KW-3357

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

協和発酵キリン株式会社

CONFIDENTIAL

略号及び用語の定義一覧

略号

略号	略していない用語
APTT	Activated partial thromboplastin time（活性化部分トロンボプラスチン時間）
AT	Antithrombin（アンチトロンビン）
CAD	Congenital antithrombin deficiency（先天性アンチトロンビン欠乏症）
DIC	Disseminated intravascular coagulation（汎発性血管内凝固症候群）
LPS	Lipopolysaccharide（リポポリサッカライド）
pAT	Plasma derived antithrombin（ヒト血漿由来アンチトロンビン）
PT	Prothrombin time（プロトロンビン時間）
TCA	Trichloroacetic acid（トリクロロ酢酸）

用語の定義

用語	定義
[^{125}I]KW-3357	^{125}I で標識された KW-3357
$AUC_{0\text{-}24}$	投与後 24 時間までの血漿中薬物濃度－時間曲線下面積
C_{24h}	投与後 24 時間における血漿中薬物濃度
CL	全身クリアランス
DNA	デオキシリボ核酸
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
IU	国際単位
$t_{1/2\beta}$	β 相の半減期

目次

略号及び用語の定義一覧 2
目次 3
2.4 非臨床試験の概括評価 4
2.4.1 非臨床試験計画概略 4
2.4.2 薬理試験 5
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 5
2.4.2.2 副次的薬理試験 5
2.4.2.3 安全性薬理試験 5
2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用 6
2.4.3 薬物動態試験 6
2.4.3.1 吸収 6
2.4.3.2 分布 6
2.4.3.3 代謝 7
2.4.3.4 排泄 7
2.4.3.5 薬物動態学的薬物相互作用 7
2.4.3.6 その他の薬物動態試験 7
2.4.4 毒性試験 7
2.4.4.1 単回投与毒性試験 8
2.4.4.2 反復投与毒性試験 8
2.4.4.3 遺伝毒性試験 9
2.4.4.4 がん原性試験 9
2.4.4.5 生殖発生毒性試験 9
2.4.4.6 局所刺激性試験 9
2.4.4.7 その他の毒性試験 10
2.4.5 総括及び結論 10
2.4.5.1 薬理試験 10
2.4.5.2 薬物動態試験 10
2.4.5.3 妊娠ラットと非妊娠ラットのクリアランスの差について 11
2.4.5.4 KW-3357 と pAT 製剤とのクリアランスの差について 11
2.4.5.5 毒性試験 11
2.4.5.6 毒性試験で認められた出血の種差について 11
2.4.5.7 反復投与毒性試験での曝露とヒトでの曝露の比較 12
2.4.5.8 妊娠時の使用について 12
2.4.6 参考文献 12

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

KW-3357 は、ヒトアンチトロンビン遺伝子を組み込んだ Chinese hamster ovary 細胞で産生された 432 個のアミノ酸からなる遺伝子組換え型の糖タンパク質である（2.6.1）。KW-3357 の分子量は約 57000 であり、そのアミノ酸配列及び分子内ジスルフィド結合はヒトアンチトロンビンと同一である。ヒト血漿由来アンチトロンビン（pAT）製剤は、汎発性血管内凝固症候群（DIC）及び先天性アンチトロンビン欠乏症（CAD）を適応として製造販売承認されている。しかしながら、pAT 製剤はヒト血漿成分からの製剤であるため、ヒト血漿由来成分を用いない手法による製剤が期待され、KW-3357 を開発するに至った。

薬理試験

KW-3357 の効力を裏付ける試験として、pAT 製剤と同様に血液凝固抑制作用を有していることをヒト新鮮血漿及びラット DIC 動物モデルを用いて評価した。また、安全性薬理試験として、心血管系、中枢神経系及び呼吸系に対する影響をラット及びカニクイザルの 2 週間反復投与毒性試験において評価した。

薬物動態試験

非標識体（KW-3357）及び標識体（[^{125}I]KW-3357）を用いて、ラットにおける静脈内投与後の血漿中濃度推移、組織分布、胎児移行性及び乳汁中排泄を評価した。また、カニクイザルにおける静脈内投与後の血漿中濃度推移を pAT 製剤との濃度推移の比較を含めて評価した。カニクイザルを用いた検討においては、KW-3357 のシアル酸含量が血漿中濃度推移に及ぼす影響についても評価した。

