# サムスカ錠 7.5 mg
# サムスカ錠 15 mg
# サムスカ錠 30 mg

第 2 部(モジュール 2) : CTD の概要(サマリー)

2.6.1 緒言

大塚製薬株式会社

## 2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

### 2.6.1　緒言

#### 2.6.1.1　名称及び化学構造式

トルバプタンの名称及び化学構造式は以下のとおりである。

一般名：INN　tolvaptan

JAN　トルバプタン（日本名），Tolvaptan（英名）

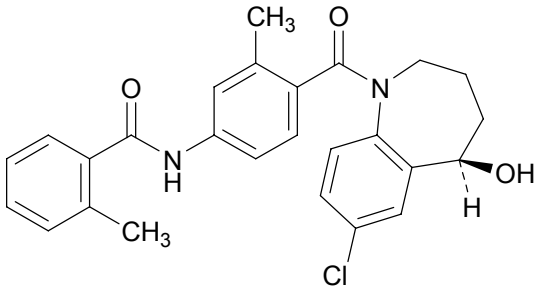
化学名：*N*−{4−[(5*RS*)-7-クロロ-5-ヒドロキシ-2,3,4,5-テトラヒドロ-1*H*-ベンゾ[*b*]アゼピン-1-カルボニル]-3-メチルフェニル}-2-メチルベンズアミド（日本名）

*N*−{4−[(5*RS*)-7-Chloro-5-hydroxy-2,3,4,5-tetrahydro-1*H*-benzo[*b*]azepine-1-carbonyl]-3-methylphenyl}-2-methylbenzamide（英名）

CAS 登録番号：150683-30-0

コード番号：OPC-41061，OPC-156

構造式：




及び鏡像異性体

分子式：$C_{26}H_{25}ClN_2O_3$

分子量：448.94

#### 2.6.1.2　トルバプタンの薬理作用

トルバプタンは，経口投与で有効な非ペプチド性バソプレシン $V_2$-受容体拮抗薬であり，多発性嚢胞腎においては $V_2$-受容体拮抗作用により，バソプレシンによる細胞内 cAMP の上昇を抑制することで腎嚢胞の増大を抑制し，常染色体優性多発性嚢胞腎（ADPKD）の進行を抑制することが期待される。

#### 2.6.1.3　トルバプタンの予定する効能・効果及び用法・用量

トルバプタンの予定する効能・効果及び用法・用量を表 2.6.1-1 に示した。

表 2.6.1-1　　トルバプタンの予定する効能・効果及び用法・用量

| | |
|---|---|
| 効能・効果 | 腎容積が既に増大しており，かつ，腎容積の増大速度が速い常染色体優性多発性のう胞腎の進行抑制 |
| 用法・用量 | 通常，成人にはトルバプタンとして 1 日 60 mg を 2 回（朝 45 mg，夕方 15 mg）に分けて経口投与を開始する。1 日 60 mg の用量で，1 週間以上投与し，忍容性がある場合には，1 日 90 mg（朝 60 mg，夕方 30 mg），1 日 120 mg（朝 90 mg，夕方 30 mg）と 1 週間以上の間隔を空けて段階的に増量する。なお，忍容性に応じて適宜増減するが，最高用量は 1 日 120 mg までとする。 |

# サムスカ錠 7.5 mg
# サムスカ錠 15 mg
# サムスカ錠 30 mg

第 2 部(モジュール 2)：CTD の概要(サマリー)

2.6.2 薬理試験の概要文

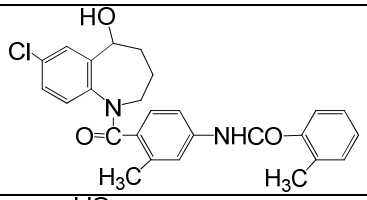
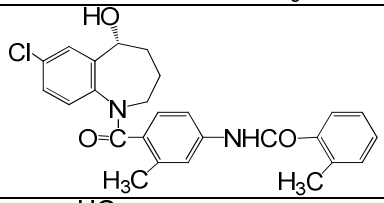
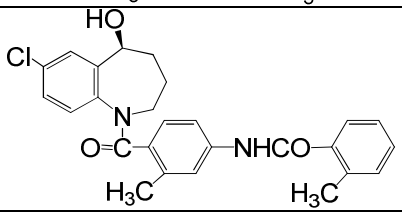
大塚製薬株式会社

# 目次

目次 ..... 2
略号一覧 ..... 3
2.6.2 薬理試験の概要文 ..... 5
2.6.2.1 まとめ ..... 5
2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験 ..... 5
2.6.2.1.2 副次的薬理試験 ..... 6
2.6.2.1.3 安全性薬理試験 ..... 6
2.6.2.1.4 薬力学的薬物相互作用試験 ..... 6
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 ..... 7
2.6.2.2.1 PKD モデル動物に対する作用 ..... 7
2.6.2.2.2 ヒト ADPKD 患者の腎嚢胞由来の培養細胞に対する作用 ..... 19
2.6.2.3 副次的薬理試験 ..... 21
2.6.2.4 安全性薬理試験 ..... 21
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 ..... 21
2.6.2.6 考察及び結論 ..... 22
2.6.2.6.1 効力を裏付ける試験の考察及び結論 ..... 22
2.6.2.7 図表 ..... 24

# 略号一覧

| 略号 | 省略していない表現 |
|---|---|
| ADPKD | 常染色体優性多発性嚢胞腎（autosomal dominant polycystic kidney disease） |
| AQP2 | aquaporin 2 |
| ARPKD | 常染色体劣性多発性嚢胞腎（autosomal recessive polycystic kidney disease） |
| BUN | 血中尿素窒素（blood urea nitrogen） |
| B-Raf | B-rapidly accelerated fibrosarcoma |
| cAMP | cyclic AMP |
| CFTR | cystic fibrosis transmembrane conductance regulator |
| ERK | extracellular signal-regulated kinase |
| MAP kinase | mitogen activated protein kinase |
| MRI | magnetic resonance imaging |
| NGAL | neutrophil gelatinase-associated lipocalin |
| PCNA | 核内増殖抗原（proliferating cell nuclear antigen） |
| PC1 | ポリシスチン 1（polycystin 1） |
| PC2 | ポリシスチン 2（polycystin 2） |
| PKA | protein kinase A |
| PKD | 多発性嚢胞腎（polycystic kidney disease） |

| 名称（由来） | 構造式 |
| --- | --- |
| トルバプタン（JAN）<br>OPC-41061<br>（OPC-156） |  |
| R(+)-トルバプタン<br>R(+)-OPC-41061<br>DM-4101<br>（光学異性体） |  |
| S(-)-トルバプタン<br>S(-)-OPC-41061<br>DM-4102<br>（光学異性体） |  |

## 2.6.2　薬理試験の概要文

### 2.6.2.1　まとめ

トルバプタンは，販売名サムスカ錠 15 mg として，2010 年 10 月 27 日に「ループ利尿薬等の他の利尿薬で効果不十分な心不全における体液貯留（以下，心不全における体液貯留）」を効能・効果として製造販売承認を取得している。トルバプタン及び代謝物の薬理作用については，「心不全における体液貯留」の審査時に評価されている。今般，効能追加として申請する「腎容積が既に増大しており，かつ，腎容積の増大速度が速い常染色体優性多発性のう胞腎（以下，ADPKD）の進行抑制」の効力を裏付ける試験として，各種の多発性嚢胞腎（以下，PKD）モデル動物を用いた薬効評価試験及びヒト ADPKD 患者の腎嚢胞由来の培養細胞を用いた試験を実施した。副次的薬理試験，安全性薬理試験及び薬力学的薬物相互作用試験については，新たな試験は実施しなかった。

#### 2.6.2.1.1　効力を裏付ける試験

トルバプタンはバソプレシン $V_2$-受容体（以下，$V_2$-受容体）拮抗薬であり，腎集合管においては cyclic AMP（以下，cAMP）を低下させ，水再吸収を阻害して水利尿作用をもたらす。効力を裏付ける試験の結果，バソプレシンによる細胞内 cAMP の上昇を抑制することで ADPKD における腎嚢胞の増大を抑制するものと考えられた。

##### 2.6.2.1.1.1　PKD モデル動物に対する作用

**(1)　腎嚢胞に対する作用**

トルバプタン（0.01-0.1%含有飼料）は混餌投与により PKD モデル動物である，DBA/2:FG-*pcy* マウス，PCK ラット及び $Pkd2^{WS25/-}$マウスにおいて，腎重量（腎容積）の増加を抑制した。いずれのモデルにおいても腎嚢胞容積は低下傾向にあり，トルバプタンは腎嚢胞の増大を抑制して腎重量（腎容積）を低下させたと考えられた。また，嚢胞の増大抑制とともに，腎組織においては間質の線維化の抑制（DBA/2:FG-*pcy* マウス及び PCK ラット），核内増殖抗原（proliferating cell nuclear antigen：以下，PCNA）陽性細胞数の抑制（DBA/2:FG-*pcy* マウス，PCK ラット及び $Pkd2^{WS25/-}$マウス）やアポトーシスの抑制（PCK ラット及び $Pkd2^{WS25/-}$マウス）も認められた。

**(2)　腎障害マーカーに対する作用**

トルバプタンの投与により，DBA/2:FG-*pcy* マウスの長期投与試験では尿中アルブミン排泄の低下が，用量依存性の試験では尿中 neutrophil gelatinase-associated lipocalin（以下，NGAL）の低下が認められた。DBA/2:FG-*pcy* マウス（用量依存性の検討），PCK ラット及び $Pkd2^{WS25/-}$マウスでは腎線維化容積の低下も認められており，トルバプタンは腎嚢胞の増大抑制に伴って腎障害マーカーの悪化を抑制した。また，DBA/2:FG-*pcy* マウスの長期投与試験ではトルバプタンにより有意な死亡率の改善も認められた。

### (3) 水利尿作用

トルバプタン投与によりいずれの PKD モデル動物においても腎重量の抑制とともに，用量依存的な水利尿作用が見られた。DBA/2:FG-*pcy* マウスを用いた用量依存性の検討では（トルバプタンの投与量：0.01-0.3%），トルバプタンの腎重量の抑制作用と水利尿作用はいずれも 0.1%でほぼ最大作用を示しており，この投与量における血清中トルバプタン濃度には日内変動がみられたが，49.4 - 467.5 ng/mL の範囲であった。

### (4) 作用機序

ADPKD の嚢胞上皮細胞では cAMP が protein kinase A（以下，PKA）を活性化し B-rapidly accelerated fibrosarcoma（以下，B-Raf）を含む一連の mitogen activated protein kinase（以下，MAP kinase）系が活性化されることが明らかになっている。トルバプタンは DBA/2:FG-*pcy* マウスにおいて，嚢胞の増大に伴って上昇した腎内 cAMP 含量を用量依存的に低下させた。さらに，cAMP の下流にあり細胞増殖に関与する extracellular signal-regulated kinase（以下，ERK）活性も同様に抑制したことから，トルバプタンは $V_2$-受容体拮抗作用により，バソプレシンによる細胞内 cAMP の上昇を抑制することで腎嚢胞の増大を抑制するものと考えられた。

