す。

1) 単回皮下投与試験

① 国内 TDU4089 試験

日本人健康成人男性 18 例に、本薬 0.75、2.5 及び 8mg を皮下投与した時、血漿中本薬濃度は投与 1.8~2 時間後に C_{max} に達し、それぞれ 0.127 \pm 0.015、0.335 \pm 0.030 及び 0.971 \pm 0.125mg/L (平均値 \pm 標準偏差、以下同様) であった。AUC_{0-last} は 1.40 \pm 0.387、5.15 \pm 0.905

及び $15.4 \pm 1.26 \text{ mg} \cdot \text{hr/L}$ であり、累積尿中排泄量（以下、 A_e ）は 0.498 ± 0.090 、 1.76 ± 0.085 及び $5.44 \pm 0.214 \text{ mg}$ であった。8mg 投与時の C_{\max} は用量比より低値であったが、 $AUC_{0-\text{last}}$ 及び A_e は用量比例的に増加した。腎 CL（以下、 CL_r ）は $4.6 \sim 5.5 \text{ mL/min}$ であり、 CL/F の $80 \sim 95\%$ を占めていた。また、 $t_{1/2}$ は $14 \sim 17$ 時間であり、2.5 及び 8mg 投与時の V_d/F は 7.8 及び 8.3 L であった。投与後 120 時間までの A_e は $76 \sim 81\%$ であり、その大部分が投与後 24 時間までに未変化体として回収された。2.5mg 皮下投与時の F ($AUC_{0-\infty}$ (皮下) / $AUC_{0-\infty}$ (静脈内点滴)) は 101% (95%信頼区間: $92 \sim 111\%$) であった。

② 国内 TDU4289 試験

日本人健康高齢男性 6 例 (69~79 歳、24 時間クレアチニン CL (以下、 CL_{cr}) $75.1 \sim 98.2 \text{ mL/min}$) に本薬 2.5mg を皮下投与した時、 C_{\max} は $0.314 \pm 0.118 \text{ mg/L}$ 、 t_{\max} は 2.3 時間 (中央値)、 $t_{1/2}$ は 17.8 ± 3.73 時間、 $AUC_{0-\text{last}}$ は $5.80 \pm 1.04 \text{ mg} \cdot \text{hr/L}$ であった。尿中から投与量の約 79% が未変化体として回収され、 CL/F の 83% が CL_r であり、 V_d/F は 7.8 L であった。

2) 反復皮下投与試験 (国内 PKM5053 試験)

日本人健康高齢者 24 例 (男性 12 例、女性 12 例: 66~80 歳、Cockroft and Gault の式により算出した推定 CL_{cr} $53 \sim 117 \text{ mL/min}$) に本薬 0.75、1.5、2.5 及び 3.0mg を 1 日 1 回 7 日間皮下投与した時、 C_{\max} は、それぞれ $0.110 \pm 0.021 \rightarrow 0.156 \pm 0.037$ (第 1 日 → 第 7 日、以下同様) $0.197 \pm 0.032 \rightarrow 0.277 \pm 0.043$ 、 $0.381 \pm 0.073 \rightarrow 0.516 \pm 0.093$ 及び $0.431 \pm 0.093 \rightarrow 0.577 \pm 0.104 \text{ mg/L}$ 、投与 24 時間後までの AUC (以下、 AUC_{0-24}) は、1.58 及び 2.03 (個別値) $\rightarrow 2.42 \pm 0.63$ 、 $2.82 \pm 0.36 \rightarrow 3.92 \pm 0.72$ 、 $4.80 \pm 0.69 \rightarrow 6.71 \pm 1.20$ 及び $5.60 \pm 0.98 \rightarrow 7.67 \pm 1.40 \text{ mg} \cdot \text{hr/L}$ であり、用量の増加に伴い上昇した。また、1 日 1 回の反復投与において第 3 日には定常状態に到達した。 t_{\max} 及び $t_{1/2}$ は投与量にかかわらずほぼ同様であり、それぞれ 1~2 及び 17~19 時間であった。男性の C_{\max} は女性に比べ 1.23 倍 (95%信頼区間: $1.10 \sim 1.38$) 高かったが、 AUC_{0-24} に有意差は認められなかった。なお、体重補正により、 C_{\max} の男女差は 1.08 倍 (95%信頼区間 $1.00 \sim 1.15$) と縮小した。

3) 単回静脈内投与試験

① 国内 TDU3085 試験

日本人健康成人男性 30 例に本薬 2、4、8、12 及び 16mg を静脈内投与した時、血漿中濃度推移は用量増加に伴う増加傾向を示したが、高用量 (12 及び 16mg) 群で用量比より低い傾向が認められ、CL 及び CL_r の増加が認められた。 $t_{1/2}$ 及び投与後 72 時間までの累積尿中排泄率は、それぞれ 13~15 時間及び 71~79% と、投与量による差は認められなかった。なお、尿中に抗 Xa 因子活性のある代謝物は検出されなかった。