毒性試験

単回投与毒性試験は、最大投与可能量と判断した投与量を最高用量とする反復投与毒性試験より KW-3357 の急性毒性を評価可能であると判断したため実施しなかった。反復投与毒性試験は、ラット及びカニクイザルを用いて実施した。KW-3357 の対象疾患である DIC は急性かつ致死率の高い疾患であり、臨床での投与期間が最長で 5 日間であること、また、CAD においては妊娠又は手術時等、血栓症発生リスクがある場合に 5 日間程度投与することを想定していることから、反復投与毒性試験における投与期間は、2 週間とした。ラット反復投与毒性試験では予備試験及び本試験に加え、商業生産設備で製造された原薬を用いた試験を実施した。カニクイザルにおける反復投与毒性試験は、予備試験及び本試験を実施した。遺伝毒性試験は、生体因子であり高分子タンパク質である KW-3357 が DNA 障害を引き起こす可能性は低いことから、実施していない。がん原性試験については、本剤の臨床での使用を最長 5 日間と想定しており長期間の曝露がないこと、また、本剤が遺伝毒性を有している可能性が低いことから、実施していない。生殖発生毒性試験は、ラット及びウサギを用いて実施した。ラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験は雌雄に分け 2 試験で実施した。ウサギにおける胚・胎児発生に関する試験及びラットにおける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は予備試験を実施後に本試験を実施した。また、ウサギを用いて血管及び血管周囲に対する局所刺激性を評価した。その他に、不純物の安全性を、商業生産設備で製造された原薬を用いたラット反復投与毒性試験の中で評価した。

予備試験を除く毒性試験は「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（GLP）」（厚生省令第 21 号、平成 9 年 3 月 26 日）に準拠して実施した。

2.4.2 薬理試験

特に断らない限り KW-3357 とノイアートは同じ濃度又は投与量で比較した。

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

1）ヒト血漿における凝固時間に対する作用

ヒト新鮮血漿に KW-3357 を添加し、ヘパリン存在下で凝固時間の指標であるプロトロンビン時間（PT）及び活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）を計測した（n=5）。

PT に対する KW-3357 の評価において、ヘパリン単独の凝固時間は、47.90±6.79 秒であったのに対して、3 IU/mL の KW-3357 を併用すると、66.16±9.57 秒に延長した。APTT に対する KW-3357 の評価において、ヘパリン単独の凝固時間は、69.68±6.21 秒であったのに対して、3 IU/mL の KW-3357 を併用すると、86.94±7.19 秒に延長した。

KW-3357 の PT 及び APTT に対する作用は、pAT 製剤であるノイアート®と比較して、統計学的に有意な差は認められなかった（2.6.2.2.1）。

2）DIC モデル動物に対する作用

DIC モデル動物としてラットリポポリサッカライド（LPS）誘発凝固亢進モデル（n=10）及びラットトロンボプラスチン誘発凝固亢進モデル（n=8）を用いた。

ラット LPS 誘発凝固亢進モデルにおいて、KW-3357 の 250 IU/kg 投与により、LPS 投与で認められた、血小板数及びフィブリノーゲンの減少、PT 及び APTT の延長並びに血漿中アンチトロンビン（AT）活性の低下等の凝固系評価項目の変化を統計学的に有意に抑制した。これらの作用は、ノイアート®と比較して、統計学的に有意な差は認められなかった（2.6.2.2.2）。

ラットトロンボプラスチン誘発凝固亢進モデルにおいて、KW-3357 の 250 IU/kg 投与により、トロンボプラスチン投与で認められた、血小板数及びフィブリノーゲンの減少、PT 及び APTT の延長並びに血漿中 AT 活性の低下等の凝固系評価項目の変化を統計学的に有意に抑制した。これらの作用は、ノイアート®と比較して、統計学的に有意な差は認められなかった（2.6.2.2.3）。

2.4.2.2 副次的薬理試験

該当する試験は実施していない。

2.4.2.3 安全性薬理試験

カニクイザルを用いた 2 週間反復投与毒性試験（2.6.6.3.5）において、血圧及び心電図パラメータの変化を測定し、KW-3357 の心血管系に及ぼす影響を評価した。その結果、KW-3357 は心血管系の機能に直接的な影響を及ぼさないと考えられた。

