

**デベルザ錠20mg/アプルウェイ錠20mg
(トホグリフロジン水和物)
[2型糖尿病]**

第2部 (モジュール2)

CTD の概要 (サマリー)

2.4 非臨床試験の概括評価

興和株式会社/サノフィ株式会社

略語一覧

略号	英名	和名
ADH	Alcohol dehydrogenase	アルコール脱水素酵素
ALT	Alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AUC _{0-t}	Area under the plasma concentration-time curve from time zero to t	投与後0時間からt時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
AUC _{inf}	Area under the plasma concentration-time curve from time zero to extrapolated infinity	投与後0時間から無限時間まで外挿した血漿中濃度－時間曲線下面積
AST	Aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
BUN	Blood urea nitrogen	血中尿素窒素
CHL	Chinese hamster lung	チャイニーズ・ハムスター肺由来
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズ・ハムスター卵巣由来
CL	Total clearance	クリアランス
C _{max}	Maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
CYP	Cytochrome P450	チトクローム P450
F	Bioavailability	生物学的利用率
GK rat	Goto-Kakizaki rat	後藤－柿崎ラット
GLP	Good laboratory practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
Glu	Glucose	グルコース
Hb	Hemoglobin	ヘモグロビン
HEK	Human embryonic kidney	ヒト胎児腎臓由来
hERG	Human ether-a-go-go related gene	—
HPLC	High performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
IC ₂₀	Concentration producing 20% inhibition	20%阻害濃度
IC ₅₀	Concentration producing 50% inhibition	50%阻害濃度
ICH	International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
K _i	Inhibition constant	阻害定数
LC-MS/MS	Liquid chromatography tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィータンデム質量分析
LOAEL	Lowest observed adverse effect level	最小毒性量
MCHC	Mean corpuscular hemoglobin concentration	平均赤血球血色素濃度
MDR1	Multidrug resistance 1	多剤耐性1
NOAEL	No observed adverse effect level	無毒性量
OAT	Organic anion transporter	有機アニオントランスポーター
OATP1B	Organic anion transporting polypeptide 1B	有機アニオン輸送ポリペプチド1B
OCT	Organic cation transporter	有機カチオントランスポーター
RBC	Red blood cell count	赤血球数
SD rat; CD(SD) rat	Caesarean derived (Sprague-Dawley) rat strain	SD ラット, CD(SD)ラット
SGLT	Sodium-glucose cotransporter	ナトリウム・グルコース共輸送体
SMIT	Sodium-myo-inositol cotransporter	ナトリウム・ミオイノシトール共輸送体
t _{1/2}	Elimination half-life	消失半減期

略号	英名	和名
T2DM	Type 2 diabetes mellitus	2型糖尿病
T-KB	Total ketone bodies	総ケトン体
T _{max}	Time to reach maximum plasma concentration	最高血漿中濃度到達時間
V _{d,ss}	Volume of distribution at steady-state	定常状態の分布容積
ZDF rat	Zucker diabetic fatty rat	Zucker 糖尿病性肥満ラット

トホグリフロジン及び代謝物の略称は2.6.4「トホグリフロジン水和物及び代謝物の略称一覧」を、不純物については表 2.3.S.3.2.1.1-1を参照

目次

	頁
2.4 非臨床試験の概括評価	6
2.4.1 非臨床試験計画概略	6
2.4.1.1 薬理試験	6
2.4.1.2 薬物動態試験	7
2.4.1.3 毒性試験	8
2.4.1.4 GLP 及びガイドライン	9
2.4.1.5 不純物	9
2.4.1.6 生物学的同等性	9
2.4.2 薬理試験	10
2.4.2.1 効力を裏付ける試験	10
2.4.2.1.1 SGLT1 及び SGLT2 阻害活性	10
2.4.2.1.2 2 型糖尿病モデル動物における単回投与による血糖降下作用	10
2.4.2.1.3 正常動物における血糖値に対する影響	10
2.4.2.1.4 2 型糖尿病モデル動物における食後過血糖改善作用	10
2.4.2.1.5 2 型糖尿病モデル動物における 4 週間反復投与による糖化ヘモグロビン低下作用及び耐糖能改善作用	11
2.4.2.2 副次的薬理試験	11
2.4.2.2.1 本薬の代謝物の SGLT1 及び SGLT2 阻害活性	11
2.4.2.2.2 本薬及び代謝物の各種受容体, イオンチャネル及びトランスポーター結合活性	11
2.4.2.2.3 グルコーストランスポーター (GLUT) 阻害活性	11
2.4.2.3 安全性薬理試験	12
2.4.3 薬物動態試験	12
2.4.3.1 分析法	12
2.4.3.2 吸収	13
2.4.3.3 分布	13
2.4.3.4 代謝及び酵素誘導・阻害	14
2.4.3.5 排泄	14
2.4.3.6 その他の薬物動態試験	15
2.4.4 毒性試験	15
2.4.4.1 単回投与毒性	15
2.4.4.2 反復投与毒性	15
2.4.4.3 遺伝毒性	15
2.4.4.4 がん原性	16
2.4.4.5 生殖発生毒性	16

2.4.4.6	局所忍容性.....	16
2.4.4.7	その他の毒性.....	16
2.4.4.7.1	毒性発現の機序に関する試験	16
2.4.4.7.2	ヒト主要代謝物カルボン酸体を用いた試験	17
2.4.4.7.3	不純物を用いた試験	17
2.4.4.7.4	光安全性の評価	18
2.4.4.8	動物からヒトへの外挿（曝露量のまとめ，臨床との関連性）	18
2.4.5	総括及び結論	20
2.4.6	参考文献一覧	22

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

中外製薬が開発したトホグリフロジン水和物（以下、本薬）は、腎尿細管における尿糖再吸収に関与するナトリウム・グルコース共輸送体2（SGLT2）を選択的に阻害する2型糖尿病（T2DM）治療薬である。

血漿グルコースはタンパクに結合しておらず、また高分子との複合体も形成していないため、腎糸球体でそのまま濾過される。健康成人では、腎尿細管において濾過された原尿からほぼすべてのグルコースが再吸収により回収されるため、尿にはほとんどグルコースは含まれない。一方、糖尿病患者では、腎糸球体で濾過されたグルコース量が大量となり、腎尿細管での再吸収がおいつかず、尿中に大量のグルコースが排泄される。

これらの腎尿細管におけるグルコースの再吸収に関与する SGLT は、ナトリウムイオンと共役してグルコースを輸送するトランスポーターであり、腎尿細管でのグルコース再吸収においては、SGLT1と SGLT2の二つのアイソフォームが主に関与していると考えられている¹⁾。SGLT2の発現は腎臓に特異的であり、遺伝的な SGLT2の機能不全により引き起こされる家族性腎性糖尿症においては、尿糖排泄が認められるものの大きな健康上の問題はないことが報告されている²⁾⁴⁾。一方、SGLT1は腎尿細管だけでなく小腸においてもグルコース及びガラクトースの輸送に関与し、SGLT1の変異は重篤な下痢を症状とするグルコース・ガラクトース吸収不全症を引き起こすことが知られている⁵⁾⁶⁾。

以上の知見から、中外製薬株式会社では、SGLT2を選択的に阻害することにより、積極的に尿中にグルコースを排泄させ、T2DM 患者における高血糖を是正する薬剤の開発を目指し、選択性の高い SGLT2阻害剤トホグリフロジン水和物を見出した。

2型糖尿病治療薬として開発された本薬の薬理作用、作用機序、薬物動態及び安全性を以下の試験により検討した。

なお、非臨床試験における投与量はトホグリフロジンとしての投与量とした。

2.4.1.1 薬理試験

本薬の SGLT1及び SGLT2阻害活性を、それぞれを発現した CHO 細胞又は COS-7細胞を用いて、基質である methyl- α -D-glucopyranoside の取り込みを指標に評価した。本薬の単回経口投与での血糖降下作用の評価は、肥満2型糖尿病モデル動物である db/db マウス及び ZDF ラットを用いて実施した。ZDF ラットにおいては、単回経口投与における尿糖排泄亢進作用も評価した。正常血糖に対する影響は Wistar ラット及び SD ラットを用いて評価した。食後過血糖に対する作用の評価は、非肥満2型糖尿病モデル動物である GK ラットを用いて、食後過血糖改善薬であるボグリボースを陽性対照にして実施した。反復経口投与による血糖降下作用、糖尿病病態への影響は、db/db マウスを用いて評価した。

