ムルプレタ錠 3mg

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

塩野義製薬株式会社

目次

略号及び用語定義一覧表 4
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
2.4.2　薬理試験 7
2.4.2.1　効力を裏付ける試験 7
2.4.2.2　副次的薬理試験 8
2.4.2.3　安全性薬理試験 9
2.4.3　薬物動態試験 10
2.4.3.1　吸収 10
2.4.3.2　分布 12
2.4.3.3　代謝 13
2.4.3.4　排泄 14
2.4.3.5　薬物動態学的薬物相互作用 15
2.4.4　毒性試験 17
2.4.4.1　一般毒性試験 17
2.4.4.1.1　単回投与毒性試験 17
2.4.4.1.2　反復投与毒性試験 17
2.4.4.2　遺伝毒性試験 20
2.4.4.3　がん原性試験 21
2.4.4.4　生殖発生毒性試験 21
2.4.4.5　その他の毒性試験 23
2.4.5　総括及び結論 25
2.4.5.1　*In vitro* 血小板産生作用 25
2.4.5.2　*In vivo* 血小板造血作用 26
2.4.5.3　副次的薬理作用 27
2.4.5.4　安全性薬理試験 27
2.4.5.5　ルストロンボパグの体内動態について 28
2.4.5.5.1　吸収 28
2.4.5.5.2　分布 29
2.4.5.5.3　代謝 29
2.4.5.5.4　排泄 31
2.4.5.5.5　薬物動態学的薬物相互作用について 31
2.4.5.6　ルストロンボパグの正常動物における反復投与毒性について 33
2.4.5.6.1　反復投与毒性の概略ならびに安全域 33
2.4.5.6.2　PT，APTT の延長について 34
2.4.5.6.3　副腎への影響について 34
2.4.5.6.4　胆嚢の変化について 34

2.4.5.7 がん原性について 35
2.4.5.8 生殖発生毒性について 35
2.4.5.9 皮膚光毒性について 37
2.4.5.10 ルストロンボパグの TPO 受容体を介した毒性について 37
2.4.6 参考文献一覧 38

2.4 略号及び用語定義一覧表

略号	用語定義
Acyl-GN	アシルグルクロナイド
$APD_{30\,(90)}$	30 (90) %再分極時の活動電位持続時間
$AUC_{0\text{-}8\,(24)\,hr}$	時間 0 から 8 (24) 時間までの血漿中薬物濃度－時間曲線下面積
AUC_{inf}	時間 0 から無限大までの血漿中薬物濃度－時間曲線下面積
BA	バイオアベイラビリティ
BCRP	breast cancer resistance protein
BOCA	β 酸化カルボン酸体
CL_t	全身クリアランス
C_{max}	最高血漿中薬物濃度
CYP	チトクローム P450
DH	ルストロンボパグ-脱ヘキシル体
EC_{50}	50%有効濃度
EMA	欧州医薬品庁
EPO	エリスロポエチン
FDA	アメリカ食品医薬品局
G-CSF	顆粒球コロニー刺激因子
GM-CSF	顆粒球マクロファージコロニー刺激因子
Hb	ヘモグロビン
hERG	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
Ht	ヘマトクリット
IC_{50}	50%阻害濃度
IL-3 (6, 11)	インターロイキン 3 (6, 11)
JAK2	ヤヌスキナーゼ 2
LDH	乳酸脱水素酵素
MAPK	マイトジェン活性化プロテインキナーゼ
MC	メチルセルロース
OATP	有機アニオントランスポーターポリペプチド
OCT1	有機カチオントランスポーター1
PD	薬力学
PEG/Tween 80	Tween 80 を 5%含有するポリエチレングリコール 400
P_{app}	みかけの膜透過係数
P-gp	P-糖たん白質
PK	薬物動態

QWBA	定量的全身オートラジオグラフィ
RBC	赤血球数
rhTPO	ヒト遺伝子組換え TPO
STAT	シグナル伝達性転写因子
$t_{1/2}$	消失半減期
$t_{1/2,z}$	終末相消失半減期
TC-BOCA	β酸化カルボン酸タウリン抱合体
TGF−β	transforming growth factor β
T_{max}	最高血漿中薬物濃度到達時間
TPO	トロンボポエチン
TPOR-Ki/Shi マウス	マウス TPO 受容体の膜貫通部位をヒト型に改変したキメラ TPO 受容体遺伝子をノックインしたマウス
TYK2	チロシンキナーゼ 2
UGT	ウリジン 2 リン酸−グルクロン酸転移酵素
V_{ss}	定常状態分布容積
5-ケト体	ルストロンボパグ-5-ケト体

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

ルストロンボパグは，塩野義製薬で創製された経口投与で薬効を発揮する新規の低分子トロンボポエチン (TPO) 受容体作動薬であり，巨核球に発現する TPO 受容体の膜貫通部位に作用し，TPO のシグナル伝達経路 3 種のうちの 2 種 [ヤヌスキナーゼ (JAK)–シグナル伝達性転写因子 (STAT) 経路及び Ras–マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAPK) 経路] を介して巨核球系前駆細胞を増殖・分化させ血小板を産生させると考えられる．

TPO は，造血幹細胞・巨核球系前駆細胞に働いて巨核球への増殖・分化を促進し，血小板産生に幅広く作用するサイトカインであり [1]，血小板減少症治療薬として開発が進められてきた．血小板減少症は血小板破壊の亢進や血小板の不十分な産生により血小板が減少し出血傾向を引き起こす疾患である．

血小板減少症の治療には，血小板輸血も行われるが，輸血用製剤そのものに由来するリスクと輸血実施の過程で生じるリスクが伴うことから，これらの潜在的なリスクを上回る効果が期待できると医師が判断した場合にのみ実施される．過去に，ヒト遺伝子組換え TPO (rhTPO) の臨床試験が行われたが，内因性 TPO に対する中和抗体が誘導され，抗原性の問題で開発が中止された [1,2]．血小板造血に作用するサイトカインの中で，唯一インターロイキン 11 (IL-11) の注射剤が米国において，癌化学療法後の血小板減少を改善する目的に限定して承認・臨床応用されている．このような状況から，副作用が少なく，簡便に投与可能な血小板減少症に対する治療薬が望まれていた．そのため，経口投与可能な低分子 TPO 受容体アゴニストであるルストロンボパグが開発された．

ルストロンボパグの効力を裏付ける試験としては 20[redacted]年[redacted]月から 20[redacted]年[redacted]月までにヒト TPO 受容体発現細胞とサイトカイン依存性細胞株を用いた増殖活性評価並びにヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞を用いた巨核球コロニー形成能評価，ルストロンボパグの代謝物の増殖活性評価，ヒト TPO 受容体発現細胞におけるシグナル伝達経路，ヒト骨髄由来細胞に対する巨核球コロニー形成能を調べる試験を実施した．加えて，マウス TPO 受容体の膜貫通部位をヒト型に改変したキメラ TPO 受容体遺伝子をノックインしたマウス (TPOR-Ki/Shi マウス) を用いた血小板造血作用を検討した．また，副次的薬理試験としては 20[redacted]年[redacted]月から 20[redacted]年[redacted]月までにルストロンボパグとエリスロポエチン (EPO) 又は顆粒球コロニー刺激因子 (G-GSF) との交差性をヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞で検討した．

ルストロンボパグの安全性薬理試験としては 20[redacted]年[redacted]月から 20[redacted]年[redacted]月までに，コアバッテリー試験として中枢神経系に及ぼす影響，呼吸系に及ぼす影響並びに心血管系に及ぼす影響を検討し，フォローアップ試験として心血管系に及ぼす影響を追加検討した．

ルストロンボパグの薬物動態試験としては 20[redacted]年[redacted]月から 20[redacted]年[redacted]月までに，主にマウス，ラット及びイヌを用いて，分析法・バリデーション，吸収・分布・代謝・排泄・薬物動態学的薬物相互作用試験を実施した．

ルストロンボパグの毒性試験としては，20[redacted]年[redacted]月から 20[redacted]年[redacted]月までの間に，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を実施した．なお，長期反復投与毒性試験及びがん原性試験は，血小板減少症治療

薬として多岐にわたる疾患での適応が考えられたため，ルストロンボパグの長期投与が必要となる疾患での開発の可能性を踏まえ実施した．

ルストロンボパグの主要な安全性薬理試験及び毒性試験はGLP試験として実施したが，安全性薬理試験のフォローアップ試験は信頼性基準を適用して実施し，その他の毒性試験のTPOR-Ki/Shiマウスを用いた骨髄線維化ポテンシャルの検討試験はGLP及び信頼性基準適用外で実施した．

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

ルストロンボパグのヒトTPO受容体への作用を調べる目的で，マウスインターロイキン3 (IL-3) 依存性pro B細胞株であるBa/F3細胞にヒトTPO受容体を発現させた細胞 (Ba/F3-hMpl細胞) を作製し，ルストロンボパグ (濃度：4.88～5000 nmol/L) の増殖活性を検討した．rhTPO添加群の最大増殖活性の平均値を100%としたときの相対増殖活性が50%に達する濃度を50%有効濃度 (EC_{50}) と定義し算出した．その結果，ルストロンボパグのEC_{50}値は84.0 nmol/Lであり，rhTPOのEC_{50}値は0.08 nmol/Lであった [2.6.2.2.1.1項参照]．同様に，ルストロンボパグの代謝物であるルストロンボパグ-脱ヘキシル体 (DH) 及びルストロンボパグ-5-ケト体 (5-ケト体) の増殖活性を調べたところEC_{50}値はそれぞれ34861.0及び555.7 nmol/Lであり，両代謝物がルストロンボパグの薬理作用に影響する可能性は低いと考えられた [2.6.2.2.1.2項参照]．

ルストロンボパグのTPO受容体に対する特異性を確認する目的で，サイトカイン依存性細胞株に対する増殖活性を，Ba/F3細胞にヒトEPO受容体発現細胞，ヒト顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) 依存性NOMO-1細胞株並びに，ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) 及びヒトIL-3依存性TF-1細胞株を用いて検討した結果，ルストロンボパグはいずれの細胞に対しても増殖活性を示さなかった [2.6.2.2.1.3項参照]．

ルストロンボパグの細胞内シグナル伝達経路系を調べた結果，ルストロンボパグ (3 μmol/L) はヒトTPO (1 nmol/L) と同様に，ヤヌスキナーゼ2 (JAK2)，STAT3，STAT5，p44/42 MAPKのリン酸化を促進した．このことから，ルストロンボパグはヒトTPOと同様のシグナル伝達系を活性化することが示された [2.6.2.2.1.4項参照]．

ルストロンボパグのヒト骨髄由来CD34陽性細胞に対する巨核球コロニー形成能を検討した結果，12日間の培養によって巨核球コロニーが形成された．ヒトTPO (1.846 nmol/L) 添加群における巨核球コロニー形成細胞数の平均値の50%に達する濃度をEC_{50}と定義し算出した結果，ルストロンボパグのEC_{50}値は0.31 μmol/Lであった．光学異性体である (+)-ルストロンボパグのEC_{50}値は0.19 μmol/Lであったが，本薬中に微量しか含まれないため薬理作用に影響する可能性は低いと考えられた [2.6.2.2.1.5項参照]．

ルストロンボパグの血小板造血作用を雌性TPOR-Ki/Shiマウス (8例/群) を用いて検討した．ルストロンボパグ0 (対照)，0.3，1，3及び10 mg/kg/日を21日間反復経口投与し，群分け時，投与7，14，21日後に血小板数を測定した結果，ルストロンボパグは0.3 mg/kg/日以上の用量で用量依存的に有意な血小板数の増加を惹起し，血小板数は経日的に増加した．対照化合物として用いた類薬のエルトロンボパグ (2，10，50 mg/kg/日) でも同様に，10 mg/kg/日以上の用量で

有意な血小板数の増加が認められた [2.6.2.2.2 項参照].

ルストロンボパグを 42 日間反復経口投与したときの血小板造血作用を TPOR-Ki/Shi マウス (10 例/群) で検討した. ルストロンボパグ 0 (対照), 0.3, 1 及び 3 mg/kg/日を反復経口投与し, 7 日間間隔で血小板数の推移を調べた. Day 8 以降, いずれの用量でも有意な血小板増加が認められた. 0.3 mg/kg の用量では Day 8 以降, 血小板数は一定に推移した. また, 1 及び 3 mg/kg の用量でも Day 29 以降, 血小板数は一定の値で推移した [2.6.2.2.2 項参照].

ルストロンボパグの骨髄での血小板造血作用を裏付ける骨髄での巨核球産生亢進を雌性 TPOR-Ki/Shi マウス (12 例/群) で検討するとともに, 薬効用量において血小板造血に付随した他の変化の有無について, 血液学的, 血液化学的並びに病理組織学的検査で確認した. ルストロンボパグ 0 (対照), 0.3 及び 10 mg/kg を 21 日間の反復経口投与終了翌日に, 血液学的検査 (各用量 4 例), 血液凝固系検査 (各用量 4 例), 血液化学的検査 (各用量 3 又は 4 例), 骨髄や脾臓を含めた諸器官・組織の病理組織学的検査 (各用量 9 又は 10 例) 及び骨髄の巨核球数の計測 (各用量 9 又は 10 例) を実施した. その結果, ルストロンボパグの 10 mg/kg/日投与群では有意な血小板数の増加が認められた. また, 骨髄では巨核球数の有意な増加が認められた. さらに, 病理組織学的検査では, 骨髄や脾臓以外にも肺や肝臓で巨核球数の増加が認められた. これら薬効及びそれを裏付ける指標の変化以外に, ルストロンボパグの 10 mg/kg/日投与群で赤血球数 (RBC), ヘモグロビン (Hb) 量及びヘマトクリット (Ht) 値の有意な減少並びに乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性の上昇傾向がみられたが, いずれも軽度であった. 血液凝固系検査では特記すべき変化は認められなかった. 対照化合物として類薬であるエルトロンボパグ (10 及び 50 mg/kg/日) を用いて同様に検討した結果, 50 mg/kg/日投与群で有意な血小板数の増加が認められ, 骨髄では巨核球数の有意な増加が認められた. さらに, 病理組織学的検査では, 骨髄や脾臓以外に肺で巨核球数の増加が認められた. エルトロンボパグの 50 mg/kg/日投与群ではルストロンボパグと同様の RBC 及び Ht 値の有意な減少並びに LDH 活性の有意な上昇がみられたが, 血液凝固系検査での変化は認められなかった [2.6.2.2.3 項参照].

TPOR-Ki/Shi マウスにルストロンボパグ (0.3, 1, 3 及び 10 mg/kg/日) を 21 日間反復経口投与したときの血小板造血作用 [薬力学 (PD)] 及びルストロンボパグ (0.3, 3 及び 10 mg/kg) を単回経口投与したときの血漿中薬物濃度 [薬物動態 (PK)] のデータに基づいて PK/PD 解析を行った. Day 8, 15 又は 22 の血小板増加率と血漿中のルストロンボパグ濃度との関係を検討した結果, 血小板増加率は, PK 指標である時間 0 から無限大までの血漿中薬物濃度－時間曲線下面積 (AUC_{inf}) 並びに最高血漿中薬物濃度 (C_{max}) と相関した [2.6.2.2.4 項参照].

2.4.2.2 副次的薬理試験

ルストロンボパグがヒト EPO 及びヒト G-CSF の造血系コロニー形成に与える影響を, ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞を用いたコロニーアッセイで検討した. その結果, ルストロンボパグは巨核球以外の赤血球系又は顆粒球・マクロファージ系細胞への分化を誘導せず, EPO 及び G-CSF による造血系コロニー形成能にも影響を与えないことが明らかになった [2.6.2.3.1 項参照].

2.4.2.3 安全性薬理試験

ルストロンボパグ 0 (対照), 40, 200 及び 1000 mg/kg を雄性 Sprague-Dawley 系ラット (8 例/群) に単回経口投与し，一般症状及び行動について，機能観察総合評価法を用いて検討した．その結果，ルストロンボパグの 40 及び 1000 mg/kg 投与群で，媒体 [Tween 80 を 5%含有するポリエチレングリコール 400 (PEG/Tween 80)] 対照群に比して有意な一過性かつ軽度の自発運動量の亢進が認められたが，200 mg/kg 投与群では認められなかった．その他の一般症状及び行動の観察項目にルストロンボパグに起因する変化は認められなかった [2.6.2.4.1.1 項参照].

媒体 [0.5% メチルセルロース (MC) 水溶液] 及びルストロンボパグの 100, 300 及び 500 mg/kg の用量で，雄性ビーグルイヌ (4 例) に 7 日間間隔で漸増的に経口投与し，テレメトリー及びホルター心電図測定法を用いて血圧，心拍数及び心電図を測定した．その結果，いずれの用量でも影響は認められなかった．また，100, 300 及び 500 mg/kg 投与時の C_{max} は，それぞれ 3.79, 5.73 及び 7.63 μg/mL であり，最高血漿中薬物濃度到達時間 (T_{max}) は，それぞれ 5.0, 3.5 及び 3.0 時間，時間 0 から 24 時間までの血漿中薬物濃度-時間曲線下面積 ($AUC_{0\text{-}24hr}$) は，それぞれ 63.64, 81.84 及び 106.37 μg·hr/mL であった [2.6.2.4.1.2.1 項参照].