② 国内 TDU3166 試験

日本人健康成人男性 9 例に本薬 8mg (6 例) 及びプラセボ (3 例) を 1 時間にわたって静脈内点滴投与した時、本薬の $t_{1/2}$ は約 13 時間、CL は約 7 mL/min 、 V_d は約 8 L であった。また、投与後 72 時間までの累積尿中排泄率は約 67%、 CL_r は約 5 mL/min であった。

4) 反復静脈内投与試験

① 国内 TDR3088 試験

日本人健康成人男性 9 例に本薬 8mg を 1 日 1 回 7 日間反復静脈内投与した時、第 1 日の AUC_{0-24} に対し第 7 日の AUC_{0-24} は約 1.3 倍であった。また、各日の投与後 5 分濃度及び投与直前濃度から、2 ～3 日後には定常状態に到達していると考えられ、消失半減期（約 12.5 時間）の値と一致した。反復投与後 24 時間までの累積尿中排泄率は 71%であった。

5) 特殊集団における薬物動態

① 腎機能が低下した成人における薬物動態（海外 63107 試験）

腎機能が正常及び腎機能が低下した欧米人成人男女 20 例に本薬 4mg を単回静脈内投与した時の薬物動態が検討された。腎機能正常 ($90\text{mL}/\text{min} < \text{CL}_{\text{cr}} \leq 140\text{mL}/\text{min}$)、軽度腎機能低下 ($60\text{mL}/\text{min} < \text{CL}_{\text{cr}} \leq 90\text{mL}/\text{min}$)、中等度腎機能低下 ($30\text{mL}/\text{min} < \text{CL}_{\text{cr}} \leq 60\text{mL}/\text{min}$) 及び重度腎機能低下 ($10\text{mL}/\text{min} \leq \text{CL}_{\text{cr}} \leq 30\text{mL}/\text{min}$) の被験者（各群 5 例）の CL は 7.82、5.22、3.35 及び $1.37\text{mL}/\text{min}$ 、 CL_r は 5.51、3.77、2.16 及び $0.54\text{mL}/\text{min}$ であり、いずれも腎機能の低下に伴い減少し、一方、 $t_{1/2}$ は 13.1、17.9、28.7 及び 71.5 時間と延長し、 $AUC_{0-\infty}$ は 7.6、11.5、18.3 及び $43.8\text{mg}\cdot\text{hr}/\text{L}$ と増加した。 C_{max} は 0.914、1.063、1.052 及び $1.009\text{mg}/\text{L}$ であった。以上から、本薬の排泄は腎機能に大きく依存すると考えられた。

腎機能重度低下者 2 例において、投与後 15 分に基準値を超える出血時間延長がみられたが、各投与群で一貫性のある変化はみられなかった。また、本薬投与による APTT の変動はみられなかった。

② 血液透析患者における薬物動態（海外 63113 試験）

慢性間欠性血液透析を要する欧米人成人 15 例（男性 2 例、女性 13 例）に、血液透析開始 5 分前に本薬 4、6、8 及び 10mg を単回静脈内投与した時、血液透析中（投与 0～4 時間後）の本薬の $t_{1/2}$ は 10～15 時間、血液透析後（投与 4 時間後以降）は 59～70 時間であり、また、血液透析中の AUC_{0-4} は、投与 4 時間後以降の $t_{1/2}$ から推定した血液透析後の AUC_{0-4} と比べ約 20%低かった。

本薬 4～10mg 静脈内投与時の血液透析開始 1 時間後の血漿中フィブリノペプチド A 濃度はダルテパリンナトリウム投与時に比べて有意に高かったが、血液透析終了時では本薬の高用量（8 及び 10mg）投与群とダルテパリンナトリウム投与群（個別に用量を設定）に有意差は認められず、血漿中トロンビン-ATⅢ複合体濃度（以下、TAT）も有意差は認められなかった。本薬は明らかなトロンビン生成阻害作用を示さず、PT 又は APTT への影響もみられなかった。

③ 肝機能障害患者における薬物動態（海外 63132 試験）

肝機能が正常及び中等度に低下（Child-Pugh スコア：7～9）した欧米人成人 16 例（男女各 8 例）に本薬 7.5mg を単回皮下投与した時、中等度肝機能低下者（男女各 4 例）では肝機能正常者（男女各 4 例）に比べ本薬の C_{max} は 22%、 $AUC_{0-\infty}$ は 39%低かった。中等度肝機能低下者の血漿中 ATⅢ濃度が低いことから、薬物濃度に影響した可能性が示唆され、血漿中 ATⅢ濃度のベースライン値を共変量として解析したところ、両群の薬物動態パラメータに有意差は認められなかった。また、本薬は腎排泄型であり、投与後 48 時間までの本薬の尿中排泄量及び尿中排泄率は類似していた。

肝機能正常者及び中等度肝機能低下者のいずれにも投与後 2 時間に APTT の延長がみられた（それぞれ 17 及び 14%）が、投与後 48 時間には前値に復した。また、血漿中 ATⅢ濃