#### 2.6.2.1.1.2 ヒト ADPKD 患者の腎嚢胞由来の培養細胞に対する作用

ヒト ADPKD 患者の嚢胞由来の培養細胞において，バソプレシンは細胞増殖を促進し，この作用は細胞内 cAMP 量の増加とそれに続く B-Raf 及び ERK のリン酸化を介していた。トルバプタンは濃度依存的にバソプレシンによる cAMP の上昇とそれに関連する細胞シグナル系の活性化を抑制したことから，$V_2$-受容体拮抗作用により細胞増殖を抑制することで，腎嚢胞の増大を抑制するものと考えられた。一方，腎嚢胞の増大には細胞増殖の亢進とともに，cAMP 依存的な cystic fibrosis transmembrane conductance regulator（以下，CFTR）の活性化を介した嚢胞液の流入が関与することが知られている。トルバプタンはヒト ADPKD 患者の嚢胞由来の培養細胞において，バソプレシンによる CFTR の活性化を抑制することが報告されており，トルバプタンの嚢胞増大の抑制作用には cAMP 依存的な嚢胞液の流入の抑制作用も関与しているものと考えられた。

#### 2.6.2.1.2 副次的薬理試験

今回の効能・追加申請にあたり，新たに実施した試験はない。

#### 2.6.2.1.3 安全性薬理試験

今回の効能・追加申請にあたり，新たに実施した試験はない。

#### 2.6.2.1.4 薬力学的薬物相互作用試験

今回の効能・追加申請にあたり，新たに実施した試験はない。

### 2.6.2.2　効力を裏付ける試験

#### 2.6.2.2.1　PKD モデル動物に対する作用

（概要表 2.6.3.2, 報告書番号 028192, 028257, 028160, 016916, 017738（参考）, 017316, 017968，018373（参考））

**目的**：トルバプタンの PKD に対する抑制作用を，原因遺伝子の異なる 3 種の PKD モデル動物を用いて検討した。

##### 2.6.2.2.1.1　DBA/2:FG-*pcy* マウスにおける作用（報告書番号 028192，028257，028160）

*pcy* マウスは高橋ら[1]によって見出された自然発症の PKD モデルであり，ヒト若年性ネフロン癆の相同遺伝子である *Nphp3* 遺伝子のミスセンス変異により腎嚢胞を形成する。

**(1)　単一用量による長期投与試験（報告書番号 028192）**

**方法**：雄性 DBA/2:FG-*pcy* マウスにトルバプタン 0.1%含有飼料を 5 週齢より 29 週齢まで混餌投与した。嚢胞腎の指標である腎容積（左腎）は核磁気共鳴画像法（magnetic resonance imaging：以下，MRI）を用いて経時的に評価し，水利尿作用及び腎機能の指標としての尿中アルブミン排泄と BUN を経時的に評価した。また，29 週齢までの生存率についても併せて評価した。

**成績**：DBA/2:FG-*pcy* マウス（対照群）では 4 週齢（薬物処置前）より正常群に比較して有意な腎容積の増大と MRI 画像上での腎嚢胞が認められ，週齢の増加とともに腎容積は増大し，16-20 週齢で腎容積は最大となった。トルバプタンの混餌投与により腎容積の増大は 12 週齢の測定時より有意に抑制され，その作用は試験終了時まで維持された（図 2.6.2-1）。対照群では病態の進行に伴って，尿量の増加と尿浸透圧の低下が見られ，尿中アルブミン排泄の増加及び BUN の上昇が認められた（図 2.6.2-2）。トルバプタンの混餌投与により試験期間を通じて尿量の増加と尿浸透圧の低下が認められた。腎機能に対しては，尿中アルブミン排泄の増加は有意に抑制したが，BUN の上昇は 27 週齢で抑制傾向が見られたものの有意な改善は見られなかった。生存率に対しては，対照群では 20 週齢以降に死亡例が発現し 29 週齢までに 15 例中 9 例が死亡したが，トルバプタン投与群では 15 例中 3 例の死亡であり，トルバプタンは生存率を有意に改善した（図 2.6.2-3）。

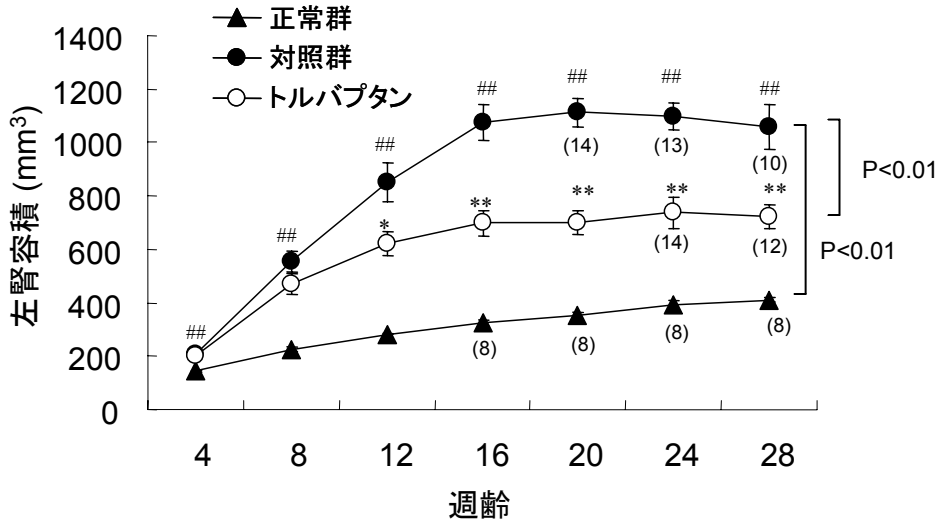



図 2.6.2-1　　雄性 DBA/2:FG-*pcy* マウスにおけるトルバプタン（0.1%）の腎容積に対する作用

平均値±標準誤差，n=9（正常群），n=15（対照群，トルバプタン群），括弧内の数値は例数を示す。
左腎容積は 4 週毎に麻酔下で MRI を用いて非侵襲的に計測した。
##：p<0.01（正常群との比較），*：p<0.05，**：p<0.01（対照群との比較）
検定：繰り返し測定に基づく分散分析（全期間）及び t 検定（両側：各時点）
＜資料番号 4.2.1.1-01：図 8-1＞

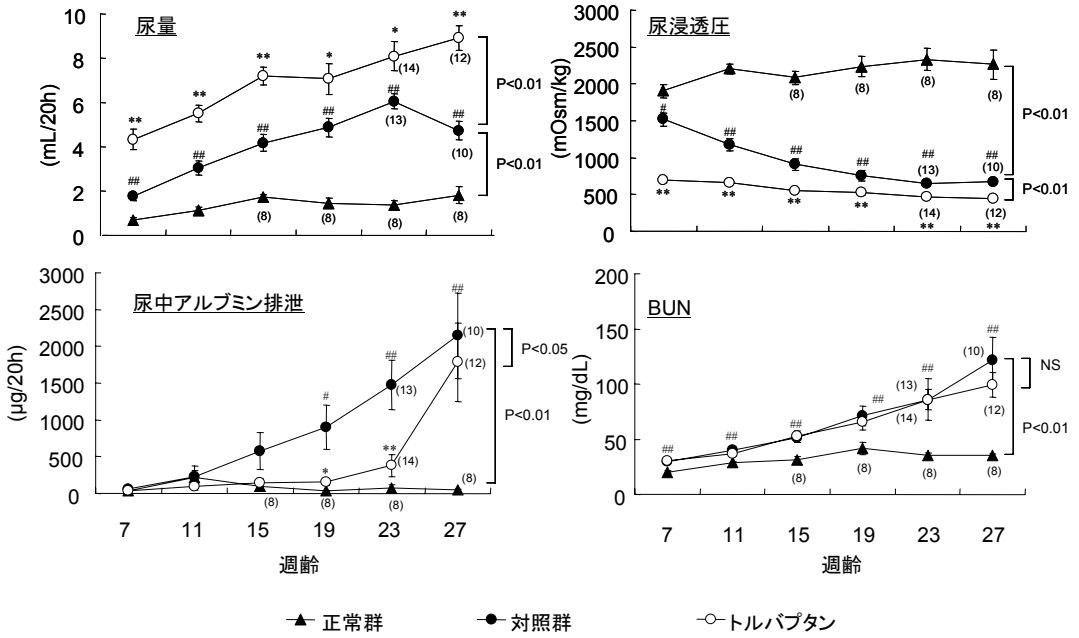



図 2.6.2-2　　雄性 DBA/2:FG-*pcy* マウスにおけるトルバプタン（0.1%）の尿量，尿浸透圧，尿中アルブミン排泄及び BUN に対する作用

平均値±標準誤差，n=9（正常群），n=15（対照群，トルバプタン群），括弧内の数値は例数を示す。
尿は 4 週毎に 20 時間の蓄尿により採取し，尿量，浸透圧及びアルブミン排泄を算出した。
##：p<0.01（正常群との比較），*：p<0.05，**：p<0.01（対照群との比較）
検定：繰り返し測定に基づく分散分析（全期間）及び t 検定（両側：各時点）
＜資料番号 4.2.1.1-01：図 8-4＞

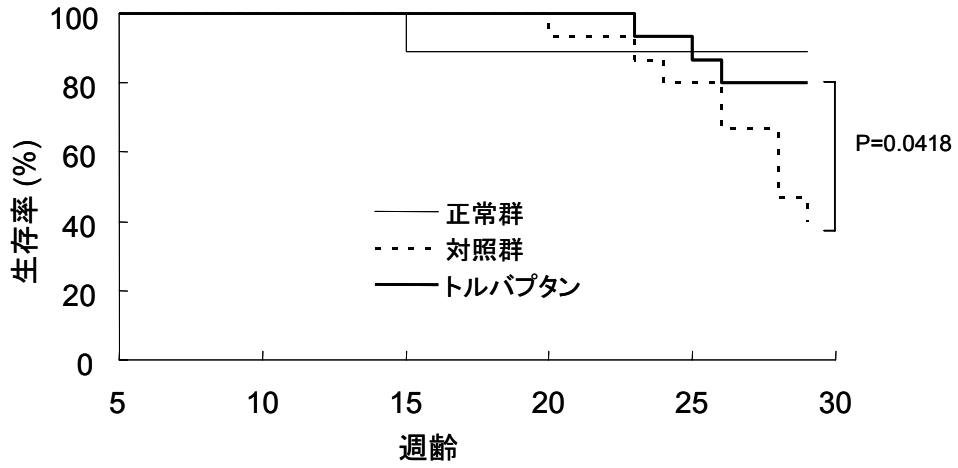



図 2.6.2-3　　雄性 DBA/2:FG-*pcy* マウスにおけるトルバプタン（0.1%）の生存率に対する作用

n=9（正常群），n=15（対照群及びトルバプタン群）
検定：Log-rank 検定
＜資料番号 4.2.1.1-01：図 8-3＞

### (2)　用量依存性を検討した試験（報告書番号 028257）

**方法**：雄性 DBA/2:FG-*pcy* マウスにトルバプタン 0.01%～0.3%含有飼料を 5 週齢より腎容積がほぼ最大化する 15 週齢まで混餌投与した。14 週齢時に代謝ケージによる採尿を行い，尿パラメータを評価し，15 週齢時に剖検を行い腎重量及び腎組織パラメータの評価を行った。また，作用機序の検討として腎内の cAMP 含量，ERK 活性，aquaporin 2（以下，AQP2）mRNA 発現量の評価も併せて実施した。

