

2. 4. 非臨床試験の概括評価

スイニー錠 100 mg

ベスコア錠 100 mg

第 2 部（モジュール 2）CTD の概要

2. 4. 非臨床試験の概括評価

株式会社三和化学研究所/興和株式会社

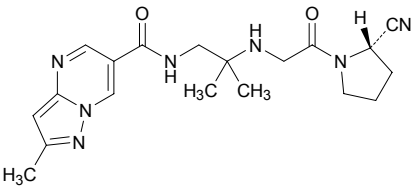
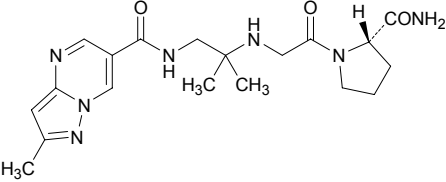
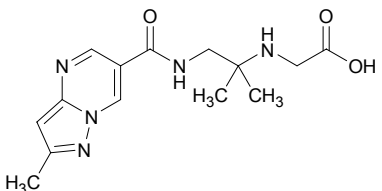
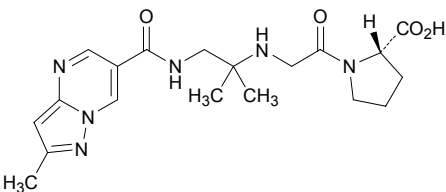
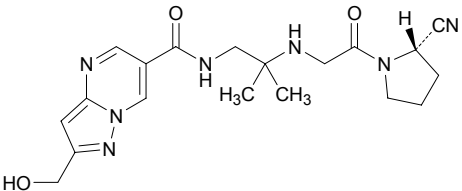
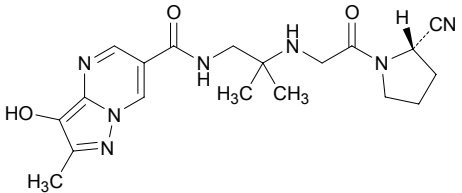
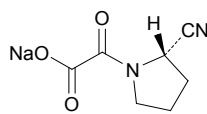
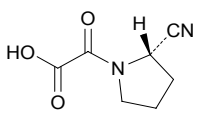
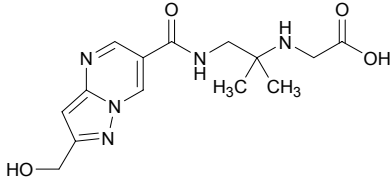
2. 4. 非臨床試験の概括評価

目 次

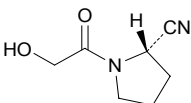
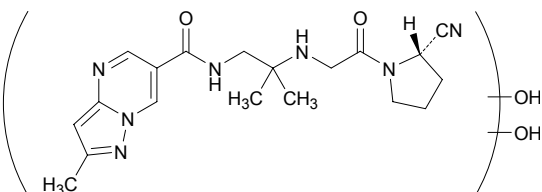
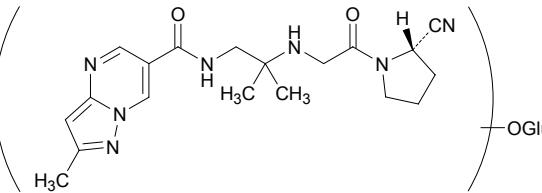
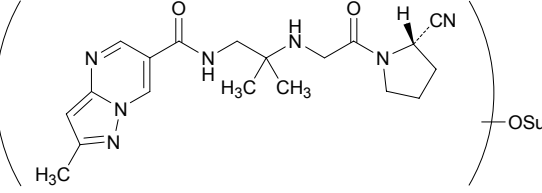
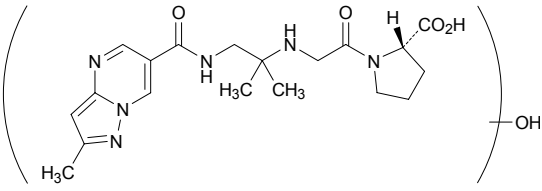

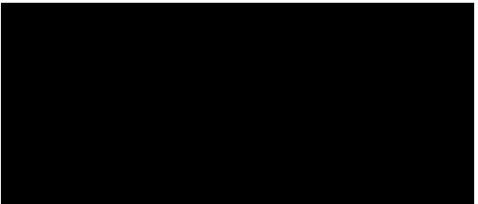
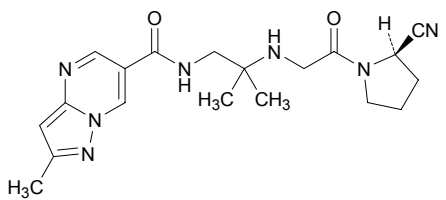
2. 4. 非臨床試験の概括評価	7
2. 4. 1. 非臨床試験計画概略	7
2. 4. 1. 1. 緒言	7
2. 4. 1. 2. 薬理試験	8
2. 4. 1. 3. 薬物動態試験	8
2. 4. 1. 4. 毒性試験	9
2. 4. 2. 薬理試験	10
2. 4. 2. 1. 効力を裏付ける試験	10
2. 4. 2. 2. 副次的薬理試験	15
2. 4. 2. 3. 安全性薬理試験	15
2. 4. 2. 4. 薬力学的薬物相互作用試験	19
2. 4. 3. 薬物動態試験	20
2. 4. 3. 1. 分析法	20
2. 4. 3. 2. 吸収	20
2. 4. 3. 3. 分布	21
2. 4. 3. 4. 代謝	22
2. 4. 3. 5. 排泄	24
2. 4. 3. 6. 薬物動態学的薬物相互作用試験	25
2. 4. 4. 毒性試験	27
2. 4. 4. 1. 単回投与毒性試験	27
2. 4. 4. 2. 反復投与毒性試験	27
2. 4. 4. 3. 遺伝毒性試験	35
2. 4. 4. 4. がん原性試験	35
2. 4. 4. 5. 生殖発生毒性試験	36
2. 4. 4. 6. その他の毒性試験	39
2. 4. 5. 総括及び結論	42
2. 4. 5. 1. 薬理試験	42
2. 4. 5. 2. 薬物動態試験	43
2. 4. 5. 3. 毒性試験	44
2. 4. 5. 4. まとめ	46
2. 4. 6. 参考文献一覧	47

2. 4. 非臨床試験の概括評価

アナグリプチン、代謝物及び類縁物質の構造一覧表

略称・略号	構造式	由来
アナグリプチン (未変化体, <i>S</i> 体)		原薬
SKL-12250 (プロリンアミド体)		代謝物
SKL-12277 (カルボン酸体)		代謝物
SKL-12320 (プロリン体)		代謝物
SKL-12339 (一水酸化体：2-ヒドロキシメチル体)		代謝物
SKL-13776 (一水酸化体：3-ヒドロキシメチル体)		代謝物
SKL-14687	1) ナトリウム塩 (合成標準品)  2) フリー体 	代謝物 (合成標準品はナトリウム塩, 代謝物はフリー体として表示)
SKL-14695		代謝物

2. 4. 非臨床試験の概括評価

略称・略号	構造式	由来
SKL-15451		代謝物
二水酸化体		代謝物
一水酸化体の グルクロン酸抱合体		代謝物
一水酸化体の硫酸抱合体		代謝物
SKL-12320 の一水酸化体		代謝物
SKL-06327		類縁物質
SKL-12309		類縁物質 原薬の分解生成物
SKL-13775 (エナンチオマー, <i>R</i> 体)		類縁物質 原薬のエナンチオマー

2. 4. 非臨床試験の概括評価

略号一覧表

略号	略号内容
ACE	アンジオテンシン I 変換酵素
APP	アミノペプチダーゼ P
AUC _{0-∞}	(0 から無限大時間までの) 濃度－時間曲線下面積
AUC _{0-t}	(0 から t 時間までの) 濃度－時間曲線下面積
BA	生物学的利用率
CL _p	全身血漿クリアランス
C _{max}	最高濃度
DNA	デオキシリボ核酸
DPP	ジペプチジルペプチダーゼ
FAP	Fibroblast activation protein α
GK ラット	Goto-Kakizaki ラット
GIP	グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド
GLP	Good Laboratory Practice
GLP-1	グルカゴン様ペプチド-1
hBCRP	ヒト乳がん耐性たん白
HEK293 細胞	Human embryo kidney 293 細胞
hERG	Human ether-a-go-go related gene
HIT-T15 細胞	Hamster insulinoma tumor-T15 細胞
hMDR1	ヒト多剤耐性たん白 1 (ヒト P 糖たん白)
hMRP	ヒト多剤耐性たん白
hOAT	ヒト有機アニオントランスポーター
hOCT	ヒト有機カチオントランスポーター
HPLC	高速液体クロマトグラフ
IC ₅₀	50%阻害濃度
IC ₈₀	80%阻害濃度
ICH	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
LAP	ロイシルアミノペプチダーゼ
LC/MS	液体クロマトグラフ／質量分析装置
LC/MS/MS	液体クロマトグラフ／タンデム質量分析装置
LLC-PK1 細胞	Lewis lung carcinoma porcine kidney 1 細胞
LSC	液体シンチレーションカウンター
OGTT	経口グルコース負荷試験
PAS	過ヨウ素酸シッフ
PK/PD	ファーマコキネティクス/ファーマコダイナミクス
POP	プロリルオリゴペプチダーゼ
PQ 間隔	心電図上の P 波の始めから Q 波の始めまでの間隔
PR 間隔	心電図上の P 波の始めから QRS 波の始めまでの間隔
QRS 時間	Q 波の始まりから S 波の終わりまでの時間
QT 間隔	心電図上の QRS 波の始めから T 波の終わりまでの間隔

2. 4. 非臨床試験の概括評価

略号	略号内容
QTc 間隔	心拍数で補正した心電図 QT 間隔
Rf 値	薄層クロマトグラフィーでのスポット移動率
RI-HPLC	放射能検出器付き高速液体クロマトグラフ
S9	ホモジネート 9000×g 上清画分
STZ	ストレプトゾトシン
$t_{1/2}$	消失半減期
T ₄	サイロキシン
TK	トキシコキネティクス
TLC	薄層クロマトグラフ
TSH	甲状腺刺激ホルモン
T _{max}	最高濃度到達時間
Vd _{ss}	定常状態における見かけの分布容積
ZDF ラット	Zucker Diabetic Fatty ラット

2. 4. 非臨床試験の概括評価

2. 4. 非臨床試験の概括評価

2. 4. 1. 非臨床試験計画概略

2. 4. 1. 1. 緒言

アナグリプチンは三和化学研究所が創薬し、経口投与が可能な2型糖尿病の治療剤として開発された新規DPP-4阻害剤である。

アナグリプチンの化学構造式を図2.4.1-1に示す。分子中に一つの不斉炭素原子を持ち、キラリティーを有することからS体とR体のエナンチオマーが存在するが、アナグリプチン自体はS体の化合物である。

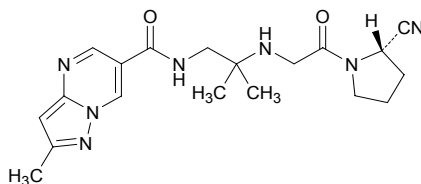


図 2. 4. 1-1 アナグリプチンの化学構造式

一般名：和名 アナグリプチン (JAN)

英名 anagliptin (INN), Anagliptin (JAN)

化学名：N-[2-({2-[(2S)-2-Cyanopyrrolidin-1-yl]-2-oxoethyl} amino)-2-methylpropyl]-2-methylpyrazolo[1,5-a]pyrimidine-6-carboxamide

分子式：C₁₉H₂₅N₇O₂

分子量：383.45

DPP-4 は生体内に広く分布するセリンプロテアーゼであり、インクレチンを含む種々の生理活性ペプチドに作用し、N末端から2番目のアラニン又はプロリンのC末側ペプチド結合を特異的に切断する[1][2]。インクレチンは消化管から分泌され、膵β細胞からのインスリン分泌を促進するペプチドホルモンの総称であり、小腸下部のL細胞から分泌されるGLP-1と小腸上部のK細胞から分泌されるGIPが知られている。これらはDPP-4によって分解されるが、DPP-4を阻害することによって内因性のインクレチン濃度は維持される。GLP-1及びGIPはいずれも、グルコース依存性にインスリン分泌を促進し、特にGLP-1はこの作用に加えて、インスリン生合成促進、グルカゴン分泌抑制、胃排出能抑制及び中枢性食欲抑制など、糖代謝の恒常性の維持に重要な役割を果たすことが明らかにされている[2][3]。また、動物モデルでは膵β細胞機能の改善効果も報告されている[4]。GLP-1は、生体内において、24時間を通して消化管から持続的に少量が分泌されているが、食事の摂取に伴って分泌量は速やかに増加し、血中のGLP-1濃度は上昇する。しかし、分泌されたGLP-1はDPP-4によって速やかに分解・不活化されるため、その血中半減期は2分以内と非常に短い[5][6][7][8]。

上述のように、GLP-1が多様な生理作用を示し、糖代謝と密接に関連していることから、糖尿病治療への臨床応用の可能性が検討された[9][10]。GLP-1及びGIPに関する基礎及び臨床研究から、インクレチン作用の増強を目的とするインクレチン関連薬の開発が進められた結果、現在ではDPP-4阻害剤とGLP-1受容体作動薬が2型糖尿病治療に使用されている[11]。

アナグリプチンは、強力な阻害活性と優れた選択性を有するDPP-4阻害剤として開発された。本薬は、経口投与によりDPP-4によるGLP-1の分解を抑制し、内因性のGLP-1濃度を上昇させることでその作用を増強し、2型糖尿病患者の血糖コントロールを改善することが期待された。そこで、アナグリプチンの2型糖尿病治療における有効性及び安全性を評価するため、*in vitro*及び*in vivo*の試験系を用いて種々の非臨床試験を行った。

2. 4. 非臨床試験の概括評価

2. 4. 1. 2. 薬理試験

効力を裏付ける試験として、*in vitro* 試験では、ラット、イヌ及びヒト由来の DPP-4 に対するアナグリプチンの阻害作用、阻害様式及び DPP-4 類縁酵素に対する選択性を評価し、既存の DPP-4 阻害剤と DPP-4 阻害作用及び酵素選択性を比較した。また、代謝物及びエナンチオマーを含む原薬の製造工程中に混入する可能性がある類縁物質の DPP-4 阻害作用、並びに主要代謝物の DPP-4 類縁酵素に対する阻害作用を評価した。*In vivo* 試験では、正常動物を用いて血漿 DPP-4 活性阻害作用及び血漿 GLP-1 濃度に対する作用を評価し、既存のインスリン分泌促進剤と絶食時血糖値に対する作用を比較した。また、正常動物及び種々の糖尿病モデル動物を用いて耐糖能改善作用を評価した。更に、糖尿病モデル動物及びインスリンノーマ細胞株を用いて膵β細胞に対する作用を評価した。

副次的薬理試験として、アナグリプチン及びヒトでの主代謝物である SKL-12320 の各種プロテアーゼ、受容体及びイオンチャネルに対する作用を確認した。また、DPP-4 はリンパ球表面抗原の CD26 と同一であり、T細胞活性化に関与するとされていることから[12]、アナグリプチンの免疫系に及ぼす作用を検討するため、リンパ球の活性化に対する作用を評価した。

安全性薬理試験として、中枢神経系、呼吸器系及び心血管系に及ぼす作用を検討した。また、毒性試験で影響が認められた腎/泌尿器系、胃腸管系及び自律神経系に及ぼす作用を検討した。なお、安全性薬理試験は ICH ガイドラインの S7A ; 「安全性薬理試験ガイドラインについて」(医薬審発第 902 号, 平成 13 年 6 月 21 日) 及び S7B ; ”The Non-Clinical Evaluation of the Potential for Delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals” (2005 年 5 月 12 日) に従い、「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」(厚生省令第 21 号, 平成 9 年 3 月 26 日) 及び関連省令に定められた基準 (GLP) に準拠して実施した。

薬力学的薬物相互作用試験として、α-グルコシダーゼ阻害剤であるミグリトール及びビッグアナイド剤であるメトホルミンとの併用効果を評価した。

なお、実施した *in vivo* 試験の投与経路は、持続的皮下投与を行った一試験を除き、臨床予定投与経路である経口投与とした。

2. 4. 1. 3. 薬物動態試験

非臨床薬物動態試験の吸収、分布、代謝及び排泄の評価は、「非臨床薬物動態試験ガイドラインについて」(医薬審第 496 号, 平成 10 年 6 月 26 日) 及び「反復投与組織分布試験ガイドラインについて」(薬審第 442 号, 平成 8 年 7 月 2 日) に従い、^{[14]C} アナグリプチンを用いて実施した。試験は主に薬理試験及び毒性試験で使用された動物種であるラット、イヌ及びサルを用いて評価した。更に、毒性試験で使用されたマウス及びウサギの代謝物も評価し、種差を検討した。また、ヒト試料も用いて、血清たん白結合率、血球移行率、代謝及び酵素誘導を *in vitro* にて評価し、動物とヒトとの種差を検討した。

薬物相互作用の評価は、「薬物相互作用の検討方法について」(医薬審発第 813 号, 平成 13 年 6 月 4 日) に従い、ヒト試料を用いてチトクローム P450 に対する相互作用及び P 糖たん白に対する相互作用を *in vitro* にて評価した。更に、20●●年●月●日に実施した医薬品第Ⅱ相試験終了後相談(1.13.2.3.項)における医薬品医療機器総合機構の意見に従い、腎トランスポーターに対する相互作用を *in vitro* にて評価した。

2.4. 非臨床試験の概括評価

2.4.1.4. 毒性試験

毒性試験は、ICH ガイドラインの M3 ; 「医薬品の臨床試験のための非臨床安全性試験の実施時期についてのガイドライン」(医薬審第 1019 号, 平成 10 年 11 月 13 日, 一部改定 医薬審第 1831 号, 平成 12 年 12 月 27 日) 及び「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」(薬食審査発 0219 第 4 号, 平成 22 年 2 月 19 日), 並びに安全性に関する他の ICH ガイドラインに基づき計画した。主要な毒性試験はすべて GLP に従って実施した。

試験は、ラット、イヌ及びサルを用いた単回投与毒性試験及び反復投与毒性試験, *in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験, マウス及びラットを用いたがん原性試験, 並びにラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験を実施した。更に、抗原性試験及び免疫毒性試験を実施した。代謝物の毒性評価として, *in vitro* 遺伝毒性試験を実施した。また, 不純物(原薬の分解生成物)の評価として, ラットを用いた反復投与毒性試験及び *in vitro* 遺伝毒性試験を実施した。その他, 各動物種を用いた毒性発現の機序に関する試験を実施した。

2. 4. 非臨床試験の概括評価

2. 4. 2. 薬理試験

2. 4. 2. 1. 効力を裏付ける試験

(1) DPP-4 阻害作用 (*in vitro* 試験)

アナグリプチンのラット、イヌ及びヒト DPP-4 活性に対する阻害作用を評価した。

アナグリプチンは、ラット、イヌ及びヒト由来のDPP-4 活性を濃度に依存して阻害した。ラット及びイヌ血漿DPP-4 に対するIC₅₀値は、それぞれ 5.8 及び 6.4 nmol/Lを示した。ヒト血漿、ヒト腸管上皮細胞株Caco-2 細胞分画DPP-4 及びヒト組換えDPP-4 に対するIC₅₀値は、それぞれ 5.4, 3.5 及び 3.3 nmol/Lを示した。アナグリプチンは、いずれのDPP-4 に対してもほぼ同程度の阻害作用を示した。また、各種DPP-4 に対する阻害作用を類薬のビルダグリプチン及びシタグリプチンと比較した。その結果、アナグリプチンのDPP-4 阻害作用 (IC₅₀値=3.3 ~6.4 nmol/L) は、ビルダグリプチン (IC₅₀値=2.5~4.2 nmol/L) とほぼ同程度であり、シタグリプチン (IC₅₀値=14.8~40.3 nmol/L) に比べて強かった (表 2.4.2-1, 2.6.2.2.1項)。

表 2. 4. 2-1 ラット、イヌ及びヒト由来 DPP-4 に対するアナグリプチン、ビルダグリプチン並びにシタグリプチンの阻害作用

DPP-4 由来	IC ₅₀ (nmol/L)		
	アナグリプチン	ビルダグリプチン	シタグリプチン
ラット血漿	5.8 ± 0.4	3.0 ± 0.7	40.3 ± 5.3
イヌ血漿	6.4 ± 0.1	4.2 ± 0.1	17.9 ± 1.2
ヒト血漿	5.4 ± 0.2	3.7 ± 0.1	21.5 ± 1.1
Caco-2 細胞分画	3.5 ± 0.3	2.6 ± 0.3	14.9 ± 0.9
ヒト組換え	3.3 ± 0.3	2.5 ± 0.3	14.8 ± 0.6

平均値±標準偏差 (n=3)