ラットを用いた 2 週間反復投与毒性試験（2.6.6.3.2）における一般状態観察並びにカニクイザルを用いた 2 週間反復投与毒性試験（2.6.6.3.5）における一般状態観察及び体温測定により、KW-3357 の中枢神経系に及ぼす影響を評価した。その結果、KW-3357 は中枢神経系の機能に直接的な影響を及ぼさないと考えられた。

ラット及びカニクイザルを用いた 2 週間反復投与毒性試験（2.6.6.3.2、2.6.6.3.5）における一般状態観察により、KW-3357 の呼吸系に及ぼす影響を評価した。その結果、KW-3357 が呼吸系の機能に影響を及ぼしたと考えられる所見は認められなかった。また、薬理作用が同等と考えられる血漿由来 AT 製剤の一般薬理試験において、呼吸器系への影響は認められないことが報告されていること [3)]、KW-3357 の臨床試験において呼吸器系に特異的な事象が認められていないことから、KW-3357 は呼吸系の機能に影響を及ぼさないと考えられた。

なお、カニクイザルを用いた 2 週間反復投与毒性試験（2.6.6.3.5）の 1000 IU/kg/日投与群において重篤な貧血が認められた雄 1 例で、血圧及び体温の低下並びに自発運動の低下が認められた。しかしながら、これらの変化は、KW-3357 の血液凝固抑制作用に起因した重度の出血による二次的な変化と考えられた（2.6.2.4）。

2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用

ラットを用いた DIC モデルである LPS 誘発凝固亢進モデルにおいて、未分画ヘパリン併用時の KW-3357 とノイアート®の作用を比較した（n=10~12）。LPS を投与した対照群では、血小板数及びフィブリノーゲンの減少、PT 及び APTT の延長並びに血漿中 AT 活性の低下が認められた。未分画ヘパリンと KW-3357 又はノイアート®の併用投与により、血小板数及びフィブリノーゲン減少は有意に抑制された。血漿中 AT 活性は、KW-3357 又はノイアート®の投与により上昇し、未分画ヘパリン併用投与による変化は認められなかった。一方、APTT は未分画ヘパリンの投与で延長され、KW-3357 又はノイアート®と併用投与することにより更に延長された。これら凝固系評価項目に対するヘパリン併用時の KW-3357 の作用は、ノイアート®と比較して、統計学的に有意な差は認められなかった（2.6.2.5）。

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 吸収

カニクイザルに 200 IU/kg を単回静脈内投与したとき、血漿中 KW-3357 濃度及び AT 活性は、いずれも投与後 2 相性に消失した。KW-3357 の $t_{1/2\beta}$ は 38.9±2.7 時間であり、CL は 1.87±0.12 mL/h/kg であった。3 種の pAT 製剤（ノイアート®、アンスロビン®及びノンスロン®）との比較において、$t_{1/2\beta}$ に明確な違いは認められなかったが、KW-3357 の CL は pAT 製剤の CL の約 1.2~1.4 倍であった（2.6.4.3.1.1）。

ラット及びカニクイザルに KW-3357 を 2 週間反復静脈内投与したとき、初回及び最終投与時（Day 1 及び Day 14）の $AUC_{0\text{-}24}$ は、ラットでは 500~2000 IU/kg の用量で、カニクイザルでは 100~1000 IU/kg の用量で、投与量の増加に伴った増加が認められた。すべての用量において明確な雌雄差は認められなかった。最終投与後（Day 14）の $AUC_{0\text{-}24}$ は、初回投与時と比較してラットでは約 1.3~1.7 倍、カニクイザルでは約 2.2~2.6 倍に増加した。最終投与後 24 時間における血漿中濃度は初回投与時と比較してラットでは約 1.8~2.0 倍、カニクイザルでは約 2.9~3.7 倍であった（2.6.4.3.2.1、2.6.4.3.2.2）。