**成績**：雄性 DBA/2:FG-*pcy* マウスでは 15 週齢で正常群に比較して有意な腎重量の増加を示し，腎の嚢胞容積と線維化容積は著明に増加し，細胞増殖の指標である PCNA 陽性細胞数も有意に増加した（図 2.6.2-4）。トルバプタンの混餌投与（0.01%～0.3%）は，これらの変化を用量依存的に抑制し，0.03%以上の投与量では有意に腎重量の増加を抑制した。トルバプタンによる腎重量と腎嚢胞容積の抑制作用は，0.1%の投与量でほぼ最大の作用を示した。

腎機能に関しては，14-15 週齢時点では尿中 NGAL は著明に上昇していたが，尿中アルブミン排泄，血清中クレアチニン濃度及び BUN に明らかな上昇は見られなかった（図 2.6.2-5）。トルバプタンの混餌投与により尿中 NGAL は用量依存的に低下した。

利尿作用に関しては，トルバプタンの混餌投与により，尿量の増加と尿浸透圧の低下が認められ，尿量の増加は 0.03%以上で，尿浸透圧の低下は 0.01%以上の用量で有意な作用を示した（図 2.6.2-6）。トルバプタンの水利尿作用は 0.1%でほぼ最大作用を示した。

DBA/2:FG-*pcy* マウス（対照群）では，腎内 cAMP 含量が正常群に比較して有意に上昇し，細胞増殖に関与する ERK 活性の上昇が認められた（図 2.6.2-7）。トルバプタンの混餌投与により，腎内 cAMP 含量は用量依存的に低下し，ERK 活性は有意に低下した。また，トルバプタンの水利尿作用に寄与する AQP2 の mRNA の発現量は腎内 cAMP 含量の低下に伴って用量依存的に低下した。これらの結果から，トルバプタンは $V_2$-受容体拮抗作用により細胞内 cAMP を低下させるこ

とにより，腎集合管では AQP2 の減少を介した水利尿作用を発現し，腎嚢胞においては嚢胞上皮細胞の増殖を抑制することで腎嚢胞の増大を抑制するものと考えられた。

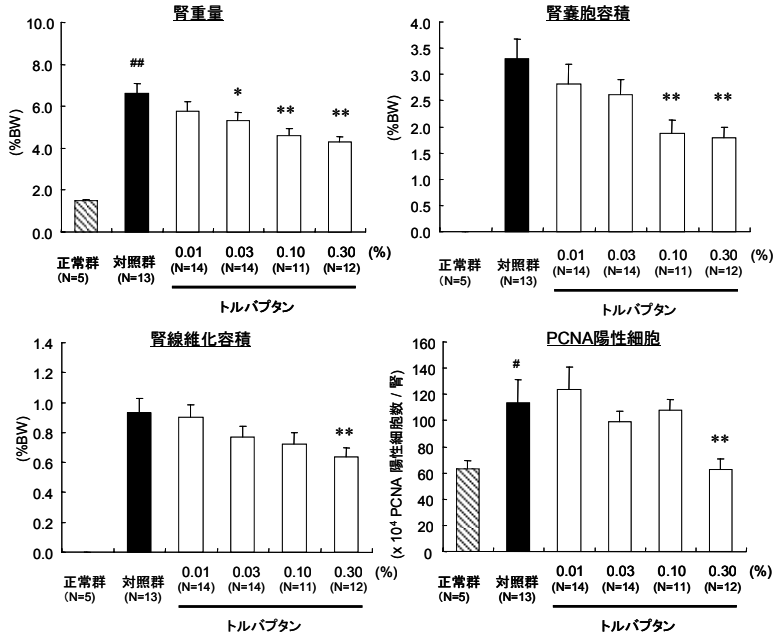



図 2.6.2-4　　雄性 DBA/2:FG-pcy マウスにおけるトルバプタンの腎重量及び腎組織パラメータに対する作用

平均値±標準誤差，括弧内の数値は例数を示す。
腎嚢胞容積：腎断面あたりの嚢胞面積(%) × 腎重量，腎線維化容積：腎断面あたりの線維化面積(%) × 腎重量，PCNA 陽性細胞数：腎断面あたりの PCNA 陽性細胞数 × 腎重量
#：p<0.05，##：p<0.01（正常群との比較），*：p<0.05，**：p<0.01（対照群との比較）
検定：正常群と対照群の比較は t 検定（両側），対照群とトルバプタン群は用量依存性の検定後，Williams 検定（片側）。正常群の腎嚢胞容積と線維化容積は 0 としたため正常群と対照群の検定は実施していない。
＜資料番号 4.2.1.1-02：図 7-2 及び図 7-3 より作成＞

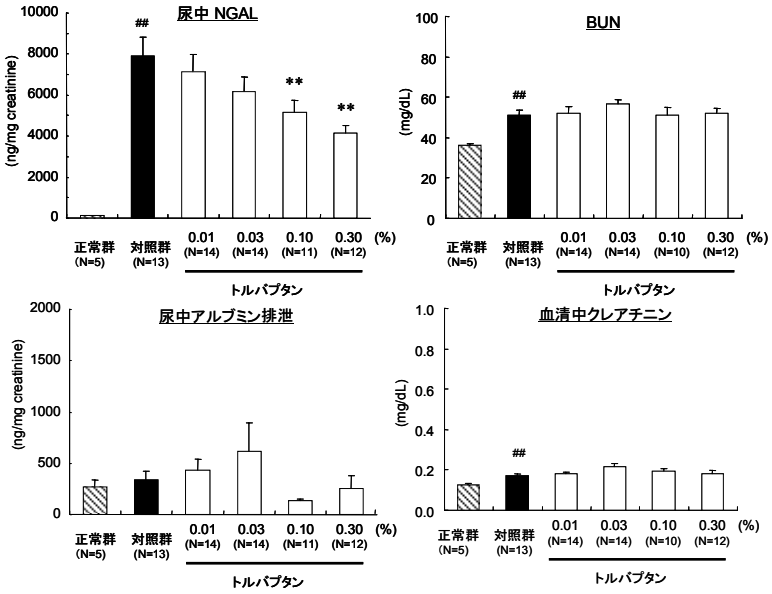



図 2.6.2-5　　雄性 DBA/2:FG-*pcy* マウスにおけるトルバプタンの腎機能パラメータに対する作用

平均値±標準誤差，括弧内の数値は例数を示す。
尿は 14 週齢時に 19 時間の蓄尿により採取し，尿中 NGAL 及びアルブミン排泄を算出した。
BUN 及び血清中クレアチニンは剖検時（15 週齢）の血液から測定した。
##：p<0.01（正常群との比較），*：p<0.05，**：p<0.01（対照群との比較）
検定：正常群と対照群の比較は t 検定（両側），対照群とトルバプタン群は用量依存性の検定後，Williams 検定（片側：尿中 NGAL）または Dunnett 検定（両側：BUN，尿中アルブミン排泄及び血清クレアチニン）。
＜資料番号 4.2.1.1-02：図 7-4＞

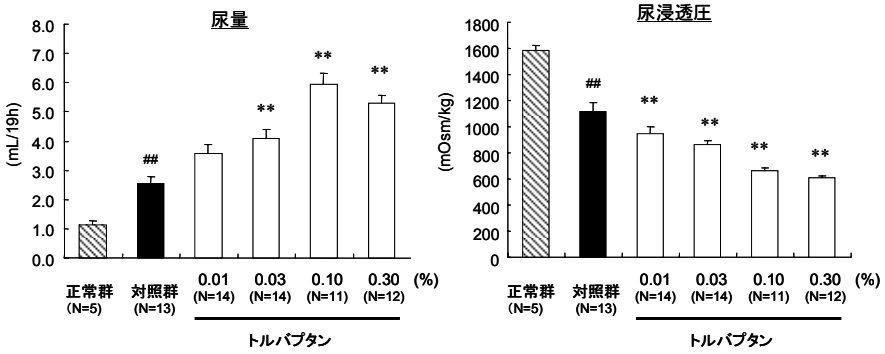



図 2.6.2-6　　雄性 DBA/2:FG-*pcy* マウスにおけるトルバプタンの尿量に対する作用

平均値±標準誤差，括弧内の数値は例数を示す。
尿は 14 週齢時に 19 時間の蓄尿により採取し，尿量及び浸透圧を測定した。
##：p<0.01（正常群との比較），　**：p<0.01（対照群との比較）
検定：正常群と対照群の比較は t 検定（両側），対照群とトルバプタン群は用量依存性の検定後，Williams 検定（片側：尿浸透圧）または Dunnett 検定（両側：尿量）。
＜資料番号 4.2.1.1-02：図 7-5＞

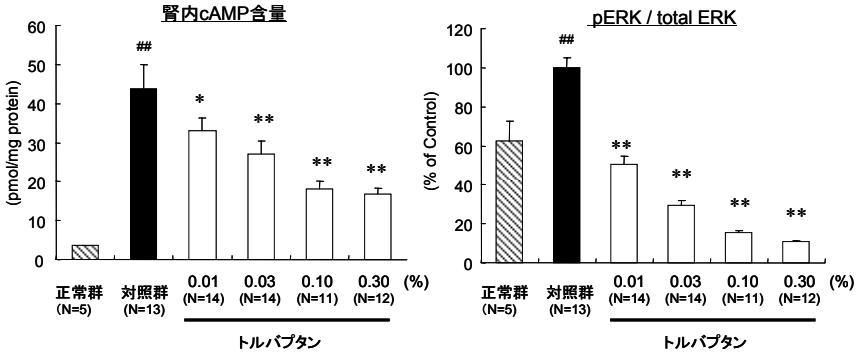



図 2.6.2-7　　雄性 DBA/2:FG-*pcy* マウスにおけるトルバプタンの腎内 cAMP 含量及び腎内 ERK 活性に対する作用

平均値±標準誤差，括弧内の数値は例数を示す。ERK 活性はリン酸化 ERK/トータル ERK 比で算出した。
##：p<0.01（正常群との比較），*：p<0.05, **：p<0.01（対照群との比較）
検定：正常群と対照群の比較は t 検定（両側），対照群とトルバプタン群は用量依存性の検定後，Williams 検定（片側：腎内 cAMP 含量）または Dunnett 検定（両側：ERK 活性）。
＜資料番号 4.2.1.1-02：図 7-6＞