[資料 4.2.1.1-1, 4.2.1.1-2, 4.2.1.1-3 より引用, 改変]

アナグリプチンは、時間及び濃度に依存して DPP-4 を阻害し、残存する DPP-4 活性の時間推移から slow-binding inhibitor であることが示された。また、活性測定用基質を含む緩衝液で希釈した酵素-阻害剤複合体の DPP-4 活性が、時間の経過に伴い回復したことから、アナグリプチンと DPP-4 の結合は可逆的であった。更に、アナグリプチンはヒト組換え DPP-4 を競合的に阻害した (2.6.2.2.2項)。

(2) 酵素選択性

DPP-4 にはDPP-8, DPP-9 及びFAPなど、多くの類縁酵素が存在する[1][2][13][14]。ラット及びイヌで認められたDPP-4 阻害剤による種々の毒性発現について、DPP-8/9 阻害の関与が報告されている[15]。一方、これらの毒性発現には、別の機序が関与するとの報告もある[16]。DPP-8/9 阻害による毒性発現の詳細に加えて、その臨床的意義も明らかとなっていないが、DPP-4 類縁酵素に対する選択性は、DPP-4 阻害剤の安全性に影響を及ぼす可能性が示唆される。そこで、DPP-4 類縁酵素であるDPP-8, DPP-9, FAP, DPP-2, POP, APP, prolidase, ACE 及びLAPに対するアナグリプチンの阻害作用を評価した。

各種のDPP-4 類縁酵素に対するIC₅₀値は、DPP-8 で 84.7 µmol/L, DPP-9 で 56.1 µmol/L, FAP で 72.7 µmol/L, DPP-2 で 176.7 µmol/L及びPOPで 229.2 µmol/Lであった。APP, prolidase, ACE

2. 4. 非臨床試験の概括評価

及びLAPに対しては、阻害作用を示さなかった (IC_{50} 値 $>500 \mu\text{mol/L}$)。アナグリプチンのDPP-4 類縁酵素に対する IC_{50} 値をヒト組換えDPP-4 に対する IC_{50} 値と比較すると、最も低い値を示したDPP-9 に対する IC_{50} 値でも 17,000 倍となり、アナグリプチンはDPP-4 に対して高い選択性を示した。また、酵素選択性をビルダグリプチン及びシタグリプチンと比較すると、アナグリプチンでは 17,000 倍以上 (DPP-9) であったのに対し、ビルダグリプチンでは 440 倍以上 (DPP-9) を示し、シタグリプチンでは 5,730 倍以上 (DPP-8) であった (表 2.4.2-2, 2.6.2.2.3. 項)。

したがって、アナグリプチンは、ビルダグリプチン及びシタグリプチンよりも酵素選択性の優れた DPP-4 阻害剤であった。

表 2. 4. 2-2 DPP-4 類縁酵素に対するアナグリプチン、ビルダグリプチン並びにシタグリプチンの阻害作用

	IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$)		
	アナグリプチン	ビルダグリプチン	シタグリプチン
DPP-8	84.7 ± 9.8 [25,700]	6.4 ± 0.8 [2,560]	84.8 ± 11.6 [5,730]
DPP-9	56.1 ± 5.3 [17,000]	1.1 ± 0.1 [440]	299.4 ± 17.1 [20,200]
FAP	72.7 ± 1.2 [22,000]	54.6 ± 0.5 [21,800]	>500
DPP-2	176.7 ± 16.1 [53,500]	>500	129.3 ± 4.5 [8,740]
POP	229.2 ± 31.8 [69,500]	>500	>500
APP	>500	>500	>500
Prolidase	>500	>500	>500
ACE	>500	>500	>500
LAP	>500	>500	>500

平均値 \pm 標準偏差 (n=3, ただし $IC_{50}>500 \mu\text{mol/L}$ の場合はn=1)

[] 内の値は各 IC_{50} 値をヒト組換えDPP-4 に対する IC_{50} 値を 1 として比較した相対強度とし、次式に従って算出した：相対強度=DPP-4 類縁酵素に対する IC_{50} /ヒト組換えDPP-4 に対する IC_{50}

[資料 4.2.1.1-5, 4.2.1.1-6 より引用, 改変]

(3) DPP-4 阻害作用 (*in vivo* 試験)

絶食した正常ラット及びイヌにアナグリプチン (0.3~100 mg/kg 及び 0.3~30 mg/kg) を単回経口投与して経時的に採血を行い、血漿 DPP-4 活性及び血漿中アナグリプチン濃度を測定した。

アナグリプチンは、用量に依存して血漿 DPP-4 活性を阻害し、その阻害作用は血漿中のアナグリプチン濃度の増加に伴い増大した (2.6.2.2.4.項, 2.6.2.2.5.項)。

また、DPP-4 阻害剤の血漿中薬物濃度と血漿DPP-4 活性阻害率の関係 (PK/PD) について、血漿DPP-4 活性阻害率が約 80%又はそれ以上であるとき、OGTT後の血漿活性型GLP-1 濃度が約 2~3 倍に上昇し、血糖上昇抑制作用がほぼ最大となることが示唆されている[17][18]。そこで、ラット及びイヌにおけるPK/PD解析を行った結果、ラットの IC_{50} 値及び IC_{80} 値は、それぞれ 25.7 nmol/L (9.85 ng/mL) 及び 81.4 nmol/L (31.2 ng/mL) であった (2.6.2.2.4.項)。また、イヌの IC_{50} 値及び IC_{80} 値は、それぞれ 8.9 nmol/L (3.41 ng/mL) 及び 27.7 nmol/L (10.6 ng/mL) であった (2.6.2.2.5.項)。

アナグリプチンは、3 mg/kg以上で正常ラットの血漿DPP-4 活性を投与後 2 時間まで 80%以

2. 4. 非臨床試験の概括評価

上阻害し [2.6.2.2.4.(1)項], OGTT後の血糖上昇を対照群に比べて有意に抑制した (2.6.2.2.8.項)。したがって、血漿DPP-4 活性を約 80%以上阻害するアナグリプチンの 3 mg/kgで血糖上昇抑制作用が最大となることから、血糖上昇に対する最大効果が発揮されるには、血漿中アナグリプチン濃度が少なくともIC₈₀値以上となる必要があると考えられた[18]。なお、第I相単回投与試験で行ったPK/PD解析の結果、ヒトのIC₅₀値及びIC₈₀値は、それぞれ 3.34 ng/mL及び 26.1 ng/mLであった。同試験において、アナグリプチンは、50～200 mgの用量で投与後 4 時間までのDPP-4 活性を 80%以上阻害し、血漿活性型GLP-1 濃度をプラセボと比較して約 2 倍以上に上昇させた (2.7.2.3.4.項)。

正常ラットにアナグリプチン (3, 30 及び 100 mg/kg/日) を 1 日 1 回 6 週間反復経口投与したところ、用量に依存して血漿 DPP-4 活性を阻害し、投与後 2, 4 及び 6 週間の作用は初回投与時の作用と比較してほぼ同等であった。正常ラットにおいて、アナグリプチンの反復投与による効果の減弱は認められなかった [2.6.2.2.4.(3)項]。

(4) 糖質負荷後の GLP-1 濃度に対する作用

インクレチンは、食事の摂取に伴い分泌が増加することから、糖質負荷後の GLP-1 濃度に対するアナグリプチンの作用を評価した。

絶食した正常ラットにアナグリプチン (3 mg/kg) を単回経口投与し、糖質としてスターチを経口負荷した。経時的に採血を行い、血漿活性型 GLP-1 濃度を測定し、併せて血漿グルコース濃度及び血漿 DPP-4 活性も測定した。アナグリプチンは、経口スターチ負荷後の血漿活性型 GLP-1 濃度を著明に上昇させた。血漿活性型 GLP-1 濃度はスターチ負荷後 30 分に最高濃度に達し、対照群では負荷直前に比べて 2 倍に上昇したのに対し、アナグリプチンでは 12 倍に上昇した。このとき、アナグリプチンは、スターチ負荷後の血漿グルコース濃度上昇を対照群に比べて有意に抑制し、血漿 DPP-4 活性を 80%以上阻害した (2.6.2.2.6.項)。

(5) 絶食時血糖値に対する作用

インクレチンによる膵β細胞からのインスリン分泌は、グルコース依存的である。したがって、アナグリプチンは、血糖値が高い場合には血糖降下作用を示し、低い場合には作用しないと考えられた。一方、既存のインスリン分泌促進剤は DPP-4 阻害剤と異なり、グルコース非依存性にインスリン分泌を促進する。そこで、絶食時血糖値に対するアナグリプチン及びインスリン分泌促進剤の作用を比較した。

絶食した正常ラットにアナグリプチン (3 及び 30 mg/kg)、インスリン分泌促進剤のナテグリニド (50 及び 100 mg/kg) 及びグリベンクラミド (1 及び 3 mg/kg) を単回経口投与して経時的に採血を行い、血漿グルコース濃度を測定した。ナテグリニド及びグリベンクラミドは絶食時の血漿グルコース濃度を更に低下させたが、アナグリプチンは 30 mg/kg においてもほとんど影響を及ぼさなかった (2.6.2.2.7.項)。

(6) 耐糖能改善作用

インクレチンは、グルコース依存的に膵β細胞からのインスリン分泌を促進し、血糖コントロールを改善する。また、アナグリプチンは、単回投与により血漿 DPP-4 活性を阻害し、糖質負荷後の血漿活性型 GLP-1 濃度を上昇させた。そこで、正常ラット、肥満・インスリン

2. 4. 非臨床試験の概括評価

抵抗性モデル動物の Zucker fatty ラット及び非肥満2型糖尿病モデル動物の GK ラットを用いて、OGTT 後の血糖上昇及びインスリン分泌に対する作用から、アナグリプチンの耐糖能改善作用を評価した。

正常ラットの OGTT におけるアナグリプチンの単回経口投与（0.3～30 mg/kg）は、グルコース負荷後 15 分から 60 分の血漿グルコース濃度の上昇を抑制し、3 mg/kg 以上で明らかな抑制効果を示した。また、グルコース負荷後 0 分から 120 分までの血漿グルコース濃度の AUC の増加を抑制し、3 mg/kg 以上で有意な抑制作用を示した（2.6.2.2.8.項）。

Zucker fatty ラットの OGTT におけるアナグリプチンの単回経口投与（1, 3 及び 10 mg/kg）は、グルコース負荷後 0 分から 120 分までの血漿インスリン濃度の AUC を増加させ、血漿グルコース濃度変化量の AUC を用量に依存して減少させた（2.6.2.2.9.項）。

GK ラットの OGTT におけるアナグリプチンの単回経口投与（1, 3 及び 10 mg/kg）は、用量に依存してグルコース負荷後 0 分から 120 分までの血漿インスリン濃度の AUC を用量に依存して増加させ、3 mg/kg 以上で血漿グルコース濃度変化量の AUC を有意に減少させた（2.6.2.2.10.項）。

（7） 膵β細胞に対する作用

GLP-1 は膵β細胞の増殖促進作用及び細胞死抑制作用を有し、DPP-4 阻害剤においても、膵β細胞量の増加やβ細胞/α細胞比の正常化などの作用が報告されている[19][20][21]。そこで、膵β細胞を選択的に障害する薬剤を静脈内投与して作製した実験的糖尿病モデル動物を用いた *in vivo* 試験、及びインスリンノーマ細胞株を用いた *in vitro* 試験を行って、アナグリプチンの膵β細胞に対する作用を評価した。

STZ 誘発糖尿病ラットにおける浸透圧ポンプを用いたアナグリプチンの4週間持続的皮下投与（75 及び 500 µg/h）は、膵臓インスリン含量及び膵β-cell mass を用量に依存して増加させ、500 µg/h で対照群に比べて有意であった。アナグリプチンの投与により、血漿 DPP-4 活性は用量に依存して阻害され、投与開始後4週間における阻害率は75 µg/h で約80%を示し、500 µg/h で約85%であった。また、血漿中アナグリプチン濃度は、500 µg/h では75 µg/h と比較して約6倍高値を示した。更に、血漿活性型 GLP-1 濃度にも用量に依存した上昇が認められ、いずれの用量も対照群に比べて有意に上昇した。一方、血漿グルコース濃度及び糖化ヘモグロビン値には、対照群と比べて低下する傾向が認められたが、その差は有意ではなかった [2.6.2.2.11.(1)項]。

アロキサン誘発糖尿病マウスを用いたアナグリプチンの4週間反復飲水投与は、0.5 mg/mL（平均1日投与量：219 ± 51 mg/kg/日）において、膵臓インスリン含量を対照群に比べて有意に増加させ、糖化ヘモグロビン値を対照群に比べて有意に低下させた。一方、随時及び食後血漿グルコース濃度には、対照群と比較して有意な差は認められなかった [2.6.2.2.11.(2)項]。また、1.0 mg/mL（384 ± 167 mg/kg/日）投与において、膵β-cell mass を対照群に比べて有意に増加させ、随時及び食後血漿グルコース濃度、並びに糖化ヘモグロビン値を対照群に比べて有意に低下させた [2.6.2.2.11.(2)項]。

糖尿病モデル動物を用いた *in vivo* 試験を実施した結果、アナグリプチンによる膵臓インスリン含量及び膵β細胞量の増加が認められた。以上の結果から、アナグリプチンは、既存の DPP-4 阻害剤及び GLP-1 受容体作動薬と同様に、膵β細胞に対して保護作用を発揮する可能

2.4. 非臨床試験の概括評価

性が示唆された。

また、ハムスター膵β細胞由来インスリノーマ細胞株 HIT-T15 を用いた *in vitro* 試験を実施した結果、アナグリプチン (0.1~10 nmol/L) は GLP-1 (10 pmol/L) 共存下で、HIT-T15 細胞の増殖を対照群に比べて有意に増加させた [2.6.2.2.11.(3)項]。

(8) 代謝物及び類縁物質の DPP-4 阻害作用 (*in vitro* 試験)

アナグリプチンの代謝物及び原薬の製造工程中に混入する可能性がある類縁物質の薬理作用を検討するため、ヒトでの主代謝物である SKL-12320 (プロリン体)、SKL-12320 以外に動物で比較的多く認められた 5 種類の代謝物、及びアナグリプチンのエナンチオマーを含む 3 種類の類縁物質の DPP-4 に対する阻害作用を評価した。また、SKL-12320 及び SKL-14687 (アミンに隣接するメチレンが酸化された代謝物のナトリウム塩) については、DPP-4 類縁酵素 (DPP-8, DPP-9, FAP, DPP-2, POP, APP, prolidase, ACE 及び LAP) に対する阻害作用も評価した。

代謝物の SKL-12320 及び SKL-14687 は、ヒト組換え DPP-4 及び類縁酵素に対して阻害作用を示さなかった (IC_{50} 値 > 500 μ mol/L) (表 2.6.2.2-7)。その他の代謝物のヒト組換え DPP-4 に対する IC_{50} 値は、SKL-12250 (プロリンアミド体) で 1,700 nmol/L, SKL-12339 (一水酸化体: 2-ヒドロキシメチル体) で 3.1 nmol/L, SKL-13776 (一水酸化体: 3-ヒドロキシメチル体) で 3.4 nmol/L を示したが、SKL-12277 (カルボン酸体) は阻害作用を示さなかった (IC_{50} 値 > 500 μ mol/L) (表 2.6.2.2-8)。

類縁物質の SKL-06327, SKL-12309 及びアナグリプチン (S 体) のエナンチオマーである SKL-13775 (R 体) は、ヒト組換え DPP-4 に対して阻害作用を示さなかった (IC_{50} 値 > 500 μ mol/L) (表 2.6.2.2-8)。

[14 C] アナグリプチンを動物 (マウス, ラット, ウサギ, イヌ及びサル) に経口投与したとき、血漿中では主に未変化体として存在した。また、血漿中代謝物として多数の化合物が検出されたが、特に濃度が高い代謝物は認められなかった (図 2.4.3-1)。これらの代謝物のうち、SKL-12320, SKL-14687 及び SKL-12277 は DPP-4 を阻害しなかったが、SKL-12339 及び SKL-13776 はアナグリプチンと同等の阻害作用を示し、SKL-12250 は 1/515 倍の阻害活性であった (表 2.6.2.2-7, -8)。一方、[14 C] アナグリプチンをヒトに経口投与したとき、血漿には主として未変化体が存在し、主代謝物は SKL-12320 であり、その他の代謝物の生成量はいずれも投与量の 1% 未満であった。また、SKL-12320 の C_{max} 及び AUC は未変化体より低かった (2.7.6.3.3.項)。更に、SKL-12320 の DPP-4 阻害以外の薬理作用を副次的薬理試験 (2.6.2.3.1.項, 2.6.2.3.2.項) 及び安全性薬理試験 [2.6.2.4.3.(5)項] で検討したところ、臨床的に意味のある作用は認められなかった。

アナグリプチンは、分子中に一つの不斉炭素原子を持ち、キラリティーを有することから S 体と R 体のエナンチオマーが存在する (図 2.4.1-1)。R 体は DPP-4 を阻害しなかったことから、アナグリプチンの DPP-4 阻害活性には S 体の配置が必要であることが示唆された。

以上の結果から、アナグリプチンの代謝物及び類縁物質が薬理作用の発現に寄与し、臨床問題となる影響を及ぼす可能性はほとんどないものと考えられた。

2. 4. 非臨床試験の概括評価

(9) 作用機序

一連の *in vitro* 及び *in vivo* の試験系による評価から、アナグリプチンの作用機序は以下のよう考える。

アナグリプチンは、可逆的に DPP-4 と結合して DPP-4 のペプチダーゼ活性を選択的に阻害し (2.6.2.2.1.～5.項), GLP-1 の分解を抑制することで内因性の活性型 GLP-1 濃度を上昇させ (2.6.2.2.6.項), グルコース依存的にインスリン分泌を促進して血糖上昇抑制作用を発揮し, 血糖コントロールを改善する (2.6.2.2.7.～10.項)。また, 膵 β 細胞に対して保護作用を発揮する可能性がある (2.6.2.2.11.項)。

2. 4. 2. 2. 副次的薬理試験

DPP-4 阻害以外の薬理作用を示す可能性を検討するため, アナグリプチン及びヒトでの主代謝物である SKL-12320 の各種プロテアーゼ, 受容体及びイオンチャネルに対する阻害作用を確認した。その結果, アナグリプチン及び SKL-12320 は 500 $\mu\text{mol/L}$ まで, いずれのプロテアーゼの酵素活性に対しても 50%以上の阻害作用を示さなかった (2.6.2.3.1.項)。また, アナグリプチン及び SKL-12320 は 10 $\mu\text{mol/L}$ で, いずれの受容体及びイオンチャネルと特異的リガンドとの結合に対しても 50%以上の阻害作用を示さなかった (2.6.2.3.2.項)。

アナグリプチンの免疫系に及ぼす作用を検討するため, マウス脾細胞由来リンパ球 (T 細胞及び B 細胞) の活性化に対する作用を評価した。その結果, アナグリプチンは 50 $\mu\text{mol/L}$ で, 抗 CD3 ϵ 抗体刺激による T 細胞の増殖及び LPS 刺激による B 細胞の増殖に対して 50%以上の阻害作用を示さなかった (2.6.2.3.3.項)。したがって, アナグリプチンによる DPP-4 酵素活性阻害は, DPP-4 の表面抗原 CD26 としての作用に影響を及ぼさないことが示唆された。また, ラットを用いた 4 週間反復経口投与による免疫毒性試験において, アナグリプチンは免疫毒性を示さないことが確認されている (2.6.6.8.2.項)。

第I相反復投与試験の最終投与時の結果より, 最高臨床用量である 1 回 200 mg を 1 日 2 回反復経口投与したときの血漿中アナグリプチン及びSKL-12320 (分子量 402.45) の C_{max} は, それぞれ 1,200 ng/mL (3.1 $\mu\text{mol/L}$) 及び 162 ng/mL (0.40 $\mu\text{mol/L}$) であった (2.7.6.3.2. 表 3.2-4)。種々のプロテアーゼ, 受容体及びイオンチャネル, 並びにリンパ球の活性化に対する 50%以上の阻害作用が認められなかったアナグリプチンの濃度は, それぞれ 500 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$ 及び 50 $\mu\text{mol/L}$ であり, 最高臨床用量 (1 回 200 mg, 1 日 2 回) におけるヒト血漿中アナグリプチンの C_{max} と比較すると, それぞれ約 161 倍, 3 倍及び 16 倍の乖離が認められた。同様に, SKL-12320 の 500 及び 10 $\mu\text{mol/L}$ は, 最高臨床用量 (1 回 200 mg, 1 日 2 回) におけるヒト血漿中SKL-12320 の C_{max} と比較して, それぞれ約 1,250 倍及び 25 倍であった。

以上の結果から, アナグリプチンは DPP-4 に対する高い選択性を特徴とし, 臨床用量において, DPP-4 阻害以外の他の標的分子に対する作用に起因した薬理作用を示す可能性は低いと推察された。