雄性 Hartley 系モルモットから摘出した右心室乳頭筋標本 (5 例/群) を用い，ルストロンボパグを 0.1, 1 及び 10 μmol/L (0.06, 0.59 及び 5.92 μg/mL) の濃度で適用し，活動電位振幅，静止膜電位，脱分極最大立ち上がり速度並びに 30%及び 90%再分極時の活動電位持続時間 (APD_{30} 及び APD_{90}) を測定した．その結果，ルストロンボパグはいずれの濃度においても，いずれのパラメータに影響を及ぼさなかった [2.6.2.4.1.2.2 項参照].

ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子 (hERG) チャネルを発現させた HEK293 細胞 (5 例/群) を用い，ルストロンボパグを 0.1, 1 及び 10 μmol/L の濃度で適用し，遅延整流 K^+電流を測定した結果，テールピーク電流の有意な抑制が観察され，適用前値に対する抑制率はそれぞれ，17.0%, 29.0% 及び 38.3%であった．検討した最高濃度である 10 μmol/L の抑制率は 50%に到達しなかったが，50%阻害濃度 (IC_{50}) を推定値として算出した結果，70.04 μmol/L (41.4 μg/mL) であった [2.6.2.4.1.2.3 項参照].

ルストロンボパグを 0 (対照), 40, 200 及び 1000 mg/kg の用量で，雄性 Sprague-Dawley 系ラット (6 例/群) に単回経口投与し，呼吸数，1 回換気量及び 1 分間当たりの換気量を，無拘束下で whole-body plethysmograph 法により測定した結果，いずれの用量でも，いずれのパラメータに影響を及ぼさなかった [2.6.2.4.1.3 項参照].

イヌ 1 ヵ月反復経口投与毒性試験の心電図検査で第 2 度房室ブロック (3 及び 10 mg/kg/日投与群) 及び PR 延長 (媒体，3 及び 300 mg/kg/日投与群) が認められた [2.6.6.3.2.1 項参照]．そこで，媒体として用いた PEG/Tween 80 の心電図に及ぼす影響を検討するため，雌性ビーグルイヌ (3～4 例/群) に 0.5% MC 水溶液を 1.5 mL/kg/日 (対照) 又は PEG/Tween 80 を 1.5 若しくは 5 mL/kg/日で 3 日間反復経口投与したときの心電図への影響をホルター心電図測定法により検討した．不整脈の観察及び心電図パラメータの解析を実施した結果，対照群には心電図への影響は認められなかったが，PEG/Tween 80 の 1.5 及び 5 mL/kg/日投与群では，全例で 3 日間ともに Wenckebach 型の第 2 度房室ブロックが観察された [2.6.2.4.2.1 項参照].

また，媒体 PEG/Tween 80 の影響を除くため，被験物質をルストロンボパグのナトリウム塩に，

媒体を注射用水にそれぞれ変更して，28 日間反復経口投与時のイヌ心電図に対する影響を検討した．雄性ビーグルイヌにルストロンボパグナトリウム塩を 200 mg/kg/日の用量で経口投与し，ホルター心電計による心電図を記録した．群構成は，媒体投与群を 3 例，ルストロンボパグナトリウム塩投与群を 6 例の計 2 群とした．その結果，ルストロンボパグナトリウム塩投与群 5 例 (先天的に房室ブロックを有しているイヌと判断された個体を除く) では，投与 7 日後に 2 例で第 2 度房室ブロックが観察されたのみで，発現頻度は媒体投与群よりも少なかった．本試験での血漿中ルストロンボパグの C_{max} (Day 28 : 17.26 μg/mL) は，イヌ 1 ヵ月反復経口投与毒性試験の 10 mg/kg/日投与群の C_{max} (Day 29 : 16.05 μg/mL) とほぼ同じであった．この結果から，イヌ 1 ヵ月反復経口投与毒性試験で観察された房室ブロックは，ルストロンボパグに起因するものではなく，投与媒体である PEG/Tween 80 により発現したと考えられる [2.6.2.4.2.2 項参照].

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 吸収

非絶食下の雄性 Sprague-Dawley ラットに [^{14}C]-ルストロンボパグのポリエチレングリコール 400 (PEG) 溶液を 3 mg/kg の用量で単回経口投与したとき，[^{14}C]-ルストロンボパグの吸収は緩やかで，血漿中放射能濃度は投与後 7.0 時間で C_{max} (1.61 μg/mL，ルストロンボパグ換算濃度；以下同様) に達し，終末相消失半減期 ($t_{1/2,z}$) は 8.2 時間であった．血漿中未変化体濃度は放射能と同様，投与後 7.0 時間で C_{max} (1.30 μg/mL) に達し，$t_{1/2,z}$ は 7.0 時間であった．血漿中未変化体/放射能の AUC 比率は約 74%であり，血漿中放射能の多くは未変化体であることが示された．また，光学異性体である (+)-ルストロンボパグの血漿中濃度測定の結果，ラット生体内では (+)-ルストロンボパグへのキラル反転は起こらないと考えられる [2.6.4.3.1 項参照].

非絶食下の雄性 Sprague-Dawley ラットにルストロンボパグを 1 及び 2 mg/kg の用量で単回静脈内投与したとき，AUC_{inf} は用量の増加に比例して増大し，全身クリアランス (CL_t) 及び定常状態分布容積 (V_{ss}) に変化は認められなかった．この結果から，2 mg/kg までの用量で線形性が確認された．また，経口投与と同様，静脈内投与においても生体内での (+)-ルストロンボパグへのキラル反転は起こらないと考えられる [2.6.4.3.2.1 項参照].

非絶食下の雄性 Sprague-Dawley ラットにルストロンボパグの PEG 溶液あるいは MC 懸濁液を 1，3 及び 10 mg/kg の用量で単回経口投与し，媒体による影響を検討した．PEG 溶液では，1，3 及び 10 mg/kg 単回経口投与後の C_{max} 及び AUC_{inf} は，いずれも用量の増加に比例して増大し，10 mg/kg までの用量で線形性が確認された．また，バイオアベイラビリティ (BA) は，それぞれ 51.8%，48.5%及び 44.5%であった．一方，MC 懸濁液では，1 及び 3 mg/kg 単回経口投与後の C_{max} 及び AUC_{inf} は，用量の増加に比例して増大したが，10 mg/kg では C_{max} 及び AUC_{inf} は用量比以下の増大となり，10 mg/kg では吸収が飽和傾向にあることが示唆された．また，1 及び 3 mg/kg 単回経口投与後の BA は，それぞれ 23.0%及び 21.1%であり，PEG 溶液を媒体に用いた場合に比べて約 1/2 に低下した [2.6.4.3.2.2 項参照].

絶食及び非絶食下の雄性 Sprague-Dawley ラットにルストロンボパグの PEG 溶液を 3 mg/kg の用量で単回経口投与したときの吸収に及ぼす食餌の影響について検討した．絶食及び非絶食下ラットでは，ルストロンボパグの C_{max} は，それぞれ 1.52 及び 1.47 μg/mL，T_{max} は，それぞれ 5.5

及び 6.0 時間，AUC_{inf}は，それぞれ 23.5 及び 25.3 μg·hr/mL，BA は，それぞれ 45.1%及び 48.5%とほぼ同じであった．この結果から，ルストロンボパグをラットに経口投与した場合，吸収に及ぼす食餌の影響はないと考えられる [2.6.4.3.3 項参照].

非絶食下の雄性 Sprague-Dawley ラットに [^{14}C]-ルストロンボパグの PEG 溶液を 3 mg/kg/日の用量で 14 日間反復経口投与したとき，血漿中放射能濃度は単回 (初回) 投与後 5.0 時間で C_{max} (1.34 μg/mL) に達し，投与後 12～48 時間の消失半減期 ($t_{1/2}$) は 8.1 時間，AUC_{inf}は 23.1 μg·hr/mL であった．14 日間の反復投与期間の後，これらの薬物動態パラメータに顕著な変化はみられなかった．さらに，単回 (初回) 経口投与後，ルストロンボパグの血漿中濃度は 4.0 時間で C_{max} (1.13 μg/mL) に達し，投与後 12～48 時間での $t_{1/2}$ 及び終末相消失半減期 ($t_{1/2,z}$) はそれぞれ 6.8 及び 7.0 時間であり，AUC_{inf}は 17.4 μg·hr/mL であった．血漿中ルストロンボパグについても反復投与後の薬物動態パラメータに顕著な変化がみられなかった．以上の結果から，ラットでは血漿中放射能及び血漿中未変化体濃度に与える反復経口投与の影響はないことが示された [2.6.4.3.4 項参照].

非絶食下の雄性ビーグルイヌに [^{14}C]-ルストロンボパグを 1 mg/kg の用量で単回静脈内投与したとき，血漿中未変化体の CL_t は 1.02 mL/min/kg と低く，V_{ss} は 0.311 L/kg と小さかった．血漿中未変化体/放射能の AUC 比率は 59%であり，血漿中放射能の多くは未変化体として存在することが示された．非絶食下の雄性ビーグルイヌに [^{14}C]-ルストロンボパグの PEG 溶液を 3 mg/kg の用量で単回経口投与したとき，血漿中放射能及び未変化体の T_{max} はいずれも 2.7 時間で，ラット (7.0 時間) と比べ速かった．血漿中放射能及び未変化体の C_{max} は，それぞれ 4.34 及び 3.74 μg/mL を示し，いずれもラットに比べて 2 倍以上であった．また，血漿中放射能及び未変化体の $t_{1/2,z}$ は，それぞれ 45 及び 13 時間で，放射能の消失はラットに比べ遅いが，未変化体の消失はラットとほぼ同じであった．血漿中未変化体/放射能の AUC 比率は約 58%であり，血漿中放射能の多くは静脈内投与時と同様，未変化体として存在することが示唆された．3 mg/kg 単回経口投与後の BA は 74.9%であった．また，ラットと同様，イヌの生体内でも光学異性体である (+)-ルストロンボパグへのキラル反転は起こらないと考えられる [2.6.4.3.5 項参照].

非絶食下の雄性ビーグルイヌにルストロンボパグの PEG 溶液を 1，3 及び 10 mg/kg の用量で単回経口投与したとき，C_{max} 及び AUC_{inf} は，いずれも用量の増加に比例して増大し，10 mg/kg までの用量で線形性が確認された [2.6.4.3.6 項参照].

絶食及び非絶食下の雄性ビーグルイヌにルストロンボパグの PEG 溶液を 3 mg/kg の用量で単回経口投与したときの吸収に及ぼす食餌の影響について検討した．絶食及び非絶食下イヌではルストロンボパグの C_{max} は，それぞれ 2.33 及び 3.87 μg/mL，AUC_{inf} は，それぞれ 27.5 及び 45.5 μg·hr/mL であり，C_{max} 及び AUC_{inf} は非絶食時にいずれも約 1.7 倍に増大し，食餌の影響が認められた [2.6.4.3.7 項参照].

ルストロンボパグの薬効評価動物の雌性 TPOR-Ki/Shi マウスに，非絶食下でルストロンボパグの MC 懸濁液を 0.3, 3 及び 10 mg/kg の用量で単回経口投与し，用量相関性について検討した．C_{max} 及び AUC_{inf} は用量の増加に比例して増大し，10 mg/kg までの用量で線形性が確認された [2.6.4.3.8 項参照].

2.4.3.2 分布

非絶食下の雄性 Sprague-Dawley ラットに [^{14}C]-ルストロンボパグの PEG 溶液を 3 mg/kg の用量で単回経口投与し，放射能の組織移行性を定量的全身オートラジオグラフィ (QWBA) により検討した．[^{14}C]-ルストロンボパグの吸収は緩やかで，ほとんどの組織で投与後 8 時間の測定時点で最高濃度に達した．最も高い放射能分布を示したのは肝臓で，次いで副腎皮質であった．腎皮質，副腎髄質，膵臓，心筋，松果体及び褐色脂肪において 2 μg/g 以上の濃度を示したが，脊髄及び脳は低濃度であった．また，胆管内の胆汁に高レベルの放射能が認められたが，膀胱尿は低かった．投与後 2～24 時間の骨髄/血液濃度比は 0.5～0.8 であった．投与後 72 時間では，測定した組織の半数で定量下限未満の濃度に低下したが，副腎皮質，包皮腺及び副腎髄質に比較的高濃度の放射能分布が認められた [2.6.4.4.1.1 項参照].

非絶食下の雌性 Sprague-Dawley ラットについて同様に検討したところ，雄性ラットと同様，[^{14}C]-ルストロンボパグの吸収は緩やかで，ほとんどの組織で投与後 8～12 時間の測定時点で最高濃度に達した．最も高い放射能分布を示したのは肝臓で，次いで副腎皮質，ハーダー腺，副腎髄質，腎皮質，膵臓の順であった．脳及び脊髄は低濃度であった．投与後 2～24 時間の骨髄/血液濃度比は 0.6～0.8 であった．投与後 72 時間でも高い濃度を示したのは副腎皮質で，次いで卵巣であった [2.6.4.4.1.2 項参照].

非絶食下の雄性有色ラット (Lister-Hooded 系統) に [^{14}C]-ルストロンボパグの PEG 溶液を 3 mg/kg の用量で単回経口投与し，放射能の組織移行性を QWBA により検討した．有色ラットの放射能の組織分布様式はアルビノラットとほぼ同じで，メラニン含有組織である眼窩外涙腺あるいはブドウ膜への特異的な放射能分布は認められなかった．この結果から，ルストロンボパグ及びその代謝物のメラニンへの結合性はないことが示唆された．投与後 35 日に副腎皮質 (0.441 μg/g) のみに放射能が検出された [2.6.4.4.1.3 項参照].

非絶食下の雄性 Sprague-Dawley ラットに [^{14}C]-ルストロンボパグを 3 mg/kg/日の用量で 14 日間反復経口投与し，放射能の組織移行性を QWBA により検討した．最終 14 回目の投与後で放射能は広範囲に緩やかに分布し，ほとんどの組織で最終投与後 12 時間で最高濃度に達した．最も高い放射能分布を示したのは肝臓であり，次いで副腎皮質，包皮腺，ハーダー腺，腎皮質，膵臓の順であった．一方，精嚢，脊髄，脳及び水晶体は低濃度であった．ほとんどの組織で最終投与後 336 時間で最低濃度となり，血漿を含む半数以上の組織で定量下限未満であった．この時，最も高い放射能濃度を示したのは，副腎皮質であり，次いで副腎髄質及び肝臓であった [2.6.4.4.1.4 項参照].

妊娠 19 日齢の Sprague-Dawley ラットに非絶食下で [^{14}C]-ルストロンボパグの PEG 溶液を 3 mg/kg の用量で単回経口投与し，放射能の組織移行性及び胎盤通過性を QWBA により検討した結果，胎児の組織中放射能濃度は投与後の時間の経過とともに徐々に上昇し，大部分の組織が 24 時間後に最高濃度に達した．胎児の組織では母動物と同様，副腎の濃度が高く (2.29 μg/g)，次いで褐色脂肪 (1.13 μg/g)，肝臓 (0.962 μg/g) の順であった．これらの結果は，ルストロンボパグ由来の放射能が胎盤を通過し，胎児に移行することを示している [2.6.4.4.2 項参照].

非絶食下の雌性 Sprague-Dawley ラットに [^{14}C]-ルストロンボパグの PEG 溶液を 10 mg/kg の用量で単回経口投与したとき，副腎中の放射能のほとんどはエタノールで抽出可能であり，副

腎組織に共有結合する物質由来の放射能の濃度は投与後 24 及び 72 時間でそれぞれ 1.81 及び 0.990 pmol/mg protein と極めて低く，また，分析の結果，副腎抽出物中の放射能の大部分は未変化体であった．この結果から，ラットの副腎組織における放射能の残留形態は，組織への共有結合ではないことが示された． [2.6.4.4.3 項参照].

雄性 ICR マウス，雌性 TPOR-Ki/Shi マウス，雄性 Sprague-Dawley ラット，雌性日本白色ウサギ，雄性ビーグルイヌ及びヒト (男性) の *in vitro* 血漿たん白結合率をルストロンボパグとして 5～50 μg/mL の濃度範囲で検討した結果，いずれの種も 99.9%以上の高い結合率を示した [2.6.4.4.4 項参照].

雄性 ICR マウス，雌性 C57BL/6J マウス，雄性 Sprague-Dawley ラット，雌性日本白色ウサギ，雄性ビーグルイヌ及びヒト (男性) の新鮮血液を用いて，*in vitro* 血球移行率を [^{14}C]-ルストロンボパグとして 0.5～50 μg/mL の濃度範囲で検討した結果，ラット，イヌ，ヒトで血球移行性がわずかに認められた (0.07%～2.86%) が，マウス及びウサギでは認められなかった [2.6.4.4.5.1 項参照]．また，雄性 Sprague-Dawley ラット及び雄性ビーグルイヌを対象に，[^{14}C]-ルストロンボパグを 3 mg/kg の用量で単回経口投与後の放射能の血球移行性について検討した結果，*in vivo* 血球移行率はラットで 1.4%～6.1%，イヌで 0%～4.4%と，いずれの種もわずかであり，*in vitro* 試験と同様の結果が得られた [2.6.4.4.5.2 項参照].