### (3)　DBA/2:FG-*pcy* マウスにおける血清中トルバプタン濃度（報告書番号 028160）

**方法**：雄性 DBA/2:FG-*pcy* マウスにトルバプタン 0.01%及び 0.1%含有混餌飼料を 7 週齢より 2 週間混餌投与し血清中トルバプタン濃度を評価した。

**成績**：雄性 DBA/2:FG-*pcy* マウスにトルバプタンを混餌投与した時の血清中トルバプタン濃度には日内変動が認められ，夕方に低下し夜間に上昇する傾向が認められた（表 2.6.2-1）。トルバプタン 0.1%投与時の夜間，朝及び夕方の血清中トルバプタン濃度はそれぞれ，467.5，177.9 及び 49.3 ng/mL であった。また，雄性 DBA/2:FG-*pcy* マウスを用いた用量依存性を検討した短期投与試験[報告書番号 028257]の，剖検時（朝 9:30～11:30）に採血したトルバプタン 0.01，0.03，0.1 および 0.3%投与群の平均血清中トルバプタン濃度は，それぞれ，7.2（14），35.5（14），146.0（10）及び 297.9 ng/mL（12）であった（括弧内は例数を示す）。

表 2.6.2-1　　雄性 DBA/2:FG-pcy マウスにおける血清中トルバプタン濃度

| | 血清中トルバプタン濃度（ng/mL） | |
|---|---|---|
| 採血時間 | 0.01% | 0.1% |
| 朝（8:00-9:00） | 16.5±7.0　(3) | 177.9±20.6　(3) |
| 夕（16:00-17:00） | 検出下限以下　(3) | 49.3±31.5　(3) |
| 夜（0:00-1:00） | 27.2±8.9　(3) | 467.5±81.3　(3) |

平均値±標準偏差，括弧内の数値は例数を示す。
検出下限：5 ng/mL
＜資料番号 4.2.1.1-03：表 7-1 を改変＞

### 2.6.2.2.1.2　PCK ラットに対する作用（試験報告書番号 016916，017738（参考），017316）

PCK ラットは勝山ら[2]により見出された自然発症の PKD モデルであり，ヒト常染色体劣性多発性嚢胞腎（以下，ARPKD）の責任遺伝子である *Pkhd1* 遺伝子の変異（フレームシフト）により腎嚢胞を形成する。

#### (1)　トルバプタン混餌投与での作用（報告書番号 016916）

**方法**：雌雄 PCK ラットにトルバプタン 0.01%～0.1%含有飼料を 3 週齢より 10 週齢まで混餌投与した。10 週齢で剖検を行い，腎嚢胞形成の指標として腎重量，腎嚢胞容積，腎線維化容積を評価し，腎機能と利尿作用についても併せて評価した。

**成績**：雌雄 PCK ラットにトルバプタン（0.01，0.03 及び 0.1%）を混餌投与すると，有意な腎重量の低下が認められ，腎嚢胞容積及び腎線維化容積も有意に低下した。また，組織学的評価では，細胞増殖の指標である Mitotic Index とアポトーシスの有意な抑制が認められた。トルバプタン投与群では有意な腎内 cAMP 含量の低下が認められ，尿量は用量依存的に増加した。一方，腎機能に対しては,対照群でも 10 週齢では腎嚢胞を生じない SD ラットに比較して[3]著明な BUN 及び血漿クレアチニンの上昇は認められず，トルバプタン投与群で有意な変化は認められなかった。また，PCK ラットでは腎嚢胞のみならず肝嚢胞が形成されるが，トルバプタンは肝重量に対して影響しなかった（表 2.6.2-2）。

表 2.6.2-2　　雌雄 PCK ラットにおけるトルバプタン混餌投与の作用

| | 雄性 PCK ラット | | | | 雌性 PCK ラット | | | | 統計解析（p 値） | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 対照群 (n=10) | 0.01% (n=10) | 0.03% (n=10) | 0.1% (n=10) | 対照群 (n=10) | 0.01% (n=10) | 0.03% (n=10) | 0.1% (n=10) | 性差 | ﾄﾙﾊﾞﾌﾟﾀﾝ | 交互作用 |
| 腎重量 (%BW) | 1.67±0.27 | 1.41±0.19 | 1.35±0.13 | 1.38±0.15 | 1.42±0.18 | 1.23±0.13 | 1.24±0.12 | 1.20±0.13 | <0.01 | <0.01 | NS |
| 腎嚢胞容積 (%BW) | 0.40±0.16 | 0.28±0.10 | 0.23±0.11 | 0.29±0.10 | 0.27±0.12 | 0.24±0.06 | 0.17±0.10 | 0.17±0.09 | <0.01 | <0.01 | NS |
| 腎線維化容積 (%BW) | 0.029±0.022 | 0.014±0.010 | 0.015±0.009 | 0.015±0.013 | 0.018±0.005 | 0.013±0.009 | 0.012±0.006 | 0.009±0.004 | <0.05 | <0.01 | NS |
| Mitotic Index (%) | 4.64±1.19 | 2.02±0.64 | 2.30±0.85 | 2.04±0.90 | 4.58±1.74 | 1.98±0.86 | 1.72±0.92 | 2.16±1.90 | NS | <0.01 | NS |
| Apoptotic Index (%) | 2.32±1.69 | 0.56±0.42 | 0.60±0.50 | 0.86±0.77 | 2.52±1.95 | 0.30±0.27 | 0.26±0.27 | 0.48±0.27 | NS | <0.01 | NS |
| 腎 cAMP 含量 (pmol/mg protein) | 18.08±5.35 | 15.01±4.86 | 13.47±2.90 | 15.56±5.20 | 19.75±6.28 | 16.68±5.97 | 13.42±5.69 | 14.49±4.82 | NS | <0.05 | NS |
| BUN (mg/dL) | 16.3±1.1 | 17.4±2.2 | 15.7±1.3 | 16.0±2.0 | 14.4±0.8 | 14.6±1.8 | 14.2±1.5 | 14.2±1.4 | <0.01 | NS | NS |
| 血漿ｸﾚｱﾁﾆﾝ濃度 (mg/dL) | 0.49±0.03 | 0.51±0.12 | 0.50±0.05 | 0.51±0.03 | 0.46±0.05 | 0.47±0.05 | 0.49±0.03 | 0.44±0.05 | <0.01 | NS | NS |
| 尿量 (mL/24h) | 21.4±2.8 | 27.0±2.4 | 39.5±6.6 | 55.3±13.1 | 14.1±3.7 | 31.5±4.9 | 36.4±11.3 | 71.7±15.2 | NS | <0.01 | NS |
| 肝重量 (%BW) | 4.89±0.15 | 5.20±0.50 | 5.25±0.90 | 5.16±0.77 | 5.84±0.67 | 5.78±0.11 | 5.91±0.61 | 6.57±0.96 | <0.01 | NS | NS |

平均値±標準偏差，n=10。トルバプタンは 3 週齢から 10 週齢まで混餌投与した。

検定：二元配置分散分析

腎嚢胞容積：腎断面あたりの嚢胞面積(%) × 腎重量，腎線維化容積：腎断面あたりの線維化面積(%) × 腎重量，Mitotic Index：500 上皮細胞中の PCNA 陽性細胞数 (%)，Apoptotic Index：500 上皮細胞中の TUNEL 陽性細胞数 (%)

＜資料番号 4.2.1.1-04：表 1 より抜粋＞

### (2) トルバプタン強制経口投与での作用（報告書番号　017738（参考），017316）

**方法**：雄性 PCK ラットにトルバプタンを 10 mg/kg の用量で 1 日 1 回または 1 日 2 回，5 週齢より 13 週齢まで強制経口投与した。13 週齢で剖検を行い，嚢胞形成の指標として腎重量，腎嚢胞容積，腎線維化容積を評価し，腎機能と利尿作用についても併せて評価を実施した[報告書番号 017738（参考）]。

**成績**：雄性 PCK ラットにトルバプタンを 10 mg/kg の用量で 1 日 1 回または 1 日 2 回強制経口投与すると，尿量の有意な増加が認められた。しかし，トルバプタンの反復経口投与により，腎重量，腎嚢胞容積及び腎繊維化容積の縮小は見られず，剖検時の腎内 cAMP 含量の低下もみられなかった。腎機能に対しては，対照群において正常群に対して軽度の BUN の上昇が認められたが，トルバプタン投与群で有意な変化は認められなかった（表 2.6.2-3）。

**表 2.6.2-3　　雄性 PCK ラットにおけるトルバプタン強制経口投与の作用**

| | 雄性 SD ラット | 雄性 PCK ラット | | |
|---|---|---|---|---|
| | 正常群<br>(N＝10) | 対照群<br>(N=10) | 10 mg/kg x 1<br>(N=10) | 10 mg/kg x 2<br>(N=10) |
| 腎重量<br>(%BW) | 0.60±0.01 | 1.20±0.04 | 1.21±0.03 | 1.25±0.03 |
| 腎嚢胞容積<br>(%BW) | 0.00±0.00 | 0.23±0.03 | 0.25±0.03 | 0.28±0.03 |
| 腎線維化容積<br>(%BW) | 0.008±0.001 | 0.036±0.007 | 0.039±0.008 | 0.042±0.007 |
| Mitotic Index<br>(%) | 0.81±0.08 | 3.38±0.24 | 3.62±0.49 | 3.76±0.33 |
| Apoptotic Index<br>(%) | 0.28±0.08 | 1.38±0.09 | 1.56±0.18 | 1.11±0.10 |
| 腎 cAMP 含量<br>(pmoL/g) | 70.9±12.9 | 122.7±17.3 | 163.9±26.4 | 138.8±29.2 |
| BUN<br>(mg/dL) | 17.4±0.7 | 20.7±0.8 | 21.4±0.9 | 20.3±0.6 |
| 血漿クレアチニン濃度(mg/dL) | 0.3±0.0 | 0.3±0.0 | 0.3±0.0 | 0.3±0.0 |
| 尿量<br>(mL/kg) | 31.8±4.3 | 38.7±1.9 | 107.1±5.2 ** | 127.0±8.5 ** |
| 肝重量<br>(%BW) | 3.54±0.08 | 5.55±0.25 | 5.24±0.11 | 5.43±0.14 |

平均値±標準誤差，n=10。トルバプタンは 5 週齢から 13 週齢まで混餌投与した。

**：p<0.01（対照群との比較）検定：対照群とトルバプタン投与群で Dunnett 検定（両側）

腎嚢胞容積：腎断面あたりの嚢胞面積(%) × 腎重量，腎線維化容積：腎断面あたりの線維化面積(%) × 腎重量，Mitotic Index：500 以上の上皮細胞中の PCNA 陽性細胞数 (%)，Apoptotic Index：500 以上の上皮細胞中の TUNEL 陽性細胞数 (%)