副次的薬理試験として、本薬の代謝物について、*in vitro* における SGLT1及び SGLT2阻害活性を測定した。また、本薬及び代謝物の各種受容体、イオンチャネル及びトランスポーター結合活性を評価した。

安全性薬理試験として、中枢神経系、呼吸系及び心血管系に及ぼす影響を評価した。また、本薬のヒト主要代謝物であるカルボン酸体及び二級水酸化体について、hERG 電流に及ぼす影響を評価した。

以下に実施した主な薬理試験項目を示す。

(1) 効力を裏付ける試験

- *In vitro* における SGLT1及び SGLT2阻害活性
- 2型糖尿病モデル動物（db/db マウス、ZDF ラット）における単回経口投与による血

糖降下作用，及び ZDF ラットにおける尿糖排泄亢進作用

- 正常動物（Wistar ラット，SD ラット）における血糖値への影響
- 2型糖尿病ラット（GK ラット）における食後過血糖改善作用
- 2型糖尿病マウス（db/db マウス）における4週間反復経口投与による糖化ヘモグロビン低下作用・耐糖能改善作用

(2) 副次的薬理試験

- 本薬の代謝物の *in vitro* における SGLT1 及び SGLT2 阻害活性
- 本薬及び代謝物の各種受容体，イオンチャネル及びトランスポーター結合活性
- 本薬のグルコーストランスポーター（GLUT）阻害活性

(3) 安全性薬理試験

- 中枢神経系：ラットの一般状態及び行動に及ぼす影響（Irwin 変法）
- 呼吸系：ラットの呼吸数，1回換気量及び毎分換気量に及ぼす影響（全身プレチスモグラフィ）
- 心血管系：覚醒下カニクイザルの血圧，心拍数，心電図及び体温に及ぼす影響，hERG チャネルに及ぼす影響
- その他の試験：ヒト主要代謝物であるカルボン酸体及び二級水酸化体の hERG チャネルに及ぼす影響

2.4.1.2 薬物動態試験

本薬の体内動態は主としてラット（Wistar，SD 及び Long-Evans）及びカニクイザルを用いて評価した。反復投与時の体内動態は，マウス，ラット，ウサギ及びカニクイザルを用いた毒性試験の中で評価した。代謝に関しては，ヒト肝ミクロソーム及びヒト凍結肝細胞を用いた *in vitro* 試験並びにラット及びカニクイザルを用いた *in vivo* 試験を実施した。ヒトにおける代謝関与酵素並びにトランスポーターを介する輸送に関しては，それぞれ組み換え型ヒト CYP 発現系及びヒト凍結肝細胞並びに各種トランスポーターを発現した細胞を用い調べた。

以下に実施した主な薬物動態試験項目を示す。

(1) 吸収試験

- ラットにおける単回静脈内及び単回経口投与時の血漿中未変化体濃度推移
- カニクイザルにおける単回静脈内及び単回経口投与時の血漿中未変化体濃度推移
- マウス3カ月間，ラット1カ月間及びカニクイザル1カ月間トホグリフロジン反復経口投与毒性試験並びにウサギ胚・胎児発生に関する試験における血漿中未変化体濃度推移

(2) 分布試験

- ラットにおける ^{14}C -トホグリフロジン単回経口投与時の組織中放射能濃度
- 有色ラットにおける ^{14}C -トホグリフロジン単回経口投与時の組織中放射能濃度
- ラットにおける ^{14}C -トホグリフロジン7日間反復投与時の組織中放射能濃度
- 妊娠18日の雌ラットにおける ^{14}C -トホグリフロジン単回経口投与時の胎児移行性
- 血漿蛋白結合及び血球移行性 (*in vitro*)
- カルボン酸体の血漿蛋白結合 (*in vitro*)
- 各種トランスポーター発現細胞を用いたトホグリフロジンの取り込み評価及び輸送阻害能評価
- 各種トランスポーター発現細胞を用いたカルボン酸体の輸送阻害能評価

(3) 代謝試験

- ヒト凍結肝細胞を用いた *in vitro* 代謝
- ラットに¹⁴C-トホグリフロジンを単回経口投与した時の血漿中、尿中、糞中及び組織中代謝物
- カニクイザルに¹⁴C-トホグリフロジンを単回経口投与した時の血漿中、尿中、糞中及び胆汁中代謝物
- 代謝関与酵素（ヒト CYP 発現系及びヒト肝細胞）
- CYP 酵素誘導及び CYP 酵素阻害
- カニクイザル単回経口投与試験、マウス3カ月間、ラット6カ月間、カニクイザル12カ月間トホグリフロジン反復経口投与毒性試験並びにウサギ胚・胎児発生に関する試験における血漿中代謝物測定

(4) 排泄試験

- ラットに¹⁴C-トホグリフロジンを単回経口投与した時の放射能の尿中及び糞中排泄
- カニクイザルに¹⁴C-トホグリフロジンを単回経口投与した時の放射能の尿中及び糞中排泄
- カニクイザルに¹⁴C-トホグリフロジンを単回経口投与した時の放射能の胆汁中排泄
- 授乳期ラットに¹⁴C-トホグリフロジンを単回経口投与した時の放射能の乳汁中排泄

(5) その他薬物動態試験

- 糖尿病モデル動物（db/db マウス，ZDF ラット）にトホグリフロジンを単回経口投与した時の血漿中未変化体濃度推移

2.4.1.3 毒性試験

本薬の安全性を評価するため、単回投与毒性試験、反復投与毒性試験、遺伝毒性試験、生殖発生毒性試験及びがん原性試験を実施した。また、単回投与毒性試験、反復投与毒性試験、がん原性試験及び生殖発生毒性試験において、一部の試験を除き、本薬及び代謝物の曝露量を評価するために血漿中濃度を測定した。

使用動物は、単回投与毒性試験ではラット、反復投与毒性試験ではラット、カニクイザル及びマウス、がん原性試験ではマウス及びラット、生殖発生毒性試験ではラット及びウサギを用いた。投与経路は、いずれの試験も臨床適用経路と同じ経口投与とした。

その他、ラット（アルビノ）6カ月間反復経口投与毒性試験で認められた網膜萎縮の発現機序を検討する目的で、有色ラット及び低照度条件下でアルビノラットを用いた6カ月間反復経口投与毒性試験を実施した。また、ヒト主要代謝物であるカルボン酸体を用いたラット3カ月間反復経口投与毒性試験及び *in vitro* 遺伝毒性試験（復帰突然変異試験及び染色体異常試験）を実施した。加えて、XXXXXXXXXXにより生成すると考えられたXXXX不純物（XXXX，XXXX，XXXX，XXXX）の毒性を評価するため、トホグリフロジン水和物の原薬に上記5種のXXXX不純物（表 2.3.S.3.2.1.1-1）を添加したロットを用いてラット1カ月間反復経口投与毒性試験及び *in vitro* 遺伝毒性試験（復帰突然変異試験及び染色体異常試験）を実施した。

以下に実施した主な毒性試験項目を示す。

(1) 単回投与毒性試験：

- ラット単回経口投与毒性試験

(2) 反復投与毒性試験：

- ラット1カ月間、6カ月間反復経口投与毒性試験

- カニクイザル1カ月間，3カ月間，12カ月間反復経口投与毒性試験
- マウス3カ月間反復経口投与毒性試験

(3) 遺伝毒性試験：

- 細菌を用いた復帰突然変異試験
- 哺乳類培養細胞を用いた染色体異常試験
- ラットを用いた小核試験

(4) がん原性試験：

- マウス24カ月間経口投与がん原性試験
- ラット24カ月間経口投与がん原性試験

(5) 生殖発生毒性試験：

- ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験
- ラット胚・胎児発生に関する試験
- 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