2.4.3.3 代謝

非絶食下の雄性 Sprague-Dawley ラットに [^{14}C]-ルストロンボパグの PEG 溶液を 3 mg/kg の用量で単回経口投与し，血漿，尿，糞及び胆汁中代謝物を検索した結果，血漿中放射能の大部分 (70%～80%) は未変化体であり，代謝物としてβ酸化カルボン酸体 (BOCA) 及び 5-ケト体が検出されたが，これらの代謝物は血漿中放射能のそれぞれ，ND (検出されず)～1.1%及び 1.8%～5%であった．尿中に排泄された総放射能は投与量の 0.5%であり，未変化体，BOCA 及び 5-ケト体はいずれも検出されなかった．糞中に排泄された総放射能は投与量の 96%であり，その多くは未変化体であった．糞中の主要な代謝物は BOCA であり，加えて 5-ケト体も微量検出された．胆汁中の主な代謝物はβ酸化カルボン酸タウリン抱合体 (TC-BOCA) (投与量の 9.4%) と推定され，BOCA も検出された．胆汁中の未変化体は微量であった [2.6.4.5.1 項参照].

非絶食下の雄性ビーグルイヌに [^{14}C]-ルストロンボパグの PEG 溶液を 3 mg/kg の用量で単回経口投与し，血漿，尿，糞及び胆汁中代謝物を検索した結果，血漿中放射能の大部分 (約 80%) はラットと同様に，未変化体であり，代謝物として BOCA 及び 5-ケト体が検出されたが，これらの代謝物は血漿中放射能のそれぞれ 0.4%～1.6%及び 3.7%～4.4%であった．尿中に排泄された総放射能は投与量の 0.4%であり，未変化体が微量検出された．糞中に排泄された総放射能は投与量の 91%であり，その多くは未変化体であった．代謝物として，BOCA 及び 5-ケト体が検出された．胆汁中の主な代謝物は DH (投与量の 4.6%) と推定され，BOCA 及び 5-ケト体も検出された．胆汁中の未変化体は微量であった [2.6.4.5.2 項参照].

非絶食下の雌性 TPOR-Ki/Shi マウスに [^{14}C]-ルストロンボパグの PEG 溶液を 3 mg/kg の用量で単回経口投与し，血漿中代謝物を検索した結果，血漿中放射能の大部分 (約 80%) は未変化体であった．代謝物として 5-ケト体が検出されたが，血漿中放射能の 3.5%～3.8%であった

[2.6.4.5.3 項参照].

非絶食下の雄性ICRマウスに [^{14}C]-ルストロンボパグのPEG溶液を10 mg/kgの用量で単回経口投与し，血漿中代謝物を検索した結果，血漿中放射能の大部分 (70%～80%) は未変化体であり，代謝物としてDH及び5-ケト体が検出されたが，これらの代謝物はいずれも血漿中放射能のそれぞれ1.8%～2%及び1.7%～1.8%であった．血漿中に比較的多量のアシルグルクロナイドが検出され，投与後2及び6時間において血漿中放射能の7.7%及び15.9%であった．その他，BOCAのタウリン抱合体も検出された [2.6.4.5.4 項参照].

非絶食下の雌性日本白色ウサギに [^{14}C]-ルストロンボパグのPEG溶液を10 mg/kgの用量で単回経口投与し，血漿中代謝物を検索した結果，血漿中放射能の大部分 (約 90%) は未変化体であり，代謝物としてDH，BOCA及び5-ケト体が検出されたが，これらの代謝物は血漿中放射能のそれぞれ0.4%～0.6%，0.2%～0.3%及び1.8%～3.5%であった [2.6.4.5.5 項参照].

[^{14}C]-ルストロンボパグ (10及び50 μmol/L) を凍結ヒト肝細胞と反応させた時の反応液中の代謝物を検索した結果，放射能の大部分 (80%～90%) は未変化体として残存していた．代謝物としてアシルグルクロナイド (Acyl-GN) (推定) が主に検出 (6%～15.3%) され，BOCA及び5-ケト体もわずかに検出された．さらに，2種類の代謝物が検出され，DH及びルストロンボパグのヘキシル基の水酸化体と推定された．ヒト遊離肝細胞において，ルストロンボパグの (+)-ルストロンボパグへのキラル反転は認められなかった [2.6.4.5.6 項参照].

[^{14}C]-ルストロンボパグを用いたヒトマスバランス試験で代謝物を検索した結果，血漿中放射能のうち約97%が未変化体として検出されたが，糞中の未変化体は投与された放射能の約16%と低く，β 酸化関連代謝物 (推定) が約 35%検出され，ルストロンボパグの主代謝経路は，*O*-ヘキシル側鎖のω酸化及びそれに続くβ酸化であると推定された [2.7.2.2.2.5 項参照]．発現チトクローム P450 (CYP) 酵素による6-ヒドロキシ体 (ω酸化体) の生成評価，ヒト肝ミクロソーム及びヒト肝細胞と典型的なCYP阻害剤を用いたω酸化体の生成阻害評価の結果，ω酸化体生成の主要な責任代謝酵素はCYP4A11を含むCYP4系酵素であることが示された．また，ヒト肝細胞を用いた阻害評価において，CYP4阻害剤によりω酸化体とβ酸化体の生成が同様に阻害されたことから，ルストロンボパグの代謝では，ω酸化に引き続きβ酸化が起こることが示唆された．また，CYP3A4においては，ヒト肝細胞を用いた阻害評価で，阻害剤の影響が一部認められたことから，寄与は低いもののω酸化体の生成に関与するものと考えられる． [2.6.4.5.7 項参照]. 推定されるルストロンボパグの代謝経路については2.6.4.5.8項の図2.6.4.5-1に示した.

2.4.3.4 排泄

非絶食下の雄性Sprague-Dawleyラットに [^{14}C]-ルストロンボパグのPEG溶液を3 mg/kgの用量で単回経口投与し，尿及び糞中放射能排泄について検討した．投与後96時間までの尿中に投与放射能の0.5%，糞中に98.0%，合計98.6%が排泄された．この結果から，ラットではルストロンボパグの主排泄経路は糞中であり，尿中への排泄は非常に少ないことが明らかとなった [2.6.4.6.1 項参照].

胆管カニュレーションを施した非絶食下の雄性Sprague-Dawleyラットに [^{14}C]-ルストロンボパグのPEG溶液を3 mg/kgの用量で単回経口投与し，尿，糞及び胆汁中放射能排泄について検

討した．投与後 48 時間までの尿中に投与放射能の 0.2%，胆汁中に 23.7%，糞中に 70.6%が排泄された．また，尿及び胆汁中放射能排泄率の和から求めたルストロンボパグの経口吸収率は 24%であった．この結果から，ラットではルストロンボパグの主排泄経路は胆汁を介した糞中排泄であることが確認された [2.6.4.6.2 項参照].

胆管カニュレーションを施した非絶食下の雄性 Sprague-Dawley ラットに [^{14}C]-ルストロンボパグの PEG 溶液を 3 mg/kg の用量で単回経口投与し，放射能の腸肝循環について検討した．腸肝循環率は投与量の 4.4%と低かった [2.6.4.6.3 項参照].

非絶食下の雄性 Sprague-Dawley ラットに [^{14}C]-ルストロンボパグの PEG 溶液を 3 mg/kg/日の用量で 14 日間反復経口投与し，尿及び糞中放射能排泄について検討した．尿中に投与放射能の 0.4%，糞中に 98.2%，合計 98.6%が排泄された．この結果から，反復投与後の主排泄経路は単回投与と同様，糞中であることが明らかとなり，尿糞中放射能排泄率も単回投与と同程度であった [2.6.4.6.4 項参照].

非絶食下の雄性ビーグルイヌに [^{14}C]-ルストロンボパグの PEG 溶液を 3 mg/kg の用量で単回経口投与し，尿及び糞中放射能排泄について検討した．投与後 168 時間までの尿中に投与放射能の 0.4%，糞中に 97.6%，合計 98.1%が排泄された．この結果から，イヌの主排泄経路もラットと同様，糞中であり，尿中への排泄は非常に少なかった [2.6.4.6.5 項参照].

胆管カニュレーションを施した非絶食下の雄性ビーグルイヌに [^{14}C]-ルストロンボパグの PEG 溶液を 3 mg/kg の用量で単回経口投与し，尿，糞及び胆汁中放射能排泄について検討した．尿中に投与放射能の 0.3%，胆汁中に 20.6%，糞中に 75.5%が排泄された．この結果から，イヌにおけるルストロンボパグの主排泄経路はラットと同様，胆汁を介した糞中排泄であり，尿及び胆汁中放射能排泄率の和から求めたルストロンボパグの経口吸収率は約 20%であった [2.6.4.6.6 項参照].

分娩後の哺乳 Sprague-Dawley ラットに非絶食下で [^{14}C]-ルストロンボパグの PEG 溶液を 3 mg/kg の用量で単回経口投与し，放射能の乳汁への移行性について検討した．乳汁中の放射能濃度は，投与後 12 時間に 4.87 μg/mL の最高濃度を示し，48 時間後には 0.492 μg/mL に低下した．投与後 2 時間における乳汁/血漿濃度比は 0.558 であったが，48 時間後では 6.74 となり，乳汁のほうが血漿よりも高い濃度を示した [2.6.4.6.7 項参照].

2.4.3.5 薬物動態学的薬物相互作用

ヒト肝の CYP 分子種 [1A2，2A6，2B6，2C8，2C9，2C19，2D6，2E1，3A4/5 (4 種の基質) 及び 4A11] に対して，ルストロンボパグの濃度依存的 (1～75 μmol/L) 及び時間依存的 (0 及び 30 分) な影響を，*in vitro* ヒト肝ミクロソーム系で検討した．ルストロンボパグの濃度依存的な阻害の IC_{50} 値は，CYP1A2，2A6，2B6，2C8，2C9，2C19，2D6，2E1，3A4/5 及び 4A11 のそれぞれで 34, 9.8, 13, 5.0, 7.2, 27, 26, > 75, 8.8～30 (4 種の基質) 及び 22 μmol/L であった．CYP2C8，2C9 及び 3A4/5 に対する阻害定数は，それぞれ 3.5, 5.3 及び 4.5 μmol/L であった．また，CYP1A2，2A6 及び 2D6 に対しては時間依存的な阻害が認められたが，阻害様式は還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸非依存的であることが示唆された [2.6.4.7.1 項参照].

雌雄 Sprague-Dawley ラット 1 ヵ月反復経口投与毒性試験 (投与量:8, 40, 200 及び 1000 mg/kg/

日) でルストロンボパグの肝薬物代謝酵素系への影響を検討した．雌雄ともにテストステロン 16β 水酸化及びエトキシレゾルフィン *O*-脱エチル化活性の有意な上昇が認められ，血漿中薬物濃度とほぼ相関していたことから，ルストロンボパグはラット肝の CYP2B1 及び CYP1A に対して誘導能を有するものと推測された．また，雄ではミクロソームたん白質含量の軽微な上昇が認められたことから，ラット肝臓に対して誘導に関する影響を及ぼす可能性が示唆された [2.6.4.7.2 項参照].

雌雄ビーグルイヌ 1 ヵ月反復経口投与毒性試験 (投与量：3，10，30 及び 300 mg/kg/日) でルストロンボパグの肝薬物代謝酵素系への影響を検討した．有意な変動として，雄ではテストステロン 16α 水酸化活性の用量依存的な上昇が認められた．この上昇傾向は雌でも認められたことから，ルストロンボパグは CYP2B11 及び/又は CYP2C21 の誘導能を有するものと推測された [2.6.4.7.3 項参照].

ヒト初代培養肝細胞を用い，CYP1A2，CYP2C9，CYP3A4，ウリジン 2 リン酸–グルクロン酸転移酵素 (UGT) 1A2，UGT1A6 及び UGT2B7 のマーカー活性に対して，ルストロンボパグが及ぼす影響 (誘導能) を検討した結果，いずれの CYP 及び UGT 酵素活性に対しても誘導能を示さなかった [2.6.4.7.4 項参照].

Caco-2 細胞を用いた輸送実験により，ルストロンボパグが P-糖たん白質 (P-gp) の基質であるかを検討した結果，Caco-2 細胞の基底側 (血管側) から表層側 (管腔側) への [^{14}C]-ルストロンボパグのみかけの膜透過係数 (P_{app}) は，表層側から基底側への P_{app} の 2.6 倍 (P_{app} 比) であり，[^{14}C]-ルストロンボパグの排出方向への輸送が認められた．さらに，この [^{14}C]-ルストロンボパグの輸送は，P-gp の阻害剤であるベラパミルにより阻害されなかったものの，シクロスポリン A による阻害効果が認められたことから，ルストロンボパグは P-gp の弱い基質であることが示唆された．ベラパミルにより阻害されなかった理由の 1 つとして，P-gp のルストロンボパグ結合部位がベラパミルの結合部位と異なることが考えられた．Breast cancer resistance protein (BCRP) 発現 LLC-PK1 細胞を用いた輸送実験により，ルストロンボパグが BCRP の基質であるかを検討した結果，BCRP 発現/親細胞での P_{app} 比は 5.3 であり，典型的な BCRP 阻害剤である Ko143 存在下で P_{app} 比は 0.8 まで低下した．この結果から，ルストロンボパグは BCRP の基質であることが示された．肝取込みトランスポーター [有機アニオントランスポーターポリペプチド (OATP) 1B1，OATP1B3 又は有機カチオントランスポーター1 (OCT1)] 発現 HEK293 細胞を用いた細胞内取込み実験により，ルストロンボパグが各トランスポーターの基質であるかを検討した結果，OATP1B1，OATP1B3 又は OCT1 発現細胞での [^{14}C]-ルストロンボパグ取込み活性は親細胞と同程度であり，典型的な OATP1B1，OATP1B3 及び OCT1 阻害剤により阻害されなかった．この結果から，ルストロンボパグは OATP1B1，OATP1B3 及び OCT1 の基質ではないことが示された．以上の結果から，臨床において P-gp 及び BCRP 阻害剤との併用により，ルストロンボパグの血漿中濃度が影響を受ける可能性が示唆された [2.6.4.7.5 項参照].

Caco-2 細胞を用いた輸送実験により，ルストロンボパグ (0，50 及び 100 μmol/L) の P-gp に対する阻害能を検討した結果，[^{3}H]-ジゴキシンの P_{app} 比はそれぞれ，6.3，4.7 及び 2.8 であった．[^{3}H]-ジゴキシンの P_{app} 比はルストロンボパグの濃度依存的に低下したことから，ルストロンボパグは P-gp 輸送に対し弱い阻害作用 (IC_{50} 値：50～100 μmol/L) を持つことが示された．BCRP

発現 LLC-PK1 細胞を用いた輸送実験により，ルストロンボパグの BCRP に対する阻害能を検討した結果，BCRP に対するルストロンボパグの阻害作用が認められ，IC_{50} 値は 4.04 μmol/L であった．OATP1B1 又は OATP1B3 発現 HEK293 細胞を用いた細胞内取込み実験により，ルストロンボパグの各トランスポーターに対する阻害能を検討した結果，ルストロンボパグの阻害作用が OATP1B1 及び OATP1B3 に対し認められ，IC_{50} 値はそれぞれ 2.63 及び 9.58 μmol/L であった．これらの結果を基に，アメリカ食品医薬品局 (FDA)[3] 及び欧州医薬品庁 (EMA)[4] のガイダンスに記載されている薬物相互作用リスクの基準値から判断し，ルストロンボパグの臨床用量 3 mg では P-gp，BCRP，OATP1B1 及び OATP1B3 を阻害する可能性は低いと考えられる [2.6.4.7.6 項参照].

ヒト血清アルブミンにおけるルストロンボパグの結合サイトを明らかにするために，結合サイトの特異的阻害剤 (ジアゼパム，ワルファリン及びジギトキシン) を用いて検討した結果，ルストロンボパグは主にヒト血清アルブミンのジアゼパム及びワルファリンサイトに結合することが推察された [2.6.4.7.7 項参照].

2.4.4 毒性試験

2.4.4.1 一般毒性試験

2.4.4.1.1 単回投与毒性試験

ラット単回経口投与毒性試験では，Sprague-Dawley 系ラット (雌雄 5 例/群) にルストロンボパグを 0 [対照群：媒体 (PEG/Tween 80)]，500 及び 2000 mg/kg の用量で単回経口投与し，14 日間観察した．試験期間を通じて死亡例は発生しなかった．一般状態観察では，2000 mg/kg 投与群で未吸収の被験物質と思われる黄白色物を含んだ便が観察された．概略の致死量は 2000 mg/kg を超える量と判断した．血漿中ルストロンボパグの曝露量 (C_{max}，$AUC_{0\text{-}24hr}$) に明らかな性差は認められなかった [2.6.6.2.1 項参照].