2. 4. 2. 3. 安全性薬理試験

(1) 中枢神経系に及ぼす作用

ラットにアナグリプチン (500, 1000 及び 2000 mg/kg) を単回経口投与し, Irwin の変法に準じて一般症状及び行動観察を行って, 中枢神経系に及ぼす作用を検討した。その結果, 1000

2. 4. 非臨床試験の概括評価

及び 2000 mg/kg において、縮瞳以外の一般症状及び行動に異常及び変化は認められなかった。500 mg/kg ではすべての観察項目に異常及び変化は認められなかった。縮瞳が 1000 mg/kg 以上で認められたが、瞳孔反射は消失していなかったことから、末梢神経系への作用が示唆された (2.6.2.4.1.項)。

したがって、アナグリプチンは 2000 mg/kg まで、ラットの中樞神経系に作用を及ぼさないと考えられた。

第I相反復投与試験の最終投与時の結果より、最高臨床用量である 1 回 200 mg を 1 日 2 回反復経口投与したときの血漿中アナグリプチンの C_{max} 及び AUC_{0-24h} は、それぞれ 1,200 ng/mL 及び 9.46 µg·h/mL と推定された (2.7.6.3.2. 表 3.2-4, ただし、 AUC_{0-24h} は最終投与が単回のため 2 倍値とした)。一方、ラット 4 週間反復投与毒性試験の初回投与時の結果より、雄性ラットに 600 mg/kg/日 を投与したときの血漿中アナグリプチンの C_{max} 及び AUC_{0-24h} は、それぞれ 143 µg/mL 及び 376 µg·h/mL であった (2.6.7.7A.項)。本試験で縮瞳が発現しなかった 500 mg/kg における曝露量が、ラット 4 週間反復投与毒性試験の 600 mg/kg/日 初回投与時の曝露量を下回るものと推定されることから、最高臨床用量 (1 回 200 mg, 1 日 2 回) におけるヒト推定曝露量と比較すると、 C_{max} で 119 倍以上、 AUC_{0-24h} で 40 倍以上の乖離が認められた。更に、第I相単回及び反復投与試験において瞳孔径検査を実施したが、臨床上問題となる所見は認められていない (2.7.6.3.1.項, 2.7.6.3.2.項)。

(2) 呼吸器系に及ぼす作用

ラットにアナグリプチン (500, 1000 及び 2000 mg/kg) を単回経口投与し、呼吸数, 1 回換気量及び分時換気量を測定した。その結果, 2000 mg/kg まで, いずれの測定項目もアナグリプチンの投与に起因する明らかな作用は認められなかった (2.6.2.4.2.項)。

したがって、アナグリプチンは 2000 mg/kg まで、呼吸器系に作用を及ぼさないと考えられた。

(3) 心血管系に及ぼす作用

1) hERG チャネル発現細胞を用いた hERG 電流に及ぼす作用

hERG チャネルを安定発現させたヒト胎児腎細胞株 HEK293 にアナグリプチン (30, 100 及び 300 µg/mL) を適用し、hERG 電流に及ぼす作用を検討した。その結果, 100 µg/mL 以上で有意な抑制作用を示した。30, 100 及び 300 µg/mL における hERG 電流に対する阻害率は、それぞれ 2.6, 12.6 及び 35.8% であった [2.6.2.4.3.(1)項, 表 2.6.2.4-1]。

したがって、アナグリプチンは 30 µg/mL まで、hERG 電流に作用を及ぼさないと考えられた。

2) モルモット摘出乳頭筋を用いた心筋活動電位持続時間に及ぼす作用

モルモット摘出乳頭筋標本にアナグリプチン (30, 100 及び 300 µg/mL) を適用し、静止膜電位 (RMP), 活動電位振幅 (APA), 最大立ち上がり速度 (V_{max}), 30%, 50% 及び 90% 再分極時活動電位持続時間 (APD_{30} , APD_{50} 及び APD_{90}), 並びに APD_{90} と APD_{30} との差 (APD_{30-90}) を測定した。その結果, 100 µg/mL で APD_{30-90} 相対値の高値が認められ, 300 µg/mL で APA, V_{max} , APD_{30} , APD_{50} 及び APD_{90} 相対値の低値, 並びに APD_{30-90} 相対値の高値が認められた。

2.4. 非臨床試験の概括評価

[2.6.2.4.3.(2)項, 表 2.6.2.4-2]。

したがって、アナグリプチンは 30 µg/mL まで、モルモット摘出乳頭筋の活動電位に作用を及ぼさないと考えられた。

3) 無麻酔イヌを用いた心血管系に及ぼす作用

無麻酔イヌにアナグリプチン (30, 100 及び 300 mg/kg) を単回経口投与し、血圧 (収縮期血圧, 拡張期血圧及び平均血圧), 心拍数及び心電図パラメータ (PQ 間隔, QRS 時間, QT 間隔及び QTc 間隔) に及ぼす作用を検討した。その結果, 300 mg/kg まで, 血圧及び心拍数に作用を及ぼさなかった。心電図パラメータに対して, 300 mg/kg で投与後 1~6 時間に有意な QRS 時間の延長が認められたが, 投与後 24 時間には回復する可逆性の変化であった。一方, 30 及び 100 mg/kg では QRS 時間に対する作用は認められなかった。また, その他の心電図パラメータ (PQ 間隔, QT 間隔及び QTc 間隔) には, いずれの用量も作用を及ぼさなかった [2.6.2.4.3.(3)項, 表 2.6.2.4-3]。

したがって、アナグリプチンは 100 mg/kg まで、イヌの心血管系に作用を及ぼさないと考えられた。

4) 心血管系に及ぼす作用について

In vitro 電気生理学的試験による検討では, hERG 電流に及ぼす作用試験において, アナグリプチンの 100 µg/mL 以上で急速活性化遅延整流カリウムイオン電流の抑制作用が示唆された。また, モルモットの心筋活動電位持続時間に及ぼす作用試験において, 300 µg/mL で心筋ナトリウムイオン電流, 電位依存性カルシウムイオン電流及び遅延整流カリウムイオン電流の抑制作用が示唆された。同試験では 100 µg/mL 以上で遅延整流カリウムイオン電流の抑制作用が示唆されたが, 300 µg/mL では活動電位持続時間が短縮したことから, ナトリウムチャンネル及びカルシウムチャンネルの抑制が, カリウムチャンネルの抑制より優位に作用すると考えられた。以上の結果から, アナグリプチンは 30 µg/mL まで, ナトリウムチャンネル, カルシウムチャンネル及びカリウムチャンネルに作用を及ぼさないと考えられた。

In vivo 試験による検討では, 無麻酔イヌを用いた心血管系に及ぼす作用試験において, 300 mg/kg でナトリウムチャンネルの抑制作用に基づく伝導遅延が示唆されたが, 可逆性の変化であった。したがって, イヌの心血管系に対する無作用量は 100 mg/kg と考えられた。

イヌ 4 週間反復投与毒性試験の初回投与時の結果より, 雄性イヌに 100 mg/kg/日を投与したときの血漿中アナグリプチンの C_{max} 及び AUC_{0-24h} は, それぞれ 83.9 µg/mL 及び 376 µg·h/mL であった (2.6.7.7D.項)。このときの曝露量と最高臨床用量 (1 回 200 mg, 1 日 2 回) におけるヒト推定曝露量を比較すると, アナグリプチンの心血管系に対する安全係数は, hERG 電流及びモルモット心筋活動電位に対して約 25 倍, イヌ心血管系に対して 40~70 倍と算出された。また, イヌ及びサル反復投与毒性試験で行った心電図検査において, イヌでは 300 mg/kg/日で (2.6.6.3.4.項), サルでは 200 mg/kg/日以上で (2.6.6.3.5.~7.項), QTc 間隔の延長を含む変化が認められたが, いずれも休薬による回復性が確認された。4 週間反復投与毒性試験の成績から, イヌでは 100 mg/kg/日 (28 回投与後の血漿中アナグリプチンの C_{max} : 78.9 ~ 84.9 µg/mL, 2.6.7.7D.項) まで, サルでは 60 mg/kg/日 (同: 26.5~30.5 µg/mL, 2.6.7.7E.項) まで, 影響が認められなかった。このときの C_{max} と最高臨床用量における C_{max} を比較すると,

2.4. 非臨床試験の概括評価

イヌでは 66～71 倍、サルでは 22～25 倍の開きがあった。

なお、国内で実施された臨床試験において安静時 12 誘導心電図検査を行った結果、臨床上問題となる所見は認められていない (2.7.6.1.1.～3.項, 2.7.6.3.1.項, 2.7.6.3.2.項, 2.7.6.3.7.～9.項, 2.7.6.4.2.項, 2.7.6.5.1.～5.項)。また、海外で実施された外国人健康被験者を対象とした QTc 間隔への影響試験においても、単回経口投与で最高 1600 mg まで、アナグリプチンの投与に起因する QTc 間隔への影響は認められていない (2.7.6.4.1.項)。

(4) 腎/泌尿器系に及ぼす作用

ラットにアナグリプチン (200, 600 及び 2000 mg/kg) を単回経口投与し、尿量、尿中電解質及び尿浸透圧を測定した。その結果、600 及び 2000 mg/kg で尿量の増加、並びに尿中ナトリウム、カリウム及び塩素排泄量の増加が認められた。また、200 mg/kg においても、軽度ながら尿中ナトリウム及びカリウム排泄量の増加が認められた。一方、いずれの投与量も尿浸透圧に変化は認められなかった (2.6.2.4.4.項)。

ラットにアナグリプチン (200, 600 及び 2000 mg/kg) を単回経口投与し、糸球体濾過量、腎血漿流量及び濾過率を測定した。その結果、2000 mg/kg で糸球体濾過量及び腎血漿流量の低下が認められたが、濾過率に影響は認められなかった。600 mg/kg でも糸球体濾過量の低下が認められたが、腎血漿流量及び濾過率には作用を及ぼさなかった。一方、200 mg/kg では、いずれの測定項目もアナグリプチンの投与に起因する明らかな作用は認められなかった (2.6.2.4.5.項)。

ラット 4 週間反復投与毒性試験の初回投与時の結果より、雄性ラットに 200 mg/kg/日を投与したときの血漿中アナグリプチンの C_{max} 及び AUC_{0-24h} は、それぞれ 65.3 $\mu\text{g/mL}$ 及び 116 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ であった (2.6.7.7A.項)。200 mg/kg でラット尿中電解質に軽度な影響が認められたが、このときの曝露量と最高臨床用量 (1 回 200 mg, 1 日 2 回) におけるヒト推定曝露量を比較すると、 C_{max} で約 54 倍、 AUC_{0-24h} で約 12 倍の乖離が認められた。

(5) 胃腸管系に及ぼす作用

ラットにアナグリプチン (200, 600 及び 2000 mg/kg) を単回経口投与し、胃排出能、小腸輸送能及び胃液分泌 (胃液分泌量, pH, 総酸排出量及びペプシン活性) に及ぼす作用をそれぞれ検討した。その結果、600 及び 2000 mg/kg で胃排出能の抑制が認められた (2.6.2.4.6.項)。また、2000 mg/kg で小腸輸送能の抑制、pH の上昇及びペプシン活性の低下傾向が認められたが、胃液分泌量及び総酸排出量には作用を及ぼさなかった (2.6.2.4.7.項, 2.6.2.4.8.項)。

ラット 4 週間反復投与毒性試験の初回投与時の結果より、雄性ラットに 600 mg/kg/日を投与したときの血漿中アナグリプチンの C_{max} 及び AUC_{0-24h} は、それぞれ 143 $\mu\text{g/mL}$ 及び 376 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ であった (2.6.7.7A.項)。600 mg/kg でラット胃排出能の抑制が認められたが、このときの曝露量と最高臨床用量 (1 回 200 mg, 1 日 2 回) におけるヒト推定曝露量を比較すると、 C_{max} で約 119 倍、 AUC_{0-24h} で約 40 倍の乖離が認められた。

(6) 自律神経系に及ぼす作用

モルモット摘出回腸標本に各種アゴニスト (アセチルコリン, ヒスタミン, 塩化バリウム及びセロトニン) を適用し、収縮反応に対するアナグリプチン (38.3, 115 及び 383 $\mu\text{g/mL}$)

2. 4. 非臨床試験の概括評価

の作用を評価した。その結果、115 及び 383 µg/mL でヒスタミン収縮高比率の低下が認められた。383 µg/mL ではアセチルコリン収縮高比率の低下も認められたが、塩化バリウム及びセロトニン収縮に対する作用、並びにアナグリプチン単独の作用は認められなかった (2.6.2.4.9.項)。

アナグリプチンは、ヒスタミン収縮に対して 115 µg/mL以上で抑制作用を示したが、作用が認められなかった 38.3 µg/mLと最高臨床用量 (1 回 200 mg, 1 日 2 回) におけるヒト血漿中アナグリプチンのC_{max}との間には、約 32 倍の乖離が認められた。

(7) 代謝物の安全性薬理試験

アナグリプチンのヒトでの主代謝物である SKL-12320 の安全性薬理試験は、*in vitro* における hERG 電流に及ぼす作用を検討した。*In vivo* における評価は実施しなかった。

hERG チャネルを安定発現させた HEK293 細胞に SKL-12320 (31.5, 105 及び 315 µg/mL) を適用し、hERG 電流に及ぼす作用を検討した。その結果、いずれの濃度も有意な作用を示さず、31.5, 105 及び 315 µg/mL における hERG 電流に対する阻害率は、それぞれ 1.4, 0.0 及び 4.4%であった [2.6.2.4.3.(5)項, 表 2.6.2.4-4]。

したがって、SKL-12320 は 315 µg/mLまでhERG電流に作用を及ぼさず、その作用はアナグリプチンより弱いと考えられた [2.4.2.3.(3) 1) 項]。なお、SKL-12320 の 315 µg/mLは、最高臨床用量 (1 回 200 mg, 1 日 2 回) におけるヒト血漿中SKL-12320 のC_{max}の 1,900 倍以上である。

2. 4. 2. 4. 薬力学的薬物相互作用試験

α-グルコシダーゼ阻害剤であるミグリトール及びビグアナイド剤であるメトホルミンと、アナグリプチンとの併用効果を評価した。

糖尿病モデル動物の GK ラットにアナグリプチン (3 mg/kg) とミグリトール (3 mg/kg) を併用投与すると、経口液体流動食負荷後の血漿活性型 GLP-1 濃度変化量の AUC (0 分の濃度を基準) がそれぞれの単独投与に比べて有意に増加し、アナグリプチンの単独投与と比較して約 2.4 倍高値を示した。一方、血漿インスリン濃度及び血漿グルコース濃度の AUC にはそれぞれの単独投与との有意な差はなく、併用効果は認められなかった (2.6.2.5.1.項)。

肥満・糖尿病モデル動物の ZDF ラットにアナグリプチン (3 mg/kg) とメトホルミン (300 mg/kg) を併用投与すると、経口スターチ負荷後の血漿活性型 GLP-1 濃度変化量の AUC (0 分の濃度を基準) が対照群に比べて増加し、アナグリプチン及びメトホルミンの単独投与と比較してもそれぞれ約 4 倍及び約 5 倍高値を示したものの、有意な増加ではなかった。血漿 GIP 濃度の AUC は、併用投与でメトホルミンの単独投与に比べて減少したが、アナグリプチンの単独投与との差は認められなかった。また、血漿インスリン濃度の AUC は、アナグリプチンの単独投与で増加したが、併用投与では増加が認められなかった。一方、血漿グルコース濃度の AUC は、併用投与でアナグリプチンの単独投与に比べて減少した (2.6.2.5.2.項)。

したがって、アナグリプチンは、作用メカニズムが異なる経口血糖降下剤である α-グルコシダーゼ阻害剤のミグリトールとの併用により、単独投与に比べて更に GLP-1 濃度が上昇することが示唆された。

2. 4. 非臨床試験の概括評価

2. 4. 3. 薬物動態試験

2. 4. 3. 1. 分析法

血漿中アナグリプチン濃度及び主代謝物である SKL-12320 濃度は、試料を固相抽出により前処理したのち、LC/MS/MS で測定した。ラット、ウサギ、イヌ及びサル血漿中アナグリプチンの定量下限は 0.2 ng/mL であった。マウス、ラット及びサル血漿中アナグリプチン並びに SKL-12320 の同時定量におけるアナグリプチンの定量下限は、それぞれ 5, 1 及び 1 ng/mL であり、SKL-12320 の定量下限も、それぞれ 5, 1 及び 1 ng/mL であった。なお、分析法バリデーションを行った結果、各分析能パラメータは良好であり、分析法は妥当であった(2.6.4.2.2.項)。

一方、生体試料中の放射能は、試料に直接液体シンチレーターを加え、あるいは試料を溶解剤又は自動燃焼装置で処理した後液体シンチレーターを加え、LSC にて測定した。代謝物は、代謝物を HPLC で分離後、放射能検出器で測定 (RI-HPLC) 又は HPLC 溶離液に液体シンチレーターを加え、LSC で測定した。また、一部の *in vitro* 試験においては、代謝物を TLC で分離後、バイオイメージングアナライザーシステム (TLC-ラジオルミノグラフィー) で放射エネルギーを測定した。代謝物の同定は、LC/MS によって行った。また、非標識合成標準品がある代謝物は、HPLC 又は TLC のクロマトグラム上で合成標準品の保持時間又は R_f 値と比較して同定を行った (2.6.4.2.1.項)。

2. 4. 3. 2. 吸収

ラット、イヌ及びサルに [¹⁴C] アナグリプチンを単回経口投与したときの血漿中放射能及び未変化体の薬物動態パラメータを表 2.4.3-1 に示した。

[¹⁴C] アナグリプチンを雄性ラットに 3~30 mg/kg、雌性ラットに 10 mg/kg、雄性イヌに 10 mg/kg 及び雄性サルに 3 mg/kg で単回経口投与したとき、血漿中放射能濃度及び未変化体濃度は速やかに上昇して 20 min~2.0 h に C_{max} を示した後、放射能は t_{1/2} 4.38 h~4.90 day で、未変化体は t_{1/2} 1.7~6.6 h で消失した。見かけの吸収率は、それぞれ 38.1~85.5, 60.8, 70.4 及び 62.6%, BA は、それぞれ 24.9~54.0, 61.2, 77.7 及び 50.2% であった。いずれの動物種においても吸収は良好であり、速やかに吸収された後、未変化体は比較的速やかに消失するものと推察された。一方、放射能は雌性ラットを除き、緩慢な消失相が認められた。この消失相は代謝物によるものと推察された。

ラットにおいて、3~30 mg/kg の用量範囲で線形性を評価した結果、放射能及び未変化体の C_{max} 及び AUC_{0-∞} は投与量の公比を上回る非線形を示した。この主な原因は、アナグリプチンは P 糖たん白の基質となることから、投与量の増加に伴い P 糖たん白の輸送能が飽和し、吸収率が上昇したためと推察された。

ラットにおいて、10 mg/kg の用量で性差を評価した結果、未変化体の C_{max} 及び AUC_{0-∞} に性差が見られ、雌性ラットの方がそれぞれ 2.0 及び 1.7 倍高かった。雌性ラットでは見かけの吸収率と BA が同等であったのに対し、雄性ラットでは見かけの吸収率に対し BA が約 28% 低かった。このことより、雄性ラットでは一部初回通過効果を受けていると推察された。また、この代謝の性差が経口投与後の未変化体濃度の差の原因と推察された (2.6.4.3.1.項)。

なお、イヌ及びサル反復投与毒性試験の TK の結果より、経口投与後の血漿中未変化体濃度に明確な性差は認められなかった (2.6.6.3.項)。

2. 4. 非臨床試験の概括評価

表 2. 4. 3-1 ラット、イヌ及びサルに $[^{14}\text{C}]$ アナグリプチンを単回経口投与したときの
薬物動態パラメータ

a) 放射能

動物種	性	投与量 (mg/kg)	C_{\max} (ng eq./mL)	$AUC_{0-\infty}$ (ng eq.·h/mL)	T_{\max} (min 又は h)	$t_{1/2}$ (day 又は h)	$F^{1)}$ (%)
ラット	雄	3	390 ± 159	2010 ± 470	25 ± 9 min	18.9 ± 13.1 h	38.1 ± 8.8
		10	3560 ± 720	10400 ± 1800	30 ± 0 min	50.3 ± 9.2 h	59.3 ± 10.5
		30	17400 ± 3300	45200 ± 2700	20 ± 9 min	40.0 ± 13.4 h	85.5 ± 5.1
	雌	10	5900 ± 1490	6990 ± 460	20 ± 9 min	4.38 ± 5.25 h	60.8 ± 4.0
イヌ	雄	10	9710 ± 550	48800 ± 7300	0.8 ± 0.3 h	4.90 ± 0.18 day	70.4 ± 10.5
サル	雄	3	338	4430	2.0 h	1.7 day	62.6

b) 未変化体

動物種	性	投与量 (mg/kg)	C_{\max} (ng/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (ng·h/mL)	T_{\max} (min 又は h)	$t_{1/2}$ (h)	$BA^{2)}$ (%)
ラット	雄	3	279 ± 77	695 ± 92	20 ± 9 min	5.15 ± 3.12	24.9 ± 3.3
		10	3260 ± 960	3950 ± 860	30 ± 0 min	3.16 ± 1.56	42.4 ± 9.2
		30	15100 ± 2600	15100 ± 2400	20 ± 9 min	4.06 ± 0.77	54.0 ± 8.5
	雌	10	6630 ± 2060	6540 ± 400	20 ± 9 min	2.98 ± 0.45	61.2 ± 3.7
イヌ	雄	10	8770 ± 610	26600 ± 2700	0.7 ± 0.3 h	1.70 ± 0.14	77.7 ± 7.9
サル	雄	3	168	882	2.0 h	6.6	50.2