(6) その他の毒性試験：

- 有色ラット6カ月間反復経口投与毒性試験
- ラット6カ月間反復経口投与毒性試験（低照度条件下）
- ラット3カ月間反復経口投与毒性試験（代謝物：カルボン酸体）
- 細菌を用いた復帰突然変異試験（代謝物：カルボン酸体）
- 哺乳類培養細胞を用いた染色体異常試験（代謝物：カルボン酸体）
- ラット1カ月間反復経口投与毒性試験（ 不純物添加ロット）
- 細菌を用いた復帰突然変異試験（ 不純物添加ロット）
- 哺乳類培養細胞を用いた染色体異常試験（ 不純物添加ロット）

2.4.1.4 GLP 及びガイドライン

安全性薬理試験及び主要な毒性試験は GLP 及び ICH ガイドラインを遵守して実施した。

2.4.1.5 不純物

安全性の確認が必要な濃度閾値（0.15%）を超えて最終的に個別規格設定された類縁物質は*類縁物質A（規格値■%以下）及び*類縁物質B（規格値■%以下）であった（2.3.S.4.1, 表2.3.S.3.2.1.1-1）。

非臨床毒性試験で実際に投与された *類縁物質A 及び *類縁物質B の量を算出し、本類縁物質の安全性を考察した (2.4.4.7.3)。*類縁物質B は [REDACTED] 類縁物質であり、*類縁物質A は [REDACTED] 類縁物質であった。

*緑物質¹を含有しているロットでは、ラット1カ月間反復経口投与毒性試験、復帰突然変異試験及び染色体異常試験を実施した。

また、**類縁物質**を含有しているロットでは、単回投与毒性試験、反復投与毒性試験、遺伝毒性試験及び安全性薬理試験を実施した。

2.4.1.6 生物学的同等性

該当なし。

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

2.4.2.1.1 SGLT1及びSGLT2阻害活性

(資料番号4.2.1.1-1, 4.2.1.1-2)

ヒト及びマウスの SGLT1及び SGLT2をそれぞれ発現した CHO 細胞を用いて、基質である methyl- α -D-glucopyranoside の取り込みを指標に、本薬の SGLT1及び SGLT2に対する阻害活性を評価した。本薬の SGLT2に対する阻害定数 (K_i 値) は、ヒト及びマウスでそれぞれ0.0029 $\mu\text{mol/L}$ 及び0.0064 $\mu\text{mol/L}$ であった。 K_i 値で比較した本薬の SGLT2阻害活性は、ヒトにおいて SGLT1の2100倍、マウスにおいては SGLT1の190倍強かった。また、ラットの SGLT1及び SGLT2をそれぞれ発現した COS-7細胞を用い、methyl- α -D-glucopyranoside の取り込みを指標に、本薬のラット SGLT1及び SGLT2に対する阻害活性を評価した。本薬のラット SGLT2に対する IC_{50} 値は0.0145 $\mu\text{mol/L}$ であった。 IC_{50} 値で比較した本薬のラット SGLT2阻害活性はラット SGLT1の560倍強かった。なお、 IC_{50} 値で比較した本薬のヒト SGLT3, SGLT4, SGLT5, SGLT6 及び SMIT1に対する SGLT2選択性は、それぞれ19000倍, 1500倍, 540倍, 6200倍及び28000倍であり、SGLT1を含めたいずれの SGLT サブタイプに対して500倍以上の高い SGLT2選択性が認められた。

2.4.2.1.2 2型糖尿病モデル動物における単回投与による血糖降下作用

(資料番号4.2.1.1-3, 4.2.1.1-4)

本薬 (0.1, 0.3, 1, 3及び10 mg/kg) 単回経口投与時の随時血糖に対する作用を肥満2型糖尿病モデルマウス (db/db マウス) 及びラット (ZDF ラット) を用いて評価した。いずれのモデル動物においても、本薬は投与12時間後までの血糖値を用量依存的に低下させ、0.1 mg/kg 以上で溶媒投与群と比較して有意な血糖降下作用が認められた。

本薬の尿糖排泄への影響 (グルコース腎排泄クリアランス値) について ZDF ラットを用いて評価した結果、本薬はグルコース腎排泄クリアランス値を用量依存的に増加させ、1 mg/kg 以上で有意なグルコース腎排泄クリアランス値の増加作用が認められた。

以上の試験成績から、本薬は2型糖尿病モデル動物の血糖値を低下させること、また、その作用機序である腎臓におけるグルコース再吸収阻害に起因する尿糖排泄の亢進が確認された。

2.4.2.1.3 正常動物における血糖値に対する影響

(資料番号4.2.1.1-5, 4.2.1.1-2)

Wistar ラットを用いて、正常動物における本薬 (0.1, 0.3, 1, 3及び10 mg/kg) 単回経口投与時の随時血糖に対する作用を評価した。投与1, 2, 4, 6, 8, 12及び24時間後のいずれの時間においても、溶媒投与群と比較して、すべての本薬投与群で血糖値の低下は認められなかった。

SD ラットへの本薬 (1, 3及び10 mg/kg) 投与により、投与後6時間まではすべての用量で、6～12時間では3及び10 mg/kg で、12～24時間では10 mg/kg の用量で、有意な尿糖排泄亢進作用が認められたが、投与6, 12及び24時間後のいずれの時間においても有意な血糖値の低下は認められなかった。

以上の結果から、本薬の正常血糖に対する影響は小さいものと推察された。

2.4.2.1.4 2型糖尿病モデル動物における食後過血糖改善作用

(資料番号4.2.1.1-6)

非肥満2型糖尿病のモデルである後藤 - 柿崎 (GK) ラットを用いて、本薬の食後過血糖改善作用を評価した。一晚絶食したラットに本薬 (1, 3及び10 mg/kg) あるいは α -グルコシダーゼ阻害剤であるボグリボース (0.1, 0.3及び1 mg/kg) を単回経口投与し、薬剤投与5分後に液体飼料を負荷して血糖値推移を検討した。本薬及びボグリボースはともに、すべての用量群で溶

媒投与群と比較して液体飼料負荷後の血糖上昇を有意に抑制した。

この結果から、本薬はボグリボースと同様に食後過血糖改善作用を有することが示された。

2.4.2.1.5 2型糖尿病モデル動物における4週間反復投与による糖化ヘモグロビン低下作用及び耐糖能改善作用

(資料番号4.2.1.1-7)

db/db マウスに、本薬 (0.1, 0.3, 1, 3及び10 mg/kg/日) を1日1回、4週間反復経口投与し、糖化ヘモグロビンへの作用及び db/db マウスの病態への影響を評価した。本薬は0.3 mg/kg/日以上用量で、投与4週後の糖化ヘモグロビン値を溶媒投与群と比較して有意に低下させた。また、4週間反復投与の最終投与から4日後に実施した経口グルコース負荷試験において、本薬を3及び10 mg/kg/日投与した群の血糖曲線下面積 (Glu AUC_{0-4h}) は、溶媒投与群と比較して有意に低かった。

これらの試験成績から、本薬は反復投与により db/db マウスの血糖値を長期間低下させ、また休薬後においても耐糖能の改善がみられたことから、db/db マウスの糖尿病病態を改善したものと考えられた。

2.4.2.2 副次的薬理試験

2.4.2.2.1 本薬の代謝物の SGLT1及び SGLT2阻害活性

(資料番号4.2.1.2-1)

ヒト SGLT1及びヒト SGLT2をそれぞれ発現した CHO 細胞を用いて、基質である methyl- α -D-glucopyranoside の取り込みを指標に、本薬の代謝物の SGLT1及び SGLT2に対する阻害活性を評価した。