イヌ単回経口投与毒性試験では，ビーグルイヌ (雌雄 1 例/群) にルストロンボパグを 0 [対照群：媒体 (PEG/Tween 80)]，500 及び 2000 mg/kg の用量で単回経口投与し，14 日間観察した．試験期間を通じて死亡例は発生しなかった．一般状態観察では，投与当日から翌日にかけて 500 及び 2000 mg/kg 投与の雌では嘔吐が観察された．概略の致死量は 2000 mg/kg を超える量と判断した．血漿中ルストロンボパグの曝露量 (C_{max}，$AUC_{0\text{-}24hr}$) は，雄では用量の増加に伴い増大したが，雌では 2000 mg/kg の投与群で嘔吐が認められ，曝露は 500 mg/kg 投与群より低かった [2.6.6.2.2 項参照].

2.4.4.1.2 反復投与毒性試験

ラット 1 ヵ月反復経口投与毒性試験では，Sprague-Dawley 系ラット (雌雄 12 例/群) にルストロンボパグを 0 [対照群：媒体 (PEG/Tween 80)]，8，40，200 及び 1000 mg/kg/日の用量で 1 ヵ月間反復経口投与し，1000 mg/kg/日投与群では 1 ヵ月間の休薬による回復性試験群 (各群雌雄 5 例) を設けた．試験期間を通じてルストロンボパグに起因した死亡例は発生しなかった．200 及び 1000 mg/kg/日投与群の雌に四肢，足蹠あるいは腹部に落屑，被毛粗剛が投与 9 日目から投与期間の後期にかけて散見された．血液学的検査では，40 mg/kg/日以上の投与群の雄及び 200

mg/kg/日投与群の雌でプロトロンビン時間 (PT) あるいは活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) の延長が認められた．さらに，200 mg/kg/日投与群の雌では RBC，Ht 値及び Hb 濃度が低値を示した．血液化学的検査では，200 mg/kg/日投与群の雌雄でアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)，アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)，アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の上昇並びに総たん白の減少が認められた．器官重量では，200 mg/kg/日投与群の雌で肝臓，腎臓及び副腎の重量増加と胸腺重量の減少が認められた．肉眼検査では，200 mg/kg/日以上の投与群の雄及び 40 及び 200 mg/kg/日投与群の雌で副腎の腫大が認められた．病理組織学的検査では，200 mg/kg/日以上の投与群の雄及び 40 mg/kg/日以上の投与群の雌で副腎皮質束状帯の肥大，200 mg/kg/日以上の投与群の雌で副腎皮質束状帯に単細胞壊死，200 mg/kg/日以上の投与群の雄及び 40 mg/kg/日以上の投与群の雌で表皮の過角化あるいは肥厚が認められた．1000 mg/kg/日投与群の 1 ヵ月回復試験終了時には，落屑，被毛粗剛，PT の延長，表皮の過角化と肥厚，副腎皮質束状帯の肥大は良好な回復性を示した．なお，最も高曝露を示した 200 mg/kg/日投与群で認められた変化については，回復群を設定しなかったため回復性を評価できなかった．血漿中ルストロンボパグの曝露量 (C_{max}，$AUC_{0\text{-}24hr}$) は 200 mg/kg/日投与までは用量の増加に伴って増大したが，1000 mg/kg/日投与では 200 mg/kg/日投与よりも低かった．200 mg/kg/日投与の曝露量は，雌の方が雄よりも高く，雌のみ反復投与による曝露量の増大が認められた．血漿中ルストロンボパグの曝露量は，200 mg/kg/日以上で用量の増加に伴う増大はが認められず，また雌雄でやや異なる挙動を示したが，各種の毒性所見は，曝露量の大小に依存して認められた．以上の結果から，無毒性量は 8 mg/kg/日と判断した [2.6.6.3.1.1 項参照].

ラット 6 ヵ月反復経口投与毒性試験では，Sprague-Dawley 系ラット (雌雄 12 例/群) にルストロンボパグを 0 [対照群：媒体 (PEG/Tween 80)]，2，20 及び 100 mg/kg/日の用量で 6 ヵ月間反復経口投与し，100 mg/kg/日投与群では 1 ヵ月間の休薬による回復性試験群 (各群雌雄 6 例) を設けた．試験期間を通じてルストロンボパグに起因した死亡例は発生しなかった．投与期間終了時の血液学的検査では，100 mg/kg/日投与群の雄で PT 及び APTT の延長が認められた．投与期間終了時の血液化学的検査では，20 mg/kg/日以上の投与群の雄でナトリウム及びクロールの増加が，100 mg/kg/日投与群の雌でナトリウムの増加が認められた．投与期間中期あるいは終了時の尿検査では，20 mg/kg/日以上の投与群の雌雄で尿たん白陽性の頻度が上昇した．器官重量では，20 mg/kg/日以上の投与群の雌で肝臓の重量増加が，100 mg/kg/日投与群の雌で腎臓の重量増加並びに卵巣重量の減少が認められた．肉眼検査では，20 mg/kg/日以上の投与群の雌の卵巣及び 100 mg/kg/日投与群の雌雄の副腎が褐色を帯びていた．さらに，100 mg/kg/日投与群の雄では肝臓の腫大が認められた．病理組織学的検査では，20 mg/kg/日以上の投与群の雌雄で副腎皮質球状帯細胞の萎縮，副腎皮質束状帯細胞の脂肪滴減少，腎糸球体の空胞化及び鉱質沈着が認められた．100 mg/kg/日投与群の雌で卵巣の黄体減少，嚢胞化卵胞及び膣粘膜上皮の粘液変性が認められ性腺系のホルモンの動きに関連する可能性が考えられたが，卵巣及び膣の病変は対照群にもみられる自然発生性の変化であり，その他，ホルモンの動きに関連する子宮，乳腺及び下垂体では変化が認められないことからも，毒性学的意義は低いと判断した．100 mg/kg/日投与群で認められた変化は，1 ヵ月回復試験終了時には，回復傾向を示した．20 mg/kg/日以上の投与群では，凝固系の延長，並びに腎臓，副腎，卵巣及び膣に軽度な変化が認められた．血漿中ル

ストロンボパグの曝露量 (C_{max}, $AUC_{0\text{-}24hr}$) は 2～20 mg/kg/日投与までは用量の増加に伴い増大したが，20～100 mg/kg/日の用量範囲では用量比以下で増大した．血漿中ルストロンボパグの曝露量は，すべての用量で雄よりも雌が高い傾向が認められ，また雌では反復投与により曝露量が増える傾向が認められた．以上の結果から，無毒性量は 2 mg/kg/日と判断した [2.6.6.3.1.2 項参照].

イヌ 1 ヵ月反復経口投与毒性試験及び追加試験では，ビーグルイヌ (各群雌雄 3 例) にルストロンボパグを 0 [対照群：媒体 (PEG/Tween 80)]，3，10，30 及び 300 mg/kg/日の用量で 1 ヵ月間反復経口投与し，300 mg/kg/日投与群では 1 ヵ月間の休薬による回復性試験群 (各群雌雄 2 例) を設けた．試験期間を通じて死亡例は発生しなかった．肉眼検査では，10 mg/kg/日以上の投与群の胆嚢壁が肉眼的に水腫様を呈し，病理組織学的検査では，10 mg/kg/日以上の投与群の雌雄でリンパ球の浸潤を伴う胆嚢粘膜固有層の軽度な水腫及び軽度な重量減少を伴う副腎の皮質束状帯細胞の軽度な萎縮が認められた．なお，ホルモンの動きに関連する下垂体では変化は認められなかった．300 mg/kg/日投与群の 1 ヵ月回復試験終了時には，これらの変化は回復していた．血漿中ルストロンボパグの曝露量 (C_{max}, $AUC_{0\text{-}24hr}$) は 30 mg/kg/日投与まで用量の増加に伴って増大したが，30 mg/kg/日投与群と 300 mg/kg/日投与群の曝露量に明らかな差はなかった．また，曝露量には性差及び反復投与による明らかな影響はなかった．心電図検査では 3 mg/kg/日投与群の雌雄各 1 例及び 10 mg/kg/日投与群の雄 1 例の第 2 度房室ブロックが認められ，3 及び 300 mg/kg/日投与群の雄各 1 例に PR 延長が認められたが，これらの所見は用量依存性を示さず，対照群においても PR 延長を示す例 (雄 1 例) が認められた．この 1 ヵ月投与毒性試験 (以降，本体試験と表記) の投薬群で認められた第 2 度房室ブロックは，媒体 (PEG/Tween 80) に起因する可能性が考えられたが [2.6.2.4.2.1 項参照]，ルストロンボパグに起因する可能性を完全には否定できなかったため，心電図への影響のない媒体 (0.5% MC) を用いて 1 ヵ月間投与による追加試験を実施した．ビーグルイヌ (各群雌雄 3 例) にルストロンボパグを 0 [対照群：媒体 (0.5% MC)]，100 及び 300 mg/kg/日の用量で 1 ヵ月間反復経口投与し，心電図への影響を評価した結果，いずれの個体にも心電図への影響は認められなかった．なお，300 mg/kg/日投与群の血漿中ルストロンボパグの曝露量 (C_{max}, AUC) は，本体試験で PEG/Tween 80 を媒体とした際における 3 mg/kg/日投与群の曝露量と同等又はそれ以上であった．さらに，安全性薬理フォローアップ試験でもイヌの心電図に及ぼすルストロンボパグの影響を検討した結果 [2.6.2.4.2.2 項参照]，本体試験の 3 mg/kg/日投与群で観察された第 2 度房室ブロックは，媒体である PEG/Tween 80 に起因すると考えられた．以上の成績から，本体試験の無毒性量は 3 mg/kg/日と判断した [2.6.6.3.2.1 項参照].

イヌ 3 ヵ月反復経口投与毒性試験では，ビーグルイヌ (各群雌雄 4 例) にルストロンボパグを 0 [対照群：媒体 (0.5% MC)]，10，80 及び 600 mg/kg/日の用量で 3 ヵ月間反復経口投与し，600 mg/kg/日投与群では 1 ヵ月間の休薬による回復性試験群 (各群雌雄 3 例) を設けた．試験期間を通じて死亡例は発生しなかった．肉眼検査では，600 mg/kg/日投与群の雄 3 例及び雌 4 例の副腎が褐色を呈していた．病理組織学的検査では，80 mg/kg/日以上の投与群の雄及び 600 mg/kg/日投与群の雌で，副腎皮質に軽度から中等度の脂肪滴減少が認められた．これらの変化は，1 ヵ月回復試験終了時には良好な回復性を示した．血漿中ルストロンボパグ曝露量 (C_{max}, $AUC_{0\text{-}24hr}$)

は用量比以下で増大した．曝露量に性差及び反復投与による影響は認められなかった．以上の結果から，無毒性量は雄 10 mg/kg/日，雌 80 mg/kg/日と判断した [2.6.6.3.2.2 項参照].

イヌ 9 ヵ月反復経口投与毒性試験では，ビーグルイヌ (雌雄 4 例/群) にルストロンボパグを 0 [対照群：媒体 (0.5% MC)], 3, 10 及び 100 mg/kg/日の用量で 9 ヵ月間反復経口投与し，100 mg/kg/日投与群では 1 ヵ月間の休薬による回復性試験群 (各群雌雄 3 例) を設けた．試験期間を通じて死亡例は発生しなかった．病理組織学的検査では，10 mg/kg/日以上の投与群の雄，100 mg/kg/日投与群の雌雄で，極軽度から軽度の胆嚢粘膜上皮の空胞化がみられ，100 mg/kg/日投与群の雌雄で極軽度の副腎皮質の脂肪滴減少が認められた．これらの変化は 1 ヵ月回復試験終了時には良好な回復性を示した．血漿中ルストロンボパグ曝露量 (C_{max}, $AUC_{0\text{-}24hr}$) は用量の増加に伴い増大した．曝露量に性差及び反復投与による影響は認められなかった．以上の結果から，無毒性量は雄 3 mg/kg/日，雌 10 mg/kg/日と判断した [2.6.6.3.2.3 項参照].

ビーグルイヌ 9 ヵ月反復経口投与毒性試験で認められた胆嚢粘膜上皮の空胞化について原因を調べるため，追加の病理組織学的評価を行った．9 ヵ月間投与した各群と 1 ヵ月間の休薬後の媒体対照群及び 100mg/kg/日投与群の全個体の胆嚢組織標本を用いて特殊染色により脂質及びムコ多糖の有無を確認した結果，胆嚢粘膜上皮の空胞化は脂肪の蓄積が原因であることが判明した [2.6.6.3.2.4 項参照].

2.4.4.2 遺伝毒性試験

細菌を用いる復帰突然変異試験でルストロンボパグの復帰突然変異誘発性を評価した．ネズミチフス菌 (TA98, TA100, TA1535, TA1537) 及び大腸菌 (WP2*uvrA*) の 5 菌株を用いて，代謝活性化系 (S9 mix) の有無の条件下でプレインキュベーション法による試験を実施した．いずれの菌株でも S9 mix の有無に関わらず，すべての処理用量で復帰変異コロニー数は陰性対照群と同程度であり，用量依存的な増加は認められず，再現性のある結果が得られたことから，細菌を用いる復帰突然変異試験は陰性と判断した [2.6.6.4.1 項参照].

ほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験でルストロンボパグの染色体異常誘発性を評価した．チャイニーズハムスター培養細胞を用いて，S9 mix 非存在下条件での 6 時間処理 (処理後 18 時間再培養) 及び 24 時間連続処理並びに S9 mix 存在下条件での 6 時間処理 (処理後 18 時間再培養) を実施した．いずれの処理条件でも，構造異常細胞及び数的異常 (倍数性) 細胞の有意な増加は認められなかったことから，ほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験は陰性と判断した [2.6.6.4.2 項参照].

げっ歯類骨髄細胞を用いる小核試験でルストロンボパグの *in vivo* 染色体異常誘発性を評価した．各群 5 例の雄性 CD1(ICR) マウスを用いてルストロンボパグを 0 [対照群：媒体 (PEG/Tween 80)], 500, 1000 及び 2000 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回 2 日間経口投与した．ルストロンボパグ投与群では，一般状態に変化は認められなかった．ルストロンボパグ投与群での多染性赤血球中の小核を有する細胞の頻度を求めたが，有意な増加は認められなかった．また，全赤血球のうちの多染性赤血球の割合は，いずれの投与群も陰性対照群と有意差はなく，骨髄細胞の増殖抑制は認められなかったことから，マウス小核試験は陰性と判断した [2.6.6.4.3 項参照].

2.4.4.3 がん原性試験

マウスがん原性試験では，マウス 13 週間反復経口投与がん原性予備試験の結果に基づき用量設定した．20 mg/kg/日を投与した際の曝露量 (AUC) は約 100 μg·hr/mL と推定され，慢性特発性血小板減少性紫斑病患者を対象とした臨床試験で予定していた臨床用量 (1 mg/日) の曝露量 (1.34 μg·hr/mL)[2.7.2.2.2.1 項参照] の約 75 倍と算出されたことから，104 週がん原性試験の高用量として 20 mg/kg/日を設定した．本試験では，CD1(ICR) マウス (雌雄 60 例/群) にルストロンボパグを 2，6 及び 20 mg/kg/日の用量で 104 週間反復経口投与し，がん原性を評価した．対照群には水対照群と媒体対照群 (100% PEG) を設けた．最終投与時 (104 週) に腫瘍及び非腫瘍性増殖性病変の発生増加は認められなかった．投与 13 及び 26 週間目の血漿中ルストロンボパグの曝露量 (C_{max}，AUC) は 13 週目の雄で用量比以下であったことを除き，用量比以上で増大した．曝露量は雄に比べて雌で低く，雌雄ともに反復投与による影響は認められなかった．以上の結果から，ルストロンボパグをマウスに 104 週間反復経口投与したときに，慢性肝疾患患者の観血的手技前の血小板産生促進を適応とした本申請での予定臨床用量 (3 mg/日) の曝露量 (AUC : 4.799 μg·hr/mL [2.7.2.2.3.2 項参照]) と比較して 25 倍以上の曝露量が得られる投与量でがん原性は認められなかった [2.6.6.5.1 項参照].

ラットがん原性試験では，ラット 13 週間反復経口投与がん原性予備試験の結果に基づき用量設定した．104 週がん原性試験の高用量群は，最大耐量として雄は 20 mg/kg/日を設定，雌は雄よりも曝露が高く反復投与により曝露量が増える傾向がみられたことから 2 mg/kg/日を設定した．本試験では，Sprague-Dawley 系ラット (雌雄 65 例/群) に，ルストロンボパグを 2，6 及び 20 mg/kg/日 (雄)，及び 0.5，1 及び 2 mg/kg/日 (雌) の用量で 104 週間経口投与し，がん原性を評価した．対照群には水対照群と媒体対照群 (100% PEG) を設けた．最終投与時 (104 週) の病理組織学的検査では，本薬の投与に起因した腫瘍の発生増加は認められなかったが，雌性ラットの全投与群で両対照群と比べ，非腫瘍性増殖性病変として卵巣に軽度な顆粒膜細胞過形成の発生増加が認められた．しかし，ラット 6 ヵ月反復投与毒性試験 [2.6.6.3.1.2 項参照] と同様にその他，ホルモンの動きに関連する部位に変化が認められないことから，毒性学的意義は低いと判断した．投与 13 及び 26 週間目における，血漿中ルストロンボパグの曝露量 (C_{max}, AUC) は，雄では用量比以下及び雌ではほぼ用量比で増大した．曝露量は 2 mg/kg/日では雄に比べて雌で高く，反復投与により雌の曝露量が増大する傾向を示した．以上の結果から，ルストロンボパグをラットに 104 週間経口投与したときに，最大耐量の投与でもがん原性は認められなかった [2.6.6.5.2 項参照].