ラット及びイヌの値は3例の平均値±標準偏差、サルの値は1例の値を表示

1) 見かけの吸収率；血漿中放射能濃度の $AUC_{0-\infty}$ を経口投与時と静脈内投与時で比較し算出

2) 血漿中未変化体濃度の $AUC_{0-\infty}$ を経口投与時と静脈内投与時で比較し算出

$[^{14}\text{C}]$ アナグリプチンを雄性のラット (10 mg/kg)、イヌ (10 mg/kg) 及びサル (1 mg/kg) に単回静脈内投与したとき、未変化体の CL_p は、それぞれ 1190、296 及び 1710 mL/h/kgであり、 Vd_{ss} は、それぞれ 0.667、0.659 及び 1.60 L/kgであった。また、雌性ラット (10 mg/kg) に単回静脈内投与したとき、未変化体の CL_p 及び Vd_{ss} は、それぞれ 958 mL/h/kg及び 0.709 L/kgであり、顕著な性差は認められなかった (2.6.4.3.1.項)。

雄性ラットに $[^{14}\text{C}]$ アナグリプチンを 10 mg/kgで1日1回14日間反復経口投与し、反復投与による体内動態への影響を評価した。投与後24時間における血漿中放射能濃度は投与回数に伴い上昇したが、血漿中未変化体濃度は投与期間中ほぼ一定であり、単回投与後と14回反復投与後の血漿中濃度推移もほぼ一致した。これらの結果から、反復投与により放射能の累積は認められるが、未変化体の体内動態に変化はないものと推察された (2.6.4.3.2.項)。

また、イヌ及びサル反復投与毒性試験のTKの結果から、反復投与により未変化体の蓄積は認められなかった (2.6.6.3.項)。

雄性の絶食及び飽食ラットに $[^{14}\text{C}]$ アナグリプチンを 10 mg/kgで単回経口投与し、食餌の影響を評価した。飽食ラットにおける未変化体の C_{\max} 及び $AUC_{0-\infty}$ は、絶食ラットと比較して、それぞれ 12.2 及び 56.2%に低下し、食餌の影響が認められた (2.6.4.3.3.項)。

2. 4. 3. 3. 分布

雄性アルビノラットに $[^{14}\text{C}]$ アナグリプチンを 10 mg/kgで単回経口投与したとき、組織内放射能濃度は、投与後30分又は6時間に最高濃度を示した。胃、小腸、腎臓、肝臓及び膀胱などの組織内放射能濃度が高く、眼球、中枢組織及び白色脂肪の放射能濃度は低かった。各

2. 4. 非臨床試験の概括評価

組織に移行した放射能は、投与後 72 時間では最高濃度の 10%以下に、投与後 120 時間では最高濃度の 7%以下に減少した。一方、雌性ラットに $[^{14}\text{C}]$ アナグリプチンを 10 mg/kgで単回経口投与したとき、雄性ラットと同様な組織内分布を示したが、各組織からの消失は雌性ラットより速やかであった。また、雌雄ともに生殖器への特異的な分布は認められなかった。

雄性有色ラットに $[^{14}\text{C}]$ アナグリプチンを 10 mg/kgで単回経口投与したとき、メラニン非含有組織の放射能濃度はアルビノラットと同様であったが、メラニン含有組織においては、虹彩・毛様体、網膜・脈絡膜及び強膜の放射能濃度が高く、各組織からの消失はメラニン非含有組織と比較して遅延していた (2.6.4.4.1.項)。しかし、イヌ及びサル反復投与毒性試験において、眼組織に異常は認められなかった (2.6.6.3.4.項, 2.6.6.3.5.～7.項)。

雌雄アルビノラットに $[^{14}\text{C}]$ アナグリプチンを 10 mg/kgで1日1回28日間反復経口投与したとき、単回投与と比較して同様の分布傾向を示したが、ほぼすべての組織において最終投与後 24 又は 72 時間以降の最終相における放射能濃度の累積が認められた。しかし、各組織に累積した放射能は、投与後 72 時間以降で累積投与量の 0.04%以下とわずかであった (2.6.4.4.1.項)。

*In vitro*において、 $[^{14}\text{C}]$ アナグリプチンの血清たん白に対する結合率は、ラットで 73.8～88.9%、イヌで 41.7～62.2%、サルで 26.9～45.8%及びヒトで 37.1～48.2%であった。また、SKL-12320 の血清たん白に対する結合率は、ラットで 47.8～49.1%、イヌで 43.0～45.5%、サルで 30.8～34.0%及びヒトで 15.0～18.1%であった (2.6.4.4.3.項)。

*In vitro*において、 $[^{14}\text{C}]$ アナグリプチンの血球移行率は、ラットで 4.6～16.5%、イヌで 15.9～30.8%、サルで 21.6～28.8%及びヒトで 21.3～24.9%であった (2.6.4.4.4.項)。

妊娠ラットに $[^{14}\text{C}]$ アナグリプチンを 10 mg/kgで単回経口投与したとき、胎児組織に移行した放射能のAUC_{0-48h}は母体血漿の 0.51 倍以下であった。また、移行した放射能は母体血漿と同様に経時的に消失した (2.6.4.4.6.項)。

2. 4. 3. 4. 代謝

アナグリプチンの推定代謝経路を図 2.4.3-1に示した。

雌雄マウス、雌雄ラット、雌性ウサギ、雄性イヌ及び雌雄サルに $[^{14}\text{C}]$ アナグリプチンを単回経口投与したとき、アナグリプチンはいずれの動物種においても、血漿中では主に未変化体として存在した。血漿中代謝物として、ニトリルが加水分解されたSKL-12320、アミンに隣接するメチレンが酸化されたSKL-14687 及びSKL-15451、一水酸化体 (SKL-12339) 及びその抱合体並びに二水酸化体などの多数が検出されたが、特に血漿中濃度が高い代謝物は認められなかった (2.6.4.5.1.項)。

雌雄ラット、雄性イヌ及び雌雄サルに $[^{14}\text{C}]$ アナグリプチンを単回経口投与したとき、いずれの動物種においても、尿糞中には主に未変化体が排泄され、未変化体の排泄率は投与量の 41～56%であった。その他、血漿と同様な代謝物が排泄されたが、10%以上の生成が認められた代謝物はSKL-12320 のみであった (2.6.4.5.2.項)。また、ラット尿中に未変化体のエナンチオマー (SKL-13775) は検出されなかった (2.6.4.5.8.項)。

動物種によって各種代謝物の生成量に差は見られたが、代謝物の種類は同様であったこと、特に生成量の多い代謝物はなかったことから、代謝に顕著な種差はなく、アナグリプチンは同様な経路により代謝を受けていると推察された。

2. 4. 非臨床試験の概括評価

ラットにおいて、SKL-14687 及び SKL-15451 の生成量に性差が見られ、雄性で多かったが、マウス及びサルにおいては明確な性差は認められなかった (2.6.4.5.1.項, 2.6.4.5.2.項)。

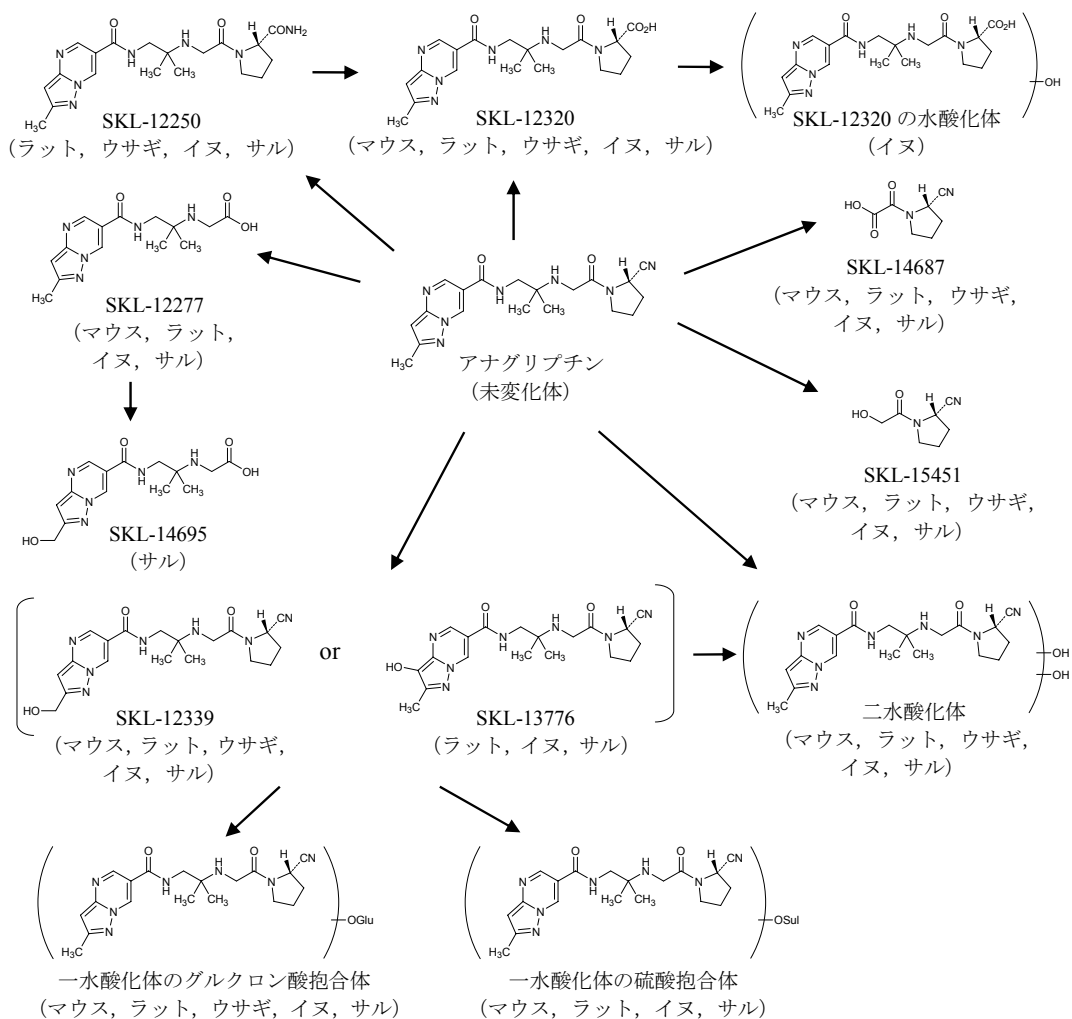


図 2. 4. 3-1 アナグリプチンの推定代謝経路

雄性ラットに $[^{14}\text{C}]$ アナグリプチンを 10 mg/kg で 1 日 1 回 28 日間反復経口投与したとき、血漿、肝臓及び腎臓中代謝物で単回投与後より累積した代謝物は認められなかった。一方、血漿及び肝臓をエタノールで抽出したときの放射能の回収率は、単回投与後より反復投与後の方が低かった。この結果から、反復投与により血漿及び各組織中に累積する放射能は、エタノール抽出後の残留物に属する分画に存在する代謝物と推察された。累積する放射能濃度は雄性ラットの方が高かったことから、雄性ラットで生成量の多い SKL-14687 及び SKL-15451 の分解物又は類似化合物などの極性成分が、累積に関与している可能性が推察された (2.6.4.5.4.項)。

$[^{14}\text{C}]$ アナグリプチンを各種動物 (ラット, イヌ, サル及びヒト) の肝 S9 と 2 時間インキュベーションした結果、未変化体の減少は 10% 以下と小さかったことより、アナグリプチンの代謝にチトクローム P450 の関与は小さいと推察された (2.6.4.5.6.項)。

2.4. 非臨床試験の概括評価

ヒト組換えDPP-4 及びヒト血液を用いた [^{14}C] アナグリプチンの*in vitro*代謝試験より、アナグリプチンからSKL-12320 への代謝にDPP-4 の関与が認められた (2.6.4.5.6.項)。

ヒト肝細胞を用いた*in vitro*酵素誘導試験の結果、アナグリプチン及びSKL-12320 とともに、100 $\mu\text{g/mL}$ ではCYP1A2, CYP2C8/9, CYP2C19 及びCYP3A4 (SKL-12320 はCYP2C19 のみ) にわずかな誘導が認められたが、10 $\mu\text{g/mL}$ 以下では誘導は認められなかった。第I相反復投与試験の最終投与時の結果より、最高臨床用量である1回200 mgを1日2回反復経口投与したときのヒト血漿中未変化体及びSKL-12320 の C_{max} は、それぞれ1,200 及び162 ng/mL (2.7.6.3.2.表 3.2-4) であったことより、臨床用量では誘導は起こらないと推察された。

雌雄ラットにアナグリプチンを10, 100, 500 及び1000 mg/kg で1日1回7日間反復経口投与した結果、雄性ラットにおいて肝薬物代謝酵素の誘導は認められなかった。一方、雌性ラットにおいて、CYP2E 活性が500 mg/kg 以上で約30%増加し、CYP1A 活性が1000 mg/kg で17%増加したが、いずれも軽度な誘導であった (2.6.4.5.7.項)。

2.4.3.5. 排泄

雄性ラットに [^{14}C] アナグリプチンを3, 10 及び30 mg/kgで単回経口投与したとき、投与後168時間までの尿中累積排泄率は、それぞれ投与量の24.67, 37.09 及び44.26%, 糞中累積排泄率は、それぞれ投与量の72.88, 62.43 及び53.82%であり、投与量の増加に伴う尿中排泄率の上昇及び糞中排泄率の低下が認められた。この非線形は吸収率の非線形に対応したものと推察された。また、雌性ラットに [^{14}C] アナグリプチンを10 mg/kgで単回経口投与したとき、尿及び糞中累積排泄率は同投与量の雄性ラットの排泄率とほぼ一致した。

雄性イヌに [^{14}C] アナグリプチンを10 mg/kgで単回経口投与したときの尿及び糞中累積排泄率は、投与後168時間で、それぞれ投与量の57.10 及び40.36%であった。

雌雄ラット及び雄性イヌに [^{14}C] アナグリプチンを10 mg/kgで単回静脈内投与したときの尿及び糞中累積排泄率を表 2.4.3-2に示した。

投与後168時間までの尿中累積排泄率は、雄性ラットで投与量の64.62%, 雌性ラットで62.51%及び雄性イヌで66.21%であった。また、糞中累積排泄率は、雄性ラットで投与量の34.58%, 雌性ラットで37.35%及び雄性イヌで32.24%であり、尿及び糞中排泄率に種差及び性差は認められなかった。雌雄ラット及び雄性イヌともに、投与量の大部分は投与後24時間までに排泄され、排泄は速やかであると推察された (2.6.4.6.1.項)。

2. 4. 非臨床試験の概括評価

表 2. 4. 3-2 ラット及びイヌに [^{14}C] アナグリプチンを単回静脈内投与したときの
尿及び糞中累積排泄率

動物種	性	投与量 (mg/kg)	時間 (h)	累積排泄率 (投与量に対する%)		
				尿	糞	合計
ラット	雄	10	0-24	63.86 \pm 3.68	31.38 \pm 3.50	95.24 \pm 2.22
			0-168	64.62 \pm 3.89	34.58 \pm 3.27	99.20 \pm 0.64
			屍体			0.21 \pm 0.19
ラット	雌	10	0-24	62.29 \pm 4.32	36.31 \pm 3.12	98.60 \pm 1.60
			0-168	62.51 \pm 4.26	37.35 \pm 3.52	98.85 \pm 1.69
			屍体			0.00 \pm 0.00
イヌ	雄	10	0-24	64.23 \pm 5.41	24.96 \pm 7.37	89.19 \pm 4.56
			0-168	66.21 \pm 5.94	32.24 \pm 6.54	98.45 \pm 0.66
			ケージ洗浄液			0.35 \pm 0.04

平均値 \pm 標準偏差 (n=3)

雌雄ラットに [^{14}C] アナグリプチンを 10 mg/kg で 1 日 1 回 28 日間反復経口投与したとき、雌雄ともに尿及び糞中への排泄は速やかであり、28 回投与後 24 時間までに、雄性ラットは累積投与量の 94.5%、雌性ラットは 99.5% が排泄された (2.6.4.6.2.項)。

胆管カニキュレ処置した雌雄ラットに [^{14}C] アナグリプチンを 10 mg/kg で単回経口投与したとき、投与後 48 時間までの胆汁中累積排泄率は、雄性ラットが投与量の 25.01%、雌性ラットが 28.62% であった。また、10 mg/kg で単回静脈内投与したとき、投与後 48 時間までの胆汁中累積排泄率は、雄性ラットが投与量の 25.24%、雌性ラットが 32.89% であった (2.6.4.6.3.項)。

哺育中ラットに [^{14}C] アナグリプチンを 10 mg/kg で単回経口投与したとき、放射能の乳汁中への移行が認められ、このときの放射能の乳汁/血漿中濃度比は 3.35~14.25 であった。乳汁中に移行した放射能は、血漿中濃度と同様に経時的に消失した (2.6.4.6.5.項)。

2. 4. 3. 6. 薬物動態学的薬物相互作用試験

In vitro において、アナグリプチン及び SKL-12320 は、チトクローム P450 分子種 (CYP1A¹⁾, 1A2²⁾, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 及び 3A4) の各典型基質の代謝に対してほとんど阻害作用を示さず (IC₅₀ 値 > 100 $\mu\text{g/mL}$)、併用他剤の代謝を阻害する可能性は低いと推察された (2.6.4.7.1.項)。

- 1) アナグリプチンのみ評価
- 2) SKL-12320 のみ評価

In vitro において、hMDR1 (ヒト P 糖タンパク) 発現細胞 (hMDR1 遺伝子を発現したブタ腎上皮細胞由来 LLC-PK1 細胞) を介した [^{14}C] アナグリプチン及び SKL-12320 の細胞輸送試験を行った結果、アナグリプチンは、ヒト P 糖タンパクの基質であることが示唆された。一方、SKL-12320 は、ヒト P 糖タンパクの基質となる可能性は低いと推察された (2.6.4.7.2.項)。

In vitro において、hMDR1 を介したジゴキシン輸送に対するアナグリプチン及び SKL-12320 の阻害作用を検討した結果、アナグリプチンは、濃度 0.1~100 $\mu\text{mol/L}$ (38.3~38300 ng/mL) において、濃度依存的な阻害をほとんど示さなかった。しかし、1000 $\mu\text{mol/L}$ (383000 ng/mL) において、31.2% の阻害を示した。また、SKL-12320 は、濃度 0.1~100 $\mu\text{mol/L}$ (40.2~40200

2.4. 非臨床試験の概括評価

ng/mL)において、濃度依存的な阻害をほとんど示さなかった。以上の結果から、アナグリプチンは高濃度（経口投与後の消化管濃度）において、わずかに hMDR1 によるジゴキシン輸送を阻害する可能性が示唆された。また、SKL-12320 は、hMDR1 によるジゴキシン輸送に対して阻害作用を示さないものと推察された (2.6.4.7.2.項)。

In vitro において、アナグリプチン及び SKL-12320 の腎排泄におけるトランスポーター (hOAT1, hOAT3, hOAT4, hOCT2, hBCRP, hMRP2 及び hMRP4) の関与を検討した結果、アナグリプチンは、hOAT1, hOAT3, hOAT4 及び hMRP2 の基質であることが示唆され、SKL-12320 は、hOAT3, hOAT4, hBCRP, hMRP2 及び hMRP4 の基質であることが示唆された (2.6.4.7.3.項)。