2.4.3.2 分布

ラットに 100 IU/kg の[^{125}I]KW-3357 を単回静脈内投与したときの放射能の分布を組織摘出法で評価したところ、放射能濃度はいずれの時点においても血漿で最も高く、脾臓、骨髄、腎臓、副腎、肝臓、肺、胃及び卵巣（雌のみ）で比較的高かった。トリクロロ酢酸（TCA）不溶性画分中放射能濃度は総放射能濃度と大きな差が認められなかったことから、血漿、肝臓、腎臓及び脾臓における放射能は、高分子成分として存在すると考えられた（2.6.4.4.1）。

妊娠ラット（妊娠 7 日、妊娠 17 日）に 100 IU/kg の[^{125}I]KW-3357 を単回静脈内投与したときの放射能の分布を組織摘出法で評価したところ、胎児に放射能が認められた。TCA 不溶性画分には放射能がほとんど検出されなかったことから、胎児に認められた放射能は高分子成分由来ではないと考えられた（2.6.4.4.2）。

2.4.3.3 代謝

該当する試験は実施していない。

2.4.3.4 排泄

分娩後ラット（分娩後 11 日目）に 100 IU/kg の[^{125}I]KW-3357 を単回静脈内投与したところ、投与後 8 時間以降、乳汁中に血漿中濃度を上回る放射能濃度が認められた。乳汁中放射能濃度は投与後 8~48 時間において血漿中濃度の 2.2~2.7 倍であり、血漿中濃度と並行して経時的に低下した（2.6.4.6.1）。

2.4.3.5 薬物動態学的薬物相互作用

該当する試験は実施していない。

2.4.3.6 その他の薬物動態試験

ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験において、妊娠 17 日の C_{24h} は妊娠 7 日と比較して低かった。そこで、KW-3357 の薬物動態の妊娠による変化を検討した。雌性ラット（非妊娠、妊娠 7 日、妊娠 17 日）に 2000 IU/kg の KW-3357 を単回静脈内投与したところ、血漿中 KW-3357 濃度及び AT 活性はいずれも投与後 2 相性に消失した。血漿中 KW-3357 濃度から算出した CL は、妊娠 17 日で非妊娠及び妊娠 7 日の約 1.2 倍であった（2.6.4.8.1）。

KW-3357 のシアル酸含量が薬物動態に与える影響を確認するため、カニクイザルにシアル酸含量の異なる KW-3357 を単回静脈内投与したときの血漿中 KW-3357 濃度推移を検討した。シアル酸数が [redacted] mol/mol protein である KW-3357（Lot [redacted]）の血漿中への曝露は、シアル酸数が [redacted] mol/mol protein である KW-3357（Lot [redacted]）と比較して低かった。KW-3357（Lot [redacted]）の CL は KW-3357（Lot [redacted]）の CL の約 1.5 倍であり、シアル酸含量が KW-3357 の薬物動態に影響を与えることが推察された（2.6.4.8.2）。

2.4.4 毒性試験

実施した毒性試験の一覧を表 2.4.4-1 に示す。

表 2.4.4-1 実施した毒性試験の一覧

試験の種類及び期間		投与経路	動物種/系統	GLP 適用
反復投与毒性試験	2 週間（予備試験）	静脈内投与	ラット/Crl:CD(SD)	非適用
	2 週間	静脈内投与	ラット/Crl:CD(SD)	適用
	2 週間（商業生産設備で製造された原薬を用いた試験）	静脈内投与	ラット/Crl:CD(SD)	適用
	1 又は 2 週間（予備試験）	30 分間静脈内持続投与	カニクイザル	非適用
	2 週間	30 分間静脈内持続投与	カニクイザル	適用
生殖発生毒性試験	受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（雌性）	静脈内投与	ラット/Crl:CD(SD)	適用
	受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（雄性）	静脈内投与	ラット/Crl:CD(SD)	適用
	胚・胎児発生に関する試験	静脈内投与	ラット/Crl:CD(SD)	適用
	胚・胎児発生に関する試験（予備試験）	30 分間静脈内持続投与	ウサギ/Kbs:NZW	非適用
	胚・胎児発生に関する試験	30 分間静脈内持続投与	ウサギ/Kbs:NZW	適用
	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（予備試験）	静脈内投与	ラット/Crl:CD(SD)	非適用
	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	静脈内投与	ラット/Crl:CD(SD)	適用
その他	局所刺激性試験	静脈内投与 静脈周囲投与	ウサギ/Kbl:JW	適用