2.4.4.4 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では，Sprague-Dawley 系ラット (雌雄 20 例/群) にルストロンボパグを 0 [対照群 : 媒体 (PEG/Tween 80)]，4，20 及び 100 mg/kg/日の用量で反復経口投与し，雌雄親動物の交尾行動及び受 (授) 胎を含む生殖能並びに初期胚発生への影響を評価した．試験期間を通じて雌雄親動物に死亡例は発生しなかった．100 mg/kg/日投与群の雄並びに 20 mg/kg/日以上の投与群の雌で四肢に落屑が認められた．雄の生殖器官重量，精子検査，雌の性周期，交配所要日数，交尾率，受 (授) 胎率，黄体数，着床数，生存胚数，死亡

胚数，並びに着床前及び着床後死亡率にルストロンボパグ投与の影響は認められなかった．以上の結果から，無毒性量は，雄の一般毒性に関して 20 mg/kg/日，雌の一般毒性に関して 4 mg/kg/日，雌雄の生殖毒性及び胚の発生毒性に関して 100 mg/kg/日と判断した [2.6.6.6.1 項参照].

ラット胚･胎児発生に関する試験では，Sprague-Dawley 系の妊娠ラット (各群 19 又は 20 例) にルストロンボパグを 0 [対照群：媒体 (PEG/Tween 80)]，4，12.5，40 及び 80 mg/kg/日の用量で妊娠 7～17 日に反復経口投与し，母動物の妊娠維持及び胚・胎児発生への影響を評価した．試験期間を通じて母動物に死亡，流産及び早産は発生しなかった．40 及び 80 mg/kg/日投与群で四肢の落屑，並びに体重増加抑制及び摂餌抑制が認められた．胚・胎児に関しては 80 mg/kg/日投与群で胎児体重の低下と胸骨分節骨化数の低下が認められた．骨格検査では 12.5 mg/kg/日以上の投与群で胸腰部短小過剰肋骨発現率が増加し，40 mg/kg/日以上の投与群で頚部短小過剰肋骨発現率が増加又は増加傾向を示した．血漿中ルストロンボパグの曝露量 (C_{max}，$AUC_{0\text{-}24hr}$) は 4～40 mg/kg/日投与群の間では用量の増加に伴って増大したが，80 mg/kg/日投与の曝露量は 40 mg/kg/日投与と同程度であった．また，すべての群で反復投与による曝露量の増大がみられた．以上の結果から，無毒性量は，母動物の一般毒性に関して 12.5 mg/kg/日，母動物の生殖毒性に関して 80 mg/kg/日，胚・胎児の発生毒性に関して 4 mg/kg/日と判断した [2.6.6.6.2 項参照].

ウサギ胚・胎児発生に関する試験では，日本白色種の妊娠ウサギ (17～19 例/群) にルストロンボパグを 0 [対照群：媒体 (0.1 w/v% Tween 80 を含む 0.5% MC 水溶液)]，100，300，1000 mg/kg/日の用量で妊娠 6～18 日に反復経口投与し，母動物の妊娠維持及び胚・胎児発生への影響を評価した．試験期間を通じて母動物に死亡，流産及び早産は発生しなかった．胚・胎児にはルストロンボパグ投与の影響は認められなかった．血漿中ルストロンボパグの曝露量 (C_{max}，$AUC_{0\text{-}24hr}$) は 100～300 mg/kg/日投与の間では用量の増加に伴って増大したが，1000 mg/kg/日投与の曝露量は 300 mg/kg/日投与と同程度であった．また，すべての群において，反復投与による曝露量の増大がみられた．以上の結果から，無毒性量は，母動物の一般毒性及び生殖毒性，並びに胚・胎児の発生毒性に関していずれも 1000 mg/kg/日と判断した [2.6.6.6.3 項参照].

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では，Sprague-Dawley 系の妊娠ラット (各群 22 又は 23 例) にルストロンボパグを 0 [対照群：媒体 (PEG/Tween 80)]，1，4，12.5 及び 40 mg/kg/日の用量で妊娠 7 日から哺育 20 日に反復経口投与し，母動物の妊娠維持，分娩及び哺育，並びに出生児の発生への影響を評価した．なお，本試験では，ラット胚・胎児発生に関する試験 [2.6.6.6.2 項参照] で認められた F1 胎児の胸腰部短小過剰肋骨の生後発生に及ぼす影響を精査するために，生後 4 日の同腹児数調整後の F1 余剰児及び離乳後の F1 成熟動物について，軟 X 線撮影による骨格検査を実施した．試験期間を通じて母動物に流産及び早産は発生しなかったが，40 mg/kg/日投与群で妊娠 23 日に死亡が 1 例発生した．この母動物は死亡前に活動性低下と低体温が認められ，剖検時には子宮頸部に胎児が残存していた．また，妊娠 23 日でも分娩徴候は認められなかったこと及び同群で妊娠期間の延長が認められていたことから，分娩が困難となって死亡したと考えられた．同群では，妊娠期間中に体重低値，体重増加抑制及び摂餌抑制，哺育期間初期に四肢の落屑と粗毛，哺育期間中に体重低値並びに哺育期間後期に摂餌抑制が認められた．出産率，哺育行動及び器官の肉眼検査にはルストロンボパグ投与の影響は認められなかった．離乳前の F1 出生児において，出生率，出生時体重，性比，外表

の形態及び離乳前までの一般状態にルストロンボパグ投与の影響は認められなかった．40 mg/kg/日投与群で生後 4 日生存率の低下傾向，離乳前児体重の低値，背地走性スコアの低値及び眼瞼開裂完了率の低値が認められた．離乳後の F1 出生児では，40 mg/kg/日投与群の雄 2 例 (同腹児) が生後 23 及び 39 日に死亡した．これら出生児は，死亡前から顕著な体重の低値を示し，一般状態の異常 (活動性低下，粗毛又は軟便) を示した．また，器官の肉眼検査では，胸腺の小型化が認められた．したがって，これら出生児の死亡は，離乳前から継続して認められた著しい発育抑制に起因している可能性が考えられ，同群では離乳前から体重低値が認められていることから，ルストロンボパグ投与の影響であると判断した．同群では，生後 32～54 日に尾に帯状 (環状) の狭窄変化が認められた．この変化は発現初期では尾全体に認められたが，徐々に軽度になり最終的には消失した．また，同群では，行動機能，性成熟，性周期及び器官の肉眼検査にルストロンボパグ投与の影響は認められなかった．なお，12.5 mg/kg/日以下の投与群では，離乳後の死亡は発生せず，一般状態，体重，行動機能，性成熟，性周期及び器官の肉眼検査にルストロンボパグ投与の影響は認められなかった．生殖機能検査では，雌雄の交尾率及び交配所要日数，並びに雄の授胎率にルストロンボパグ投与の影響は認められなかったが，40 mg/kg/日投与群の雌の受胎率の低値傾向が認められた．また，F2 胚の観察では，40 mg/kg/日投与群で黄体数及び着床数の低値傾向並びに着床前死亡率の高値傾向が認められた．生存胚数，死亡胚数及び着床後死亡率にルストロンボパグ投与の影響は認められなかった．以上の結果から，母動物へのルストロンボパグ投与は，次世代の雌の受胎能及び着床前の初期胚発生に影響を及ぼすと判断した．なお，交尾しなかった雌雄動物，不妊の雌及び不妊の雌と交配した相手雄について，雌雄生殖器の病理組織学的検査を実施したが，受胎能低下の原因を特定できる所見は認められなかった．F1 妊娠雌に死亡は発生せず，一般状態，体重及び器官の肉眼検査にルストロンボパグ投与の影響は認められなかった．生後 4 日の同腹児数調整後の F1 余剰児の胸腰部過剰肋骨の骨格検査では，いずれの投与群においても胸腰部完全過剰肋骨の発現率にルストロンボパグ投与の影響は認められなかったが，12.5 mg/kg/日以上の投与群で胸腰部短小過剰肋骨の発現率の増加が認められた．一方，F1 成熟動物の同検査では，いずれの投与群にも胸腰部完全過剰肋骨及び胸腰部短小過剰肋骨は認められなかった．したがって，母動物のルストロンボパグ投与により認められた胎児期あるいは哺育初期での胸腰部短小過剰肋骨は成長するにつれて消失すると考えられた．以上の結果から，無毒性量は，母動物の一般毒性及び生殖毒性に関して 12.5 mg/kg/日，過剰肋骨を除く次世代の発生毒性に関して 12.5 mg/kg/日，次世代の過剰肋骨に関して 4 mg/kg/日と判断した [2.6.6.6.4 項参照].

2.4.4.5 その他の毒性試験

皮膚光毒性試験では，雌性 HR-1 系ヘアレスマウス (5 又は 10 例/群) にルストロンボパグを 0 [対照群：媒体 (PEG/Tween 80)]，50 及び 500 mg/kg の用量で単回経口投与し，皮膚光毒性ポテンシャルを評価した．ルストロンボパグ投与の約 4 時間後からマウスに紫外線 (290～400 nm) を約 1 時間 (10 J/cm^2) 照射した後，2 日間，皮膚反応の有無を調べた．観察期間中，陽性対照群に光毒性を示す皮膚反応が認められたが，各ルストロンボパグ投与群に変化はみられなかった．血漿中ルストロンボパグの曝露量 (C_{max}，$AUC_{0\text{-}24hr}$) は，50 及び 500 mg/kg 投与群では用量

比以下で増大した．T_{max}は3～6時間であった．上記の結果から，ルストロンボパグ投与後の紫外線曝露による皮膚光毒性ポテンシャルは無いと判断した [2.6.6.8.1 項参照].

ルストロンボパグ投与のPT及びAPTT延長に及ぼすビタミンKの影響を評価する試験では，雄性ラットでPT及びAPTTが延長する200 mg/kg/日の用量を1ヵ月間経口投与し，ビタミンKの併用投与による影響を調べた．Sprague-Dawley系ラット(各群雄6例) にルストロンボパグを0 [対照：媒体 (PEG/Tween 80)] 及び200 mg/kg/日の用量で1ヵ月間反復投与し，ビタミンK_1又はK_3を0.1及び0.3 mg/kg/日若しくは注射水を併用投与した．その結果，ルストロンボパグの単独投与群でPT及びAPTTの延長と同時にビタミンK依存性凝固因子の低下が確認された．一方，ビタミンK非依存性の凝固因子に変化は認められなかった．しかし，ビタミンK併用投与群では，いずれも血液凝固時間は正常であった．ルストロンボパグの単独投与群とビタミンK併用投与群の血漿中ルストロンボパグ曝露量 (C_{max}，$AUC_{0\text{-}24hr}$) には，反復投与及び併用投与による影響は認められなかった．以上の結果から，ルストロンボパグの反復投与により，ビタミンK依存性凝固因子の活性が低下することでPT及びAPTTの延長が起こることが示唆されたが，その作用はビタミンKを付加することで回避できることが明らかとなった [2.6.6.8.2 項参照].

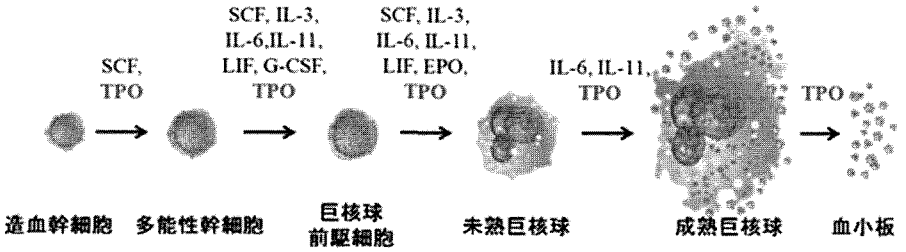
TPOR-Ki/Shi マウスを用い，ルストロンボパグの骨髄線維化ポテンシャルを評価した (GLP/信頼性基準適用外試験)．雌性TPOR-Ki/Shiマウスにルストロンボパグを0 [対照群：媒体 (0.5% MC)]，0.3及び10 mg/kg/日の用量で3週間又は8週間経口投与した (5例/群)．同様に，対照化合物としてエルトロンボパグを，ルストロンボパグ0.3及び10 mg/kg/日投与時と同程度の血小板増加作用を示す用量である10及び40 mg/kg/日で経口投与した．8週間投与群は，投与終了後に1ヵ月間の休薬による回復性試験群 (3例/群) を設けた．血液学的検査では，ルストロンボパグ及びエルトロンボパグは共に用量に応じた血小板造血作用がみられ，1ヵ月回復試験終了時には媒体投与群と同等のレベルに戻っていた．また，ルストロンボパグ10 mg/kg/日投与群及びエルトロンボパグ40 mg/kg/日投与群でRBC，Hb濃度，Ht値の低下及び白血球数の低下，並びに血漿中transforming growth factor-β (TGF-β) の増加が認められた．投与期間終了時の肉眼検査では，ルストロンボパグ10 mg/kg/日投与群及びエルトロンボパグ40 mg/kg/日投与群で，骨髄の蒼白化，脾臓の重量増加並びに腫大が認められた．病理組織学的検査では，骨髄及び脾臓における細網線維の沈着が，ルストロンボパグ10 mg/kg/日投与群では投与3週目に4/5例，投与8週目に全例で認められ，エルトロンボパグ40 mg/kg/日投与群でも投与3週目に3/5例，投与8週目に全例で認められた．8週間投与終了時，ルストロンボパグの10 mg/kg/日投与群の1/5例で線維化の進行を示唆する骨髄の壊死，コラーゲン線維の沈着，線維芽細胞増加，骨芽細胞活性化及び骨梁増加がみられた．一方，ルストロンボパグ0.3 mg/kg/日投与群及びエルトロンボパグ10 mg/kg/日投与群では試験期間を通じて，細網線維の沈着を含め他のいずれの所見も認められなかった．その他の変化として，ルストロンボパグ10 mg/kg/日投与群及びエルトロンボパグ40 mg/kg/日投与群で投与3週目及び8週目に骨髄及び脾臓で薬理作用による変化と考えられる巨核球造血亢進が認められた．1ヵ月回復性試験終了時には，ルストロンボパグ及びエルトロンボパグで認められた病理組織学的変化はいずれも認められず回復性を示した．以上の結果から，エルトロンボパグ，ルストロンボパグともにTPOR-Ki/Shiマウスへの高用量投与で骨髄に

線維化を惹起するが，その変化には回復性があることが明らかとなった．また，ルストロンボパグは低用量，すなわちエルトロンボパグの臨床使用時と同程度の血小板造血作用を示す用量では，8 週間投与では骨髄線維化は認められなかった [2.6.6.8.3 項参照].

2.4.5 総括及び結論

2.4.5.1 *In vitro* 血小板産生作用

図 2.4.5-1　造血幹細胞の分化とサイトカイン



N Engl J Med, 1998 [7] より改変引用

EPO：エリスロポエチン，G-CSF：顆粒球コロニー刺激因子，IL-3 (-6,-11)：インターロイキン 3 (6, 11),
LIF：白血病抑制因子，SCF：幹細胞因子．TPO：トロンボポエチン

巨核球造血には，図 2.4.5-1 に示すように多くのサイトカインが作用するが，TPO は造血幹細胞から成熟した巨核球までのすべてのステージに作用する．TPO は造血幹細胞並びに巨核球系前駆細胞の分化・増殖を促進させ，巨核球の成熟化を促進して成熟巨核球から血小板を放出させることが広く知られている [5,6,7].