*In vitro*において、腎臓に発現するトランスポーター (hOAT1, hOAT3, hOAT4, hOCT2, hBCRP, hMRP2 及び hMRP4) を介した各典型基質輸送に対するアナグリプチン及び SKL-12320 の阻害作用を検討した結果、hOAT3 及び hOCT2 の各典型基質輸送に対するアナグリプチンの IC_{50} 値は、それぞれ 65.9 $\mu\text{mol/L}$ (25200 ng/mL) 及び 88.2 $\mu\text{mol/L}$ (33800 ng/mL) であった。その他のトランスポーターに対するアナグリプチンの IC_{50} 値は、100 $\mu\text{mol/L}$ (38300 ng/mL) 以上であった。hOAT1 の典型基質輸送に対する SKL-12320 の IC_{50} 値は、3.51 $\mu\text{mol/L}$ (1410 ng/mL) であった。その他のトランスポーターに対する SKL-12320 の IC_{50} 値は、10 $\mu\text{mol/L}$ (4020 ng/mL) 以上であった。最高臨床用量（1回 200 mg, 1日 2回）におけるヒト血漿中未変化体及び SKL-12320 の C_{max} は、それぞれ 1,200 及び 162 ng/mL (2.7.6.3.2. 表 3.2-4) であったことより、臨床用量では評価したトランスポーターを阻害する可能性は低いと推察された (2.6.4.7.3.項)。

2. 4. 非臨床試験の概括評価

2. 4. 4. 毒性試験

2. 4. 4. 1. 単回投与毒性試験

ラットの経口投与では、2000 mg/kg においても死亡発現及び毒性症状は認められず、概略の致死量は雌雄ともに 2000 mg/kg 超と推定された (2.6.6.2.1.項)。静脈内投与では、500 mg/kg 以下では死亡は認められず、1000 mg/kg 以上で全例が死亡したことから、概略の致死量は雌雄ともに 500～1000 mg/kg と推定された。主要な毒性症状として、自発運動減少、異常歩行、呼吸数減少、振戦、間代性痙攣又は腹臥/横臥が 500 mg/kg 以上で認められた (2.6.6.2.1.項)。

イヌの経口投与では、300 mg/kg 以上で便の異常（粘液便・軟便、便鮮血反応陽性）及び縮腫が見られ、1000 mg/kg では更に振戦、心拍数の増加、QRS 時間及び QTc 間隔の延長が見られたが、死亡は認められなかった。概略の致死量は雌雄ともに 1000 mg/kg 超と推定された (2.6.6.2.2.項)。

サルの経口投与（漸増投与）では、300 mg/kg 以下では毒性症状は見られなかった。1000 mg/kg で嘔吐及び軟便が見られたが、死亡は認められなかった。概略の致死量は雌雄ともに 1000 mg/kg 超と推定された (2.6.6.2.3.項)。

2. 4. 4. 2. 反復投与毒性試験

(1) 反復投与毒性

ラットを用いた 4, 13 及び 26 週間反復経口投与毒性試験、イヌを用いた 4 週間反復経口投与毒性試験、並びにサルを用いた 4, 13 及び 52 週間反復経口投与毒性試験を実施した。

ラット 4 週間反復投与毒性試験 (200, 600 及び 2000 mg/kg/日) では、2000 mg/kg/日で肝臓への影響として血清脂質の増加、肝臓重量の増加、小葉中心帯肝細胞の肥大及びミトコンドリア数の増加が、腎臓への影響として摂水量、尿量及び尿中電解質排泄量の増加、尿浸透圧の低下、尿たん白陽性例数の増加、血清尿素窒素の増加、血清電解質異常、並びに腎臓重量の増加が、甲状腺への影響として甲状腺重量の増加及び濾胞上皮の肥大が認められた。その他、体重増加抑制、摂餌量減少（一過性）、縮腫、大脳脈絡叢上皮の空胞化、精細管上皮の変性及び精巢上体の管腔内細胞残屑が認められた。血清脂質、肝臓重量、摂水量及び尿たん白陽性例数の増加、並びに甲状腺濾胞上皮の変化は 600 mg/kg/日でも認められた。無毒性量は、雌雄ともに 200 mg/kg/日と推定された (2.6.6.3.1.項)。

ラット 13 週間反復投与毒性試験 (100, 400 及び 2000 mg/kg/日) では、2000 mg/kg/日で貧血（赤血球数、ヘモグロビン量及びヘマトクリット値の低下、網赤血球率の増加、赤芽球数の増加、並びに小型球状赤血球の出現）が認められ、それに関連する所見として骨髄での赤芽球比率の増加及び M/E 比の低下、脾臓での髄外造血の亢進、並びに脾臓及び肝臓でのヘモジデリン沈着を示唆する褐色色素沈着又はベルリンブルー陽性顆粒の増強が認められた。更に、肝臓への影響として肝臓重量の増加、小葉中心帯肝細胞の肥大及び空胞化、並びに滑面小胞体及びミトコンドリア数の増加が、腎臓への影響として摂水量及び尿量の増加、尿中電解質排泄量の増減、尿浸透圧の低下、尿たん白陽性例数の増加、血清尿素窒素の増加、血清電解質異常及び腎臓重量の増加が、甲状腺への影響として甲状腺重量の増加及び濾胞上皮の肥大が、大脳及び小脳への影響として脈絡叢上皮の空胞化（電子顕微鏡検査の結果、低電子密度の大型ライソゾームと考えられた）が、雄性生殖器への影響として精巣及び精嚢重量の減少、精細管の萎縮及び空胞化、精巣上体の精子減少及び管腔内細胞残屑、乳腺腺房細胞の

2.4. 非臨床試験の概括評価

萎縮，下垂体去勢細胞の増加が，雌性生殖器への影響として卵巣重量の増加，子宮重量の減少，卵巣黄体の大型化，子宮内膜間質の萎縮及び腔粘膜上皮の粘液変性が認められた。その他，体重増加抑制，摂餌量減少（一過性），縮腫及び血清カルシウムの増加，血漿中T₄濃度の減少傾向又はTSH濃度の増加傾向が認められた。貧血所見，脾臓での髄外造血の亢進，尿検査値の変動及び血清カルシウムの増加は 400 mg/kg/日でも認められた。無毒性量は，雌雄ともに 100 mg/kg/日と推定された（2.6.6.3.2.項）。

ラット 26 週間反復投与毒性試験（100，300 及び 1000 mg/kg/日）では，1000 mg/kg/日で血液・造血管系への影響として貧血所見，白血球数（好中球数・単球数），血小板数及びフィブリノーゲン量の増加，並びに骨髓での桿状核好中球比率の増加が，肝臓への影響として肝臓重量の増加が，腎臓への影響として摂水量，尿量及び尿中電解質排泄量の増加，尿浸透圧の低下，尿たん白陽性例数の増加，血清尿素窒素の増加，並びに血清電解質異常が，大脳及び小脳への影響として脈絡叢上皮の空胞化が，雌性生殖器への影響として性周期異常及び腔粘膜上皮の粘液変性が認められた。その他，体重及び摂餌量の増加，並びに副腎球状帯細胞の肥大が認められた。無毒性量は，雌雄ともに 300 mg/kg/日と推定された（2.6.6.3.3.項）。

イヌ 4 週間反復投与毒性試験（30，100 及び 300 mg/kg/日）では，300 mg/kg/日で心血管系への影響として心電図検査で心拍数の増加，QRS 時間及び QTc 間隔の延長が，消化管への影響として嘔吐，粘液便・軟便，便潜血反応陽性などの消化器症状，並びに腸管粘膜固有層の好酸球増加，血液学的検査では好酸球比率の増加，末梢神経系への影響として縮腫が認められた。その他，腎臓の髄質に単核球浸潤が見られた。無毒性量は，雌雄ともに 100 mg/kg/日と推定された（2.6.6.3.4.項）。

サル 4 週間反復投与毒性試験（60，200 及び 600 mg/kg/日）では，600 mg/kg/日で投与 11 日に 1 例の死亡が認められた。本例では特に顕著な症状は見られなかったが，体重及び摂餌量の減少が見られ，更に高窒素血症，電解質異常及び尿細管病変（尿細管上皮細胞の微細空胞化，脂肪化，壊死，好酸性硝子滴及び PAS 陽性顆粒出現など）が見られたことから，死因は尿細管障害による急性腎不全と推察された。その他，肝臓への影響として血清脂質の増加及び肝臓重量の増加を伴ったびまん性肝細胞脂肪化，心血管系への影響として心臓右心室の心筋変性及び心外膜下单核球浸潤が見られた。生存例でも，200 mg/kg/日以上で腎臓及び肝臓に死亡例と断片的に類似した変化が見られた。心血管系への影響として心電図検査で QRS 時間の延長が認められた。また，消化管への影響として 600 mg/kg/日で食道の好中球浸潤，並びに結腸の好中球及び単核球浸潤が，60 mg/kg/日以上での雌及び 200 mg/kg/日の雄で胃粘膜のびらん，限局性出血，リンパ球及び好中球の浸潤又は粘膜上皮の再生が認められた。その他，600 mg/kg/日で体重及び摂餌量の減少，並びに摂水量の増加が見られた。無毒性量は雄で 60 mg/kg/日，雌で 60 mg/kg/日未満と推定された（2.6.6.3.5.項）。

サル 13 週間反復投与毒性試験（10，50 及び 300 mg/kg/日）では，300 mg/kg/日で軟便，体重及び摂餌量の減少，並びに心電図検査で QTc 間隔の延長が認められた。DPP-4 阻害作用を有する類薬のサルへの投与で，壊死性皮膚症状が認められたとの報告があったことから，皮膚について詳細な観察を行ったが，300 mg/kg/日においても皮膚の異常は認められなかった。無毒性量は，雌雄ともに 50 mg/kg/日と推定された（2.6.6.3.6.項）。

サル 52 週間反復投与毒性試験（10，50 及び 300 mg/kg/日）では，300 mg/kg/日で体重減少及び心電図検査で PR 間隔の延長が認められた。皮膚について詳細な観察を行ったが，300

2. 4. 非臨床試験の概括評価

mg/kg/日においても皮膚の異常は認められなかった。また、月経頻度、月経周期及び月経持続期間について解析を行ったが、アナグリプチン投与に起因する変化は見られなかった。無毒性量は、雌雄ともに 50 mg/kg/日と推定された (2.6.6.3.7項)。

以上の反復投与毒性試験で認められた変化の回復性については、ラット 13 週間反復投与毒性試験の 2000 mg/kg/日で見られた重度の精細管萎縮及びそれに関連する変化は5週間の休薬終了時においても残存したが、雄性生殖器への影響としては回復傾向が認められた。その他の変化も休薬により回復性が認められた。

(2) 主要所見の考察

1) 心血管系への影響について

イヌ及びサルにおいて心電図の変化が認められた。イヌでは、単回投与毒性試験の 1000 mg/kg、4 週間反復投与毒性試験の 300 mg/kg/日で心拍数の増加、QRS時間及びQTc間隔の延長が見られた。サルでは、2 週間反復投与毒性試験 (予備試験) の 300 mg/kg/日以上でQT/QTc間隔及びQRS時間の延長が見られた。また、4 週間反復投与毒性試験の 200 mg/kg/日以上でQRS時間の延長が、13 週間反復投与毒性試験の 300 mg/kg/日でQTc間隔の延長が、52 週間反復投与毒性試験の 300 mg/kg/日でPR間隔の延長が見られた。イヌ及びサルで認められた心電図変化は心臓の組織学的変化を伴うものではなく、可逆的な変化であることが確認されている。安全性薬理試験では、hERG電流に及ぼす作用試験 [2.6.2.4.3.(1)項] において 100 µg/mL (261 µmol/L) 以上で急速活性化遅延整流カリウムイオン電流の抑制作用が、モルモット摘出乳頭筋を用いた心筋活動電位持続時間に及ぼす作用試験 [2.6.2.4.3.(2)項] において 300 µg/mL (782 µmol/L) で心筋ナトリウムイオン電流、電位依存性カルシウムイオン電流及び遅延整流カリウムイオン電流の抑制作用が認められた。後者の試験では 100 µg/mL以上で遅延整流カリウムイオン電流の抑制作用が示唆されたが、300 µg/mLでは活動電位持続時間が短縮したことから、ナトリウムチャンネル及びカルシウムチャンネルの抑制が、カリウムチャンネルの抑制より優位に作用すると考えられた [2.6.2.4.3.(4)項]。無麻酔イヌを用いた心血管系に及ぼす作用試験 [テレメトリ法、2.6.2.4.3.(3)項] においては、300 mg/kgで可逆的なQRS時間の延長が見られた。これらの各種試験成績から、アナグリプチンは潜在的に心血管系に対する作用を有すると考えられるが、*in vitro*電気生理学的試験では 30 µg/mL (78.2 µmol/L) まで、また*in vivo*試験 (4 週間反復投与毒性試験) ではイヌで 100 mg/kg/日 (C_{max} : 78.9~84.9 µg/mL) まで、サルで 60 mg/kg/日 (C_{max} : 26.5~30.5 µg/mL) まで影響が認められなかった。これらの曝露量を最高臨床用量 (1 回 200 mg, 1 日 2 回) におけるヒト推定曝露量 (C_{max} : 1.20 µg/mL, 2.7.6.3.2. 表 3.2-4) と比較すると、22~71 倍の開きがあり、十分な安全域があると考えられた。ヒトでの主代謝物であるSKL-12320 についてはhERG電流に及ぼす作用試験 [2.6.2.4.3.(5)項] が実施され、SKL-12320 は 315 µg/mL (783 µmol/L) までhERG電流に作用を及ぼさないことが確認されている。国内で実施された臨床試験において安静時 12 誘導心電図検査を行った結果、臨床上問題となる所見は認められていない (2.7.6.1.1.~3.項, 2.7.6.3.1.項, 2.7.6.3.2.項, 2.7.6.3.7.~9.項, 2.7.6.4.2.項, 2.7.6.5.1.~5.項)。また、海外で実施された外国人健康被験者を対象としたQTc間隔への影響試験においても、単回経口投与で最高 1600 mgまで、アナグリプチン投与に起因したQTc間隔への影響は認められていない (2.7.6.4.1.項)。

2.4. 非臨床試験の概括評価

2) 大脳・小脳脈絡叢への影響について

ラット 4, 13 及び 26 週間反復投与毒性試験の 1000 mg/kg/日以上で、大脳及び小脳の脈絡叢上皮の空胞化が認められた。この空胞はPAS及びオイルレッドO染色ともに陰性であったことから、糖質又は脂質ではないと考えられた。大脳脈絡叢の電子顕微鏡検査で上皮細胞内に低電子密度の大型ライソゾームが認められたことから、光顕で認められた空胞はこの大型ライソゾームに相当すると考えられた。脈絡叢上皮の空胞化はリン脂質症で見られることが知られているが[22]、本薬の電子顕微鏡検査ではライソゾーム中にリン脂質症の特徴である多層板構造物 (lamellar body) は認められなかった。したがって、本薬投与により誘発される脈絡叢上皮の空胞化はリン脂質症を示唆するものではないと考えられた。本変化の発現機序及び毒性学的意義は不明であるが、薬物動態試験 (組織分布) において、アナグリプチンは脳脊髄液及び中枢神経系への移行性は低いことが示されている (表 2.6.4.4-4, 表 2.6.4.4-5)。しかし、アナグリプチンの高用量投与では脈絡叢上皮細胞が高濃度のアナグリプチンに曝露され、それにより本変化が引き起こされた可能性は否定できない。脈絡叢上皮細胞の主たる機能は脳脊髄液の産生・分泌である[22]ことから、それが影響を受けた場合には、脳脊髄液の産生量の変化を来す可能性がある。増加の場合は、髄液圧は上昇し、脳室の拡張や脳実質の圧迫を招く。減少の場合は、髄液量の減少により脳が下垂し、脳神経や疼痛感受性血管の牽引を招く。また、脈絡叢上皮細胞は血液脳脊髄液関門としての働きもある[22]ことから、それが障害された場合には薬物の中枢神経系への移行性が高まる可能性がある。しかし、ラット反復投与毒性試験では脳の実質細胞及び脳室には組織学的変化は認められず、一般状態観察においても神経学的異常は何ら認められなかった。本変化は、回復性試験により可逆性であることが確認されており、また投与期間の長期化により病変の程度は増すものの、それによって障害性変化につながることもなかった。したがって、本変化は重篤な所見ではないと考えられた。イヌ及びサル反復投与毒性試験、並びにマウスがん原性試験では脈絡叢に変化は認められなかったことから、本変化には種差が存在すると考えられた。ラット 26 週間反復投与毒性試験の成績から、本変化に関する無毒性量は 300 mg/kg/日 (AUC_{0-24h} : 301~380 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$) と考えられた。その曝露量を最高臨床用量におけるヒト推定曝露量 (AUC_{0-24h} : 9.46 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$, 2.7.6.3.2. 表 3.2-4, ただし、 AUC_{0-24h} は最終投与が単回のため 2 倍値とした) と比較すると、32~40 倍の開きがあり、十分な安全域があると考えられた。一般的に、脳脊髄液の産生量が変化した場合、増加あるいは減少のいずれにおいても、臨床的には頭痛、悪心、嘔吐、視覚異常 (霧視、複視、視力低下) 及び聴覚異常 (めまい、難聴、耳鳴り) など類似した症状を示すと言われているが[23][24]、臨床試験ではアナグリプチン投与により頭痛などの発現例数が増加する傾向はなかった (表 2.7.4.7-17, 表 2.7.4.7-21)。

3) 縮瞳について

ラット 4 及び 13 週間反復投与毒性試験の 2000 mg/kg/日、並びにイヌ単回及び 4 週間反復投与毒性試験の 300 mg/kg/日以上で縮瞳が見られた。一般には、縮瞳は瞳孔括約筋の収縮あるいは瞳孔散大筋の弛緩により生じ、前者は頭部副交感神経、後者は頭部交感神経の支配を受けていることから、副交感神経の刺激あるいは交感神経の抑制により発現した可能性が考えられるが、本変化の発現機序は不明である。安全性薬理試験においても 1000 mg/kg以上で

2.4. 非臨床試験の概括評価

ラットに縮瞳が認められたが、同用量で瞳孔反射は消失していなかったことから、末梢神経系への作用が示唆された(2.6.2.4.1.項)。また、この縮瞳は投与後 24 時間には消失することが確認されている。縮瞳の発現はAUCよりも血漿中濃度に依存していると考えられることから、 C_{max} を用いて安全域を求めた。反復投与毒性試験における縮瞳に関する無毒性量は、ラットで 600 mg/kg/日、イヌで 100 mg/kg/日であり、 C_{max} はそれぞれ 115～166 $\mu\text{g/mL}$ 、78.9～84.9 $\mu\text{g/mL}$ であった。これらの C_{max} を最高臨床用量におけるヒトの C_{max} (1.20 $\mu\text{g/mL}$) と比較すると、66～138 倍の開きがあり、十分な安全域があると考えられた。第 I 相試験(単回・反復)において瞳孔径検査を実施したが、臨床的に問題となる変動は認められていない(2.7.6.3.1.項, 2.7.6.3.2.項)。

4) 肝臓及び甲状腺への影響について

ラット 4 及び 13 週間反復投与毒性試験において、600 mg/kg/日以上用量、主として 2000 mg/kg/日で肝臓重量の増加及び小葉中心帯肝細胞の肥大、並びに甲状腺重量の増加及び濾胞上皮の肥大が認められ、甲状腺ホルモン濃度測定では 2000 mg/kg/日で血漿中 T_4 濃度の減少傾向及びTSH濃度の増加傾向が見られた。マウス 13 週間反復投与毒性試験(がん原性予備試験)においても 2000 mg/kg/日で肝臓重量の増加及び小葉中心帯肝細胞の肥大が認められた。しかし、ラット及びマウスのいずれにおいても肝障害を示唆する病変は見られなかった。ラット及びマウスにアナグリプチンの高用量を反復投与し、肝薬物代謝酵素への影響を検討した結果、ラット及びマウスともにCYP系代謝酵素及び T_4 UDP-グルクロン酸転移酵素の誘導が認められた。ラットでは、肝臓における薬物代謝酵素誘導が、視床下部-下垂体-甲状腺系を通じて甲状腺を刺激することが知られている[25]。これらのことから、肝臓及び甲状腺の変化は、ともに肝薬物代謝酵素の誘導に伴う二次性的変化と考えられた。一般に、このような甲状腺の変化はげっ歯類で起こりやすいが、ヒトでは起こりにくいと言われている。ヒト肝細胞を用いた肝薬物代謝酵素誘導試験(2.6.4.5.7.項)では、アナグリプチンは 100 $\mu\text{g/mL}$ でわずかな誘導を示したが、最高臨床用量におけるヒトの C_{max} (1.20 $\mu\text{g/mL}$) と比較して 83 倍以上の極めて高濃度での変化であり、10 $\mu\text{g/mL}$ 以下では誘導は認められなかった。反復投与毒性試験における本変化に関する無毒性量は、ラットで 300 mg/kg/日 (AUC_{0-24h} : 301～380 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)、マウスで 1000 mg/kg/日 (AUC_{0-24h} : 265～391 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$) であった。