本薬のヒト SGLT1及び SGLT2に対する IC₅₀値は、それぞれ13 μ mol/L 及び0.0039 μ mol/L であった。

本薬の代謝物のヒト SGLT2阻害活性は、脱水素体、一級水酸化体が本薬とほぼ同等であり、ケトン体、二級水酸化体エピマー1、二級水酸化体エピマー2では本薬に対して3-4倍程度弱く、カルボン酸体は本薬の700倍弱かった。

本薬の代謝物のヒト SGLT1阻害活性は、脱水素体の IC₅₀値が本薬の0.51倍で本薬よりもやや強く、一級水酸化体では本薬とほぼ同等、ケトン体、二級水酸化体エピマー1、二級水酸化体エピマー2では本薬に対して3-4倍程度弱く、カルボン酸体では本薬よりも15倍を超えて弱かった。

2.4.2.2.2 本薬及び代謝物の各種受容体、イオンチャネル及びトランスポーター結合活性

(資料番号4.2.1.2-2)

本薬及び代謝物 (カルボン酸体、一級水酸化体、二級水酸化体エピマー1及び二級水酸化体エピマー2) の各種受容体、イオンチャネル及びトランスポーターに対する *in vitro* での結合能を評価した。その結果、本薬及び代謝物は、本薬のヒト SGLT2に対する *K_i* 値に比較して3000倍以上高い濃度である10 μ mol/L では、各種受容体、イオンチャネル及びトランスポーターに対してほとんど結合しないか、又は弱い結合能しか有さなかった。ただし、二級水酸化エピマー2のみが、10 μ mol/L の濃度で σ 受容体に結合する可能性 (結合阻害率64%) が示唆された。

2.4.2.2.3 グルコーストランスポーター (GLUT) 阻害活性

(資料番号4.2.1.1-2)

ヒト骨格筋由来細胞株 (XM13A1) とラット骨格筋由来細胞株 (L6)、マウス脂肪由来細胞株 (3T3-L1) のインスリン刺激時のグルコース取り込みに対する本薬の阻害活性を評価した。

その結果、本薬のグルコース取り込み阻害活性 (IC_{50} 値) は100 $\mu\text{mol/L}$ 以上であった。骨格筋や脂肪由来細胞株のインスリン刺激時のグルコース取り込みは主に GLUT4や GLUT1が担っており^{9),10)}、本実験において本薬の GLUT4及び GLUT1 に対する阻害活性を評価していると考えられる。本薬はヒト SGLT2に対する K_i 値 (0.0029 $\mu\text{mol/L}$) の30000倍以上の高濃度においても GLUT1あるいは GLUT4によると考えられるグルコース取り込み作用を強く抑制することはなかった。

2.4.2.3 安全性薬理試験

安全性薬理試験は、ラット、カニクイザル及び hERG チャンネルを発現させた HEK293細胞を用いて評価した。

(1) 中枢神経系

(資料番号4.2.1.3-1)

ラットで本薬の単回経口投与により、本薬の薬理作用 (尿糖排泄亢進) に伴う排尿増加が10 mg/kg 以上の群でみられ、更に体温低下が640 mg/kg 群で投与後4時間の観察で、眼瞼閉塞が640 mg/kg 群で投与後2時間及び4時間の観察で認められた。なお、640 mg/kg 群の体温の低下及び眼瞼閉塞は、給餌後 (給餌は投与後4時間の観察後に実施) の投与後8時間には回復した。その他に異常はみられなかった。

(2) 呼吸系

(資料番号4.2.1.3-2)

本薬の640 mg/kg までの単回経口投与はラットの呼吸機能に影響を及ぼさなかった。

(3) 心血管系

(資料番号4.2.1.3-3, 4.2.1.3-4, 4.2.1.3-5)

本薬の100 mg/kg までの単回経口投与はカニクイザルの血圧、心拍数、心電図及び体温に影響を及ぼさなかった。100 mg/kg 投与後4時間における血漿中濃度 (22.8 $\mu\text{g/mL}$) は、CSG010JP の臨床推奨用量 (20 mg/日) を投与した被験者における C_{max} (509 ng/mL) の約45倍の値であった。hERG チャンネルを発現させた HEK293細胞では、hERG 電流の抑制は300 $\mu\text{mol/L}$ 以上の濃度で認められ、その IC_{20} 値は554 $\mu\text{mol/L}$ であった。この値は、CSG010JP で臨床推奨用量を投与した被験者における C_{max} の約2470倍であった (ヒトでの非結合画分17%からフリー体濃度を算出、2.6.4.4.4)。

hERG チャンネルを発現させた HEK293細胞を用いて、ヒト主要代謝物であるカルボン酸体及び二級水酸化体の hERG 電流に及ぼす影響を評価したところ、カルボン酸体については hERG 電流の抑制は最高濃度である1000 $\mu\text{mol/L}$ までみられず、二級水酸化体は1000 $\mu\text{mol/L}$ においてのみ、わずかな hERG 電流の抑制 (8.7%) が認められた。

以上の結果より、本薬が中枢神経系、呼吸系及び心血管系に及ぼす影響はないと考えられた。

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 分析法

(資料番号4.2.2.1-1, 4.2.2.1-2, 4.2.2.1-3, 4.2.2.1-4)

放射性標識体を投与した場合の生体試料中の放射能濃度は、試料に直接又は試料を溶解あるいは燃焼処理した後、液体シンチレータを加えて液体シンチレーションカウンターを用いて測定した。一部組織中放射能濃度の測定には定量的全身オートラジオグラフィーを用いた。代謝プロファイルの検討は、Radio-HPLC あるいは TopCountTM を用いた HPLC-固体シンチレーション分析により行った。

マウス、ラット、ウサギ及びカニクイザルの血漿中未変化体の定量法として、液体クロマトグラフィータンデム質量分析（LC-MS/MS）法を開発し、バリデーション試験を実施した。血漿10 μL を用いた場合、定量下限はマウス及びラットでは2 ng/mL 、ウサギ及びカニクイザルでは8 ng/mL であった。日内及び日差再現性の精度及び真度は、いずれも15%（定量下限は20%）の許容基準内であった。

2.4.3.2 吸収

（資料番号4.2.2.2-1, 4.2.2.2-2, 4.2.3.2-2, 4.2.3.2-4）

ラット及びカニクイザルに本薬1 mg/kg を単回経口投与した時、未変化体の最高血漿中濃度到達時間（ T_{max} ）は両動物とも1時間、生物学的利用率（ F ）はそれぞれ75.0及び58.6%であった。

ラット及びカニクイザルに本薬1 mg/kg を単回静脈内投与した時、消失半減期（ $t_{1/2}$ ）はそれぞれ1.15及び5.02時間、クリアランス（ CL ）はそれぞれ19.4及び3.65 mL/min/kg 、分布容積（ $V_{\text{d,ss}}$ ）はそれぞれ1.15及び0.919 L/kg であった。

ラット及びカニクイザルに本薬をそれぞれ10～640 mg/kg/日 及び30～300 mg/kg/日 の用量で1日1回、1カ月間反復経口投与した場合、初回投与後24時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積（ $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$ ）はいずれの動物も用量に比例して増加した。反復投与後の未変化体の $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$ 及び C_{max} の蓄積率はラットでそれぞれ0.6～1.1及び0.6～1.2（ラットの投与量は Day 7以降10～480 mg/kg/日 ）、カニクイザルでそれぞれ1.1～2.2及び1.2～1.5であり、明らかな蓄積又は曝露の減少は認められなかった。ラット及びカニクイザルにおける本薬の体内動態には顕著な雌雄差は認められなかった。

2.4.3.3 分布

(1) 組織中濃度

（資料番号4.2.2.3-1, 4.2.2.3-2, 4.2.2.3-5, 4.2.2.3-10）

ラットに ^{14}C -トホグリフロジン1 mg/kg を単回経口投与後、放射能は速やかに広く組織に分布した。ほとんどの組織中放射能は血漿中放射能と平行して消失し、投与168時間後の時点で、肝臓及び腎臓のトホグリフロジンの排泄に関与する臓器を除く組織では放射能濃度は検出限界未満であった。大脳及び小脳中放射能濃度は極めて低かった。有色ラットにおける放射能の組織分布は、ラットとほぼ同じであり、皮膚や眼のような有色組織への特異的な放射能の分布は認められなかった。反復投与時の組織中放射能濃度は7回投与でほぼ定常状態に達し、蓄積性を示した組織は認められなかった。