＜資料番号 4.2.1.1-05：図 1，2-2，2-2 及び表 4，5，6，7 より作成＞

### (3) 正常ラットにおける混餌投与と強制経口投与の比較（報告書番号 017316）

**方法**：PCK ラットにおけるトルバプタンの混餌投与と強制経口投与では，利尿作用はいずれの投与法でも認められたが，腎嚢胞の抑制効果は強制経口投与では見られなかった。この原因の一つとして作用持続時間の相違が考えられたことから，正常ラットである雄性 SD ラットを用いてトルバプタンの強制経口投与と混餌投与時の利尿作用の持続時間を比較した[報告書番号 017316]。8 週齢の雄性 SD ラットにトルバプタンを 7 日間混餌投与（0.01%及び 0.1%）または強制経口投与（10 mg/kg 1 日 1 回及び 1 日 2 回）し，7 日目の利尿作用を評価した。

**成績**：雄性 SD ラットにトルバプタン 0.1%を混餌投与すると，いずれの時間帯においても尿量の有意な増加と尿浸透圧の有意な低下が認められ，0.1%混餌投与では 24 時間継続した $V_2$-受容体拮抗作用を示すと考えられた。一方，10 mg/kg の 1 日 1 回及び 1 日 2 回の強制経口投与群の投与 7 日目の尿量は，1 日 1 回及び 1 日 2 回のいずれの群においても投与直後の 4 時間では急激な利尿作用が見られたものの，それ以降の時間帯では利尿作用は認められなかった。尿浸透圧に対しても投与後 8 時間までは有意に低下したが，それ以降の時間帯では有意な低下は見られなかった（図 2.6.2-8）。以上の結果から，トルバプタンの 10 mg/kg の 1 日 1 回及び 1 日 2 回の強制経口投与では $V_2$-受容体拮抗作用の作用持続時間が短いために PCK ラットにおいて腎嚢胞の増大を十分抑制できない可能性が考えられた。

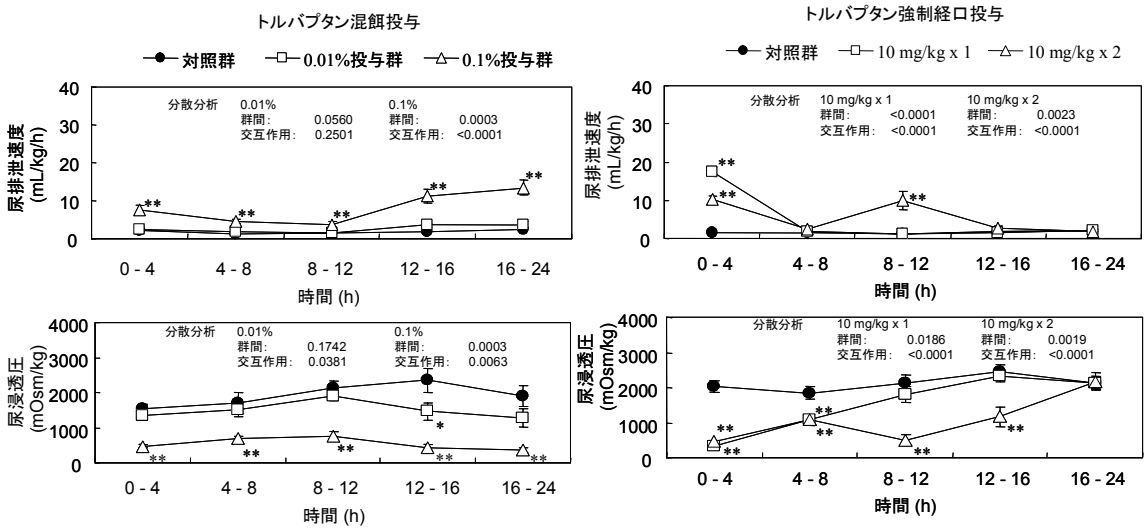



**図 2.6.2-8　雄性 SD ラットにおけるトルバプタン混餌投与と強制経口投与時の 1 日区間尿量（上段）及び 1 日区間尿浸透圧（下段）に対する作用**

平均値±標準誤差，n=5
雄性 SD ラットに 7 日間トルバプタンを混餌投与または強制経口投与した時の投与 7 日目の区間尿量及び区間尿浸透圧。トルバプタンの強制経口投与は 1 日 1 回投与が時間 0 に実施し，1 日 2 回投与は時間 0 と時間 8 に実施した。時間 0 は午前 8 時を示す。*：$p<0.05$，**：$p<0.01$（対照群との比較）
検定：繰り返し測定に基づく分散分析及び Dunnett 検定（両側）。
＜資料番号 4.2.1.1-06：図 8-4 及び図 8-8 から作成＞

### 2.6.2.2.1.3　Pkd2$^{WS25/-}$マウスに対する作用（報告書番号 017968）

Pkd2$^{WS25/-}$マウスは Somlo ら[4]により作製された *Pkd2* 遺伝子改変による PKD モデルであり，ヒト ADPKD の責任遺伝子である *Pkd2* 遺伝子の 1 対を消失し 1 対を不安定化させることで，腎嚢胞を形成する。

**方法**：雌雄 Pkd2$^{WS25/-}$マウスにトルバプタン 0.01%～0.1%含有飼料を 4 週齢より 16 週齢まで混餌投与した。16 週齢で剖検を行い，腎嚢胞形成の指標として腎重量，腎嚢胞容積，腎線維化容積を評価し，腎機能と利尿作用についても併せて評価した。

**成績**：雌雄 Pkd2$^{WS25/-}$マウスにトルバプタンを混餌投与すると，有意な腎重量と腎線維化容積の低下が認められ，腎嚢胞容積は有意差はないが低下傾向を示した。また，組織学的評価では，細胞増殖の指標である Mitotic Index の抑制とアポトーシスの抑制が認められた。腎内 cAMP 含量に対しては，雌雄の 0.1%投与群で低下傾向は見られたが，トルバプタン全体で有意な作用は認められなかった。腎機能に対しては，トルバプタン投与群では有意な BUN の低下が認められ，尿量は用量依存的に増加した。（表 2.6.2-4）

表 2.6.2-4　　雌雄 Pkd2$^{WS25/-}$マウスにおけるトルバプタン混餌投与の作用

| | 雄性 Pkd2$^{WS25/-}$マウス | | | | 雌性 Pkd2$^{WS25/-}$マウス | | | | 統計解析（p 値） | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 対照群 (n=10) | 0.01% (n=10) | 0.03% (n=11) | 0.1% (n=11) | 対照群 (n=12) | 0.01% (n=9) | 0.03% (n=10) | 0.1% (n=11) | 性差 | ﾄﾙﾊﾞﾌﾟﾀﾝ | 交互作用 |
| 腎重量 (%BW) | 2.09±0.48 | 1.98±0.84 | 1.56±0.36 | 1.65±0.28 | 1.89±0.52 | 1.73±0.57 | 1.52±0.31 | 1.51±0.26 | NS | <0.01 | NS |
| 腎嚢胞容積 (%BW) | 0.76±0.61 | 0.62±0.92 | 0.45±0.38 | 0.31±0.31 | 0.68±0.60 | 0.44±0.46 | 0.22±0.16 | 0.42±0.38 | NS | NS | NS |
| 腎線維化容積 (%BW) | 0.12±0.13 | 0.05±0.09 | 0.04±0.06 | 0.03±0.03 | 0.08±0.05 | 0.05±0.04 | 0.03±0.02 | 0.04±0.04 | NS | <0.01 | NS |
| Mitotic Index (%) | 2.20±0.85 | 1.69±1.15 | 1.78±0.98 | 1.93±1.45 | 3.15±1.19 | 2.07±1.02 | 1.48±1.00 | 1.75±0.96 | NS | <0.05 | NS |
| Apoptotic Index (%) | 2.44±2.27 | 1.13±1.66 | 1.31±1.33 | 1.38±1.20 | 1.88±1.59 | 1.36±1.31 | 0.54±0.55 | 0.91±1.00 | NS | <0.05 | NS |
| 腎 cAMP 含量 (pmol/mg protein) | 5.56±2.22 | 4.60±1.32 | 5.81±1.16 | 4.25±1.14 | 6.10±4.46 | 5.29±1.54 | 6.06±1.36 | 4.80±2.31 | NS | NS | NS |
| BUN (mg/dL) | 35.60±4.95 | 33.36±5.57 | 30.73±3.17 | 30.18±4.24 | 30.08±4.08 | 27.00±3.52 | 24.88±3.00 | 27.11±3.69 | <0.01 | <0.01 | NS |
| 血漿ｸﾚｱﾁﾆﾝ濃度 (mg/dL) | 0.36±0.05 | 0.34±0.05 | 0.35±0.05 | 0.36±0.05 | 0.34±0.05 | 0.32±0.04 | 0.33±0.05 | 0.36±0.05 | NS | NS | NS |
| 尿量 (mL/24h) | 1.61±1.18 | 2.91±2.14 | 4.05±2.87 | 7.00±4.21 | 0.76±0.93 | 1.69±1.14 | 1.65±0.78 | 4.41±3.56 | <0.01 | <0.01 | NS |
| 肝重量 (%BW) | 4.90±0.60 | 4.84±1.06 | 4.80±1.26 | 5.13±0.89 | 4.77±0.64 | 5.06±0.82 | 4.74±0.93 | 4.94±0.74 | NS | NS | NS |

平均値±標準偏差。トルバプタンは 4 週齢から 16 週齢まで混餌投与した。

検定：二元配置分散分析

腎嚢胞容積：腎断面あたりの嚢胞面積(%) × 腎重量，腎線維化容積：腎断面あたりの線維化面積(%) × 腎重量，Mitotic Index：500 上皮細胞中の PCNA 陽性細胞数 (%)，Apoptotic Index：500 上皮細胞中の TUNEL 陽性細胞数 (%)

＜資料番号 4.2.1.1-07：表 1 及び 2 より抜粋＞

#### 2.6.2.2.1.4　結論

トルバプタンの混餌投与は，原因遺伝子の異なる 3 種の PKD モデル動物である DBA/2:FG-*pcy* マウス，PCK ラット及び Pkd2$^{WS25/-}$マウスにおいて，腎重量（腎容積）の増加を抑制した。いずれのモデルにおいても腎嚢胞容積は低下傾向にあり，トルバプタンは腎嚢胞の増大を抑制して腎重量（腎容積）の増加を抑制すると考えられた。また,腎嚢胞の抑制とともに，腎組織においては間質の線維化の抑制（DBA/2:FG-*pcy* マウス，PCK ラット及び Pkd2$^{WS25/-}$マウス），PCNA 陽性細胞数の抑制（DBA/2:FG-*pcy* マウス, PCK ラット及び Pkd2$^{WS25/-}$マウス）やアポトーシスの抑制（PCK ラット及び Pkd2$^{WS25/-}$マウス）が認められた。同様の作用は雌雄 CD1-*pcy* マウスにおいても確認されている[報告書番号 018373(参考)]。