一方、サルでは、2 週間反復投与毒性試験(予備試験)の 1000 mg/kg/日以上で肝臓重量の増加を伴う小葉周辺帯肝細胞の肥大、小葉中心帯又は周辺帯肝細胞の脂肪化及びびまん性肝細胞の明調化が、4 週間反復投与毒性試験の 600 mg/kg/日(一部 200 mg/kg/日)で肝臓重量の増加を伴うびまん性肝細胞の脂肪化が認められた。また、これらの変化は血液生化学的検査で脂質の増加を伴っており、脂質代謝異常を示唆した。しかし、これら変化のほとんどは死亡又は瀕死動物で見られたもので、致死量域での変化と考えられた。サル 13 及び 52 週間反復投与毒性試験では、最高用量の 300 mg/kg/日においても肝臓及び甲状腺への影響は認められなかった。したがって、サルの肝臓及び甲状腺に対する無毒性量は 300 mg/kg/日(52 週間, AUC_{0-24h} : 292～362 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$) と考えられた。

上記の肝臓及び甲状腺に認められた変化は、回復性試験により可逆性であることが確認されている。肝臓及び甲状腺に対する無毒性量における曝露量を最高臨床用量におけるヒト推定曝露量 (AUC_{0-24h} : 9.46 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$) と比較すると、28～41 倍の開きがあり、十分な安全域が

2.4. 非臨床試験の概括評価

あると考えられた。臨床試験では、肝臓又は甲状腺に対する有害事象はなく、また、トランスアミナーゼなどの臨床検査値の変動が多く発現する傾向はなかった（表 2.7.4.7-17、表 2.7.4.7-21）。

5) 腎臓への影響について

ラット 4、13 及び 26 週間反復投与毒性試験において、400 mg/kg/日以上以上の用量、主として 2000 mg/kg/日で摂水量の増加を伴う尿検査値の変動（尿量の増加、尿浸透圧の低下、ナトリウム、カリウム及び塩素排泄量の増減、尿たん白陽性例数の増加）が認められた。しかし、いずれの試験においても、腎臓の組織学的変化は認められなかった。補足的安全性薬理試験（2.6.2.4.4.項、2.6.2.4.5.項）では、尿量の増加、並びに尿中ナトリウム、カリウム及び塩素排泄量の増加、糸球体濾過量及び腎血漿流量の低下が認められた。糸球体濾過量の低下は濾過率に影響が認められなかったことから、腎血漿流量の低下による変化と考えられた。サル 2 及び 4 週間反復投与毒性試験では、高用量（1000 mg/kg/日以上及び 600 mg/kg/日）で死亡又は瀕死動物が発現した。それらの動物では、尿素窒素及びクレアチニンの著増、電解質異常、並びに尿細管障害（尿細管上皮細胞の微細空胞化、脂肪化、壊死、好酸性硝子滴及びPAS陽性顆粒出現など）が認められたことから、死因は急性腎不全と推察された。また、高用量群の生存例でも尿細管に変化が見られた。腎臓への影響を更に検討するため、サルを用いてアナグリプチンの 1000 mg/kg/日を反復投与し、経時的に尿中バイオマーカー測定及び電子顕微鏡検査を行った。その結果、近位尿細管障害の尿中バイオマーカーであるクラスτεリン及びオステオポンチンが変動し[26]、組織学的にも近位尿細管上皮細胞に微細空胞が見られた。これらのことから、作用部位は近位尿細管と考えられ、尿細管上皮細胞の微細空胞が初期変化であると考えられた。一般的に尿細管上皮に空胞が観察された場合、液胞（apical vacuole）の増加ないし大型化であるものと、lamellar bodyを含んだ大型ライソゾームの増加である場合とが多いと言われている[27]。電子顕微鏡検査において、近位尿細管上皮細胞に比較的多数の膜様の小胞やわずかな顆粒状物を含む限界膜に囲まれた多数の小腔が観察されたことから、それらの変化とは相違した。サル 2 及び 4 週間反復投与毒性試験において、アナグリプチン投与により認められる尿細管上皮細胞内の微細空胞は、オイルレッドO染色及びPAS染色でいずれも陰性であったことから、脂質及び糖質ではないことが確認されているが、空胞化の原因については明らかにできなかった。以上のことから、発現機序の詳細は明らかでないが、アナグリプチンは近位尿細管に作用して腎障害を誘発すると考えられた。ラット及びサルで認められた腎臓への影響は、回復性試験により可逆性であることが確認されている。腎臓に対する無毒性量は、ラット 26 週間反復投与毒性試験及びサル 52 週間反復投与毒性試験のいずれにおいても 300 mg/kg/日（AUC_{0-24h}、ラット：301～380 µg·h/mL、サル：292～362 µg·h/mL）であった。これらの曝露量を最高臨床用量におけるヒト推定曝露量（AUC_{0-24h}：9.46 µg·h/mL）と比較すると、31～40 倍の開きがあり、十分な安全域があると考えられた。臨床試験では、アナグリプチン投与によりクレアチニンなどの臨床検査値の変動が多く発現する傾向はなかった（表 2.7.4.7-17、表 2.7.4.7-21）。

2. 4. 非臨床試験の概括評価

6) 消化管への影響について

イヌ単回投与毒性試験において、300 mg/kgで軟便又は粘液便が見られ、便潜血検査で陽性反応が見られた。また、イヌ4週間反復投与毒性試験でも、同用量で同様の便の異常及び便潜血反応陽性が見られ、病理組織学的検査において消化管の粘膜固有層に好酸球の増加が認められた。本変化の発現機序は不明であるが、DPP-8/9 選択的阻害剤をイヌに単回投与した際、血性の下痢が認められるとの報告がある[15]。アナグリプチンは、DPP-8、DPP-9 及びその他DPP-4 類縁酵素に対するDPP-4 選択性は少なくとも17,000 倍(DPP-9)を示し、高いDPP-4 選択性を有している(2.6.2.2.3.項)ことから、DPP-8/9 の選択阻害が関与した可能性は低いと考えられた。サルでは、2週間反復投与毒性試験(予備試験)において1000 mg/kg/日以上 of 瀕死動物で黒色便又は粘血便及び便潜血反応陽性が見られ、病理組織学的検査において消化管のびらん、出血及び細胞浸潤が認められた。しかし、これらは致死量域での変化であった。4週間反復投与毒性試験では60 mg/kg/日以上で軽度な胃粘膜障害が認められたが、13及び52週間反復投与毒性試験では300 mg/kg/日を長期間投与しても消化管障害を示唆する変化は認められなかった。ラットでは、2000 mg/kg/日までを4及び13週間、1000 mg/kg/日までを26週間反復投与したが、消化管障害を示唆する変化は認められなかった。したがって、アナグリプチンの消化管への影響には種差が存在すると考えられた。イヌ及びサルで認められた消化管への影響は、回復性試験により可逆性であることが確認されている。また、本変化に関する無毒性量は、イヌで100 mg/kg/日(AUC_{0-24h}: 369~397 µg·h/mL)、サルで300 mg/kg/日(52週間, AUC_{0-24h}: 292~362 µg·h/mL)と考えられた。これらの曝露量を最高臨床用量におけるヒト推定曝露量(AUC_{0-24h}: 9.46 µg·h/mL)と比較すると、31~42倍の開きがあり、十分な安全域があると考えられた。臨床試験の合併解析結果から、ヒトにおいてアナグリプチンによる消化管出血の発現リスクは低いことが示されている[2.5.5.4.(4)3)c)項]。

7) 雌雄生殖器への影響について

ラット4及び13週間反復投与毒性試験において、2000 mg/kg/日で精細管上皮の変性、精細管の萎縮及び空胞化、並びに精巣上体で管腔内細胞残屑及び精子数の減少が認められた。また、雄ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験において、同用量で生殖器の病理学的変化の他に精子数及び運動精子率の減少が見られた。アナグリプチンの2000 mg/kg/日を雄ラットに投与して性ホルモンへの影響を検討した結果、血清中プロラクチンの増加、並びに血清中及び精巣中テストステロン濃度の減少が認められた。テストステロンの低下により、精細管萎縮、精子数減少などの変化が発現することが知られている[28]。また、精子が運動能及び受精能を獲得する精巣上体の機能の維持はアンドロゲン、特に組織中でテストステロンから変換される5α-ジヒドロテストステロンに依存している[29]。したがって、雄生殖器に対する影響には、テストステロンの低下が関与している可能性が推察された。テストステロン低下の原因に関しては、アナグリプチン投与により血清中プロラクチンの増加が見られたこと、ヒト副腎皮質由来のH295R細胞を用いた性ホルモン産生に対する影響を検討した結果、テストステロン産生の抑制(ラット13週間反復投与毒性試験における2000 mg/kg/日群のC_{max}付近の濃度を曝露)が認められたことから、高プロラクチンによるテストステロンの低下[30][31]及び直接的な産生抑制による低下の可能性が推察された。その他、ラット13週間反復投与毒性試験の2000 mg/kg/日で、乳腺の腺房細胞の萎縮及び下垂体の去

2. 4. 非臨床試験の概括評価

勢細胞の増加が見られたが、アナグリプチン投与によるテストステロンの低下あるいは精巢の障害に起因した二次性的変化と考えられた。

ラット 13 及び 26 週間反復投与毒性試験のそれぞれ 2000 及び 1000 mg/kg/日で、卵巢重量の増加及び子宮重量の減少、卵巢黄体の大型化、子宮内膜間質の萎縮、並びに膣粘膜上皮の粘液変性が見られた。また、雌ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験の 2000 mg/kg/日において、性周期の延長（発情休止期の持続）が見られた。同様の性周期異常は、26 週間反復投与毒性試験においても確認されている。アナグリプチンの 2000 mg/kg/日を雌ラットに投与して性ホルモンへの影響を検討した結果、血清中プロラクチン及びプロゲステロンの増加、並びにエストラジオールの減少が見られた。エストロゲンの産生抑制は、子宮の萎縮、膣粘膜上皮の粘液変性及び発情休止期の持続を誘発し[32][33]、プロゲステロンが卵胞成熟を遅延させ、結果として発情休止期を持続させることが報告されている[34][35]。また、プロラクチンの増加は、エストロゲンの減少[36]及びプロゲステロンを不活性な 20 α -ジヒドロプロゲステロンに代謝する酵素である 20 α -水酸化ステロイド脱水素酵素活性の抑制に関与している[37]。したがって、雌生殖器に対する影響は、これら性ホルモンの変動が関与している可能性が推察された。

上記の雌雄生殖器に認められた変化は、回復性試験により可逆性であることが確認されている。イヌ及びサル反復投与毒性試験、並びにマウスがん原性試験では、ラットで見られたような生殖器の変化は認められなかった。また、サル 52 週間反復投与毒性試験では月経頻度、月経周期及び月経持続期間について解析を行ったが、アナグリプチン投与に起因する変化は認められなかった。したがって、本変化には種差が存在すると考えられた。ラット生殖器に対する無毒性量は、ラット 26 週間反復投与毒性試験において雄で 1000 mg/kg/日、雌で 300 mg/kg/日であったが、ラットがん原性試験の雄では 600 mg/kg/日でもアナグリプチン投与の影響が認められたことから、そのことを考慮して、雌雄ともに 300 mg/kg/日（AUC_{0-24h}、雄：301 μ g·h/mL、雌：380 μ g·h/mL）と推定した。これらの曝露量を最高臨床用量におけるヒト推定曝露量（AUC_{0-24h}：9.46 μ g·h/mL）と比較すると、32～40 倍の開きがあり、十分な安全域があると考えられた。

8) 貧血について

ラット 13 週間反復投与毒性試験の 400 mg/kg/日以上及び 26 週間反復投与毒性試験の 1000 mg/kg/日で、赤血球数、ヘモグロビン量及びヘマトクリット値の低下などの貧血所見が見られた。更に、13 週間反復投与毒性試験の 2000 mg/kg/日では網赤血球率の増加及び小型球状赤血球の出現が見られ、骨髓検査において赤芽球系細胞比率の増加が見られた。また、病理組織学的検査において、脾臓での髄外造血の亢進、ヘモジデリン沈着を示唆する褐色色素沈着及びベルリンブルー陽性顆粒の増強が見られ、肝臓でもベルリンブルー陽性顆粒の増強が見られた。網赤血球率の増加、骨髓での赤芽球系細胞比率の増加及び脾臓での髄外造血の亢進は、貧血に対する反応性変化と考えられた。また、末梢血中に小型球状赤血球が出現し、脾臓及び肝臓にヘモジデリンの沈着が見られたことから、溶血性貧血が示唆された。マウス 13 週間反復投与毒性試験（がん原性予備試験）においても 2000 mg/kg/日で極めて軽度な貧血所見が見られたが、造血器系器官の変化を伴うものではなかった。マウスがん原性試験では、2000 又は 2000/1000 mg/kg/日をより長期間投与しても貧血所見は見られなかった。サル

2. 4. 非臨床試験の概括評価

反復投与毒性試験では、アナグリプチン投与に起因する貧血所見は認められなかった。ラットで認められた貧血性変化は、回復性試験により可逆性であることが確認されている。ラット反復投与毒性試験における貧血性変化に関する無毒性量は、300 mg/kg/日（AUC_{0-24h}：301～380 µg·h/mL）であった。この曝露量を最高臨床用量におけるヒト推定曝露量（AUC_{0-24h}：9.46 µg·h/mL）と比較すると、32～40 倍の開きがあり、十分な安全域があると考えられた。臨床試験では、アナグリプチン投与により赤血球数などの減少が多く発現する傾向はなかった（表 2.7.4.7-17、表 2.7.4.7-21）。

2. 4. 4. 3. 遺伝毒性試験

細菌を用いた復帰突然変異試験（2.6.6.4.1.項）、ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験（2.6.6.4.2.項）、並びにラットを用いた小核試験（2.6.6.4.3.項）及び不定期 DNA 合成（UDS）試験（2.6.6.4.4.項）を実施した。染色体異常試験において、短時間処理法の代謝活性化系非存在下で陽性を示したが、極めて高用量（3835 µg/mL）での変化であり、また他の *in vitro* 及び *in vivo* 試験では陰性であったことから、アナグリプチンが生体内で遺伝毒性を示す可能性は低いと考えられた。

2. 4. 4. 4. がん原性試験

(1) がん原性

マウス 104 週間反復経口投与がん原性試験（200, 600 及び 2000 mg/kg/日）を実施した。雄の高用量群は、投与 52 週を経過する頃より毒性によると考えられる死亡（瀕死期剖検動物を含む）が多発したことから、投与 74 週以降 1000 mg/kg/日に減量したが、その後も死亡が多発したことから、投与 102 週で剖検した。本試験の結果、アナグリプチンにがん原性は認められなかった（2.6.6.5.2.項）。

ラット 104 週間反復経口投与がん原性試験（200, 600 及び 2000 mg/kg/日）を実施した。雄の高用量群は、投与 52 週を経過する頃より毒性によると考えられる死亡（瀕死期剖検動物を含む）が多発したことから、投与 71 週以降 1000 mg/kg/日に減量（以下、2000/1000 mg/kg/日と記載）したが、その後も死亡が多発したことから、投与 84 週で剖検した。また、雌の中及び高用量群は、生存率の著しい低下が認められたため、投与 101 週及び投与 99 週で剖検した。本試験の結果、2000/1000 mg/kg/日の雄で肝臓の血管肉腫の発生頻度の増加が見られ、2000 mg/kg/日の雌 1 例の肝臓にも同様の血管肉腫が見られた。また、2000/1000 mg/kg/日の雄の膀胱において、結石及び移行上皮の単純性過形成の発生頻度が増加し、移行上皮乳頭腫の発生頻度の増加傾向が見られた（2.6.6.5.3.項）。

(2) 腫瘍発生についての考察

1) ラットにおける肝臓の血管肉腫について

ラットがん原性試験において、2000/1000 mg/kg/日の雄で肝臓血管肉腫の発生頻度の増加が見られ、2000 mg/kg/日の雌 1 例の肝臓にも同様の血管肉腫が見られた。しかし、肝臓以外の器官・組織には血管肉腫の発生頻度の増加は見られなかった。アナグリプチンが生体内で遺伝毒性を示す可能性は低いことから、肝臓血管肉腫の発生頻度の増加は非遺伝毒性メカニズムによるものと考えられた。げっ歯類においては、溶血により血管肉腫が誘発されることが

2. 4. 非臨床試験の概括評価

報告されており[38]、その作用機序としては、溶血による局所組織の低酸素状態がマクロファージを活性化し、それにより内皮細胞の増殖を刺激する血管新生促進因子やサイトカインが放出されて無調節な血管新生が起こり、この状態が長期間持続することにより血管肉腫が誘発されることが考えられている[38]。ラット反復投与毒性試験で溶血性貧血が見られており、本試験においても高用量群で同様の貧血が見られていることから、アナグリプチン投与により認められた血管肉腫は、溶血によって二次的に誘発された可能性が考えられた。血管肉腫の増加が肝臓に限定して認められた理由は明らかではないが、おそらく肝臓固有の大食細胞であるクッパー細胞が溶血に基づくヘモジデリン沈着により活性化されたからではないかと推察される。アナグリプチン投与による血管肉腫増加のメカニズム及びヒトへの外挿性は必ずしも明らかではないが、アナグリプチンが生体内で遺伝毒性を示す可能性は低いこと、ヒトにおける血管肉腫の自然発生は極めてまれ（＜ 0.001%）であること[38]、アナグリプチン投与による血管肉腫の増加は最高臨床用量（1回 200 mg, 1日 2回）におけるヒト推定曝露量と比較して 200 倍/140 倍以上の極めて高用量においてのみ認められた変化であり、80 倍以上の安全域が存在することから、本試験で認められた肝臓血管肉腫の増加は、ヒトでのリスクを示唆するものではないと考えられた。

2) ラットにおける膀胱の移行上皮乳頭腫について

ラットがん原性試験において、2000/1000 mg/kg/日の雄で膀胱移行上皮乳頭腫の発生頻度の増加傾向が見られた。本腫瘍の発生頻度は 60 例中 3 例と高いものではなく、対照群との対比較でも有意差は認められなかったが、傾向検定で有意な増加傾向が認められた。2000/1000 mg/kg/日の雄では、膀胱結石及び膀胱移行上皮の単純性過形成の発生頻度の増加が見られた。ラットの移行上皮乳頭腫は、単純性過形成、乳頭状ないし結節状過形成を経て発生する[39]。げっ歯類では膀胱結石などの異物による慢性的な物理的刺激は、膀胱腫瘍を誘発することが知られている[40]ことから、アナグリプチン投与による膀胱移行上皮乳頭腫の発生には、膀胱結石が関与している可能性が考えられた。また、尿pHの上昇や尿中ナトリウム又はカリウムの増加がプロモーターとして作用して、膀胱腫瘍を発生させることが知られている[41][42]。ラット反復投与毒性試験では、2000 又は 1000 mg/kg/日投与により尿pHの上昇傾向や尿中電解質排泄量の増加が認められていることから、膀胱結石だけでなく、これら尿成分の変化の関与も加わった可能性が考えられた。ヒトでは膀胱結石と膀胱腫瘍発生との間に相関性は認められていないことから、膀胱結石による膀胱がんは、げっ歯類に特異な現象であり、ヒトへの外挿性は低いと考えられている[41][42]。アナグリプチン投与による膀胱移行上皮乳頭腫増加のメカニズムは必ずしも明らかではないが、本腫瘍の発生頻度は高いものではないこと、アナグリプチンが生体内で遺伝毒性を示す可能性は低いこと、80 倍以上の安全域が存在していることから、本試験で認められた膀胱移行上皮乳頭腫の増加は、ヒトでのリスクを示唆するものではないと考えられた。

2. 4. 4. 5. 生殖発生毒性試験

(1) 生殖発生毒性

ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（雄投与試験と雌投与試験に分けて実施）、ラット及びウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験、ラット出生前及び出

2.4. 非臨床試験の概括評価

生後の発生並びに母体の機能に関する試験を実施した。

ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（雄投与試験）（200, 600 及び 2000 mg/kg/日）では、雄動物に及ぼす一般毒性学的影響として、2000 mg/kg/日で体重増加抑制、摂餌量の減少、摂水量の増加、肝臓重量の増加、精巣の小型化、精巣及び精巣上体重量の減少、精細管の萎縮及び空胞化、並びに精巣上体の管腔内精子の減少及び管腔内細胞残屑が見られた。雄動物の生殖機能に及ぼす影響として、2000 mg/kg/日で精子数及び運動精子率の低下が見られ、それにより受胎能は消失した。初期胚発生に及ぼす影響は 600 mg/kg/日まで認められなかった。雄動物の一般毒性学的無毒性量及び生殖機能に関する無毒性量、並びに初期胚発生に関する無毒性量は、いずれも 600 mg/kg/日と推定された（2.6.6.6.1.項）。

ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（雌投与試験）（200, 600 及び 2000 mg/kg/日）では、雌動物に及ぼす一般毒性学的影響として、600 mg/kg/日以上で肝臓重量の増加、2000 mg/kg/日で体重増加量及び摂餌量の減少、並びに摂水量の増加が見られた。雌動物の生殖機能に及ぼす影響として、2000 mg/kg/日で性周期の延長が見られた。初期胚発生に及ぼす影響は認められなかった。雌動物の一般毒性学的無毒性量は 200 mg/kg/日、生殖機能に関する無毒性量は 600 mg/kg/日、初期胚発生に関する無毒性量は 2000 mg/kg/日と推定された（2.6.6.6.2.項）。

ラット胚・胎児発生に関する試験（200, 600 及び 2000 mg/kg/日）では、母動物に及ぼす一般毒性学的影響として、600 mg/kg/日以上で摂水量の増加、2000 mg/kg/日で体重増加量及び摂餌量の減少、並びに肝臓重量の増加が見られた。しかし、生殖機能に及ぼす影響は認められなかった。胚・胎児発生に及ぼす影響として、2000 mg/kg/日で胎児の発育遅延を示唆する生存胎児体重の減少、並びに仙尾椎骨の骨化数の減少及び第 5 胸骨核骨化率の減少傾向が見られた。しかし、催奇形性作用は認められなかった。母動物の一般毒性学的無毒性量は 200 mg/kg/日、母動物の生殖機能に関する無毒性量は 2000 mg/kg/日、胚・胎児発生に関する無毒性量は 600 mg/kg/日と推定された（2.6.6.6.3.項）。

ウサギ胚・胎児発生に関する試験（150, 300 及び 600 mg/kg/日）では、母動物に及ぼす一般毒性学的影響として、600 mg/kg/日で排糞量の減少、無排便、体重増加抑制及び摂餌量の減少が見られた。母動物の生殖機能に及ぼす影響として、600 mg/kg/日で流産が見られた。胚・胎児発生に及ぼす影響は認められなかった。母動物の一般毒性学的無毒性量及び生殖機能に関する無毒性量は 300 mg/kg/日、胚・胎児発生に関する無毒性量は 600 mg/kg/日と推定された（2.6.6.6.4.項）。

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（200, 600 及び 2000 mg/kg/日）では、母動物に及ぼす一般毒性学的影響として、600 mg/kg/日以上で摂餌量の減少、体重増加抑制及び摂水量の増加、2000 mg/kg/日で肝臓重量の増加が見られた。しかし、生殖機能に及ぼす影響は認められなかった。出生児に及ぼす影響として、600 mg/kg/日以上で発育抑制（体重増加抑制）が見られた。しかし、外表分化、感覚・反射機能、行動・学習及び生殖機能に対する影響は認められなかった。母動物の一般毒性学的無毒性量は 200 mg/kg/日、母動物の生殖機能に関する無毒性量は 2000 mg/kg/日、出生児に関する無毒性量は 200 mg/kg/日と推定された（2.6.6.6.5.項）。

2.4. 非臨床試験の概括評価

(2) 生殖発生毒性の考察

雄ラット受胎能・初期胚発生試験では、精巣障害に起因する受胎能の消失が認められた。雌ラット受胎能・初期胚発生試験では、性周期の延長（発情休止期の持続）が見られたが、受胎能を含む他の生殖機能には影響は認められなかった。これらいずれの試験においても、初期胚発生に対する影響は認められなかった。精巣に対する影響及び性周期の異常は、アナグリプチンの高用量投与により雌雄ともに性ホルモンへの影響が認められることから、それと関連した変化と考えられた。雌雄動物の生殖機能に関する無毒性量における曝露量（ AUC_{0-24h} ：448～678 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ ）（注1）は、最高臨床用量（1回200 mg，1日2回）におけるヒト推定曝露量（ AUC_{0-24h} ：9.46 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ ）の47～72倍，初期胚発生に関する無毒性量における曝露量（ AUC_{0-24h} ，雄動物：448 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ ，雌動物：2260 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ ）は雄で47倍，雌で239倍であった。

注1) ラット受胎能・初期胚発生試験の曝露量は、ラット4週間反復投与毒性試験の AUC_{0-24h} を外挿した。

ラット胚・胎児発生試験では、母動物に一般毒性学的影響が認められる用量で胎児の発育遅延が認められた。しかし、胚・胎児致死作用及び催奇形性作用は認められなかった。また、母動物の生殖機能に対する影響も認められなかった。アナグリプチンは胎児への移行が認められるが、胎児組織の AUC_{0-48h} は母体血漿の0.51倍以下と低いことが示されている[2.6.4.4.6.(1)項]ことから、胎児の発育遅延に対する関与は低いと考えられた。胚・胎児発生に関する無毒性量における母動物の曝露量（ AUC_{0-24h} ：865 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ ）は、最高臨床用量におけるヒト推定曝露量の91倍，母動物の生殖機能に関する無毒性量における曝露量（ AUC_{0-24h} ：4050 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ ）は428倍であった。ウサギ胚・胎児発生に関する試験では、母動物に対する一般毒性学的影響に起因すると考えられる流産が認められた。しかし、胚・胎児発生に対する影響は認められなかった。胚・胎児発生に関する無毒性量における母動物の曝露量（ AUC_{0-24h} ：819 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ ）は、最高臨床用量におけるヒト推定曝露量の87倍，母動物の生殖機能に関する無毒性量における曝露量（ AUC_{0-24h} ：391 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ ）は41倍であった。

ラット出生前後発生・母体機能試験では、母動物に一般毒性学的影響が認められる用量で出生児の発育抑制（体重増加抑制）が認められた。しかし、母動物の生殖機能、並びに出生児の外表分化、感覚・反射機能、行動・学習及び生殖機能に対する影響は認められなかった。出生児に認められた発育抑制に関して、出生時の体重には影響がなく、その後、授乳期間中に体重増加抑制が見られていることから、授乳に対する又は授乳を介した影響が示唆された。母動物では授乳期間中に体重増加抑制が見られているが、一般状態及び哺育行動には異常が見られていないことから、乳汁分泌抑制の可能性が考えられた。また、アナグリプチンは乳汁中への移行が認められる（乳汁/血漿中濃度比：3.35～14.25，2.6.4.6.5.項）ことから、乳汁を介したアナグリプチンへの曝露の影響の可能性も考えられた。出生児に関する無毒性量における母動物の曝露量（ AUC_{0-24h} ：186 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ ）（注2）は、最高臨床用量におけるヒト推定曝露量の20倍，母動物の生殖機能に関する無毒性量における曝露量（ AUC_{0-24h} ：4050 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ ）は428倍であった。

注2) ラット出生前後発生・母体機能試験の曝露量は、ラット胚・胎児発生試験の AUC_{0-24h} を外挿した。

以上のことから、雌雄動物又は母動物の生殖機能、並びに胚、胎児又は出生児に関する無

2. 4. 非臨床試験の概括評価

毒性量は、十分な安全域を有していると考えられた。

2. 4. 4. 6. その他の毒性試験

(1) 抗原性試験

モルモットを用いて能動全身性アナフィラキシー（ASA）反応及び同種受身皮膚アナフィラキシー（PCA）反応を、マウスを用いて異種（ラット）PCA 反応を行った結果、いずれの反応も陰性であり、アナグリプチンは抗原性を示さないものと考えられた（2.6.6.8.1.項）。

(2) 免疫毒性試験

ラットを用いて 4 週間反復経口投与による免疫毒性試験（200, 600 及び 2000 mg/kg/日）を実施した。T 細胞依存性抗原に対する特異抗体産生能及びリンパ球サブセットに対する影響を指標にした。その結果、いずれの指標においてもアナグリプチン投与による影響は認められず、アナグリプチンは免疫毒性を示さないものと考えられた（2.6.6.8.2.項）。

(3) 毒性発現の機序に関する試験

ラット及びマウス反復投与毒性試験で肝臓重量の増加及び小葉中心帯肝細胞の肥大、甲状腺重量の増加、並びに濾胞上皮の肥大が認められたことから、肝薬物代謝酵素に対する影響を検討した。ラット反復投与毒性試験で雌雄生殖器官障害（雄：精巣及び精嚢重量の減少、精細管の萎縮、精巣上体の管腔内細胞残屑・精子数の減少、雌：卵巣重量の増加、子宮重量の減少、卵巣黄体の大型化、子宮内膜間質の萎縮、膈粘膜上皮の粘液変性）、雌ラット受胎能試験で性周期の延長（発情休止期の持続）が認められたことから、性ホルモンに対する影響を検討した。また、サル反復投与毒性試験で腎障害が認められたことから、尿中バイオマーカー測定及び電子顕微鏡検査による検討を行った。

1) マウス肝薬物代謝酵素に対する影響

アナグリプチンの 200, 600 及び 2000 mg/kg/日を雌雄のマウスに 2 週間反復経口投与し、肝薬物代謝酵素に対する影響を検討した。200 mg/kg/日以上雌雄で 7-エトキシレゾルフィン *O*-脱エチル化酵素活性（CYP1A1/2）及びテストステロン 16 β -水酸化酵素活性（CYP2B9/10）の増加が見られた。更に、2000 mg/kg/日の雌雄でテストステロン 6 β -水酸化酵素活性（CYP3A11）及びT₄ UDP-グルクロン酸転移酵素活性の増加が見られた。したがって、アナグリプチンは、マウスにおいてCYP系代謝酵素及びT₄ UDP-グルクロン酸転移酵素を誘導するものと考えられた [2.6.6.8.3.(1)項]。

2) ラット肝薬物代謝酵素に対する影響

アナグリプチンの 2000 mg/kg/日を雌雄のラットに 4 週間反復経口投与し、肝薬物代謝酵素に対する影響を検討した。雌雄でテストステロン 16 β -水酸化酵素活性（CYP2B1）、テストステロン 6 β -水酸化酵素活性（CYP3A1/2）及びT₄ UDP-グルクロン酸転移酵素活性の増加、雄でエトキシレゾルフィン *O*-脱エチル化酵素活性（CYP1A1/2）及びテストステロン 7 α -水酸化酵素活性（CYP2A1/2）の増加、並びにテストステロン 2 α -水酸化酵素活性（CYP2C11）の減少が見られた。したがって、アナグリプチンは、ラットにおいてCYP系代謝酵素及びT₄ UDP-

2.4. 非臨床試験の概括評価

グルクロン酸転移酵素を誘導するものと考えられた [2.6.6.8.3.(2)項]。

3) 雄ラット性ホルモンに対する影響

アナグリプチンの 2000 mg/kg/日を雄ラットに単回、並びに 1, 2 及び 4 週間反復経口投与し、血清中の LH, FSH, プロラクチン, テストステロン及びエストラジオール、並びに精巣中のテストステロンに対する影響を検討した。1, 2 及び 4 週間反復投与後に血清中テストステロン濃度の減少傾向、並びに 4 週間反復投与後に精巣中テストステロン濃度の減少傾向が見られた。また、すべての投与期間で血清中プロラクチン濃度の増加傾向が見られた。以上の結果より、アナグリプチンの高用量投与による雄ラットにおけるテストステロン及びプロラクチンに対する影響が確認された [2.6.6.8.3.(3)項]。

4) 雌ラット性ホルモンに対する影響：単回投与試験

アナグリプチンの 2000 mg/kg を発情前期の雌ラットに単回経口投与し、投与後 1, 4, 7, 10, 13 及び 24 時間に血清中の LH, FSH, プロラクチン, エストラジオール及びプロゲステロンに対する影響を検討した。投与後 1, 4 及び 7 時間に血清中エストラジオール濃度の減少、投与後 1 及び 4 時間に血清中プロゲステロン濃度の増加、並びに投与後 1 時間に血清中プロラクチン濃度の増加が見られた。以上の結果より、アナグリプチンの高用量単回投与による雌ラットにおけるエストラジオール、プロゲステロン及びプロラクチンに対する影響が確認された [2.6.6.8.3.(4)項]。

5) 雌ラット性ホルモンに対する影響：反復投与試験

アナグリプチンの 2000 mg/kg/日を雌ラットに単回、並びに 2 及び 4 週間反復経口投与し、血清中の LH, FSH, プロラクチン, エストラジオール及びプロゲステロンに対する影響を検討した。すべての投与期間で血清中プロラクチン及びプロゲステロン濃度の増加が見られた。以上の結果より、アナグリプチンの高用量反復投与による雌ラットにおけるプロゲステロン及びプロラクチンに対する影響が確認された [2.6.6.8.3.(5)項]。

6) H295R 細胞の性ホルモン産生に対する影響

ヒト副腎皮質由来の H295R 細胞を用いて、アナグリプチンの性ホルモン産生に対する影響を検討した。最高用量の 1300 µmol/L (ラット 13 週間反復投与毒性試験における 2000 mg/kg/日の C_{max} 付近の濃度) で、テストステロン濃度の減少が認められた。したがって、高濃度のアナグリプチンはステロイド合成系に直接作用し、テストステロンの産生を抑制すると考えられた [2.6.6.8.3.(6)項]。

7) 高用量投与によるサル腎臓に対する影響

アナグリプチンの 1000 mg/kg/日を雌のカニクイザルに 3, 11 及び 14 日間反復経口投与し、尿中バイオマーカー測定、並びに電子顕微鏡検査により腎臓の作用部位及び初期変化について検討した。アナグリプチン投与により近位尿細管障害の尿中バイオマーカーであるクラスレリン及びオステオポンチンが変動し、組織学的にも近位尿細管に変化が見られたことから、作用部位は近位尿細管と考えられた。また、初期変化は尿細管上皮細胞の微細空胞と考えら

2.4. 非臨床試験の概括評価

れた [2.6.6.8.3.(7)項]。

(4) 主代謝物 (SKL-12320) の毒性試験

ヒトにおける主代謝物はSKL-12320であることが明らかにされていることから(2.7.2.3.1.3.項), SKL-12320 の安全性を評価した。アナグリプチンのラット反復投与毒性試験, ラット及びウサギ胚・胎児発生試験, 並びにラットがん原性試験において, 無毒性量におけるSKL-12320 の曝露量は, 最高臨床用量 (1 回 200 mg, 1 日 2 回) におけるヒト推定曝露量を上回っていることから(表 2.6.6.9-2), SKL-12320 の一般毒性, 生殖発生毒性及びがん原性は, アナグリプチンの投与試験において評価され, それにより安全性が担保されていると考えられた。一方, アナグリプチンは, 肝 S9 によりほとんど代謝されないことから (2.6.4.5.6.項), 遺伝毒性については SKL-12320 の *in vitro* 試験を実施して評価した。

SKL-12320 の細菌を用いた復帰突然変異試験及びほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験を行った結果, いずれも陰性であり, SKL-12320 は遺伝毒性を示さないものと考えられた (2.6.6.8.4.項)。

(5) 不純物 (SKL-12309) の毒性試験

アナグリプチンの製剤中に含まれる不純物のうち, 原薬の分解生成物である SKL-12309 の申請規格値は 0.5%以下 (2.3.P.5.1.項, 2.3.P.5.5.項) であり, ICH ガイドラインの Q3B (R2) において, 安全性確認が必要とされている閾値 (0.2%) を越えて規格が設定されている。したがって, 申請規格値以上の SKL-12309 を含む SKL-12309 添加アナグリプチン (SKL-12309 を 3.65%含有, アナグリプチン ad と略) を用いて, ラットの 4 週間反復経口投与毒性試験及び *in vitro* 遺伝毒性試験を実施した。

アナグリプチン ad の 200+7.58, 600+22.7 及び 2000+75.8 mg/kg/日 (アナグリプチン+SKL-12309) を雌雄のラットに 4 週間反復経口投与し, そのときの毒性を検討するとともに, SKL-12309 非添加のアナグリプチンの毒性と比較した。その結果, アナグリプチン ad で見られた変化はアナグリプチンと同様であり, SKL-12309 添加の有無による毒性所見の差は認められなかった。したがって, SKL-12309 はアナグリプチンの毒性に影響を及ぼさないと考えられた [2.6.6.8.5.(1)項]。

細菌を用いた復帰突然変異試験及びほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験を行った結果, いずれも陰性であり, アナグリプチン ad は遺伝毒性を示さないものと考えられた [2.6.6.8.5.(2)項, 2.6.6.8.5.(3)項]。

2. 4. 非臨床試験の概括評価

2. 4. 5. 総括及び結論

2. 4. 5. 1. 薬理試験

アナグリプチンは、*in vitro*（ラット、イヌ及びヒト）及び *in vivo*（ラット及びイヌ）における DPP-4 阻害作用試験、並びに種々の DPP-4 類縁酵素、プロテアーゼ、受容体及びイオンチャネルに対する作用を評価した一連の選択性試験の結果から、強力な阻害作用を有する選択性の高い DPP-4 阻害剤であることが明らかとなった。

アナグリプチンは、正常動物及び糖尿病モデル動物（ラット又はイヌ）を用いた単回経口投与試験において、血漿DPP-4 活性を用量に依存して阻害し、消化管から分泌されるGLP-1の分解を抑制した。この作用により、内因性の活性型GLP-1 濃度が上昇し、グルコース依存性の膵β細胞からのインスリン分泌が促進されて血糖上昇を抑制し、血糖コントロールを改善した。アナグリプチンによるGLP-1 の分解抑制作用が明らかとなったが、GLP-1 と同様にGIPもDPP-4 の基質であり、DPP-4 阻害による分解抑制が確認されている[3]。すなわち、アナグリプチンは、GLP-1 に加えてGIPの分解も抑制し、これらによるインクレチン作用を増強しているものと推察された。なお、臨床試験では、アナグリプチンを投与した2型糖尿病患者において、食後の血漿活性型GLP-1 及びGIP濃度の上昇が認められている(2.7.6.3.9項)。

アナグリプチンによる耐糖能改善作用は、肥満・インスリン抵抗性モデル動物の Zucker fatty ラット及び非肥満2型糖尿病モデル動物の GK ラットにおいて、いずれも OGTT 後の血漿インスリン濃度及び血漿グルコース濃度に対して同様に確認されたことから、肥満やインスリン抵抗性の程度に関わらず、広く2型糖尿病患者に対して有効性を示す可能性が示唆された。

また、アナグリプチンは、ナテグリニドやグリベンクラミドのような既存のインスリン分泌促進剤と異なり、正常ラットの絶食時における正常血糖値にほとんど影響を及ぼさなかった。したがって、血糖値が高い場合には血糖降下作用を示し、低い場合には作用しないことから、単独投与をする場合には低血糖の発現リスクが低いことが明らかとなった。

アナグリプチンは、実験的糖尿病モデル動物（STZ 誘発糖尿病ラット、アロキサン誘発糖尿病マウス）を用いた4週間持続的皮下投与又は反復飲水投与試験の結果、糖尿病モデル動物の膵β細胞量を増加させることが明らかとなった。現在までに、臨床において DPP-4 阻害剤による膵β細胞機能の改善効果は明らかとなっていないが、アナグリプチンは、2型糖尿病患者における経年的な膵β細胞量の減少を抑制しうる可能性が示唆された。

アナグリプチンの DPP-8、DPP-9 及びその他 DPP-4 類縁酵素に対する選択性は、少なくとも 17,000 倍（DPP-9）を示し、高い DPP-4 選択性を有することが明らかとなった。したがって、アナグリプチンは、DPP-4 類縁酵素の阻害に起因した副作用が発現する可能性が低い、安全な DPP-4 阻害剤であると考えられた。

副次的薬理試験及び安全性薬理試験の成績から、臨床用量において、中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に加えて、腎/泌尿器系、胃腸管系及び自律神経系、並びに DPP-4 阻害による影響が懸念された免疫系及びその他の組織・器官において、特に問題となるような重篤な副作用が発現する可能性は低いと推察された。

アナグリプチンのヒトでの主代謝物 SKL-12320 は、DPP-4 阻害作用及びその他の薬理作用を示さない不活性代謝物であった。動物ではアナグリプチンと同等の DPP-4 阻害活性を持つ代謝物（SKL-12339 及び SKL-13776）が認められたが、ヒトでは SKL-12320 以外の代謝物の

2. 4. 非臨床試験の概括評価

生成量はいずれも投与量の 1%未満であった。また、エナンチオマーを含む原薬の製造工程中に混入する可能性がある類縁物質は、DPP-4 阻害作用を示さなかった。したがって、これらの化合物が薬理作用の発現に寄与し、臨床上問題となる影響を及ぼす可能性はほとんどないものと考えられた。

アナグリプチンは、作用メカニズムが異なる経口血糖降下剤である α -グルコシダーゼ阻害剤のミグリトールとの併用により、単独投与に比べて GLP-1 濃度の上昇が期待された。

アナグリプチンによる血糖降下作用は、GLP-1 によるグルコース依存性のインスリン分泌を促進することで発揮されるため、単独投与する場合、低血糖が発現する可能性は低いと考えられた。しかし、既存の DPP-4 阻害剤及び GLP-1 受容体作動薬で報告されているように、他の糖尿病治療剤（特にスルホニルウレア剤）と併用する場合は低血糖発現のリスクが増加する可能性があるため、注意が必要である[43][44][45]。