2.4.4.1 単回投与毒性試験

独立した単回投与毒性試験は実施していないが、急性毒性は、ラット 2 週間反復静脈内投与毒性試験、カニクイザル 1 週間（1800 IU/kg/日）及び 2 週間（180 IU/kg/日）反復静脈内投与毒性試験（予備試験）を用いて評価した。

ラットに 500 及び 2000 IU/kg/日を 2 週間反復静脈内投与した結果、死亡例は認められなかったことから、概略の致死量は 2000 IU/kg/日を超えると考えられる（2.6.6.3.2）。

カニクイザルに 1800 IU/kg/日を 1 週間反復静脈内投与した。1800 IU/kg/日投与群で 7 回投与翌日に 2/2 例で瀕死が認められた（2.6.6.3.4）。

2.4.4.2 反復投与毒性試験

KW-3357 の最大投与可能量である 2000 IU/kg を最高用量としたラット 2 週間反復静脈内投与及び 2 週間休薬期間の本試験を実施した。死亡を含めた一般状態の観察で異常は認められなかった。KW-3357 の血漿中濃度の増加に伴った AT 活性の高値が 2 週間投与後の検査で認められたが、その他の検査において、KW-3357 投与による影響は認められなかった。ラット 2 週間反復投与毒性試験における KW-3357 の無毒性量は 2000 IU/kg/日と考えられた（2.6.6.3.2）。商業生産設備で製造された原薬を用い、2000 IU/kg/日の用量で 2 週間反復静脈内投与を実施した結果、本試験と同様に、KW-3357 投与による影響は認められず、無毒性量は 2000 IU/kg/日と考えられた（2.6.6.3.3）。

カニクイザル反復投与毒性試験の予備試験において、カニクイザルに 180 及び 1800 IU/kg/日の用量でそれぞれ 2 週間又は 1 週間反復静脈内投与した。180 IU/kg/日投与群では 5 週間の休薬

期間を設けた。その結果、1800 IU/kg/日投与群では 7 回投与翌日に、KW-3357 の血液凝固抑制作用に起因すると考えられる出血により 2/2 例が瀕死となった。180 IU/kg/日投与群では投与期間中に、貧血が認められたが、休薬により回復した（2.6.6.3.4）。

カニクイザル反復投与毒性試験において、カニクイザルに 0（対照）、100、300 及び 1000 IU/kg/日の用量で 2 週間反復静脈内投与した。全群で 6 週間の休薬期間を設けた。KW-3357 投与群では、投与期間中の血漿中 AT 活性は用量増加に伴い高値を示し、KW-3357 の血液凝固抑制作用に起因すると考えられる出血及び貧血が認められた。1000 IU/kg/日投与群では、一般状態への影響、体重、摂餌量の減少を伴う重篤な出血及び貧血が認められた。100 及び 300 IU/kg/日投与群では、軽微な貧血又は出血が認められたが、一般状態及び摂餌量への影響が認められなかったことから、毒性とは捉えなかった。投与期間中に認められた KW-3357 の血液凝固抑制作用による出血及びそれに伴う貧血等の二次的変化は、いずれも休薬により回復した。以上の結果から、カニクイザル 2 週間反復投与毒性試験における KW-3357 の無毒性量は 300 IU/kg/日と考えられた（2.6.6.3.5）。

2.4.4.3 遺伝毒性試験

KW-3357 が遺伝子組換え技術により製造した組換えタンパク質であり、DNA 及び他の染色体成分に直接相互作用しないと考えられることから、遺伝毒性試験は実施しなかった。

2.4.4.4 がん原性試験

KW-3357 が遺伝毒性を有している可能性が低いこと、臨床での投与期間が最長 5 日間を想定していること、急性で致死率の高い疾患を対象としていることから、がん原性試験は実施していない。

2.4.4.5 生殖発生毒性試験

ラットに KW-3357 を 2000 IU/kg の用量で反復静脈内投与し、受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、胚・胎児発生に関する試験及び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を実施した。いずれの試験においても、親動物の一般毒性及び生殖能並びに胚・胎児又は次世代の発生に KW-3357 の影響は認められず、無毒性量は 2000 IU/kg/日と考えられた（2.6.6.6.1.1、2.6.6.6.1.2、2.6.6.6.2.1、2.6.6.6.3.2）。

ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験で、KW-3357 を 0（対照）、50、150 及び 500 IU/kg の用量で、妊娠 6 から 18 日の間、反復静脈内投与した。その結果、500 IU/kg/日投与群で膣からの出血及び子宮内の血液貯留が認められた。同群では生存胎児数及び着床後死亡率に影響は認められなかったが、胎児体重の低値及び手指骨（中手骨及び前肢中節骨）で骨化遅延が認められた。外表異常、内臓異常、骨格異常及び骨格変異の発現頻度の増加は認められず、本剤に催奇性はないと判断した。以上の結果から、KW-3357 の母動物への一般毒性学的影響に関する無毒性量は 500 IU/kg/日、母動物の生殖及び胚・胎児の発生に関する無毒性量は 150 IU/kg/日であると考えられた（2.6.6.6.2.3）。

2.4.4.6 局所刺激性試験

ウサギを用いて、KW-3357 製剤の耳介静脈内及び静脈周囲の局所刺激性を検討した。その結果、KW-3357 投与に起因した毒性学的に意義のある変化は認められず、血管刺激性、血管周囲刺激性の可能性はないと考えられた（2.6.6.7.1）。

2.4.4.7 その他の毒性試験

原薬又は製剤に含まれる不純物の安全性を、商業生産設備で製造された原薬を用いたラット反復投与毒性試験の中で評価した（2.6.6.3.3）。ラットに投与された 2000 IU/kg 中に含有される不純物量の算出は、KW-3357 の規格試験法を用いた。その結果、無毒性量で投与された不純物量は、不純物 A*が [redacted] mg/kg/日、不純物 B*が [redacted] mg/kg/日、不純物 C*が [redacted] mg/kg/日、不純物 D*が [redacted] μg/kg/日であった。

2.4.5 総括及び結論

2.4.5.1 薬理試験

KW-3357 は、ヒト新鮮血漿において凝固時間（PT 及び APTT）を延長させ、ラット DIC モデル動物において凝固系評価項目の変化（血小板数及びフィブリノーゲンの減少、PT 及び APTT の延長並びに血漿中 AT 活性の低下）を改善した。ヒト新鮮血漿及びラット DIC モデルにおける KW-3357 の作用は、pAT 製剤であるノイアート®と比較して統計学的に有意な差は認められなかった。以上の結果から、KW-3357 は血液凝固抑制作用を有し、その作用は既存の pAT 製剤と同程度であると考えられた。

更にラット DIC モデル動物において、ヘパリンと KW-3357 を併用した際に認められた血液凝固抑制作用は、ヘパリンとノイアート®を併用した際にも同様に認められた。また、ヘパリンを併用した際の KW-3357 とノイアート®の作用は、統計学的に有意な差は認められなかった。本結果より、ヘパリンを併用した際の血液凝固に対する KW-3357 作用は、既存の pAT 製剤と同程度であると考えられた。

ラット及びカニクイザルを用いた 2 週間反復投与毒性試験において、一般状態、体温、血圧及び心電図に及ぼす影響を評価した結果、KW-3357 は心血管系、中枢神経系及び呼吸系の機能に直接的な影響を及ぼさないと考えられた。

2.4.5.2 薬物動態試験

KW-3357 をラット及びカニクイザルに 2 週間反復静脈内投与したとき、初回及び最終投与時の $AUC_{0\text{-}24}$ は、投与量の範囲内においてほぼ線形であることが示された。最終投与後の $AUC_{0\text{-}24}$ 及び C_{24h} はいずれも初回投与時と比較して増加した。最終投与後の $AUC_{0\text{-}24}$ の増加は、単回投与時の薬物動態から予想される範囲であった。また、反復投与による薬物動態の変化に雌雄差は認められなかった。