妊娠18日の雌ラットに ^{14}C -トホグリフロジン1 mg/kg を単回経口投与した場合、卵巣、子宮、胎盤及び胎膜中放射能濃度は、血漿中放射能濃度と同等以上であったが、乳腺及び羊水中放射能濃度は血漿中放射能濃度未満であった。胎児においても放射能の移行が認められたが、ほとんどの胎児組織では母動物血漿中放射能濃度未満であった。

(2) 蛋白結合

（資料番号5.3.2.1-1）

本薬1 $\mu\text{g/mL}$ のときのマウス、ラット、カニクイザル及びヒト血漿中蛋白結合率はそれぞれ78, 84, 77及び83%であり、*in vitro* 血漿蛋白結合率に顕著な種差は認められなかった。

ヒト主要代謝物であるカルボン酸体のマウス、ラット、カニクイザル及びヒト血漿蛋白結合率（濃度範囲0.1～10 $\mu\text{g/mL}$ ）は、それぞれ約10, 40, 25及び55%であり、カルボン酸体の蛋白結合率には種差が認められた。

(3) トランスポーターを介した輸送

（資料番号5.3.2.3-1, 5.3.2.3-2, 5.3.2.3-3, 5.3.2.3-4）

本薬は MDR1 の良好な基質であったが、阻害作用は極めて弱く、 IC_{50} 値は $500 \mu\text{mol/L}$ 以上であった。本薬は OAT1, OCT2, OAT3, OATP1B1 及び OATP1B3 を介して能動的に輸送されることはなく、OATP1B1 に対して弱い阻害作用を示したが ($IC_{50} > 300 \mu\text{mol/L}$)、OCT2 及び OAT1 に対しての阻害作用は示さなかった。ヒト主要代謝物であるカルボン酸体に関しては、OATP1B1 に対してのみ阻害作用を示したが、その作用は極めて弱く、 IC_{50} 値は $500 \mu\text{mol/L}$ 以上であった。

2.4.3.4 代謝及び酵素誘導・阻害

(1) 代謝

(資料番号 4.2.2.4-1, 4.2.2.4-2, 4.2.2.4-3, 5.3.2.2-1, 5.3.2.2-2, 5.3.2.2-3, 4.2.3.2-1, 4.2.3.2-3, 4.2.3.5.2-3, 4.2.3.2-6, 4.2.2.2-9, 4.2.2.2-10)

ヒト凍結肝細胞を用いて本薬の代謝プロファイル調べた。主要代謝物としてカルボン酸体が認められ、その他の代謝物として一級水酸化体、二級水酸化体及びケトン体が認められた。

組み換え型ヒトチトクローム P450 (CYP) 発現系とヒト凍結肝細胞を用いた試験結果より、本薬の二級水酸化体への代謝には CYP2C18, 3A4 及び 3A5 が、一級水酸化体への代謝には CYP2C18, 4A11 及び 4F3B が関与していると推察された。一級水酸化体からカルボン酸体への関与酵素は、アルコール脱水素酵素 (ADH) 及びミクロソーム中の NAD^+ 要求性の酵素であることが推察された。

ラット及びカニクイザルにそれぞれ ^{14}C -トホグリフロジン 1 及び 10 mg/kg を単回経口投与した時の血漿中主要代謝物は、ラットでは二級水酸化体及びケトン体、カニクイザルでは二級水酸化体のグルクロナイドであった。なお、ヒト血漿中の主要代謝物はカルボン酸体であったことより、血漿中代謝物プロファイルには量的な種差が認められた。

カルボン酸体は、マウス、ラット、ウサギ及びカニクイザルを用いた毒性試験の全種動物の血漿中に認められた。ヒト血漿中に検出されているカルボン酸体のアシルグルクロナイド (アシルグルクロナイド) は、カニクイザル血漿中に検出され、 300 mg/kg 単回投与時の曝露量はヒト 20 mg/日 投与時 (表 2.7.2.2.4-2) の曝露量の約 1.6 倍であった。

(2) 酵素誘導・阻害

(資料番号 5.3.2.2-4, 5.3.2.2-5, 5.3.2.2-6, 5.3.2.2-7)

本薬は CYP1A2, 2B6 及び 3A4 の誘導能を示さず、7 種の CYP 酵素 (CYP1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 又は 3A4/5) に対して阻害作用は示さなかった ($IC_{50} > 50 \mu\text{mol/L}$)。カルボン酸体の CYP 阻害能に関しては、CYP2C19 に対して弱い阻害作用が認められたが ($IC_{50} = 27.1 \mu\text{mol/L}$)、その他 6 種の CYP に対して阻害作用は示さなかった。

2.4.3.5 排泄

(資料番号 4.2.2.5-1, 4.2.2.5-2, 4.2.2.5-4)

ラットに ^{14}C -トホグリフロジン 1 mg/kg を単回経口投与した場合、投与後 24 時間までに、尿及び糞中に投与放射エネルギーのそれぞれ 43.6 及び 49.3% が排泄され、投与後 168 時間までの総回収率は 97.4% であった。カニクイザルに ^{14}C -トホグリフロジン 10 mg/kg を単回経口投与した時もラットの場合と同様の排泄パターンを示し、投与後 168 時間までの総回収率は 89.7% であった。これらの結果から、本薬及びその代謝物の体内からの排泄は速やかであり、かつほぼ完全に排泄されることが示された。

出産後 11 日目の授乳期ラットに ^{14}C -トホグリフロジン 1 mg/kg を単回経口投与した場合、投与放射能の乳汁中への移行は投与直後から認められたが、投与 24 時間後には最高乳汁中放射能濃度の約 5% 程度に減少した。

2.4.3.6 その他の薬物動態試験

(資料番号4.2.2.7-1, 4.2.2.7-2)

糖尿病モデル動物である db/db マウス及び ZDF ラットに本薬を非絶食下单回経口投与した場合、0.1～10 mg/kg の投与量範囲で未変化体の血漿中動態はほぼ線形性を示していた。

2.4.4 毒性試験

2.4.4.1 単回投与毒性

(資料番号4.2.3.1-1)

単回投与毒性試験はラットを用いて実施した。

1000 mg/kg 群で投与後3日に、雌雄各1/5例が死亡した（平均 AUC_{0-24h} 雄：632 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ ，雌：888 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ ）。2000 mg/kg 群では、投与後2～5日に雄において4/5例，雌において1/5例が死亡した。以上の結果から、概略の致死量は1000 mg/kg と考えられた。

非げっ歯類を用いた単回投与毒性試験は実施しなかった。なお、カニクイザルを用いた1カ月間反復経口投与毒性試験において300 mg/kg/日の投与量で初回投与日において嘔吐以外に異常は認められなかった（平均 AUC_{0-24h} 雄：704 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ ，雌：803 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ ）。

2.4.4.2 反復投与毒性

(資料番号4.2.3.2-1, 4.2.3.2-2, 4.2.3.2-3, 4.2.3.2-4, 4.2.3.2-5, 4.2.3.2-6)

反復投与毒性試験は、ラット、カニクイザル及びマウスを用いて実施した。長期反復投与毒性試験での投与量は、ラットにおいて0, 5, 40及び320 mg/kg/日（6カ月間）、カニクイザルにおいて0, 10, 30及び100 mg/kg/日（12カ月間）、マウスにおいて0, 20, 80, 320及び640 mg/kg/日（3カ月間）であった。ラット及びカニクイザルにおける無毒性量（NOAEL）はそれぞれ5及び30 mg/kg/日であり、マウスにおける NOAEL は20 mg/kg/日であった。NOAEL での平均曝露量（ AUC_{0-24h} ）は、臨床推奨用量（20 mg/日）を投与した被験者の AUC_{inf} （CSG010JP）と比較すると、ラットでは2倍（雄）及び4倍（雌）、カニクイザルでは36倍（雌雄）、マウスでは7倍（雄）及び5倍（雌）であった。