2. 4. 5. 2. 薬物動態試験

[^{14}C] アナグリプチンをラット、イヌ及びサルに単回経口投与したとき、見かけの吸収率はそれぞれ 38.1～85.5, 70.4 及び 62.6%と良好であった。血漿中未変化体の T_{\max} (20 min～2.0 h) は早く、 $t_{1/2}$ (1.7～6.6 h) も比較的短かったことから、アナグリプチンは速やかに吸収された後、速やかに消失するものと推察された。また、ラットに 14 日間反復経口投与したとき、未変化体の蓄積は認められなかった。ラットにおいて、投与量の増加に伴い吸収率の上昇が認められたが、この主な原因として、アナグリプチンは P 糖たん白の基質となることから、投与量の増加に伴い P 糖たん白の輸送能が飽和したためと推察された。

[^{14}C] アナグリプチンをラットに単回経口投与したとき、放射能は速やかに全身に分布し、胃、小腸、腎臓、肝臓及び膀胱などの放射能濃度が高かったが、中枢神経系への移行は低かった。また、メラニン含有組織の放射能濃度が高く、メラニン親和性が示唆された。ラットに 28 日間反復経口投与したとき、ほぼすべての組織において最終投与後 24 又は 72 時間以降の最終相における放射能濃度の累積が認められたが、各組織に累積した放射能は、投与後 72 時間以降で累積投与量の 0.04%以下とわずかであった。

マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びサルともに血漿中では主に未変化体として存在し、主な代謝物として、ニトリルが加水分解された SKL-12320、アミンに隣接するメチレンが酸化された SKL-14687 及び SKL-15451、一水酸化体及びその抱合体並びに二水酸化体などの多数が検出されたが、特に血漿中濃度が高い代謝物は認められなかった。また、ラット、イヌ及びサルともに尿糞中には主に未変化体が排泄され、未変化体の排泄率は投与量の 41～56%であった。その他、血漿と同様な代謝物が排泄されたが、10%以上の生成が認められた代謝物は SKL-12320 のみであった。評価した動物種において、代謝に顕著な種差はなく、アナグリプチンは同様な経路により代謝を受けていると推察された。

ラット及びイヌにおいて、静脈内投与後の [^{14}C] アナグリプチンは尿中に 62.51～66.21%、糞中に 32.24～37.35%排泄され、尿及び糞中排泄率に種差及び性差は認められなかった。また、投与量の大部分は投与後 24 時間までに排泄され、排泄は速やかであると推察された。

[^{14}C] アナグリプチンは、ラットにおいて胎盤通過及び乳汁中移行が認められたが、移行した放射能は母体血漿と同様に経時的に消失したことから、残留性はないと推察された。一方、ヒトでは妊娠及び授乳時の使用経験はなく (2.7.4.5.4.項)、妊娠及び授乳時の投与に關す

2. 4. 非臨床試験の概括評価

る安全性は確立していない。したがって、アナグリプチンは妊婦又は妊娠している可能性のある婦人には治療上のベネフィットがリスクを上回ると判断された場合にのみ投与すべきと考えられた。また、授乳中の婦人への投与を避け、やむを得ず投与する場合は授乳を中止させるべきと考えられた。

ヒト肝細胞を用いた酵素誘導試験 (*in vitro*) において、アナグリプチン及びSKL-12320の高濃度 (100 µg/mL) では、CYP1A2, CYP2C8/9, CYP2C19 及びCYP3A4 (SKL-12320 はCYP2C19のみ) にわずかな誘導が認められたが、10 µg/mL以下では誘導は認められなかった。最高臨床用量 (1回 200 mg, 1日 2回) におけるヒト血漿中未変化体及びSKL-12320のC_{max}は、それぞれ 1,200 及び 162 ng/mLであったことより、臨床用量では誘導は起こらないと推察された。

P450 分子種の各典型基質の代謝に対するアナグリプチン及びSKL-12320のIC₅₀値は 100 µg/mL以上であり、併用他剤の代謝を阻害する可能性は低いと推察された。

アナグリプチンは、hMDR1, hOAT1, hOAT3, hOAT4 及び hMRP2 の基質であることが示唆され、SKL-12320 は、hOAT3, hOAT4, hBCRP, hMRP2 及び hMRP4 の基質であることが示唆された。アナグリプチンは極めて高濃度 1000 µmol/L (383000 ng/mL) において、わずかに hMDR1 によるジゴキシン輸送を阻害したことより、ジゴキシンと併用した場合、ジゴキシンの吸収がわずかに上昇する可能性が示唆された。

アナグリプチンはhOAT3 及びhOCT2 の各典型基質輸送を阻害し、IC₅₀値はそれぞれ 65.9 µmol/L (25200 ng/mL) 及び 88.2 µmol/L (33800 ng/mL) であった。また、SKL-12320 はhOAT1 の典型基質輸送を阻害し、IC₅₀値は 3.51 µmol/L (1410 ng/mL) であった。これらのIC₅₀値は、最高臨床用量 (1回 200 mg, 1日 2回) におけるヒト血漿中未変化体及びSKL-12320のC_{max}より高く、臨床用量では各トランスポーターを阻害する可能性は低いと推察された。

2. 4. 5. 3. 毒性試験

アナグリプチンの非臨床における安全性を評価するために、単回投与毒性試験、反復投与毒性試験、遺伝毒性試験、がん原性試験、生殖発生毒性試験及びその他の毒性試験 (免疫毒性試験、抗原性試験、代謝物の遺伝毒性試験、不純物の毒性試験) を実施した。

単回経口投与毒性試験における概略の致死量は、ラットで 2000 mg/kg 超、イヌ及びサルで 1000 mg/kg 超であった。ラット単回静脈内投与毒性試験では、概略の致死量は 500～1000 mg/kg であった。

反復投与毒性試験の成績から、アナグリプチンの毒性学的な標的器官は、心血管系、大脳・小脳脈絡叢、末梢神経系 (縮腫)、甲状腺、肝臓、腎臓、消化管、雌雄生殖器及び血液・造血系 (溶血性貧血) と考えられた。これらの毒性は、いずれも回復性が確認された。無毒性量における曝露量は、最高臨床用量 (1回 200 mg, 1日 2回) におけるヒト推定曝露量と比較して、ラットで 32～40 倍、イヌで 39～42 倍、サルで 4～6 倍の開きがあった (表 2.6.6.9-1)。サルでは、ヒト推定曝露量の 31～38 倍の曝露量においても重篤な変化は認められなかった。したがって、安全性は確保されていると考えられた。

遺伝毒性試験では、染色体異常試験において、短時間処理法の代謝活性化系非存在下で陽性を示したが、極めて高用量 (3835 µg/mL) での変化であり、また他の *in vitro* 及び *in vivo* 試験では陰性であったことから、アナグリプチンが生体内で遺伝毒性を示す可能性は低いと考えられた。

2.4. 非臨床試験の概括評価

がん原性試験では、マウスにおいてがん原性は認められなかったが、ラットにおいて肝臓の血管肉腫及び膀胱の移行上皮乳頭腫の発生頻度の増加が認められた。アナグリプチン投与による血管肉腫増加のメカニズムは必ずしも明らかではないが、アナグリプチンが生体内で遺伝毒性を示す可能性は低いこと、最高臨床用量におけるヒト推定曝露量と比較して140倍以上の極めて高い曝露量での変化であり、80倍以上の安全域(表 2.6.6.9-1)が確保されていることから、ヒトでのリスクを示唆するものではないと考えられた。また、膀胱移行上皮乳頭腫の増加は、膀胱結石が関与したげっ歯類に特異な現象であり、ヒトへの外挿性は低いと考えられた。

生殖発生毒性試験では、雄ラット受胎能・初期胚発生試験において精巣に対する影響が認められ、それにより受胎能が消失した。雌ラット受胎能・初期胚発生試験では性周期の延長が見られた。ラット胚・胎児発生試験では、母動物に一般毒性学的影響が認められる用量で胎児の発育遅延が見られた。ウサギ胚・胎児発生試験では、母動物に対する一般毒性学的影響に起因すると考えられる流産が認められた。ラット出生前後発生・母体機能試験では、母動物に一般毒性学的影響が認められる用量で出生児の発育抑制(体重増加抑制)が見られた。雌雄動物又は母動物の生殖機能に関する無毒性量における曝露量は、最高臨床用量におけるヒト推定曝露量と比較してラットで47～428倍、ウサギで41倍、胚、胎児又は出生児に関する無毒性量における親動物の曝露量は、同様にラットで20～239倍、ウサギで87倍の開きがあり[表 2.6.6.9-1, ラット受胎能・初期胚発生試験はラット 4 週間反復投与毒性試験より、ラット出生前後発生・母体機能試験はラット胚・胎児発生試験よりAUC_{0-24h}を外挿], 十分な安全域を有していると考えられた。

抗原性及び免疫毒性試験において、特記すべき変化は認められなかった。

主代謝物である SKL-12320 は、遺伝毒性を示さなかった。また、アナグリプチンのラット反復投与毒性試験、ラット及びウサギ胚・胎児発生試験、並びにラットがん原性試験において、無毒性量における SKL-12320 の曝露量は最高臨床用量におけるヒト推定曝露量を上回っており(3～9倍)、安全性の評価及び担保ができていると考えられた(表 2.6.6.9-2)。製剤中の不純物(原薬の分解生成物)である SKL-12309 の毒性評価において、SKL-12309 添加アナグリプチンのラットへの4週間反復投与により見られた変化はアナグリプチンと同様であり、SKL-12309 添加の有無による毒性所見の差は認められなかった。したがって、SKL-12309 はアナグリプチンの毒性に影響を及ぼさないと考えられた。また、SKL-12309 添加アナグリプチンは遺伝毒性を示さなかった。

以上の非臨床毒性試験成績から、アナグリプチンは臨床上の安全性において問題となる可能性は低いと考えられた。

2.4. 非臨床試験の概括評価

2.4.5.4. まとめ

アナグリプチンは、DPP-4 を選択的かつ強力に阻害し、内因性の活性型 GLP-1 濃度を上昇させることでグルコース依存的にインスリン分泌を促進して血糖上昇抑制作用を示し、血糖コントロールを改善した。また、糖尿病動物の膵 β 細胞量を増大したことから、長期投与では膵 β 細胞に対する保護作用が期待された。

非臨床試験成績から、アナグリプチンは臨床用量において安全に使用することが可能であり、特に問題となる重篤な副作用を発現する可能性は低いと推察された。

アナグリプチンによる安全性上の懸念として、ラットで胎盤通過及び乳汁移行が確認されている。したがって、妊婦又は妊娠している可能性のある婦人には治療上のベネフィットがリスクを上回ると判断された場合にのみ投与を考慮するべきと考えられた。また、授乳中の婦人への投与を避け、やむを得ず投与する場合には授乳を中止させるべきと考えられた。

以上、非臨床薬理試験、薬物動態試験及び毒性試験で得られた成績より、アナグリプチンは2型糖尿病に対する安全かつ有効な治療剤であると考えられる。

2. 4. 非臨床試験の概括評価

2. 4. 6. 参考文献一覧

- [1] Mentlein R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-role in the inactivation of regulatory peptides. Regul Pept. 1999; 85(1): 9-24.
- [2] Lambeir AM, Durinx C, Scharpé S, De Meester I. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. Crit Rev Clin Lab Sci. 2003; 40(3): 209-94.
- [3] Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. Physiol Rev. 2007; 87(4): 1409-39.
- [4] Wang Q, Brubaker PL. Glucagon-like peptide-1 treatment delays the onset of diabetes in 8 week-old *db/db* mice. Diabetologia. 2002; 45(9): 1263-73.
- [5] Mentlein R, Gallwitz B, Schmidt WE. Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. Eur J Biochem. 1993; 214(3): 829-35.
- [6] Kieffer TJ, McIntosh CHS, Pederson RA. Degradation of glucose-dependent insulintropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 *in vitro* and *in vivo* by dipeptidyl peptidase IV. Endocrinology. 1995; 136(8): 3585-96.
- [7] Vilsbøll T, Agersø H, Krarup T, Holst JJ. Similar elimination rates of glucagon-like peptide-1 in obese type 2 diabetic patients and healthy subjects. J Clin Endocrinol Metab. 2003; 88(1): 220-4.
- [8] Meier JJ, Nauck MA, Kranz D, Holst JJ, Deacon CF, Gaeckler D, et al. Secretion, degradation, and elimination of glucagon-like peptide 1 and gastric inhibitory polypeptide in patients with chronic renal insufficiency and healthy control subjects. Diabetes. 2004; 53(3): 654-62.
- [9] Drucker DJ. Enhancing incretin action for the treatment of type 2 diabetes. Diabetes Care. 2003; 26(10): 2929-40.
- [10] Deacon CF, Ahrén B, Holst JJ. Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV: a novel approach for the prevention and treatment of Type 2 diabetes? Expert Opin Investig Drugs. 2004; 13(9): 1091-102.
- [11] Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. Lancet. 2006; 368(9548): 1696-705.
- [12] Vora KA, Porter G, Peng R, Cui Y, Pryor K, Eiermann G, et al. Genetic ablation or pharmacological blockade of dipeptidyl peptidase IV does not impact T cell-dependent immune responses. BMC Immunol. 2009; 10: 19.
- [13] Šedo A, Malík R. Dipeptidyl peptidase IV-like molecules: homologous proteins or homologous activities? Biochim Biophys Acta. 2001; 1550(2): 107-16.
- [14] Rosenblum JS, Kozarich JW. Prolyl peptidases: a serine protease subfamily with high potential for drug discovery. Curr Opin Chem Biol. 2003; 7(4): 496-504.
- [15] Lankas GR, Leiting B, Roy RS, Eiermann GJ, Beconi MG, Biftu T, et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibition for the treatment of type 2 diabetes: potential importance of selectivity over dipeptidyl peptidases 8 and 9. Diabetes. 2005; 54(10): 2988-94.
- [16] Burkey BF, Hoffmann PK, Hassiepen U, Trappe J, Juedes M, Foley JE. Adverse effects of dipeptidyl peptidases 8 and 9 inhibition in rodents revisited. Diabetes Obes Metab. 2008; 10(11): 1057-61.

2. 4. 非臨床試験の概括評価

- [17] Kim D, Wang L, Beconi M, Eiermann GJ, Fisher MH, He H, et al. (2*R*)-4-Oxo-4-[3-(trifluoromethyl)-5,6-dihydro[1,2,4]triazolo[4,3-*a*]pyrazin-7(8*H*)-yl]-1-(2,4,5-trifluorophenyl)butan-2-amine: a potent, orally active dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *J Med Chem.* 2005; 48(1): 141-51.
- [18] Herman GA, Stevens C, Van Dyck K, Bergman A, Yi B, De Smet M, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of sitagliptin, an inhibitor of dipeptidyl peptidase IV, in healthy subjects: results from two randomized, double-blind, placebo-controlled studies with single oral doses. *Clin Pharmacol Ther.* 2005; 78(6): 675-88.
- [19] Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology.* 2007; 132(6): 2131-57.
- [20] Buteau J. GLP-1 receptor signaling: effects on pancreatic β -cell proliferation and survival. *Diabetes Metab.* 2008; 34 Suppl 2: S73-7.
- [21] Mu J, Woods J, Zhou YP, Roy RS, Li Z, Zycband E, et al. Chronic inhibition of dipeptidyl peptidase-4 with a sitagliptin analog preserves pancreatic β -cell mass and function in a rodent model of type 2 diabetes. *Diabetes.* 2006; 55(6): 1695-704.
- [22] Johanson C, Stopa E, McMillan P, Roth D, Funk J, Krinke G. The distributional nexus of choroid plexus to cerebrospinal fluid, ependyma and brain: toxicologic/pathologic phenomena, periventricular destabilization, and lesion spread. *Toxicol Pathol.* 2011; 39(1): 186-212.
- [23] 篠原幸人. 頭蓋内圧(脳圧)亢進症候. In: 高久史磨, 尾形悦郎監修. *Practice of internal medicine 新臨床内科学* 第6版. 医学書院;1993. p.1012-14.
- [24] 立山真吾, 高崎眞弓. 8 髄液圧変化(高髄圧性・低髄圧性)による頭痛の診断と治療. *Brain Medical.* 2005; 17(1): 56-60.
- [25] Capen CC, DeLellis RA, Yarrington JT. Endocrine System. 2. Effect on Peripheral Metabolism of Thyroid Hormones. In: Haschek WM, Rousseaux CG, Walling MA editors. *Handbook of Toxicologic Pathology.* San Diego: Academic Press, Inc.; 2002. p.734-41.
- [26] Bonventre JV, Vaidya VS, Schmouder R, Feig P, Dieterle F. Next-generation biomarkers for detecting kidney toxicity. *Nat Biotechnol.* 2010; 28(5): 436-40.
- [27] 渡辺満利, 西川秋佳. 腎臓. In: 日本毒性病理学会編. *毒性病理組織学.* 名古屋: 日本毒性病理学会; 2000. p.247-66.
- [28] OECD. Guidance document for histologic evaluation of endocrine and reproductive tests in rodents Part 2. Available from URL (2009): <http://www.oecd.org/dataoecd/29/35/43754701.pdf>. Series on testing and assessment/Adopted guidance and review documents. 2009.
- [29] Henderson NA, Robaire B. Effects of PNU157706, a dual 5 α -reductase inhibitor, on rat epididymal sperm maturation and fertility. *Biol Reprod.* 2005; 72(2): 436-43.
- [30] 伊東信行. 精巣, 精巣上体. In: 最新毒性病理学. 東京: 中山書店; 1994. p.219-29.
- [31] Van Coppenolle F, Slomianny C, Carpentier F, Le Bourhis X, Ahidouch A, Croix D, et al. Effects of hyperprolactinemia on rat prostate growth: evidence of androgeno-dependence. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001; 280(1): E120-9.
- [32] Kafali H, Iriadam M, Ozardali I, Demir N. Letrozole-induced polycystic ovaries in the rat: a new model for cystic ovarian disease. *Arch Med Res.* 2004; 35(2): 103-8.

2. 4. 非臨床試験の概括評価

- [33] 渡辺満利, 前川昭彦. 雌性生殖器. In: 日本毒性病理学会編. 毒性病理組織学. 名古屋: 日本毒性病理学会; 2000. p.315-54.
- [34] Kaneko S, Sato N, Sato K, Hashimoto I. Changes in plasma progesterone, estradiol, follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone during diestrus and ovulation in rats with 5-day estrous cycles: effect of antibody against progesterone. Biol Reprod. 1986; 34(3): 488-94.
- [35] Tébar M, Ruiz A, Gaytán F, Sánchez-Criado JE. Follicular and luteal progesterone play different roles synchronizing pituitary and ovarian events in the 4-day cyclic rat. Biol Reprod. 1995; 53(5): 1183-9.
- [36] Ota H, Wakizaka A, Fukushima M. Modulation of ovarian LH receptor and serum hormone levels in rats with hyperprolactinemia induced by administration of ovine prolactin or sulpiride. Tohoku J Exp Med. 1986; 148(2): 213-27.
- [37] 服部眞彰. 性腺刺激ホルモンの作用. In: 高橋迪雄監修. 哺乳類の生殖生物学. 東京: 学窓社; 2001. p.120-6.
- [38] Cohen SM, Storer RD, Criswell KA, Doerr NG, Dellarco VL, Pegg DG, et al. Hemangiosarcoma in rodents: mode-of-action evaluation and human relevance. Toxicol Sci. 2009; 111(1): 4-18.
- [39] 福島昭治. 膀胱/尿管/尿道. In: 日本毒性病理学会編. 毒性病理組織学. 名古屋: 日本毒性病理学会; 2000. p.267-82.
- [40] Fukushima S, Murai T. Calculi, precipitates and microcrystalluria associated with irritation and cell proliferation as a mechanism of urinary bladder carcinogenesis in rats and mice. IARC Sci Publ. 1999; (147): 159-74.
- [41] 高橋道人. 発がん性の外挿. In: 林裕造. 大澤仲昭編. 毒性試験講座 1 安全性評価の基礎と実際. 東京: 地人書館; 1990. p.247-58.
- [42] 伊東信行. 尿管, 膀胱, 尿道. In: 最新毒性病理学. 東京: 中山書店; 1994. p.209-18.
- [43] 「インクレチンと SU 薬の適正使用について」. 2010 年 4 月 7 日作成, 2011 年 2 月 23 日修正. インクレチン (GLP-1 受容体作動薬と DPP-4 阻害薬) の適正使用に関する委員会.
- [44] 医薬品・医療機器等安全性情報. No.275. 平成 22 年 (2010 年) 12 月. 厚生労働省医薬食品局.
- [45] 医薬品・医療機器等安全性情報. No.276. 平成 23 年 (2011 年) 1 月. 厚生労働省医薬食品局.