ラットに[^{125}I]KW-3357 を単回静脈内投与した組織分布試験では、投与後いずれの時点においても血漿の放射能濃度が最も高く、組織への分布は少なかった。血漿、肝臓、腎臓及び脾臓の TCA 不溶性画分中放射能濃度は総放射能濃度と大きな差は認められなかったことから、これらの臓器では大部分が KW-3357 又は KW-3357 由来の高分子成分として存在すると考えられた。また、妊娠ラットに[^{125}I]KW-3357 を単回静脈内投与したとき、胎児に放射能が認められたが、母動物血漿中濃度と比較して低かった。TCA 不溶性画分中放射能濃度の検討から、胎児で認められた放射能は高分子成分由来ではないことが示唆され、KW-3357 の胎児移行性は非常に低いと考えられた。

分娩後ラットに[^{125}I]KW-3357 を単回静脈内投与したとき、投与後 8 時間において、乳汁中に血漿中濃度を上回る放射能濃度が認められ、血漿中放射能濃度と並行して経時的に低下した。このことから、ヒトにおいても KW-3357 が乳汁中へ移行する可能性が示唆された。

2.4.5.3 妊娠ラットと非妊娠ラットのクリアランスの差について

妊娠ラット又は非妊娠ラットに KW-3357 又は[^{125}I]KW-3357 を単回静脈内投与したところ、妊娠 17 日で CL は非妊娠及び妊娠 7 日の CL の約 1.2 倍であり、血漿中濃度は非妊娠及び妊娠 7 日より低くなる傾向が認められた。妊娠後期においては一般に血液凝固が亢進していることが報告されていることから [1)]、血液凝固の亢進に伴い抗凝固因子である AT の消費も増大したため、KW-3357 の消失が速くなったものと考えられた。

2.4.5.4 KW-3357 と pAT 製剤とのクリアランスの差について

カニクイザルに KW-3357 又は pAT 製剤 3 剤（ノイアート®、アンスロビン®及びノンスロン®）をそれぞれ単回静脈内投与したときにおける CL を比較した結果、KW-3357 は 3 つの pAT 製剤と比較して、CL が約 1.2~1.4 倍であった。糖タンパク質で *N*-結合型糖鎖末端に付加されているシアル酸含量の低下に伴って血漿中における滞留時間が短縮することが報告されている [2)] ことから、*N*-結合型糖鎖末端のシアル酸数について比較した。その結果、KW-3357 が [redacted] mol/mol protein、3 つの pAT 製剤は [redacted]~[redacted]mol/mol protein であり、KW-3357 のシアル酸数が pAT 製剤と比べ低かった。更にシアル酸数がクリアランスに影響することを確認する目的で、シアル酸含量が異なる KW-3357 をカニクイザルに単回静脈内投与したとき、シアル酸含量の低下に伴い CL が約 1.5 倍に大きくなることが確認された。

2.4.5.5 毒性試験

急性毒性は、ラットでは 2 週間の反復投与毒性試験、カニクイザルでは 1 週間及び 2 週間の短期間の反復投与毒性試験の予備試験により評価した。ラットでの概略の致死量は 2000 IU/kg/日を超える用量であり、カニクイザルでは 1800 IU/kg/日投与群で 7 回投与翌日に 2/2 例で瀕死が認められた。

反復投与毒性試験では、ラット 2 週間反復投与毒性試験における KW-3357 の無毒性量は 2000 IU/kg/日と考えられた。カニクイザルにおいては、2 週間の反復投与毒性試験で、血液凝固抑制作用による出血及び貧血が認められた。特に 1000 IU/kg/日投与群では、重度の出血に起因した一般状態の悪化、体重の低下、貧血が認められたことから、毒性量と考え、無毒性量は 300 IU/kg/日と考えられた。

生殖発生毒性試験では、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、胚・胎児発生に関する試験並びに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において、KW-3357 の影響は認められなかった。

ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験で、500 IU/kg/日以上の投与群で胎盤に由来すると考えられる膣からの出血、子宮内の血液貯留が認められ、1000 IU/kg/日投与群では 1 例が流産した。また、500 IU/kg/日投与群で胎児の発育遅延が、1000 IU/kg/日投与群で着床後死亡率の増加及び生存胎児数の減少が認められた。以上の結果から、KW-3357 の母動物への一般毒性学的影響に関する無毒性量は 500 IU/kg/日、母動物の生殖能及び胚・胎児の発生に関する無毒性量は 150 IU/kg/日であると考えられた。