TPO のシグナル伝達経路は，TPO が TPO 受容体に結合すると JAK2 とチロシンキナーゼ 2 (TYK2) が活性化され [8,9]，転写因子の STAT3，STAT5，Vav が活性化される [10]．さらに，アダプター蛋白である Shc もリン酸化され，Grb2/Sos 複合体が Ras を活性化し，Raf-1 を介して MAPK [11] が活性化される．また，ホスファチジルイノシトール-3 キナーゼ (PI3K)[12] も活性化されることが知られている．

ルストロンボパグのヒト TPO 受容体に対する作用をヒト TPO 受容体発現細胞で調べた結果，ヒト TPO と同様に細胞増殖活性を示したが，ヒト TPO 受容体を発現していない宿主細胞に対しては増殖活性を示さなかった．次に，TPO 受容体以外のサイトカイン受容体に対するルストロンボパグの作用を調べた．ヒト EPO 受容体発現細胞，ヒト G-CSF 依存性細胞株 [13]，ヒト GM-CSF 及びヒト IL-3 依存性細胞株 [14] を用いてルストロンボパグ及びヒト TPO の増殖活性を調べたところ，いずれの細胞株に対しても増殖活性を示さなかった．これらの結果から，ルストロンボパグはヒト TPO 受容体に選択的に作用し，他のヒトサイトカイン受容体に作用しないことが示された．

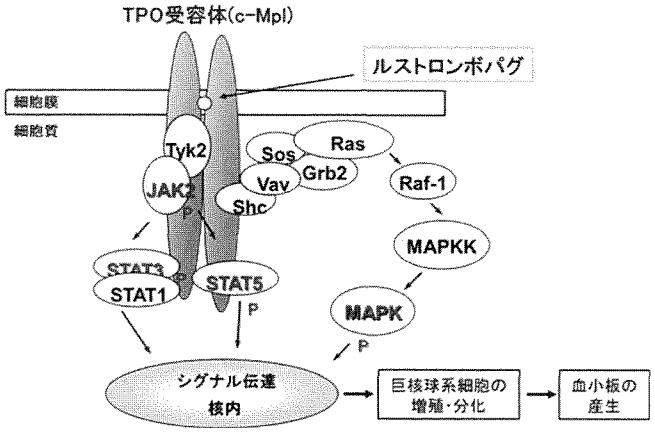
次に，ルストロンボパグの血小板造血作用を，ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞からの巨核球への分化能を巨核球コロニーアッセイで調べた結果，ルストロンボパグはヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞から巨核球への分化誘導を促進させることが示された．

また，ルストロンボパグのシグナル伝達経路に関して，細胞増殖活性を示した Ba/F3-hMpl 細胞を用いて JAK-STAT 経路並びに MAPK 経路の関与について調べた結果，ルストロンボパグは

TPO と同様に JAK2，STAT3，STAT5 及び p44/42 MAPK をリン酸化することが示された．ルストロンボパグのシグナル伝達経路を図 2.4.5-2 に示す．この結果から，ルストロンボパグはヒト造血幹細胞に作用し，TPO 受容体を介して JAK-STAT 経路並びに MAPK 経路を活性化させることにより巨核球系細胞への分化及びその増殖を促進させ，血小板を産生させるものと考えられる．

以上の結果から，ルストロンボパグは低分子ヒト TPO 受容体作動薬として，ヒト TPO 受容体に対して選択的に作用し，TPO のシグナル伝達系の JAK-STAT 経路と Ras-MAPK 経路を活性化することにより，骨髄前駆細胞からの血小板造血を促進させて血小板を増加させるものと考えられる．

図 2.4.5-2　ルストロンボパグの TPO 受容体 (c-Mpl) を介するシグナル伝達経路



Grb2：増殖因子受容体結合タンパク質 2，JAK2：ヤヌスキナーゼ 2，MAPK：マイトジェン活性化プロテインキナーゼ，MAPKK：MAPK キナーゼ，Raf-1：Rapidly accelerated fibrosarcoma 由来のキナーゼの 1 種，Ras：Rat sarcoma 由来のキナーゼの 1 種，Sos：Son of Sevenless たん白，Shc 及び Vav：シグナル伝達分子のアダプター蛋白質の 1 種，STAT：シグナル伝達性転写因子．P はリン酸化を，赤字はリン酸化により活性化されることを示す．

2.4.5.2 *In vivo* 血小板造血作用

ルストロンボパグは *in vitro* でヒト TPO 受容体に作用するが，マウス TPO 受容体には反応しないことからルストロンボパグの TPO 受容体への作用は種特異性が高いと考えられる．類薬のエルトロンボパグや E-5501 (アバトロンボパグ) もヒトとチンパンジーの TPO 受容体に特異的に作用することが知られており，*in vivo* での血小板造血作用はそれぞれチンパンジー及びヒト胎児肝臓由来 CD34 陽性細胞を移植した NOD/ SCID マウス [15,16] で調べられている．

エルトロンボパグの作用発現には，ヒト及びチンパンジーのみに存在する TPO 受容体膜貫通領域のアミノ酸配列中のヒスチジン (H499) が必須であることが知られており [17]，ルストロンボパグと類似構造を持つ化合物であるブチザミドを用いた検討からも同様の結果が得られている [18]．これらのことから，ルストロンボパグの反応にも同様に H499 の存在が重要であると推察される．そこで，マウス TPO 受容体の膜貫通部位をヒト型に改変したキメラ TPO 遺伝子をノックインした TPOR-Ki/Shi マウスを作製し，*in vivo* でルストロンボパグの血小板造血作用を評価した [2.6.2.2.2 項～2.6.2.2.4 項参照]．

TPOR-Ki/Shi マウスにルストロンボパグを反復経口投与すると，投与 7 日後から用量依存的

に有意な血小板数の増加が認められ，血小板数は経日的に増加した．また，病理組織学的検査で骨髄及び脾臓で巨核球の産生亢進像が認められ，骨髄の巨核球数増加が認められた．これらの巨核球の産生亢進は，*in vitro* でみられたヒト造血細胞から巨核球系細胞への分化・増殖が *in vivo* でも起こっていることを示唆するものであり，ルストロンボパグの TPOR-Ki/Shi マウスでの血小板造血作用を裏付けるものと考えられる．

以上の結果から，ルストロンボパグはヒト TPO 受容体を介して巨核球系細胞の分化・増殖を促進させ，血小板を産生させる作用を有していることが明らかとなった．

2.4.5.3 副次的薬理作用

低リスクの骨髄異形成症候群 (MDS) 患者の第一選択療法として，EPO 単独療法や EPO/G-CSF の併用療法が行なわれている [19]．ルストロンボパグは MDS 患者の血小板減少症治療薬としても期待されることから，ルストロンボパグと EPO 又は G-CSF と併用した場合に，それぞれの薬剤に及ぼす作用をヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞を用いたコロニーアッセイで調べた．その結果，ルストロンボパグは赤血球系コロニーを形成させず，EPO とルストロンボパグを併用した場合でも，EPO 単独で形成される赤血球コロニー数に影響はなかった．同様に，ルストロンボパグの併用は，G-CSF 単独で形成される顆粒球・マクロファージ系コロニー数に影響しなかった．この結果から，EPO 単独療法や EPO と G-CSF の併用療法を受けている MDS 患者にルストロンボパグを投与した場合でも EPO や G-CSF の薬効に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる．

2.4.5.4 安全性薬理試験

ラット中枢神経系及び呼吸系試験では，ルストロンボパグの単回経口投与で，40 及び 1000 mg/kg 投与群が有意な自発運動量の亢進を示した以外，一般症状，行動及び呼吸系パラメータに影響は認められなかった．したがって，中枢神経系及び呼吸系に重篤な影響を与えることはないと考えられる．

イヌ心血管系試験では，500 mg/kg までの単回経口投与で，ルストロンボパグによる血圧，心拍数及び心電図への影響は認められなかった．また，ルストロンボパグナトリウム塩の 200 mg/kg/日の 28 日間反復経口投与でも，心電図パラメータへの影響及び不整脈は観察されなかった．さらに，*in vitro* 試験では，モルモット心筋活動電位は，ルストロンボパグ 10 μmol/L (5.92 μg/mL) の濃度で影響せず，hERG 電流抑制率も 10 μmol/L で 38.3%に留まり，推定 IC_{50} は 70.04 μmol/L (41.4 μg/mL) であった．なお，ルストロンボパグのヒトにおけるたん白結合率は 99.9%以上であること [2.6.4.4.4 項参照] から，本試験結果から心血管系に対する懸念は低いと考えられる．イヌ 1 ヵ月反復経口投与毒性試験 (媒体：PEG/Tween 80) の心電図検査では，ルストロンボパグ投与群で第 2 度房室ブロックが観察される例が認められた [2.6.6.3.2.1 項参照]．しかし，ルストロンボパグナトリウム塩の 200 mg/kg/日の 28 日間反復経口投与 (媒体：注射用水) で心電図を詳細に評価した結果，ルストロンボパグ起因性と考えられる房室ブロックを含む不整脈は発現しなかった．また，PEG/Tween 80 を 3 日間反復経口投与した結果，全例に第 2 度房室ブロックが認められたことから，イヌ 1 ヵ月反復経口投与毒性試験で観察された房室ブロックは，

投与媒体である PEG/Tween 80 により発現したと考えられる.

ルストロンボパグを慢性肝疾患による血小板減少患者に 3 mg の用量で 7 日間投与した場合, 投与開始 5 日目におけるルストロンボパグの C_{max} は 250 ng/mL であった [2.7.2.2.3.2 項参照]. 一方, ルストロンボパグを雄性ラットに 40 及び 1000 mg/kg/日の用量で 1 ヵ月間反復経口投与した場合, 投与 1 日目の C_{max} はそれぞれ 30.1 及び 34.9 μg/mL であった [2.6.7.7.1 項参照]. また, イヌに対してルストロンボパグの 500 mg/kg を単回経口投与又はナトリウム塩 200 mg/kg/日を 28 日間反復経口投与した場合の C_{max} は, それぞれ 7.63 μg/mL [2.6.2.4.1.2.1 項参照] 又は 17.3 μg/mL [2.6.2.4.2.2 項参照] であったことから, 安全性薬理試験の観点で, ルストロンボパグの臨床使用において, 中枢神経系, 心血管系及び呼吸系に重篤な影響が生じる可能性は低いと考えられる.

2.4.5.5 ルストロンボパグの体内動態について

2.4.5.5.1 吸収

ラット及びイヌにおけるルストロンボパグ単回経口投与後の血漿中ルストロンボパグ濃度の薬物動態パラメータを表 2.4.5.5-1 に示す. 絶食及び非絶食下のラットにルストロンボパグを経口投与したとき, T_{max} は 5.5～6.0 時間と, イヌ (2.5～3.5 時間) に比べて吸収は緩やかであるものの, $t_{1/2,z}$ に大きな差は認められなかった. また, ラットでは C_{max} 及び AUC に食餌の影響は認められなかったが, イヌでは絶食下に比べて非絶食下でいずれも約 1.7 倍に増大し, 食餌の影響が認められた. 一方, 日本人健康成人を対象に本剤の食事の影響を検討した結果, 空腹時に対する食後投与時の C_{max} 及び AUC 比はそれぞれ 0.9 程度であり, ヒトでは食事の影響は小さいと考えられる [2.7.1.2.2 項参照].

表 2.4.5.5-1　ラット及びイヌにおけるルストロンボパグ単回経口投与後の血漿中ルストロンボパグの薬物動態パラメータ

動物種	投食餌条件	投与量 (mg/kg)	C_{max} (μg/mL)	T_{max} (時間)	AUC_{inf} (μg·hr/mL)	$t_{1/2,z}$ (時間)
ラット	非絶食	3	1.47 ± 0.32	6.0 ± 1.6	25.3 ± 4.5	8.5 ± 0.6
	絶食	3	1.52 ± 0.34	5.5 ± 1.9	23.5 ± 5.9	6.5 ± 0.2
イヌ	非絶食	3	3.87 ± 0.65	2.5 ± 1.0	45.5 ± 7.0	5.3 ± 0.7
	絶食	3	2.33 ± 1.02	3.5 ± 1.0	27.5 ± 7.9	5.9 ± 0.6

平均値 ± 標準偏差 (n=4), 投与媒体 : PEG 溶液

非絶食下のラット及びイヌにルストロンボパグの PEG 溶液を 1, 3 及び 10 mg/kg の用量で単回経口投与したとき, C_{max} 及び AUC は用量の増加に伴って増大し, 10 mg/kg までの用量で線形性が確認された. 一方, 非絶食下のラットにルストロンボパグの MC 懸濁液を投与したとき, 10 mg/kg における C_{max} 及び AUC は用量比未満の増大となり, 10 mg/kg では吸収が飽和傾向を示した. したがって, ラットにおけるルストロンボパグの吸収は溶解律速と考えられ, MC 懸濁液ではより顕著に溶解性の影響を受けることが示された. 一方, 薬効評価動物である TPOR-Ki/Shi マウスに非絶食下で, ルストロンボパグの MC 懸濁液を 0.3, 3 及び 10 mg/kg の用量で単回経口投与したとき, C_{max} 及び AUC はいずれも用量の増加に伴って増大し線形性が確認

された.

ラット反復経口投与において，血漿中未変化体及び放射能濃度の薬物動態パラメータに顕著な変化はなく，反復投与の影響は認められなかった．したがって，ラットでは，反復投与による血漿中への蓄積はほとんどないと考えられる.

2.4.5.5.2 分布

非絶食下の雄性アルビノラットに [^{14}C]-ルストロンボパグの PEG 溶液を単回経口投与し，放射能の組織移行性を検討した結果，最も高い放射能分布を示したのは肝臓であり，次いで副腎皮質であった．薬効発現に重要と考えられる骨髄において，投与後 2～24 時間における骨髄/血液濃度比は 0.5～0.8 と高い比率を維持していた．投与後 72 時間には，半数の組織で定量下限未満まで低下した．有色ラットの放射能の組織分布様式はアルビノラットとほぼ同じであり，メラニン含有組織である眼窩外涙腺あるいはブドウ膜への特異的な放射能分布は認められず，ルストロンボパグ及びその代謝物のメラニンへの結合性はないことが示唆された．アルビノラットに反復経口投与後，多くの組織で放射能の消失遅延が認められ，特に副腎皮質，副腎髄質及び肝臓において顕著であった．ラットでは投与後 35 日まで副腎皮質に放射能の残留が認められたものの，副腎中の残留放射能の大部分は未変化体であり，また，溶媒で抽出可能であることから，副腎への放射能の残留形態は組織への共有結合ではないことが示された．ラット及びイヌの反復投与毒性試験 [2.6.6.9.1.3 項参照] で共通して副腎への影響が認められているが，第 1 相国内反復投与試験 [2.7.6.5.2 項参照]では，被験者 1 例で副腎皮質刺激ホルモン上昇が認められたのみであり，その他の被験者の内分泌検査項目全体でルストロンボパグに起因した変化は認められていない．また，ラット及びイヌの 1 ヵ月反復投与毒性試験の無毒性量での曝露量は [2.6.6.9.1.1 項参照] ヒト臨床用量の曝露量 (3 mg 投与時) [2.7.2.2.3.2 項参照] に対して 8 倍以上の安全域が存在する．したがって，ルストロンボパグがヒトの副腎の内分泌系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる.

妊娠ラットを用いて母動物及び胎児への放射能の組織移行性を検討した結果，胎盤通過性が認められた.

マウス，ラット，ウサギ，イヌ及びヒトの *in vitro* 血漿たん白結合率は，いずれも 99.9%以上と高く，種差は認められなかった．ラット，イヌ及びヒトの *in vitro* における血球移行性は低く，マウス及びウサギでは血球移行性は認められなかった.

2.4.5.5.3 代謝

ラット，マウス (TPOR-Ki/Shi, ICR)，ウサギ，イヌ及びヒトの代謝物検索の結果を表 2.4.5.5-2 に示す．各種動物に [^{14}C]-ルストロンボパグを単回経口投与したとき，血漿中放射能の大部分 (70%～90%) は未変化体であり，代謝物としてルストロンボパグの 5-ケト体，BOCA 又は DH が検出されたが，これらの代謝物はいずれも血漿中放射能の 5%以下であった．また，ICR マウスでのみ，アシルグルクロナイドが血漿中放射能の 8%～16%検出された．ラット及びイヌでは，尿中排泄率は 1%以下と低く，尿中への代謝物の排泄は微量であった．ラット及びイヌともに糞中に排泄された放射能の多くは未変化体であり，代謝物として BOCA 及び 5-ケト体が検出され

た．胆汁では，ラットでTC-BOCAが，イヌでDHが主に検出された．[^{14}C]-ルストロンボパグを凍結ヒト肝細胞とインキュベーションした結果，放射能の大部分 (80%～90%) は未変化体であり，代謝物としてAcyl-GN (推定) が主に検出された．また，ラット及びイヌの *in vivo* 代謝並びにヒト肝細胞を用いた *in vitro* 代謝では，ルストロンボパグの (+)-ルストロンボパグへのキラル反転は認められなかった．

表 2.4.5.5-2　各種動物及びヒトにおける代謝物検索結果

動物種	ラット	イヌ	TPOR-Ki/Shi マウス	ICR マウス	ウサギ	ヒト[a]
血漿	未変化体, 5-ケト体, BOCA, その他代謝物	未変化体, 5-ケト体, BOCA, その他代謝物	未変化体, 5-ケト体, その他代謝物	未変化体, Acyl-GN, DH, 5-ケト体, その他代謝物	未変化体, 5-ケト体, BOCA, DH, その他代謝物	未変化体, DH, BOCA, TC-BOCA, Acyl-GN, その他代謝物
尿	その他代謝物	未変化体, その他代謝物	NE	NE	NE	Acyl-GN
糞	未変化体, 5-ケト体, BOCA, その他代謝物	未変化体, 5-ケト体, BOCA, その他代謝物	NE	NE	NE	β酸化関連代謝物[b], 未変化体, 5-ケト体, DH, Acyl-GN, BOCA, TC-BOCA, その他代謝物
胆汁	TC-BOCA (推定), 未変化体, BOCA, その他代謝物	DH (推定), 未変化体, 5-ケト体, BOCA, その他代謝物	NE	NE	NE	NE
肝細胞 (*In vitro*)	NE	NE	NE	NE	NE	未変化体, Acyl-GN, DH (推定), 5-ケト体, BOCA, その他代謝物

a：添付資料 5.3.3.1-06 (ヒトマスバランス試験) 及び 5.3.2.2-01 (ヒト肝細胞 *in vitro* 代謝).
b：*O*-プロパノール代謝物 (又は *O*-酢酸代謝物) 及び *O*-エタン-1,2-ジオール代謝物 (ともに推定).
NE：評価せず.