反復投与毒性試験で認められた主な変化は、本薬の薬理作用である尿糖排泄亢進及びそれに伴うエネルギー供給量の不足によるものと考えられた。いずれの動物種においても高用量で低血糖若しくはエネルギー供給量の不足によると思われる死亡が認められ、摂餌量の増加を伴う体重増加抑制又は減少が認められた。本薬の薬理学的標的臓器である腎臓において、本薬の薬理作用に起因する浸透圧利尿による尿量の増加に伴う臓器重量の増加及び尿細管の拡張がみられ、ラットにおいては、腎皮質及び髄質の鉍質沈着及び尿細管上皮の再生も認められた。各試験における血液化学的検査では、脂質代謝、糖新生及び蛋白異化作用の亢進を示唆する変化として AST, ALT, BUN 及び総ケトン体（T-KB）の増加が認められ、病理学的検査で肝細胞のグリコーゲンの増加がみられた。

骨梁（大腿骨及び胸骨）の増加がラットにおいて40 mg/kg/日からみられたが、その他の動物種では認められなかった。RBC, Hb 及び MCHC の軽度な減少がラットでは認められたものの、マウス及びカニクイザルでは明らかな変化はみられなかった。

2.4.4.3 遺伝毒性

(資料番号4.2.3.3.1-1, 4.2.3.3.1-2, 4.2.3.3.2-1)

本薬の遺伝毒性を3種類の試験で評価した。

In vitro 試験として細菌を用いた復帰突然変異試験（Ames 試験）及びチャイニーズハムスター肺由来細胞株（CHL 細胞）を用いた染色体異常試験を代謝活性化系非存在下及び存在下の条件で実施した。本薬は細菌において遺伝子突然変異を誘発せず、CHL 細胞においても染色体異常を誘発しないと判断した。*In vivo* 試験としてラットの骨髄を用いた小核試験を実施し、

本薬を最高用量1000 mg/kg/日までの用量で2日間反復経口投与を行ったが、小核保有幼若赤血球の出現頻度の増加はなく、本薬はラットにおいて染色体異常を誘発しなかった。

以上の結果より、本薬が遺伝毒性を有する可能性は低いと考えられた。

2.4.4.4 がん原性

(資料番号4.2.3.4.1-1, 4.2.3.4.1-2)

マウス及びラットがん原性試験において、臨床推奨用量（20 mg/日）を投与した被験者のAUC_{inf}（CSG010JP）と比較して、ラットでは37倍（雄）及び76倍（雌）、マウスでは11倍（雄）及び38倍（雌）の曝露においても、本薬投与に起因する腫瘍発生率の増加は認められなかった。

2.4.4.5 生殖発生毒性

(資料番号4.2.3.5.1-1, 4.2.3.5.2-1, 4.2.3.5.2-3, 4.2.3.5.3-1)

反復投与毒性試験において、雌雄の生殖器に病理組織学的異常はみられなかった。

受胎能及び着床までの初期胚発生についてはラットを用いた試験を実施した。死亡例が320 mg/kg/日でみられ、本投与量では顕著な体重減少が観察され、全投与量で摂餌量の増加が観察された。精子パラメータ、生殖機能及び初期胚発生への影響は認められず、親動物におけるNOAELは80 mg/kg/日、生殖能及び初期胚発生におけるNOAELは320 mg/kg/日であった。

胚・胎児発生に関する試験はラット及びウサギを用いて実施した。ラットでは、320 mg/kg/日で母動物の死亡がみられ、同用量では生存母動物の胎児において、軽度の発育遅滞（胎児体重の減少及び骨化遅延）を除き、発生毒性は認められなかった。母動物及び胚・胎児発生におけるNOAELは80 mg/kg/日であった。一方、ウサギでは200 mg/kg/日で母動物の死亡が認められ、同群では流産又は早産もみられた。その他、体重の減少及び増加抑制が60及び200 mg/kg/日で認められた。胚・胎児発生に及ぼす影響については、軽度の発育遅滞、すなわち胎児体重の減少及び骨化遅延が200 mg/kg/日で認められた。胎児検査では、大血管、肋骨及び胸骨分節の奇形（迷走右鎖骨下動脈、大静脈後尿管及び肋骨又は胸骨分節の融合等）が、200 mg/kg/日群で認められたが、本用量は母動物の死亡、流産又は早産が発現している用量であり、剖検において持続的な摂餌抑制による栄養不良がみられていることから、本薬の直接作用による変化ではなく、母動物の状態悪化に伴う変化であると考えられた。以上の結果に基づき、母動物における一般毒性に対するNOAELは20 mg/kg/日と考えられ、母動物の生殖機能及び胚・胎児発生に対するNOAELは60 mg/kg/日と考えられた。両試験の結果より、本薬は直接的な作用として胚・胎児毒性を有する物質ではないと判断した。

ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験では、本薬の200 mg/kg/日投与で母動物において軽度の体重減少がみられ、出生児においては一時的に発育を遅延するが、母動物の生殖機能及び出生児の反射・感覚、行動及び性成熟に対しては影響を及ぼさないと考えられた。本試験条件下における母動物の一般毒性学的NOAELは80 mg/kg/日、母動物の生殖機能に対するNOAELは200 mg/kg/日、出生児に対するNOAELは80 mg/kg/日であった。

2.4.4.6 局所忍容性

本薬は経口投与による使用が予定されているため、局所忍容性の試験は実施しなかった。

2.4.4.7 その他の毒性

2.4.4.7.1 毒性発現の機序に関する試験

(資料番号4.2.3.7.3-1, 4.2.3.7.3-2, 4.2.3.7.3-3)

アルビノラットを用いた6カ月間反復経口投与毒性試験において認められた網膜萎縮につい

て確認するため、有色ラットを用いた6カ月間反復経口投与毒性試験及びアルビノラットを用いた低照度条件下における6カ月間反復経口投与毒性試験を実施した。その結果、いずれの試験においても網膜萎縮は認められず、カニクイザル12カ月間反復経口投与試験で病理学的検査及び網膜電位に異常が認められなかったことを踏まえると、本病変はアルビノラットにおいて長期光曝露した場合に誘発される自然発生病変と考えられ、本薬投与に起因する変化ではないと考えられた。

2.4.4.7.2 ヒト主要代謝物カルボン酸体を用いた試験

(資料番号4.2.3.7.5-1, 4.2.3.7.5-2, 4.2.3.7.5-3)

本薬を用いた反復投与毒性試験のマウス、ラット及びカニクイザルにおけるヒト主要代謝物であるカルボン酸体の最大曝露量は、CSG010JPの臨床推奨用量(20 mg/日)を投与した被験者における本代謝物曝露量($C_{\max}$: 0.162 $\mu\text{g/mL}$, AUC_{inf} : 1840 $\text{ng} \cdot \text{h/mL}$)と比較して、マウスでは約0.6～0.8倍、ラット及びカニクイザルでは約1～3倍であった。本薬を用いた生殖発生毒性試験のウサギにおける本代謝物曝露量は上記被験者の曝露量と比較して約47倍であった。これらの結果より、本薬を用いた毒性試験の中で本代謝物の評価は可能であると考えられた。加えて、本代謝物を用いたラット3カ月間反復経口投与毒性試験も実施したが、2000 mg/kg/日の投与においても毒性学的所見はみられなかった。また、本代謝物は、薬理学的活性はほとんどなく(SGLT2阻害活性: トホグリフロジンの1/700)、本代謝物を用いた復帰突然変異試験及び染色体異常試験の結果は陰性であった。

2.4.4.7.3 不純物を用いた試験

(資料番号4.2.3.7.6-1, 4.2.3.7.6-2, 4.2.3.7.6-3)

安全性の確認が必要な濃度閾値(0.15%)を超えて最終的に個別規格設定された類縁物質は*類縁物質A(規格値■■■■%以下)及び*類縁物質B(規格値■■■■%以下)であった(2.3.S.4.1, 表2.3.S.3.2.1.1-1)。