腎障害マーカーに対しては，DBA/2:FG-*pcy* マウスの長期投与試験で尿中アルブミン排泄の低下が，用量依存性の検討では尿中 NGAL の低下が認められた。DBA/2:FG-*pcy* マウス（用量依存性の検討），PCK ラット及び Pkd2$^{WS25/-}$マウスでは腎線維化容積の低下も認められており，トルバプタンは腎嚢胞の増大抑制に伴って腎障害マーカーの悪化を抑制した。また，DBA/2:FG-*pcy* マウスの長期投与試験ではトルバプタンにより有意な死亡率の改善も認められた。

トルバプタンはバソプレシン $V_2$-受容体拮抗薬であり，腎集合管の水の再吸収を抑制することで水利尿作用を示す。今回用いた PKD モデルにおいても 0.01-0.1%の混餌投与により腎重量の抑制とともに，用量依存的な水利尿作用が見られた。DBA/2:FG-*pcy* マウスを用いた用量依存性の検討では，トルバプタンの腎重量の抑制作用と水利尿作用はいずれも 0.1%でほぼ最大作用を示しており，この時の血清中トルバプタン濃度には日内変動がみられたが，49.3 - 467.5 ng/mL の範囲であった。

トルバプタンは DBA/2:FG-*pcy* マウスの腎内 cAMP 含量を用量依存的に低下させた。さらに，cAMP の下流にあり細胞増殖に関与する ERK 活性も同様に抑制したことから，トルバプタンは $V_2$-受容体拮抗作用により, 細胞内 cAMP の低下を介して腎嚢胞の増大を抑制するものと考えられた。

### 2.6.2.2.2　ヒト ADPKD 患者の腎嚢胞由来の培養細胞に対する作用

**（概要表 2.6.3.2，報告書番号 019680（参考））**

**目的**：ヒト ADPKD 患者の腎嚢胞由来の初代培養細胞を用いて，トルバプタンのバソプレシンによる細胞増殖に対する作用を検討した。また，作用機序の解明のために，細胞内 cAMP，ERK 活性および B-Raf に対する作用を検討した。

**方法**：ヒト ADPKD 患者の腎嚢胞より上皮細胞を単離し初代培養細胞を試験に用いた。細胞増殖に対する作用はトルバプタンの前処置後バソプレシン（$10^{-9}$ mol/L）刺激下で 48 時間培養し，細胞数を評価した。細胞内 cAMP 濃度に対する作用は, トルバプタンの前処置後バソプレシン（$10^{-9}$ mol/L）刺激下で 15 分間培養し，細胞内 cAMP 量を定量した。ERK 活性及び B-Raf 活性に対する作用はトルバプタンの前処置後バソプレシン（$10^{-9}$ mol/L）刺激下で 15 分間培養し，Western Blot 法によりリン酸化 ERK およびリン酸化 B-Raf を定量して評価した。

**成績**：

バソプレシン（$10^{-9}$ mol/L）はヒト ADPKD 患者の腎嚢胞由来の初代培養細胞において，細胞内

cAMP 量を増加させ細胞増殖を促進した。トルバプタン（$10^{-12}$～$10^{-7}$ mol/L）は濃度依存的にバソプレシンによる細胞増殖と細胞内 cAMP 量の増加を抑制した（図 2.6.2.2-9）。Western Blot 法による細胞内の ERK 活性および B-Raf 活性はいずれもバソプレシンにより上昇し，トルバプタン（$10^{-12}$～$10^{-7}$ mol/L）は濃度依存的にバソプレシンによる上昇を抑制した。

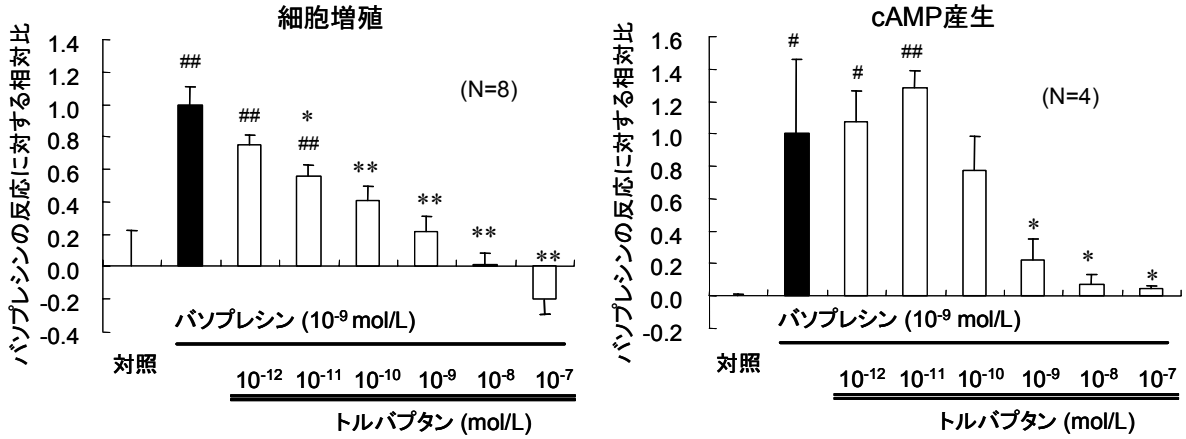



図 2.6.2.2-9　　ヒト ADPKD 患者由来の初代培養細胞おけるトルバプタンの細胞増殖および細胞内 cAMP 量に対する作用

平均値±標準誤差，括弧内の数値は例数を示す。
#：p<0.05，##：p<0.01（対照群との比較），*：p<0.05, **：p<0.01（バソプレシン $10^{-9}$ mol/L 刺激時との比較）
検定：対照群とバソプレシン $10^{-9}$ mol/L 刺激時の比較は t 検定（両側），バソプレシン $10^{-9}$ mol/L 刺激時とトルバプタン群の比較は一元配置分散分析後 Student-Newman-Keuls post-test。
＜資料番号 4.2.1.1-09　参考資料：図 1 及び図 3 より作成＞

**結論**：

ヒト ADPKD 患者の腎嚢胞由来の培養細胞において，バソプレシンは細胞増殖を促進した。この作用は細胞内 cAMP 量の増加とそれに続く B-Raf および ERK の活性化を介していた。以上の結果から，トルバプタンは $V_2$-受容体拮抗作用により cAMP 以降の細胞シグナルを抑制し，嚢胞の細胞増殖を抑制し，嚢胞腎の増大を抑制するものと考えられた。一方，嚢胞の増大には細胞増殖とともに，cAMP 依存的な CFTR の活性化を介した嚢胞液の流入が関与することが知られている[5]。トルバプタンはヒト ADPKD 患者の嚢胞由来の培養細胞において，バソプレシンによる CFTR の活性化を抑制することが報告されており[6]，トルバプタンの嚢胞増大の抑制作用には cAMP 依存的な嚢胞液の流入の抑制作用も関与しているものと考えられた。

#### 2.6.2.3　副次的薬理試験

今回の効能・追加申請にあたり,新たに実施した試験はない。

#### 2.6.2.4　安全性薬理試験

今回の効能・追加申請にあたり，新たに実施した試験はない。

#### 2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用試験

今回の効能・追加申請にあたり，新たに実施した試験はない。

### 2.6.2.6　考察及び結論

#### 2.6.2.6.1　効力を裏付ける試験の考察及び結論

##### 2.6.2.6.1.1　ADPKD とバソプレシン

ADPKD は *PKD1* 遺伝子あるいは *PKD2* 遺伝子の先天的変異による遺伝性疾患であり，進行性の腎嚢胞の形成がみられ，末期においては多数の嚢胞により著しい腎機能低下が認められる。*PKD1* 遺伝子及び *PKD2* 遺伝子の遺伝子産物であるポリシスチン 1（以下，PC1）及びポリシスチン 2（以下，PC2）は，尿細管細胞繊毛に存在し，複合体を形成して Ca チャンネルとして機能していることが報告[7]されているが，それらの機能は完全には解明されておらず，嚢胞形成との関連も明らかではなかった。近年，細胞内情報伝達物質である cAMP が ADPKD 患者由来の嚢胞上皮細胞の増殖や嚢胞液の分泌に関与することが報告され[8, 9, 5]，嚢胞形成における cAMP の生理的な役割が明らかにされた。細胞内 cAMP の上昇は，正常の細胞においては細胞増殖に対して抑制的に作用するものの，ADPKD 患者由来の嚢胞上皮細胞に対しては，細胞増殖を促進させる。この cAMP による細胞増殖の促進には，細胞内 Ca 濃度の低下が関与するとされ[10]，ADPKD における PC1 - PC2 複合体の機能異常との関係から注目されている。

バソプレシンは，下垂体後葉から分泌されるペプチドホルモンであり，腎集合管に存在する $V_2$-受容体を介して，水再吸収を促進することで生体内の水分並びに浸透圧を生理的範囲内で制御している。その一方で，ADPKD 患者由来の嚢胞上皮細胞においては，$V_2$-受容体を介した cAMP の上昇が細胞増殖を促進し[8]，嚢胞液の分泌を促進すること[6]が報告された。また，ADPKD 患者では健常人に比較して血中のバソプレシンが亢進しているとの報告もあり[11, 12]，バソプレシンの嚢胞形成への関与が示唆されている。さらに，PKD モデル動物を用いた検討でも，5%のグルコース水溶液摂取により飲水量を増加させることで内因性のバソプレシン分泌を抑制した PCK ラット[13]や，遺伝的にバソプレシンを欠損した Brattleboro ラットと PCK ラットから作製したバソプレシン欠損 PCK ラット[14]においては，腎嚢胞の形成が著しく抑制されることが報告されている。これらの報告は，多発性嚢胞腎の病態形成にバソプレシンが強く関与することを示唆している。

##### 2.6.2.6.1.2　トルバプタンの薬理作用

トルバプタンは $V_2$-受容体拮抗薬であり，マウス，ラット，ウサギ，イヌ及びヒトにおいて用量依存的な水利尿作用を示す。また，ヒト $V_2$-受容体を発現させた HeLa 細胞において，バソプレシン刺激により上昇した細胞内 cAMP を濃度依存的に低下させる。