健康成人にルストロンボパグを 50 mg の用量で単回経口投与したときの血漿及び尿中の代謝物を検索した結果，代謝物として血漿では 5-ケト体及び DH が検出され，尿では主に Acyl-GN が検出された [2.7.2.2.1.4 項参照]. [^{14}C]-ルストロンボパグを用いたヒトマスバランス試験では，血漿中放射能のうち 97%が未変化体として検出され，代謝物として，DH，BOCA，TC-BOCA 及び Acyl-GN が検出されたが，これらの代謝物はいずれも血漿中放射能の 2.6%以下であった [2.7.2.2.2.5 項参照]. したがって，血漿中ではヒト特異的かつ非臨床試験で安全性の担保が必要な代謝物は認められなかった．また，ヒトマスバランス試験の糞中では，未変化体は投与された放射能の約 16%と低く，β 酸化関連代謝物 (推定) が約 35%検出された [2.7.2.2.2.5 項参照]. これらの結果から，ルストロンボパグのヒトの主代謝経路は，*O*-ヘキシル側鎖の ω 酸化及びそれに続く β 酸化であると推定され，ヒト肝ミクロソーム，ヒト肝細胞，発現酵素及び典型的な CYP 阻害剤を用いて *in vitro* 代謝を検討した結果，ルストロンボパグの 6-ヒドロキシ体 (ルストロンボパグの ω 水酸化体) 生成の主要責任代謝酵素は，ω 酸化への関与が知られている CYP4A11 を含む CYP4 系酵素であることが示され，CYP3A4 も一部寄与していることが示された．

2.4.5.5.4 排泄

非絶食下のラット及びイヌに [^{14}C]-ルストロンボパグの PEG 溶液を単回経口投与したときの尿中排泄率は，いずれも 1%以下であり糞中排泄率は約 98%であった．ラットでは，反復投与後の尿糞中放射能排泄率は単回投与時と比べて変化は認められなかった．また，胆管カニュレーションを施したラット及びイヌに [^{14}C]-ルストロンボパグの PEG 溶液を単回経口投与したときの胆汁中排泄率は，それぞれ 23.7%及び 20.6%であり，尿中排泄率はいずれも 1%以下であることから，主排泄経路はともに胆汁を介した糞中排泄であると考えられた．ラットの腸肝循環率は投与量の 4.4%と低かった．

哺乳ラットでは乳汁への移行が認められたが，48 時間後には最高濃度の約 1/10 に低下した．

2.4.5.5.5 薬物動態学的薬物相互作用について

ルストロンボパグは CYP2C8，CYP2C9 及び CYP3A4/5 活性を濃度依存的に阻害し，阻害定数は，それぞれ 3.5，5.3 及び 4.5 μmol/L であった．*In vitro* ヒト肝細胞系では，ルストロンボパグは CYP1A2，CYP2C9，CYP3A4，UGT1A2，UGT1A6 及び UGT2B7 活性に対して誘導能を示さなかった．外国人健康成人を対象に本剤と CYP3A4 の基質であるミダゾラムを併用投与したときのミダゾラムの薬物動態を検討した結果，ミダゾラムの代謝に対する阻害及び誘導はみられなかった [2.7.2.2.5.2 項参照]．CYP2C8 及び CYP2C9 の *in vivo* におけるルストロンボパグとの相互作用評価は実施していないが，これらのアイソザイムに対するルストロンボパグの *in vitro* 阻害能が CYP3A4 と同程度であることから，CYP2C8 及び CYP2C9 の基質薬剤との相互作用の可能性は低いと考えられる．

ルストロンボパグは，CYP4A11 を含む CYP4 系酵素の基質であると考えられる．非臨床では CYP4A サブファミリーの阻害剤として 10-(imidazoyl)decanoic acid (試薬) が知られているものの [20]，臨床では CYP4A11 を含む CYP4 系酵素については阻害を介した相互作用を引き起こす医薬品の報告はない．また，CYP4A の酵素誘導メカニズムとして peroxisome proliferator-activated receptor α の関与が知られているが，その作動薬であるフィブラート系薬物によるヒトでの CYP4A 誘導能は非常に低く [21]，実際に臨床で CYP4A の酵素誘導による相互作用の事例は報告されていない．したがって，CYP4A11 を含む CYP4 系酵素の阻害及び誘導によるルストロンボパグの薬物動態への影響は低いものと考えられる．また，6-ヒドロキシ体の生成に対して CYP3A4 の関与も示唆されたが，ヒト肝細胞代謝での典型的阻害剤を用いた阻害評価では，CYP4 系酵素 (阻害率 77.2%) よりも CYP3A4 (阻害率 15.7%) の寄与は小さいと考えられる．したがって，ヒトでの糞中排泄率を基に，β 酸化関連代謝物の生成量を投与量の 35%と考えた場合，臨床において CYP3A4 活性が阻害されたとしても，代謝クリアランスの低下による薬物相互作用を引き起こす可能性は低いと考えられる．

ルストロンボパグは P-gp 及び BCRP の基質であることから，P-gp 及び BCRP 阻害剤を併用した場合，臨床においてルストロンボパグの血漿中薬物濃度に影響が生じる可能性が示唆された．しかしながら，P-gp 評価におけるルストロンボパグの P_{app} 比 (2.6) は，典型的な P-gp 基質であるジゴキシン (4.7) と比べ小さかった．また，P-gp の阻害剤であるシクロスポリン A による阻害効果が認められたものの，ベラパミルにより阻害されなかったことから，ルストロンボパグ

はP-gpの弱い基質であることが示唆された．さらに，第2相及び第3相試験でP-gp阻害剤を併用していた患者の有害事象の発現状況を検討したところ，本剤投与中にP-gp阻害剤であるクラリスロマイシンを併用していた患者が2例認められたが，P-gp阻害剤併用により有害事象の発現が増加する傾向は認められなかった [2.7.4.5.3.1項参照]．一方，BCRPに関しては，現在のところ，*in vivo* での使用が推奨される典型的阻害/誘導剤がないため，ヒトを対象にした薬物相互作用試験の実施は困難であり，BCRPを介した薬物相互作用については不明である．

表 2.4.5.5-3　各種トランスポーターの阻害作用まとめ

トランスポーター	IC_{50} (μmol/L)	パラメータ
P-gp	50～100	C_{max} × 10 = 4.2 μmol/L
		最大消化管内濃度 × 0.1 = 2.0 μmol/L
BCRP	4.04	C_{max} × 10 = 4.2 μmol/L
		最大消化管内濃度 × 0.1 = 2.0 μmol/L
OATP1B1	2.63 [IC_{50} × 0.25 = 0.66]	C_{max} × 10 = 4.2 μmol/L
		fu × $I_{inlet,\ max}$ = 0.008 μmol/L，R-value = 1.003
OATP1B3	9.58 [IC_{50} × 0.25 = 2.40]	C_{max} × 10 = 4.2 μmol/L
		fu × $I_{inlet,\ max}$ = 0.008 μmol/L，R-value = 1.001

$C_{max}/IC_{50} \geq 0.1$，($C_{max} \times 10 \geq IC_{50}$) の場合，薬物相互作用の起こる可能性あり．
(投与量/250 mL)/ $IC_{50} \geq 10$，[(投与量/250 mL) × 0.1 ≥ IC_{50}] の場合，薬物相互作用の起こる可能性あり．
投与量/250 mL：最大消化管内濃度．
$I_{inlet,\ max}$ (門脈血液中での推定最大濃度) = C_{max} + (k_a × 投与量 × $F_a F_g$/Qh).
仮定：k_a (吸収速度定数) = 0.1 min^{-1}，$F_a F_g$ (消化管アベイラビリティ) = 1，Qh (肝血流速度) = 1500 mL/min.
R-value = 1 + (fu × $I_{inlet,\ max}/IC_{50}$) ≥ 1.25，(fu × $I_{inlet,\ max} \geq IC_{50} \times 0.25$) の場合，薬物相互作用の起こる可能性あり．
仮定：fu (たん白非結合率) = 0.01.
ルストロンボパグ分子量：591.54.

ルストロンボパグはOATP1B1及びOATP1B3やOCT1の基質ではないことが示され，これらのトランスポーターの阻害/誘導剤を併用しても，臨床においてルストロンボパグの動態的な変化が生じる可能性は低いと考えられる．一方，ルストロンボパグは，P-gp，BCRP，OATP1B1及びOATP1B3に対して阻害作用を示し，そのIC_{50}値はそれぞれ50～100，4.04，2.63及び9.58 μmol/Lであり，その結果を表 2.4.5.5-3に示す．日本人慢性肝疾患患者に3 mgのルストロンボパグを経口投与したときのC_{max}は250 ng/mL (0.42 μmol/L) であり [2.7.2.2.3.2項参照]，P-gpに関しては，FDAガイダンス [3] の基準値であるC_{max} × 10 (4.2 μmol/L) 又は (最大消化管内濃度) × 0.1 (2.0 μmol/L) がIC_{50}値よりも低いことから，ルストロンボパグがP-gpの阻害剤となる可能性は低いと考えられる．また，BCRPに関しては，C_{max} × 10がIC_{50}値とほぼ同じ値であるものの，(最大消化管内濃度) × 0.1がIC_{50}値よりも低いことから，消化管内においてBCRPの阻害剤となる可能性は低いと考えられる．OATP1B3に関しては，C_{max} × 10がIC_{50}値よりも低く，OATP1B3の阻害剤となる可能性は低いと考えられる．OATP1B1においては，C_{max} × 10がIC_{50}値よりも高いものの，ルストロンボパグの門脈血液中での推定最大濃度に血漿たん白非結合率を考慮した値 (0.008 μmol/L) が，IC_{50}値 × 0.25 (0.66 μmol/L) よりも低く，FDAガイダンス [3] におけるR-valueが1.25を超えないことから，OATP1B1の阻害剤となる可能性は低いと考えられる．また，EMAガイドライン [4] の基準値から判断しても，3 mgの臨床用量では，ルストロンボパグはP-gp，BCRP，OATP1B1及びOATP1B3の阻害剤となる可能性は低いと考えられ

る.

2.4.5.6 ルストロンボパグの正常動物における反復投与毒性について

2.4.5.6.1 反復投与毒性の概略ならびに安全域

ルストロンボパグの反復投与毒性試験の結果から，主に以下の毒性所見が認められた．ラット及びイヌ反復投与試験で認められた主な毒性所見を表 2.4.5.6-1 に示す.

表 2.4.5.6-1　反復経口投与毒性試験における主な毒性所見

動物種	投与期間	投与量 (mg/kg/日)	主な毒性所見
ラット	1 ヵ月	8，40，200 及び 1000	≥ 40 mg/kg/日：PT・APTT の延長，副腎皮質束状帯肥大，表皮の過角化及び肥厚
	6 ヵ月	2，20 及び 100	≥ 20 mg/kg/日：副腎皮質球状帯細胞の萎縮，副腎皮質束状帯細胞の脂肪滴減少，腎糸球体の空胞化及び鉱質沈着 ≥ 100 mg/kg/日：PT・APTT の延長
イヌ	1 ヵ月	3，10，30 及び 300	≥ 10 mg/kg/日：副腎束状帯の萎縮，胆嚢粘膜固有層の水腫
	3 ヵ月	10，80 及び 600	≥ 80 (♂) 及び 600 (♀) mg/kg/日：副腎皮質の脂肪滴減少
	9 ヵ月	3，10 及び 100	≥ 10 (♂) 及び 100 (♀) mg/kg/日：副腎皮質の脂肪滴減少，胆嚢粘膜上皮の空胞化

ラットの反復毒性試験では，ルストロンボパグを 1 ヵ月及び 6 ヵ月反復投与した際に，血液学的検査で共通して PT 及び APTT の延長が認められた．病理組織学的検査では，1 ヵ月反復経口投与により副腎皮質束状帯の肥大及び単細胞壊死，四肢表皮の過角化及び肥厚，前胃の過角化，胸腺皮質リンパ球の減少が認められた．6 ヵ月間反復経口投与では副腎皮質球状帯の萎縮及び副腎皮質束状帯細胞の脂肪滴減少，腎糸球体の空胞化及び鉱質沈着が認められた.

イヌの毒性試験では 1 ヵ月，3 ヵ月及び 9 ヵ月間反復投与により，病理組織学的検査で副腎束状帯の萎縮，副腎皮質の脂肪滴減少，胆嚢粘膜固有層の水腫，若しくは胆嚢粘膜上皮の空胞化が認められた.

臨床使用時のヒトでの安全性を考察するために，各反復経口投与毒性試験の無毒性量と臨床用量の曝露量 [国内慢性肝疾患患者対象試験 (M0625) の 3 mg 投与時の曝露量 ($AUC_{0\text{-}24hr}$)：4.799 μg·hr/mL] [2.7.2.2.3.2 項参照] の比を表 2.4.5.6-2 に示す．ルストロンボパグは，慢性肝疾患における観血的手技前の血小板産生促進で使用される際には，3 mg/日の用量で 7 日間投与されることから，ラット及びイヌの 1 ヵ月反復投与試験を基に評価した．両毒性試験の無毒性量はそれぞれ 8 及び 3 mg/kg/日であり，その際の曝露量はヒト臨床用量の曝露量と比較して，それぞれ 19.4 倍及び 7.9 倍であり充分な安全域があると考えられた．投与期間においても臨床試験ではルストロンボパグの 7 日間の投与であるのに対し，反復経口毒投与性試験ではより長期間投与されていることから，本適応に対してルストロンボパグに起因した毒性が発現する可能性は低いと考えられる.

反復投与毒性試験で認められた毒性の影響を以下の検討により詳細に調べた．ルストロンボパグの TPO 受容体への作用は種特異的であることから [2.6.2.6.2 項参照]，正常ラット及びイヌの反復経口投与試験で認められたこれらの変化はオフターゲットの毒性と考えられる.

表 2.4.5.6-2　反復経口投与毒性試験における無毒性量と臨床用量の関係

動物種	投与期間	投与量 (mg/kg/日)	無毒性量 (mg/kg/日)	臨床用量との曝露の比 [a] (無毒性量の曝露 AUC)
ラット	1ヵ月	8，40，200及び1000	8	19.4　(93.1 μg·hr/mL)
	6ヵ月	2，20及び100	2	7.4　(35.7 μg·hr/mL)
イヌ	1ヵ月	3，10，30及び300	3	7.9　(38.1 μg·hr/mL)
	3ヵ月	10，80及び600	♂：10	3.9　(18.6 μg·hr/mL)
			♀：80	20.2　(96.9 μg·hr/mL)
	9ヵ月	3，10及び100	♂：3	0.9　(4.33 μg·hr/mL)
			♀：10	3.0　(14.2 μg·hr/mL)

a：国内慢性肝疾患患者対象試験 (M0625) の 3 mg 投与時の $AUC_{0\text{-}24hr}$ (4.799 μg·hr/mL) との比較.