*類縁物質Aを含有しているLot No. ■■■■では、ラット1カ月間反復経口投与毒性試験を実施した。*類縁物質A申請規格値(■■■■%以下)及び臨床推奨用量(20 mg/日: 0.33 mg/kg/日)から計算されたヒトの1日最大摂取量は■■■■ mg/kg/日であることから、*類縁物質Aの毒性学的評価はラットで480倍の投与用量まで行われたことになる。本試験では*類縁物質A特有の毒性と考えられる変化はみられなかった。また、*類縁物質Aを含むLot No. ■■■■(*類縁物質A ■■■■%含有, 表2.3.S.3.2.1.3-3での値に感度係数■■■■を乗じた値)を用いた復帰突然変異試験及び染色体異常試験では陰性であった。

また、*類縁物質Bを含有しているLot No. ■■■■では、単回投与毒性試験、反復投与毒性試験、遺伝毒性試験及び安全性薬理試験を実施した。*類縁物質B申請規格値(■■■■%以下)及び臨床推奨用量から計算されたヒトの1日最大摂取量は■■■■ mg/kg/日であることから、*類縁物質Bの毒性学的評価は2000倍以上の投与用量まで行われたことになる。本試験においても*類縁物質B特有の毒性と考えられる変化は認められなかった。なお、同ロットを用いた復帰突然変異試験及び染色体異常試験では陰性であった。

以上のことから、個別規格設定された類縁物質*類縁物質A及び*類縁物質Bの規格値の範囲内における安全性は評価されており、これら類縁物質による毒性は認められなかった。

表 2.4.4.7.3-1 *類縁物質A の投与量比較

試験種類	原薬ロット	類縁物質 *類縁物質A (%) *	最大投与量		
			トホグリフロジ ン (mg/kg/日)	*類縁物質A (mg/kg/日)	ヒト摂取量との 比較**
ラット1カ月試験	■	■	160	■	480

*表 2.3.S.3.2.1.3-3での値に感度係数■を乗じた値

**各非臨床毒性試験で投与された *類縁物質A (mg/kg/日)/規格値より求めた臨床推奨用量での *類縁物質A (mg/kg/日), ヒトの体重を60 kg として換算

表 2.4.4.7.3-2 *類縁物質B の投与量比較

試験種類	原薬ロット	類縁物質 *類縁物質B (%) *	最大投与量		
			トホグリフロジ ン (mg/kg/日)	*類縁物質B (mg/kg/日)	ヒト摂取量との 比較**
ラット単回試験	■	■	2000	■	51090
ラット1カ月試験, Irwin 変法試験, 呼吸試験			640	■	16364
カニクイザル1カ月試験			300	■	7664
ラット小核試験			1000	■	25545
カニクイザルテレメトリー試験			100	■	2554

*表 2.3.S.3.2.1.3-2での値に感度係数■を乗じた値

**各非臨床毒性試験で投与された *類縁物質B (mg/kg/日)/規格値より求めた臨床推奨用量での *類縁物質B (mg/kg/日), ヒトの体重を60 kg として換算

2.4.4.7.4 光安全性の評価

本薬は290～700 nm において光吸収を示さず, 光安全性についての懸念はないものと判断した(図 3.2.S.3.1.1.3.2-1)。

2.4.4.8 動物からヒトへの外挿(曝露量のまとめ, 臨床との関連性)

ラットは本薬の反復投与試験において最も感受性が高い動物種で, 6カ月間反復経口投与毒性試験での NOAEL である5 mg/kg/日での AUC_{0-24h} は CSG010JP の臨床推奨用量 (20 mg/日) での AUC_{inf} の2～4倍であった。ラットにおける中用量 (40 mg/kg/日) での所見として, 血液学的変化 (RBC, Hb 及び MCHC の減少) と, 軽微な骨梁の増加がみられた。血液学的変化は, ヒトで臨床推奨用量を投与する際, 重篤な副作用につながる可能性は低く, 回復群での所見から可逆性であったことから, 安全性に関わる重大な問題とは考えられなかった。更に, 骨の変化についても本所見は他動物種では認められておらず, ラット特異的な変化であった。他の SGLT-2阻害剤においてもラットで同様の骨の変化がみられており⁷⁾, 本所見の発現機序としては高用量の投与によって誘発される SGLT-1阻害による腸内環境の変化に起因する腸管からのカルシウム吸収の増加に基づく変化と考えられる。本薬の *in vitro* における SGLT2阻害活性は SGLT1阻害活性に対してヒトでは2100倍, ラットでは560倍であることから, ヒトにおいて

*新薬承認情報提供時に置き換え

SGLT1/2選択性が高いことが明らかになっている。これらの結果からも、ラットでの骨に関する所見はヒトへの外挿性は低いものと判断でき、またヒトへの投与において問題となるような骨の変化は認められなかった。なお、ラットがん原性試験において骨梁の増加は35 mg/kg/日群ではみられず、その用量での曝露 (AUC_{0-24h}) は臨床推奨用量投与時の曝露と比較した場合、約14倍であった。

カニクイザルでは12カ月間反復経口投与毒性試験において、高用量 (100 mg/kg/日) で死亡 (雌1例) が認められた。この動物は、与えたすべての餌を摂取したにもかかわらず、数週間にわたって体重減少がみられ、最終的に約1 kg 減少した。死因は、過度の尿糖排泄亢進に起因するエネルギー供給の不足であると考えられた。この結果を受け、給餌量を200 g/日から300 g/日に増量したところ、以降、投与期間終了時まで新たな死亡は発生せず、本薬に関連した病理学的変化もみられなかった。死亡した投与量での曝露量は臨床推奨用量を被験者に投与した際の AUC_{inf} の100倍以上あり、かつ体重及び栄養状態を反映する血液化学的变化でモニターも可能であることからヒトにおける安全性は担保できるものと考えられた。

網膜萎縮がラット (アルビノ) 6カ月間反復経口投与毒性試験において認められたが、病理組織像は、長期光曝露で誘発される自然発生病変と酷似していた⁸⁾。網膜萎縮は他系統の有色ラットを用いた6カ月間反復経口投与毒性試験及び低照度条件下でのアルビノラットを用いた6カ月間反復経口投与毒性試験で認められなかったこと、カニクイザル12カ月間反復経口投与毒性試験で病理学的検査及び網膜電位に異常が認められなかったことから、本薬の投与に関連しないアルビノラットに特有の光誘発性傷害による変化であり、ヒトへの外挿性はないと考えられた。

いずれの遺伝毒性試験においても本薬による影響は認められなかった。

マウス及びラットがん原性試験において、本薬投与に起因する腫瘍発生率の増加は認められなかった。

生殖発生毒性に関しては、反復投与毒性試験において雌雄の生殖器に病理組織学的異常はみられず、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も、雌雄ともに生殖機能及び初期胚発生に影響は認められなかった。ラット及びウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験においては、軽度の胎児発育遅延が高用量群でのみ認められ、高用量群のウサギ胎児では内臓及び骨格の異常 (迷走右鎖骨下動脈、大静脈後尿管及び肋骨又は胸骨分節融合の異常) がわずかに増加したが、本投与量は母動物の死亡、流産又は早産が発現している用量であり、剖検において持続的な摂餌抑制による栄養不良がみられていることから、本薬の直接作用による変化ではなく、母動物の状態悪化に伴う変化であると考えられた。なお、ラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験における胚・胎児発生に関する試験の NOAEL での曝露量は、臨床推奨用量を被験者に投与した際の AUC_{inf} の約50倍であった。ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験では、本薬の200 mg/kg/日投与で母動物において軽度の体重減少がみられ、出生児においては一時的に発育を遅延するが、母動物の生殖機能及び出生児の反射・感覚、行動及び性成熟に対しては影響を及ぼさないと考えられた。本試験条件下における母動物の一般毒性学的 NOAEL は80 mg/kg/日、母動物の生殖機能に対する NOAEL は200 mg/kg/日、出生児に対する NOAEL は80 mg/kg/日であり、20 mg/kg/日の本薬をヒトに投与した際の AUC_{inf} の約50倍であった (ラットを用いた生殖発生毒性試験における胚・胎児発生に関する試験での80 mg/kg/日の曝露量を参照)。