トルバプタンは混餌投与により 3 種の異なる PKD モデル動物である，DBA/2:FG-*pcy* マウス，PCK ラット及び $Pkd2^{WS25/-}$マウスにおいて，腎重量（腎容積）を低下させ腎嚢胞の増大を抑制した。また，これらのモデル動物では嚢胞の増大にともなって組織学的には間質の線維化や，PCNA 陽性細胞数の増加，アポトーシスの誘導が認められたが，これらの変化はいずれもトルバプタンの投与群では抑制された。PKD モデル動物（*pcy* マウス，PCK ラット及び $Pkd2^{WS25/-}$マウス）を用いたモザバプタン塩酸塩を用いた報告[15, 16]でも，トルバプタンと同様の腎嚢胞の増大抑制が報告されており，PKD に対する腎保護作用は $V_2$-受容体拮抗に共通した効果と考えられる。一方，PCK ラットを用いた強制経口投与試験では，混餌投与と異なりトルバプタンは腎重量の増大を抑

制しなかった。トルバプタンを SD ラットに混餌投与（0.1%）すると，24 時間持続した利尿作用が観察されるが，強制経口投与（10 mg/kg　1 日 1 回または 2 回）では投与後 4 時間程度しか利尿作用が維持されなかった。従って，トルバプタンの強制経口投与で腎嚢胞の抑制作用がみられなかったことは，10 mg/kg の 1 日 2 回投与では $V_2$-受容体拮抗作用の持続時間が 0.1%混餌投与よりも短いことが一因と考えられた。なお，0.1%混餌投与と同等の実投与量である 30 mg/kg の 1 日 2 回の強制経口投与でも 24 時間持続した利尿作用は認められなかったことから，作用持続時間の相違には投与法の相違が関与したものと考えられた。上述のように，トルバプタンはバソプレシンの作用を抑制することで腎嚢胞の細胞増殖を抑制し嚢胞液の流入を抑制することから，腎嚢胞の増大抑制には持続的な $V_2$-受容体拮抗作用の発現が重要と考えられる。

腎機能に対しては，DBA/2:FG-*pcy* マウスの長期投与試験では尿中アルブミン排泄の上昇が 19 週齢から見られ，トルバプタンはこれを有意に抑制した。高週齢で認められた BUN の上昇に対しては，対照群において腎機能の悪化に関連すると考えられる死亡率の上昇が認められたため，トルバプタン投与による改善作用は確認できなかった。しかし，トルバプタンの投与により，有意な死亡率の改善が認められた。一方，15 週齢までの評価を行った DBA/2:FG-*pcy* マウスの用量依存性の検討では，尿中アルブミン排泄，BUN 及び血清中クレアチニン濃度はほとんど上昇しておらず，トルバプタンによる改善はみられなかった。尿中 NGAL は ADPKD 患者において病態の進行に最も相関したバイオマーカーであり[17]，DBA/2:FG-*pcy* マウスにおいても 14 週齢で著明な上昇が認められ,トルバプタンはこれを有意に抑制した。PCK ラットを用いた試験でも 10 週齢の時点では BUN 及び血漿クレアチニンは正常値付近であり, トルバプタンによる改善は見られなかった。16 週齢まで評価した $Pkd2^{WS25/-}$マウスではトルバプタンによる BUN の低下が認められたが，血漿クレアチニンに有意な変動はなく，腎機能に対する作用はさらに病態の進行したステージでの検討が必要と考えられた。このように，PKD モデル動物では腎容積の増大と腎機能マーカーの上昇に時間的な差もあるために，トルバプタンの腎機能に対する作用は確認できなかったが，DBA/2:FG-*pcy* マウスにおける尿中アルブミン排泄や尿中 NGAL の抑制に加えて，腎線維化容積の抑制がいずれの PKD モデルにおいても認められており，トルバプタンは腎嚢胞の増大抑制に伴ってこれらの腎障害マーカーの悪化を抑制するものと考えられた。

トルバプタンは $V_2$-受容体拮抗薬であり，腎集合管の水の再吸収を抑制することで水利尿作用を示す。今回用いた PKD モデルにおいても 0.01-0.1%の混餌投与により腎重量の抑制とともに，用量依存的な水利尿作用が見られた。DBA/2:FG-*pcy* マウスを用いた用量依存性の検討では，トルバプタンの腎重量の抑制作用と水利尿作用はいずれも 0.1%でほぼ最大作用を示しており，この時の血清中トルバプタン濃度には日内変動がみられたが，49.3 - 467.5 ng/mL の範囲であった。ヒト ADPKD 患者における最高臨床推奨用量の 120mg/日（90mg 及び 30mg の 1 日 2 回投与）での血清中トルバプタン濃度は最大血中濃度で 716 ng/mL，最小血中濃度で 57.5 ng/mL であり，雄性 DBA/2:FG-*pcy* マウスにおける 0.1%混餌投与時の暴露量と類似していた。

上述したように腎嚢胞においては, cAMP の増加は PKA を活性化し, B-Raf の活性化を介在し, ERK をリン酸化して最終的に細胞増殖を引き起こすことが報告されている[18]。DBA/2:FG-*pcy* マウスの用量依存性の検討においても，トルバプタンは腎内 cAMP 含量を用量依存的に低下させ，cAMP の下流にある ERK 活性を低下させた。また，ヒト ADPKD 患者の腎嚢胞由来の培養細胞に

おいて，トルバプタンはバソプレシン刺激による cAMP 濃度の上昇，B-Raf 及び ERK のリン酸化をいずれも濃度依存的に抑制した。以上の結果から，トルバプタンは $V_2$-受容体拮抗作用によりバソプレシンによる cAMP 以降の細胞シグナルを抑制し，腎嚢胞の細胞増殖を抑制することで腎嚢胞の増大を抑制するものと考えられた。また，腎嚢胞の形成には細胞増殖とともに，cAMP 依存的な CFTR の活性化を介した嚢胞液の流入が関与することが報告されている[5]。トルバプタンはヒト ADPKD 患者の腎嚢胞由来の培養細胞において，バソプレシンによる CFTR の活性化を抑制することが報告されており[6]，トルバプタンの腎嚢胞の増大抑制作用には cAMP 依存的な嚢胞液の流入の抑制作用も関与しているものと考えられた。

#### 2.6.2.6.1.3　結論

トルバプタンは $V_2$-受容体拮抗作用により，バソプレシンによる細胞内 cAMP の上昇を抑制することで，ADPKD における腎嚢胞の増大を抑制するものと考えられた。

### 2.6.2.7　図表

本文中に記載した。

## 参考文献


1 Takahashi H, Calvet JP, Dittemore-Hoover D, Yoshida K, Grantham JJ, Gattone VH 2nd. A hereditary model of slowly progressive polycystic kidney disease in the mouse. J Am Soc Nephrol. 1991; 1:980-9（資料番号 4.3-01）

2 Katsuyama M, Masuyama T, Komura I, Hibino T, Takahashi H. Characterization of a novel polycystic kidney rat model with accompanying polycystic liver. Exp Animals. 2000; 49:51-5（資料番号 4.3-02）

3 Katsuyama M, Hasegawa K. Body weight, hematology, blood chemistry and reproduction data in our facility. In: Matsuzawa T, Inoue H, editors. Biological reference data on CD (SD) IGS rats-1998. Tokyo: BEST PRINTING; 1998. pp15-8（資料番号 4.3-03）

4 Wu G, D'Agati V, Cai Y, Markowitz G, Park JH, Somlo S, et al. Somatic inactivation of Pkd2 results in polycystic kidney disease. Cell. 1998;93:177–88（資料番号 4.3-04）

5 Belibi FA, Reif G, Wallace DP, Yamaguchi T, Olsen L, Li H, et al. Cyclic AMP promotes growth and secretion in human polycystic kidney epithelial cells. Kidney Int. 2004;66:964-73（資料番号 4.3-05）

6 Reif GA, Yamaguchi T, Nivens E, Fujiki H, Pinto CS, Wallace DP. Tolvaptan inhibits ERK-dependent cell proliferation, Cl┌ secretion, and in vitro cyst growth of human ADPKD cells stimulated by vasopressin. Am J Physiol Renal Physiol. 2011;301:F1005–13（資料番号 4.3-06）

7 Hanaoka K, Qian F, Boletta A, Bhunia AK, Piontek K, Tsiokas L, et al. Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents. Nature. 2000;408:990-4（資料番号 4.3-07）

8 Yamaguchi T, Pelling JC, Ramaswamy NT, Eppler JW, Wallace DP, Nagao S, et al. cAMP stimulates the in vitro proliferation of renal cyst epithelial cells by activating the extracellular signal-regulated kinase pathway. Kidney Int. 2000;57:1460-71（資料番号 4.3-08）

9 Hanaoka K, Guggino WB. cAMP regulates cell proliferation and cyst formation in autosomal polycystic kidney disease cells. J Am Soc Nephrol. 2000;11:1179-87（資料番号 4.3-09）

10 Yamaguchi T, Wallace DP, Magenheimer BS, Hempson SJ, Grantham JJ, Calvet JP. Calcium restriction allows cAMP activation of the B-Raf/ERK pathway, switching cells to a cAMP-dependent growth-stimulated phenotype. J Biol Chem. 2004;279:40419-30（資料番号 4.3-10）

11 Michalski A, Grzeszczak W. The influence of hypervolemia on electrolytes level and hormones regulating volemia in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). Pol. Arch. Med. Wewn 1996;96:329-43（資料番号 4.3-11）

12 Meijer E, Bakker SJL, van der Jagt EJ, Navis G, de Jong PE, Struck J, et al. Copeptin, a surrogate marker of vasopressin, is associated with disease severity in autosomal dominant polycystic kidney disease. Clin J Am Soc Nephrol. 2011;6:361–8（資料番号 4.3-12）

13 Nagao S, Nishii K, Katsuyama M, Kurahashi H, Marunouchi T, Takahashi H, et al. Increased water intake decreases progression of polycystic kidney disease in the PCK rat. J Am Soc Nephrol. 2006;17:2220-7（資料番号 4.3-13）

14 Wang X, Wu Y, Ward CJ, Harris PC, Torres VE. Vasopressin directly regulates cyst growth in polycystic kidney disease. J Am Soc Nephrol. 2008;19:102-8（資料番号 4.3-14）

15 Gattone VH 2nd, Wang X, Harris PC, Torres VE. Inhibition of renal cystic disease development and progression by a vasopressin V2 receptor antagonist. Nat Med. 2003;9:1323-6（資料番号 4.3-15）

[16] Torres VE, Wang X, Qian Q, Somlo S, Harris PC, Gattone VH 2nd. Effective treatment of an orthologous model of autosomal dominant polycystic kidney disease. Nat Med. 2004;10:363-4（資料番号 4.3-16）

[17] Meijer E, Boertien WE, Nauta FL, Bakker SJL, van Oeveren W, Rook M, et al. Association of urinary biomarkers with disease severity in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease: a cross-sectional analysis. Am J Kidney Dis. 2010;56:883-95（資料番号 4.3-17）