2.4.5.6.2 PT，APTT の延長について

ラット 1 ヵ月及び 6 ヵ月反復経口投与毒性試験では，血液凝固に関係する PT 及び APTT の延長が認められた．1 ヵ月反復投与試験の無毒性量とヒト臨床用量の曝露量との乖離は 19 倍あるため，充分な安全域があると判断した．ラット 1 ヵ月追加毒性試験では [2.6.6.3.2.1 項参照]，PT 及び APTT の延長と同時に，ビタミン K 依存性凝固因子の活性低下が確認されたが，ビタミン K 非依存性の凝固因子には変化が認められなかった．本追加試験ではルストロンボパグとビタミン K を併用投与した動物では血液凝固時間は正常であった事から，ルストロンボパグはラットではビタミン K 依存性血液凝固因子活性の低下をもたらし，血液凝固時間が延長したと考えられた．ヒトでは 1 日に必要なビタミン K の量は 1 μg/kg であるのに対して平均的な日本人の摂取量は 223～235 μg/日であり，充分量のビタミン K を摂取していることが報告されていることから [22]，通常の食生活の場合，ヒトでルストロンボパグの服用により PT 及び APTT が延長する可能性は低いと考えられる．

2.4.5.6.3 副腎への影響について

ラット及びイヌの反復投与試験で共通して副腎への影響が認められており，副腎皮質束状帯肥大若しくは副腎皮質の脂肪滴減少が認められたことから，ルストロンボパグが副腎の機能，特に内分泌系に影響する可能性が考えられた．そこで，ヒトへの内分泌系に及ぼす影響を確認するため，第 1 相国内反復投与試験 (M0613) で，ルストロンボパグの 0.25，0.5 及び 2 mg を 14 日間反復経口投与した際の副腎皮質刺激ホルモン，血漿中アルドステロン及びコルチゾール，尿中コルチゾール及び 17-ヒドロキシコルチコステロイド並びに 17-ケトステロイドを測定した．内分泌検査項目全体でルストロンボパグに起因した変化は認められなかった [2.7.6.5.2 項参照]．さらに，非臨床試験ではヒト臨床用量の曝露量に対して約 8 倍の安全域があることから，ルストロンボパグがヒトにおいて副腎の内分泌系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる．

2.4.5.6.4 胆嚢の変化について

イヌの 1 ヵ月反復投与毒性試験において胆嚢に粘膜固有層の水腫が認められた．また，9 ヵ月毒性試験において胆嚢粘膜上皮内に軽度の空胞化が認められたことから，ルストロンボパグの胆嚢への影響を調べるため，9 ヵ月毒性試験で認められた粘膜上皮の空胞について特殊染色を実施して病理組織学的に精査した．その結果，胆嚢粘膜上皮で認められた空胞は蓄積した脂

肪であることが判明した．対照群でも散在性の脂肪滴が高頻度に認められており，100 mg/kg/日投与群の軽度に増加した胆嚢粘膜上皮の空胞は，正常の状態に比べて脂質吸収がわずかに増加したためと考えられる．この変化は，固有層へのマクロファージの細胞浸潤や粘膜上皮の壊死などの組織病理学的変化を伴わなかった．したがって，9 ヵ月反復投与試験で認められた胆嚢上皮の空胞の増加は，脂質の取り込みが亢進した可能性があるものの，生理的な適応範囲内の変化であり，毒性学的意義は低いと判断した．以上のことからルストロンボパグ投与による胆嚢への影響は小さいと考えられる．

2.4.5.7 がん原性について

慢性肝疾患における観血的手技前の血小板産生促進を適応症としたときの用法・用量では，『医薬品におけるがん原性試験の必要性に関するガイダンス (ICH-S1A)』に従うと，がん原性試験の実施は必要ではない．しかしながら，血小板減少症治療薬として多岐にわたる疾患での適応が考えられたため，ルストロンボパグの長期投与が必要となる疾患での開発の可能性を踏まえマウス及びラット 104 週がん原性試験を実施した．その結果，ルストロンボパグに起因した腫瘍発生増加は認められなかった．また，遺伝毒性試験の結果はすべて陰性であることから，ルストロンボパグ投与による発がんリスクは低いと考えられる．

2.4.5.8 生殖発生毒性について

以下に，生殖発生毒性試験における雌雄親動物への影響，並びに胚・胎児及び出生児の発生への影響を考察する．

1.　雌雄親動物の一般毒性について

ウサギ胚・胎児発生への影響に関する試験では，妊娠母動物の一般毒性に関してルストロンボパグ投与の影響は認められず，無毒性量は 1000 mg/kg/日と判断した．

ラット雌雄親動物の一般毒性として，受胎能及び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で共通して認められた検体起因性の一般状態の変化は，四肢の落屑であった．この変化は，雄では 100 mg/kg/日以上，雌では 20 mg/kg/日以上の投与群で発現した．一方，ラット 1 ヵ月毒性試験では血漿中薬物濃度に雌雄差が認められ，かつ反復投与により曝露が増大する傾向が認められた [2.6.7.3 項参照]．したがって，これら所見の発現は本薬の曝露量 ($AUC_{0\text{-}24hr}$) と相関していると考えられる．妊娠母動物では 200 mg/kg/日投与群で妊娠期間中に，40 mg/kg/日投与群で妊娠末期に死亡が認められた．加えて，40 mg/kg/日以上の群で妊娠期間中に体重増加抑制及び摂餌抑制が認められた．以上の結果から，生殖発生毒性試験の雄動物及び雌動物における一般毒性の無毒性量はそれぞれ 20 及び 4 mg/kg/日と判断した．

2.　雌雄親動物の生殖毒性について

ラット及びウサギ胚・胎児発生への影響に関する試験では，妊娠維持に関してルストロンボパグ投与の影響は認められず，無毒性量はそれぞれ 80 及び 1000 mg/kg/日と判断した．無毒性

量におけるラット及びウサギの妊娠母動物の曝露量 ($AUC_{0\text{-}24hr}$：それぞれ 687.41 及び 440.47 μg·hr/mL) はヒト臨床用量の曝露量 [国内慢性肝疾患患者対象試験 (M0625) の 3 mg 投与時の曝露量：4.799 μg·hr/mL] のそれぞれ約 140 倍及び約 90 倍であった.

ラット受胎能及び初期胚発生に関する試験では，雌雄親動物の受胎能及び雌動物の性周期にルストロンボパグ投与の影響は認められず，無毒性量は 100 mg/kg/日と判断した．無毒性量における雌雄動物の曝露量 (ラット 6 ヵ月反復投与毒性試験の雄及び雌動物における投与初日の $AUC_{0\text{-}24hr}$：それぞれ 483 及び 691 μg·hr/mL) はヒト臨床用量の曝露量のそれぞれ約 100 倍及び約 145 倍であった.

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では，哺育行動にルストロンボパグ投与の影響は認められなかったが，40 mg/kg/日投与群で妊娠期間の延長と分娩困難に起因すると考えられる死亡が認められ，無毒性量は 12.5 mg/kg/日と判断した．無毒性量における妊娠母動物の曝露量 (ラット胚・胎児発生への影響に関する試験の $AUC_{0\text{-}24hr}$：244.00 μg·hr/mL) はヒト臨床用量の曝露量の約 50 倍であった.

3. 胚・胎児及び出生児の発生毒性について

ウサギ胚・胎児発生への影響に関する試験では，最高用量でもルストロンボパグ投与の影響は認められず，無毒性量は 1000 mg/kg/日と判断した．無毒性量での妊娠母動物の曝露量 ($AUC_{0\text{-}24hr}$：440.47 μg·hr/mL) はヒト臨床用量の曝露量の約 90 倍であった.

ラット受胎能及び初期胚発生に関する試験では，胚発生へのルストロンボパグ投与の影響は認められず，胚の発生毒性に関する無毒性量は 100 mg/kg/日と判断した．ラット胚・胎児発生への影響に関する試験では，胚・胎児の生存性，性比，並びに外表及び内部器官の形態にルストロンボパグ投与に起因する変化は認められなかったが，80 mg/kg/日投与群で胎児体重の低下と胸骨分節骨化数の低下，40 mg/kg/日以上の投与群で頚部短小過剰肋骨発現率の増加及び 12.5 mg/kg/日以上の投与群で胸腰部短小過剰肋骨発現率の増加が認められた．なお，40 mg/kg/日以上の投与群では母体毒性が認められていることから，40 mg/kg/日以上の投与群で認められた変化は母体毒性に関連した変化である可能性が考えられる．一方，胸腰部短小過剰肋骨については，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では，12.5 mg/kg/日以上の哺育 4 日の余剰児でも認められ，その発現率は胚・胎児発生への影響に関する試験で認められた発現率とほぼ同程度であった．胸腰部短小過剰肋骨は，ラットやウサギなどの実験動物で自然発症例として比較的よく認められる微細変化であり，一般的にその発現率は動物種や系統間で異なる．また，胸腰部短小過剰肋骨のうち，痕跡状 (肋骨部分が短く，肋骨の先端部に軟骨がない状態) と呼ばれる変化については，成長とともに消失することが知られている [23,24,25]．本薬投与により認められた胎児又は出生児の胸腰部短小過剰肋骨は，痕跡状に分類される変化であったことから，これら変化の生後の成長を確認する目的で，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で離乳後の F1 成熟児の骨格検査を実施した．その結果，胸腰部における短小過剰肋骨及び完全過剰肋骨の存在は認められず，本薬投与によるラット胎児又は出生児で認められた胸腰部短小過剰肋骨は成長とともに消失し，生後の発生及び形態に影響を及ぼさないと考えられた．以上の結果から，胸腰部短小過剰肋骨を除く胚・胎児の発生毒性に関する

無毒性量は 40 mg/kg/日，胸腰部短小過剰肋骨に関する無毒性量は 4 mg/kg/日と判断した．各無毒性量における妊娠母動物の曝露量 ($AUC_{0\text{-}24hr}$：それぞれ 631.00 及び 64.08 μg·hr/mL) はヒト臨床用量の曝露量のそれぞれ約 130 倍及び約 13 倍であった．

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では，40 mg/kg/日投与群で離乳後に同腹児の雄 2 例で死亡が認められた．これら 2 例の同腹児は離乳前から著しい発育抑制が認められ，死亡前には活動性低下等の一般状態の悪化が認められた．これら動物の死因は不明であるが，離乳前から継続して認められた著しい発育抑制により状態が悪化し，死亡した可能性が示唆された．同群では生後 4 日生存率の低下，背地走性獲得と眼瞼開裂の遅延，出生後児体重の低下，離乳後の雌の受胎能の低下，黄体数及び着床数の低下傾向並びに着床前死亡率の増加傾向が認められた．F1 児体重については，出生時点では本薬投与による影響は認められなかったが，哺育中に発育抑制が認められ，離乳時点で対照群との差が最大となった (対照群比で−13%)．離乳後においても体重の低値は継続したが，成熟するにつれて回復傾向が認められ，生後 70 日には対照群と比較して軽度な低値であった (雄で−5%，雌で−3%)．雌の受胎能に関して，交尾しなかった雌及び不妊であった雌動物の卵巣の病理組織学的検査を実施したが，雌の受胎能低下の原因は特定できなかった．また，同群では，生後 32〜54 日に尾に帯状 (環状) 狭窄変化が認められた．この変化は，哺育期間中に四肢の落屑及び粗毛が認められた母動物の児に比較的よく発現する傾向が認められ，発現初期では尾全体に認められたが，徐々に軽度になり，最終的には消失した．本薬は哺育中ラットで乳汁中に移行することが示されていることから [2.6.4.6.7 項参照]，本所見は母動物の乳汁を介して移行した本薬が出生児の皮膚細胞に作用し，尾の表皮に発現した可能性が考えられた．以上の結果から，次世代の発生毒性に関する無毒性量は 12.5 mg/kg/日と判断した．無毒性量では，妊娠母動物の曝露量 (肺・胎児発生に関する試験の $AUC_{0\text{-}24hr}$：244.00 μg·hr/mL) はヒト臨床用量の曝露量の約 50 倍であった．

以上のように，生殖発生毒性試験で催奇形性は認められなかったが，ラットを用いた試験の高用量群で母動物の分娩異常，胚・胎児の子宮内発育抑制及び次世代の発生に影響が認められた．また，このときの最小無毒性量は 4 mg/kg/日であり，4 mg/kg/日を母動物に投与した際の曝露量 ($AUC_{0\text{-}24hr}$) はヒト臨床用量の曝露量の約 13 倍であった．加えて，妊婦及び授乳中の女性への臨床投与経験がないことから，本薬の臨床での使用は，妊婦に対しては治療の有益性が安全性を上回る場合に使用し，哺乳ラットを用いた検討でルストロンボパグは乳汁へ移行することが明らかとなっているため，授乳中は本薬の投与を避けることが望ましいと考えられる．

2.4.5.9 皮膚光毒性について

ヘアレスマウスを用いた皮膚光毒性試験の結果から，ルストロンボパグによる光毒性のリスクは低いと考えられる．

2.4.5.10 ルストロンボパグの TPO 受容体を介した毒性について

類薬のエルトロンボパグは，長期間の投薬によりヒト TPO 受容体を介した副作用として骨髄のレチクリン形成及び線維化を進行させる可能性があることが示唆されている [26]．ルストロンボパグの TPO 受容体への作用は種特異的であることから，本薬は毒性試験で用いた正常動物

の TPO 受容体には作用しない．そこで，本薬のヒト型 TPO 受容体を介した影響を調べるために TPOR-Ki/Shi マウスを用いて，ルストロンボパグ又はエルトロンボパグを 8 週間投与し骨髄に及ぼす影響を信頼性基準適用外で検討した．

ルストロンボパグ及びエルトロンボパグの 0.3 及び 10 mg/kg/日投与群では血小板の増加が認められたが，骨髄の線維化は認められなかった．しかし，それぞれ 10 及び 40 mg/kg/日の高用量で投与した際には骨髄の線維化が惹起され，その作用は休薬により回復した．また，TPO 受容体を介した骨髄の線維化には，巨核球系前駆細胞によって生成される TGF-β が関与していることが報告されている [27]．高用量のルストロンボパグ及びエルトロンボパグ投与群では有意な血漿中 TGF-β の増加が認められたが，増加の程度に両薬剤の違いは認められなかった．このことから，本薬はエルトロンボパグと同様に高用量を投与した際には，ヒト TPO 受容体を介した骨髄線維化作用を有することが明らかとなった．

以上のことから，本薬を長期投与が必要な疾患に使用する際には，骨髄線維化に注意する必要があると考えられる．しかし，本薬を慢性肝疾患における観血的手技前の血小板産生促進目的で使用する際には，投与期間が 7 日間であることや，TPOR-Ki/Shi マウスを用いた検討により，骨髄の線維化は良好な回復性を示したことから，本適応において骨髄の線維化を惹起若しくは進行させるリスクは少ないと考えられる．

2.4.6 参考文献一覧

1. Kuter DJ. The biology of thrombopoietin and thrombopoietin receptor agonists. Int J Hematol 2013; 98(1): 10-23.
2. 池田康夫編集．血小板減少症・増加症．最新医学別冊．最新医学社．2009；17-25.
3. FDA. Guidance for Industry, Drug Interaction Studies –Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations, DRAFT GUIDANCE. 2012.
4. EMA. Guideline on the Investigation of Drug Interactions, Final. 2013.
5. Lok S, Kaushansky K, Holly RD, et al. Cloning and expression of murine thrombopoietin platelet production in vivo. Nature 1994; 369: 565-8.
6. Kaushansky K, Lok S, Holly RD, et al. Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. Nature 1994; 369: 568-71.
7. Kaushansky K Drug Therapy "Thrombopoietin". N Engl J Med 1998; 339:746-54.
8. Drachman JG, Griffin JD, Kaushansky K. The c-Mpl ligand (thrombopoietin) stimulates tyrosine phosphorylation of Jak2, Shc, and c-Mpl. J Biol Chem 1995; 270: 4979-82.
9. Ezumi Y, Takayama H, Okuma M. Thrombopoietin, c-Mpl ligand, induces tyrosine phosphorylation of Tyk2, JAK2, and STAT3, and enhances agonists-induced aggregation in platelets in vitro. FEBS Lett 1995; 374: 48-52.
10. Bacon CM, Tortolani PJ, Shimosaka A, Rees RC, Longo DL, O'shea JJ. Thrombopoietin (TPO) induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT5 and STAT3. FEBS Lett 1995; 370: 63-8.
11. Rojnuckarin P, Drachman JG, Kaushansky K. Thrombopoietin-induced activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in normal megakaryocytes: role in endomitosis.

Blood 1999; 94: 1273-82.

12. Miyakawa Y, Rojnuckarin P, Habib T, Kaushansky K. Thrombopoietin induces phosphoinositol 3-kinase activation through SHP2, Gab, and insulin receptor substrate proteins in BAF3 cells and primary murine megakaryocytes. J Biol Chem 2001; 276: 2494-502.
13. Saito M, Kiyokawa N, Taguchi T, et al. Granulocyte colony-stimulating factor directly affects human monocytes and modulates cytokine secretion. Exp Hematol 2002; 30: 1115-23.
14. Kitamura T, Tange T, Terasawa T, et al. Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. J Cell Physiol 1989; 140: 323-34.
15. Erickson-Miller CL, Delorme E, Tian SS, et al. Preclinical activity of eltrombopag (SB-497115), an oral, nonpeptide thrombopoietin receptor agonist. Stem Cells 2009; 27: 424-30.
16. Fukushima-Shintani M, Suzuki K, Iwatsuki Y, et al. AKR-501(YM477) a novel orally-active thrombopoietin receptor agonist. Eur J Haematol 2009; 82: 247-54.
17. Erickson-Miller CL, Delorme E, Iskander M, et al. Species specificity and receptor domain interaction of a small molecule TPO receptor agonist. Blood 2004; 104: 2909a.
18. Nogami W, Yoshida H, Koizumi K, et al. The effect of novel, small non-peptidyl molecule butyzamide on human thrombopoietin receptor and megakaryopoiesis. Hematologica 2008; 9310: 1495-504.
19. Bowen D, Culligan D, Jowitt S, et al. Guidelines for the diagnosis and therapy of adult myelodysplastic syndromes. Br J Haematol 2003; 120: 187-200.
20. Lewis DF, Lake BG. Molecular modelling of CYP4A subfamily members based on sequence homology with CYP102. Xenobiotica 1999; 29(8): 763-81.
21. Graham MJ, Lake BG. Induction of drug metabolism: species differences and toxicological relevance. Toxicology 2008; 254(3): 184-91.
22. 平成 24 年国民健康・栄養調査報告 厚生労働省　平成 24 年
23. Chernoff N, Rogers JM. Supernumerary ribs in developmental toxicity bioassays and in human populations: incidence and biological significance. J Toxicol Environ Health B Crit Rev 2004; 7 (6): 437-49.
24. Foulon O, Jaussely C, Repetto M, Urtizberea M, Blacker AM. Postnatal Evolution of Supernumerary Ribs in Rats after a Single Administration of Sodium Salicylate. J Appl Toxicol 2000; 20 (3): 205-9.
25. Wickramaratne GA. The Post-natal Fate of Supernumerary Ribs in Rat Teratogenicity Studies. J Appl Toxicol 1988; 8 (2): 91-4.
26. レボレード® 医薬品インタビューフォーム　2012 年 12 月改定 (改訂第 3 版)
27. Chagraoui H. Prominent role of TGF-β1 in thrombopoietin-induced myelofibrosis in mice. Blood 2002; 100 (10): 3495-503.