ウサギを用いた局所刺激性試験において、KW-3357 製剤に局所刺激性はないと考えられた。

2.4.5.6 毒性試験で認められた出血の種差について

ウサギ及びカニクイザルを用いた試験では、本剤の薬理作用に起因した出血が認められた。一方、ラットを用いた試験では、出血は認められなかった。

ウサギを用いた生殖発生毒性試験（胚・胎児発生に関する試験）及びカニクイザルを用いた反復投与毒性試験においては、ラットを用いたそれぞれの試験よりも、C_{24h} 及び $AUC_{0\text{-}24}$ が高値であった。また、カニクイザルを用いた反復投与毒性試験においては PT 及び APTT の延長も認められた。これらのことから、ウサギ及びカニクイザルでは、ラットと比較し、より血液凝固抑制作用が強く認められた可能性があり、そのため出血傾向が顕著に認められたと考えられる。

2.4.5.7 反復投与毒性試験での曝露とヒトでの曝露の比較

各動物種を用いた代表的な毒性試験における定常状態の $AUC_{0\text{-}24}$ を、72 IU/kg/日の用量におけるヒトでの反復投与後の $AUC_{0\text{-}24}$ と比較した（表 2.4.5.7-1）。ラット及びカニクイザルを用いた反復投与毒性試験は、想定される臨床投与量での曝露に比較して十分に高曝露な条件下で、毒性が評価されたと考えられる。

表 2.4.5.7-1 各動物種の反復投与毒性試験における定常状態の AUC 及びヒト AUC との比較

動物種	投与量（IU/kg/日）	雌雄	$AUC_{0\text{-}24}$（IU·h/mL）	ヒト $AUC_{0\text{-}24}$ に対する比
ラット [a)]	2000	雄性	329	7.9
	2000	雌性	274	6.6
カニクイザル [b)]	1000	雄性	611	14.7
	1000	雌性	550	13.2
ヒト [c)]	72		42.78	

a) ラットを用いた 2 週間反復投与毒性試験
b) カニクイザルを用いた 2 週間反復投与毒性試験
c) 1 日 1 回 3 日間投与時（3357-003 試験）の AT 活性（合成基質法にて測定）データから算出した 1 日 1 回 5 日間投与したときの $AUC_{0\text{-}24}$ のシミュレーション値

2.4.5.8 妊娠時の使用について

ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験では、母動物の生殖及び胚・胎児の発生に関する無毒性量は 150 IU/kg/日であり、そのときの定常状態の $AUC_{0\text{-}24}$ は 30.9 IU·h/mL であった。一方、臨床使用用量のうち 72 IU/kg/日におけるヒトでの反復投与後の $AUC_{0\text{-}24}$ は 42.78 IU·h/mL と推定され、ウサギでの無毒性量の曝露をやや上回っている。ウサギでは無毒性量を上回る投与量において、膣からの出血、子宮内の血液貯留、流産、胎児の発育遅延、着床後死亡率の増加及び生存胎児数の減少が認められていることから、本剤の妊婦への投与に際しては十分な注意が必要である。

以上、KW-3357 は pAT 製剤と同等の血液凝固抑制作用をヒトで示すことが期待される。一方、過剰な投与は通常の血液凝固作用を阻害し出血につながるリスクもあるため、投与に際しては十分な注意が必要である。ウサギでは無毒性量を上回る投与量において、膣からの出血、子宮内の血液貯留、流産、胎児の発育遅延、着床後死亡率の増加及び生存胎児数の減少が認められていることから、妊婦への投与に際しても十分な注意が必要である。

2.4.6 参考文献

1. Urasoko Y, He XJ, Ebata T, Kinoshita Y, Kobayashi J, Mochizuki M, et al. Changes in blood parameters and coagulation-related gene expression in pregnant rats. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2009;48(3):272-8.

2. Morell AG, Irvine RA, Sternlieb I, Scheinberg IH, Ashwell G. Physical and chemical studies on ceruloplasmin. V. Metabolic studies on sialic acid-free ceruloplasmin in vivo. J Biol Chem. 1968; 243(1):155-9.
3. 阿部俊一, 小柴博, 高橋順一, 川畑好之康, 中村勝信, 代本卓正, et al. Nildic の一般薬理試験. 基礎と臨床. 1986;20:765-80.