[18] Yamaguchi T, Nagao S, Wallace DP, Belibi FA, Cowley BD Jr, Pelling JC, et al. Cyclic AMP activates B-Raf and ERK in cyst epithelial cells from autosomal-dominant polycystic kidneys. Kidney Int. 2003;63:1983-94（資料番号 4.3-18）

# サムスカ錠 7.5 mg
# サムスカ錠 15 mg
# サムスカ錠 30 mg

第 2 部(モジュール 2)：CTD の概要(サマリー)

2.6.3 薬理試験概要表

大塚製薬株式会社

# 目次

目次 ..... 2

2.6.3.1 薬理試験：一覧表 ..... 3

2.6.3.2 効力を裏付ける試験 ..... 4

2.6.3.3 副次的薬理試験 ..... 8

2.6.3.4 安全性薬理試験 ..... 9

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 ..... 10

## 2.6.3.1　薬理試験：一覧表

2.6.3.1　薬理試験　一覧表（1）　被験物質：トルバプタン（JAN）

| 試験の種類 | 試験系 | 投与方法 | 実施施設 | 報告書番号 | CTD の記載箇所（資料番号） |
|---|---|---|---|---|---|
| (1)トルバプタンの効力を裏付ける試験 | | | | | |
| ①PKD モデル動物における作用 | | | | | |
| DBA/2:FG-*pcy* マウスに対する作用（長期投与） | DBA/2:FG-*pcy* マウス | 混餌 | 大塚製薬㈱ | 028192 | 4.2.1.1-01 |
| DBA/2:FG-*pcy* マウスに対する作用（用量依存性） | DBA/2:FG-*pcy* マウス | 混餌 | 大塚製薬㈱ | 028257 | 4.2.1.1-02 |
| 血清中未変化体濃度の検討 | DBA/2:FG-*pcy* マウス | 混餌 | 大塚製薬㈱ | 028160 | 4.2.1.1-03 |
| PCK ラットに対する作用（混餌） | PCK ラット | 混餌 | [redacted] | 016916 | 4.2.1.1-04 |
| PCK ラットに対する作用（経口） | PCK ラット | 経口 | [redacted] | 017738 | 4.2.1.1-05<br>参考資料 |
| 経口投与と混餌投与の利尿作用の比較 | SD ラット | 経口・混餌 | 大塚製薬㈱ | 017316 | 4.2.1.1-06 |
| Pkd2$^{WS25/-}$マウスに対する作用 | Pkd2$^{WS25/-}$マウス | 混餌 | [redacted] | 017968 | 4.2.1.1-07 |
| *pcy* マウスに対する作用 | CD1-*pcy* マウス | 混餌 | [redacted] | 018373 | 4.2.1.1-08<br>参考資料 |
| ②ヒト ADPKD 患者における嚢胞由来の培養上皮細胞に対する作用 | | | | | |
| 作用機序の検討 | ヒト ADPKD 患者における嚢胞由来の培養上皮細胞 | in vitro | [redacted] | 019680 | 4.2.1.1-09<br>参考資料 |

ADPKD: autosomal dominant polycystic kidney disease

## 2.6.3.2　効力を裏付ける試験

### 2.6.3.2　効力を裏付ける試験（1）　被験物質：トルバプタン（JAN）

| 試験の種類 | 試験系 | 投与方法 | 投与量<br>（mg/kg） | 性別及び<br>動物数／群 | 特記すべき所見 | 報告書番号 | 資料番号 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| (1)トルバプタンの効力を裏付ける試験 | | | | | | | |
| ①PKD モデル動物における作用 | | | | | | | |
| DBA/2:FG-*pcy* マウスに対する作用（長期投与） | DBA/2:FG-*pcy* マウス<br>DBA/2JJcl マウス | 混餌 | 0.1%<br>（混餌投与） | 雄性<br>1 群 15 例<br>（*pcy*）<br>1 群 9 例<br>(DBA/2) | トルバプタンの投与（5～29 週齢）により，腎容積の増大と尿中アルブミン排泄の増加は抑制された。29 週齢までに対照群では 60 %の個体が死亡したが，トルバプタン群では 20%と有意に死亡率を抑制した。トルバプタン投与群では試験期間を通じて，尿量の増加と尿浸透圧の低下が認められた。 | 028192 | 4.2.1.1-01 |
| DBA/2:FG-*pcy* マウスに対する作用（用量依存性） | DBA/2:FG-*pcy* マウス<br>DBA/2JJcl マウス | 混餌 | 0.01, 0.03, 0.1 及び 0.3%<br>（混餌投与） | 雄性<br>1 群 14 例<br>（*pcy*）<br>1 群 5 例<br>(DBA/2) | トルバプタンの投与（5～15 週齢）により，用量依存的な腎重量，腎嚢胞容積，腎線維化容積，PCNA 陽性細胞数及び尿中 NGAL の低下が認められた。また，トルバプタンの投与により，用量依存的な尿量の増加と尿浸透圧の低下が認められた。これらの作用は 0.1%の投与量でほぼ最大効果を示した。<br>トルバプタン投与群では用量依存的な腎内 cAMP 含量，ERK 活性及び AQP2 mRNA 量の低下が認められた。 | 028257 | 4.2.1.1-02 |

PCNA: proliferating cell nuclear antigen, NGAL: neutrophil gelatinase-associated lipocalin, cAMP: cyclic AMP, ERK: extracellular signal-regulated kinase, AQP2:aquaporin 2

（続く）

（続き）

| 試験の種類 | 試験系 | 投与方法 | 投与量<br>（mg/kg） | 性別及び<br>動物数／群 | 特記すべき所見 | 報告書番号 | 資料番号 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 血清中未変化体濃度の検討 | DBA/2:FG-*pcy*<br>マウス | 混餌 | 0.01 及び 0.1%<br>（混餌投与） | 雌雄<br>1 群 3 例 | 2 週間混餌投与後の血清中トルバプタン濃度<br>（ng/mL）<br>朝　夕　夜<br>雄 0.01%　16.5　<5　27.2<br>雄 0.1%　177.9　49.3　467.5<br>雌 0.01%　10.0　6.8　27.0<br>雌 0.1%　169.8　127.7　257.2 | 028160 | 4.2.1.1-03 |
| PCK ラットに対する作用（混餌） | PCK ラット | 混餌 | 0.01, 0.03 及び<br>0.1% | 雌雄<br>1 群 10 例 | トルバプタンの混餌投与（3～10 週齢）により，腎重量，腎嚢胞容積，腎線維化容積，Mitotic Index，Apoptotic Index 及び腎内 cAMP 含量は低下した。また，尿量は用量に依存して増加した。PCK ラットでは肝嚢胞も認められるが，肝重量には影響しなかった。 | 016916 | 4.2.1.1-04 |
| PCK ラットに対する作用（経口） | PCK ラット<br>SD ラット | 経口 | 10 mg/kg<br>1 日 1 回<br>10mg/kg<br>1 日 2 回 | 雄性<br>1 群 10 例<br>（PCK）<br>1 群 10 例<br>（SD） | トルバプタンの強制経口投与（5～13 週齢）により，尿量の増加は認められたが，腎重量，腎嚢胞容積，腎線維化容積，Mitotic Index，Apoptotic Index 及び腎内 cAMP 含量に影響しなかった。 | 017738 | 4.2.1.1-05<br>参考資料 |

（続く）

（続き）

| 試験の種類 | 試験系 | 投与方法 | 投与量<br>（mg/kg） | 性別及び<br>動物数／群 | 特記すべき所見 | 報告書番号 | 資料番号 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 経口投与と混餌投与の利尿作用の比較 | SD ラット | 混餌<br>経口 | 0.01 及び 0.1%（混餌投与）<br>10, 30, 100 及び 300 mg/kg 1 日 1 回及び 2 回（経口投与） | 雄性<br>1 群 5 例 | トルバプタン 0.1%の混餌投与及び 10 mg/kg を 1 日 1 回または 2 回の投与により，いずれも，24 時間尿量は増加し尿浸透圧は低下した。一方，4 時間毎の採尿区間の比較では，0.1%の混餌投与群では 24 時間持続した尿量の増加が見られたが，10 mg/kg 経口投与群では投与直後の 4 時間しか尿量の増加は見られなかった。10 mg/kg の強制経口投与では作用持続時間が短いことが明らかとなった。 | 017316 | 4.2.1.1-06 |
| $Pkd2^{WS25/-}$マウスに対する作用 | $Pkd2^{WS25/-}$マウス | 混餌 | 0.01, 0.03 及び 0.1% | 雌雄<br>1 群 9～12 例 | トルバプタンの混餌投与（4～16 週齢）により，腎重量，腎線維化容積，BUN，Mitotic Index 及び Apoptotic Index は低下した。また，尿量は用量に依存して増加した。 | 017968 | 4.2.1.1-07 |
| *pcy* マウスに対する作用 | CD1-*pcy* マウス<br>CD1 マウス | 混餌 | 0.01, 0.03 及び 0.1% | 雌雄<br>1 群 10 例 | トルバプタンの混餌投与（4～30 週齢及び 15～30 週齢）により，雌性 CD1-*pcy* マウスにおいては腎重量，腎嚢胞容積，SUN 及び Apoptotic Index は低下した。雄性 CD1-*pcy* マウスにおいては腎重量及び Apoptotic Index は低下した。CD-1 マウスには影響しなかった。 | 018373 | 4.2.1.1-08<br>参考資料 |

BUN: blood urea nitrogen, SUN: serum urea nitrogen.

（続く）

（続き）

| 試験の種類 | 試験系 | 投与方法 | 投与量<br>（mg/kg） | 性別及び<br>動物数／群 | 特記すべき所見 | 報告書番号 | 資料番号 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ②ヒト ADPKD 患者における嚢胞由来の培養上皮細胞に対する作用 | | | | | | | |
| 作用機序の検討 | ヒト ADPKD 患者における嚢胞由来の培養上皮細胞 (ADPKD)<br>ヒト腎皮質由来の正常培養上皮細胞（NHK） | *in vitro* | 0.001～100 nmol/L | 例数=<br>2-8 | トルバプタンは ADPKD 細胞において，バソプレシン（1 nmol/L）による細胞増殖を抑制した。この時，細胞内 cAMP 含量，B-Raf 及び ERK のリン酸化をいずれも抑制した。一方，NHK 細胞においてはバソプレシンにより（1 nmol/L），細胞増殖は抑制されトルバプタンはこれに拮抗した。cAMP は ADPKD 細胞と同様にバソプレシンによる上昇を抑制した。<br>トルバプタンは ADPKD 細胞の細胞内カルシウム濃度に影響しなかった。 | 019680 | 4.2.1.1-09<br>参考資料 |

NHK: normal human kidney, B-Raf:B-rapidly accelerated fibrosarcoma

### 2.6.3.3　副次的薬理試験

新たな副次的薬理試験は実施していない。

### 2.6.3.4　安全性薬理試験

新たな安全性薬理試験は実施していない。

### 2.6.3.5　薬力学的薬物相互作用試験

新たな薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。