表 2.4.4.8-1 ラット及びカニクイザルにおける主要な反復経口投与毒性試験
における結果と曝露量の比較

主要所見 ^a	投与量 (mg/kg/日)	AUC _{0-24h} (μg・h/mL) 雄/雌 [安全域, 雄/雌] ^b	C _{max} (μg/mL) 雄/雌 [安全域, 雄/雌] ^b
ラット, 6カ月間			
≥5 mg/kg/日: 摂餌量増加, 尿量増加によると考えられる腎臓重量増加	5 NOAEL	4.84/9.13 [2/4]	1.48/2.98 [3/6]
40 mg/kg/日: 雄における体重減少, 雌におけるRBC, Hb 及び MCHC の減少, 肝細胞におけるグリコーゲン増加に相関した肝臓相対重量の増加, 軽度の骨梁の増加 (大腿骨及び胸骨)	40 LOAEL	36.1/67.3 [17/31]	6.51/12.9 [13/25]
カニクイザル, 12カ月間			
主要所見なし (尿量増加による腎臓重量増加)	30 NOAEL	76.7/76.4 [36/36]	14.2/15.9 [28/31]
数週間に及ぶ体重減少後の死亡1例 (尿糖排泄亢進後のエネルギー供給不足によるものと思われる), 散発性嘔吐	100 LOAEL	233/252 [109/118]	32.5/44.5 [64/87]
がん原性試験			
マウス, 発がん性なし	30 (雄) °/125 (雌)	23.9/82.0 [11/38]	6.64/13.5 [13/27]
ラット, 発がん性なし	100	78.7/163 [37/76]	9.81/20.4 [19/40]

^a 尿糖排泄亢進に関連した変化 (エネルギー代謝, 電解質に関する変化) は除く。

^b 臨床推奨用量 (20 mg/日) を投与した被験者における曝露量に対する動物における曝露量の比, 曝露量は CSG010JP の値 (C_{max}: 509 ng/mL, AUC_{inf}: 2140 ng・h/mL) を用いた。

^c 投与38週まで40 mg/kg/日を投与し, 2週間の休薬後, 30 mg/kg/日を投与した。

2.4.5 総括及び結論

本薬は, *in vitro* においてヒト, マウス及びラットの SGLT2を阻害し, またそれぞれの阻害活性は SGLT1に比較して高い SGLT2選択性を有していた。db/db マウスあるいは ZDF ラットへの単回経口投与試験において, 本薬は随時血糖を用量依存的に低下させた。ZDF ラットにおいては本薬が尿糖排泄亢進作用を有することが確認された。以上のことから, 本薬は SGLT2を選択的に阻害することにより腎臓におけるグルコース再吸収を阻害し, 尿中にグルコースを排泄することで2型糖尿病モデル動物の血糖値を低下させたものと考えられた。また, db/db マウスへの4週間反復経口投与試験では糖化ヘモグロビン値の上昇を抑制したことから, 本薬が2型糖尿病モデル動物の血糖値を長期に亘り低値にコントロールできることが示された。更に, GK ラットにおいて本薬は食後過血糖改善薬であるボグリボースと同様に液体飼料負荷後の血糖上昇を抑制したことから, 本薬が臨床においても食後過血糖改善作用を有する可能性が示された。一方, 本薬は, 糖尿病モデル動物で血糖降下作用を示す用量において, 正常ラットの血糖値には影響を与えなかった。以上のことから, 本薬は高血糖や食後過血糖を改善するが, 低血糖のリスクは低い可能性が示唆された。

単回投与毒性試験及び反復投与毒性試験で認められた変化は, 本薬の薬理作用である尿糖排泄亢進とそれに伴う尿量の増加によるものと考えられた。また, 高用量における死亡も低血糖若しくはエネルギー供給量の不足によるものと考えられた。これら毒性試験で認められた変化はヒトへの投与に際してモニターが可能であり, ヒトの安全性は担保できると考えられた。更に, 本薬には遺伝毒性を疑わせる所見はみられず, がん原性も認められなかった。また, 生殖発生毒性試験から本薬は胚・胎児毒性を有する物質ではないと判断した。ただし, 妊娠ラットにおいて本薬の胎児及び乳汁への移行がみられている。

ラット及びカニクイザルを用いた薬物動態試験より, 本薬の経口吸収性は良好であり, ラッ

トでは10～640 mg/kg/日の投与量範囲で、カニクイザルでは30～300 mg/kg/日の投与量範囲で、糖尿病モデル動物である db/db マウス及び ZDF ラットでは0.1～10 mg/kg の投与量範囲で曝露量はほぼ用量比例的であった。CYP の誘導及び阻害試験の結果、及びトランスポーターに対する作用に関する試験結果より、本薬が併用薬と薬物間相互作用を引き起こすリスクは低いと考えられた。

本薬のヒト血漿中の主要代謝物であるカルボン酸体は、ヒト SGLT2阻害活性が未変化体と比較して700倍弱く、ヒトでの薬効に関与しないと考えられた。また、本薬を用いた各動物種の毒性試験における本代謝物の曝露量から、これらの試験において本代謝物も含めた毒性評価が適切になされていると考えられ、更に、本代謝物を用いたラット3カ月間反復経口投与毒性試験、*in vitro* 遺伝毒性試験、hERG 試験においても、本代謝物に毒性的な問題は認められなかった。

以上、本薬は SGLT2阻害に基づく尿糖排泄亢進作用により、T2DM の高血糖及び食後過血糖を是正し、毒性試験の結果からも安全に使用可能であると考えられることから、経口血糖降下薬として有用性及び忍容性の高い薬剤となることが期待される。

2.4.6 参考文献一覧

- 1) Wright EM. Renal Na⁺-glucose cotransporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;280:F10-8.
- 2) Magen D, Sprecher E, Zelikovic I, Skorecki K. A novel missense mutation in *SLC5A2* encoding SGLT2 underlies autosomal-recessive renal glucosuria and aminoaciduria. *Kidney Int* 2005;67:34-41.
- 3) Kleta R, Stuart C, Gill FA, Gahl WA. Renal glucosuria due to *SGLT2* mutations. *Mol Genet Metab* 2004;82:56-8.
- 4) Santer R, Kinner M, Lassen CL, Schneppenheim R, Eggert P, Bald M, et al. Molecular analysis of the *SGLT2* gene in patients with renal glucosuria. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:2873-82.
- 5) Wright EM, Hirsch JR, Loo DD, Zampighi GA. Regulation of Na⁺/glucose cotransporters. *J Exp Biol* 1997;200:287-93.
- 6) Wright EM, Turk E, Martin MG. Molecular basis for glucose-galactose malabsorption. *Cell Biochem Biophys* 2002;36:115-21.
- 7) Whaley JM, Tirmenstein M, Reilly TP, Poucher SM, Saye J, Parikh S, et al. Targeting the kidney and glucose excretion with dapagliflozin: preclinical and clinical evidence for SGLT2 inhibition as a new option for treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity. Targets and Therapy* 2012;5:135-48.
- 8) Boorman GA., Eustis SL., Elwell MR., Montgomery CA. Jr., MacKenzie WF. Pathology of the Fischer Rat. California, Academic Press Inc. 1990; 244-7.
- 9) Liao W, Nguyen MT, Imamura T, Singer O, Verma IM, Olefsky JM. Lentiviral short hairpin ribonucleic acid-mediated knockdown of GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology* 2006;147: 2245-52.
- 10) Estrada DE, Ewart HS, Tsakiridis T, Volchuk A, Ramlal T, Tritschler H, et al. Stimulation of glucose uptake by the natural coenzyme alpha-lipoic acid/thioctic acid: participation of elements of the insulin signaling pathway. *Diabetes* 1996; 45: 1798-804.