ムルプレタ錠 3mg

第 2 部 (モジュール 2) : CTD の概要 (サマリー)

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

塩野義製薬株式会社

目次

略号及び用語定義一覧表 3
2.6.1 緒言 4
2.6.1.1 医薬品の構造及び薬理的特性 4
2.6.1.2 申請した効能・効果及び用法・用量 5

2.6.1 略号及び用語定義一覧表

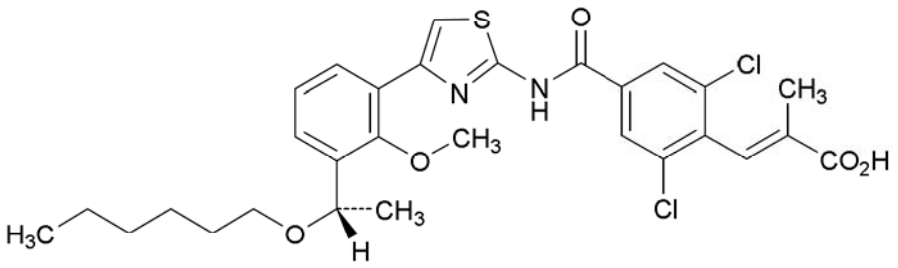
略号	用語定義
TPO	トロンボポエチン
TPOR-Ki/Shi マウス	マウス TPO 受容体の膜貫通部位をヒト型に改変したキメラ TPO 受容体遺伝子をノックインしたマウス

2.6.1 緒言

2.6.1.1 医薬品の構造及び薬理的特性

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) 受容体作動薬である．

1. 医薬品の構造



2. 薬理学的特性

- ルストロンボパグはヒト TPO 受容体発現細胞でヒト TPO と同様に細胞増殖活性を示し，この増殖活性はヒト TPO 受容体に選択的であった. また, 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系への分化誘導を促進させることにより血小板造血作用を発揮することが示唆された.
- ルストロンボパグはヒト TPO と同様にシグナル伝達系のヤヌスキナーゼ–シグナル伝達性転写因子経路及び Ras–マイトジェン活性化プロテインキナーゼ経路を活性化することが示された.
- 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) にルストロンボパグを反復経口投与すると，血小板は用量依存的・経日的に増加した．なお，投与期間に依存して血小板産生が亢進し続ける可能性は低いと考えられる．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，骨髄の巨核球数の増加も認められた.
- TPO 受容体作動薬は，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ことから，ルストロンボパグ及びエルトロンボパグの TPOR-Ki/Shi マウス骨髄への影響を調べた．ルストロンボパグ及びエルトロンボパグをそれぞれ低用量 (0.3 及び 10 mg/kg/日) で 8 週間反復経口投与した際には血小板数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，それぞれ高用量 (10 及び 40 mg/kg/日) で 8 週間反復経口投与した際には骨髄の線維化が惹起され，その作用には回復性が認められた．このように，本薬もエルトロンボパグと同様に，ヒト TPO 受容体を介した骨髄線維化作用を有することから，長期投与が必要な疾患に本薬を使用する場合には，骨髄の線維化に注意する必要があると考えられる．一方，本薬を慢性肝疾患における観血的手技を行う前の血小板産生促進目的で使用する場合には，投与期間が 7 日間であることや TPOR-Ki/Shi マウスの骨髄の線維化が良好な回復性を示したことから，本適応疾患において骨髄の線維化を惹起もしくは進行させるリスクは少ないと考えられる.

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前駆細胞の分化・増殖を促進させ，血小板数を増加させる作用を有することが明らかであり，血小板減少症を合併している慢性肝疾患患者に観血的手技を実施する際の血小板製剤に変わる薬剤として有効性が期待される．

2.6.1.2 申請した効能・効果及び用法・用量

1. 効能・効果

待機的な観血的手技を予定している慢性肝疾患患者における血小板減少症の改善

2. 用法・用量

通常，成人にはルストロンボパグとして 3 mg を 1 日 1 回，7 日間経口投与する．

ムルプレタ錠 3mg

第 2 部 (モジュール 2) : CTD の概要 (サマリー)

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2 薬理試験の概要文

塩野義製薬株式会社

目次

略号及び用語定義一覧表 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 5
2.6.2.1.3 安全性薬理試験 5
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 7
2.6.2.2.1 *In vitro* における作用 7
2.6.2.2.1.1 ヒト TPO 受容体発現細胞における増殖作用 7
2.6.2.2.1.2 ヒト TPO 受容体発現細胞に対するルストロンボパグ代謝物の増殖作用 9
2.6.2.2.1.3 各種サイトカイン依存性細胞株に対する増殖作用 10
2.6.2.2.1.4 シグナル伝達経路の解析 13
2.6.2.2.1.5 ヒト造血細胞に対する作用 (CFU アッセイ) 14
2.6.2.2.2 *In vivo* における作用 (1) 16
2.6.2.2.3 *In vivo* における作用 (2) 19
2.6.2.2.4 TPOR-Ki/Shi マウスを用いた PK/PD 解析 20
2.6.2.3 副次的薬理試験 22
2.6.2.3.1 造血系コロニー形成能に与える影響 22
2.6.2.4 安全性薬理試験 24
2.6.2.4.1 安全性薬理コアバッテリー試験 24
2.6.2.4.1.1 中枢神経系 24
2.6.2.4.1.2 心血管系 24
2.6.2.4.1.3 呼吸系 25
2.6.2.4.2 安全性薬理フォローアップ試験 25
2.6.2.4.2.1 PEG/Tween 80 のイヌ心電図に対する影響 25
2.6.2.4.2.2 ルストロンボパグナトリウム塩の 28 日間反復経口投与におけるイヌ心電図に対する作用 26
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 29
2.6.2.6 考察及び結論 30
2.6.2.6.1 *In vitro* 血小板産生作用 30
2.6.2.6.2 *In vivo* 血小板造血作用 32
2.6.2.6.3 副次的薬理作用 33
2.6.2.6.4 安全性薬理試験 34
2.6.2.7 図表 35
2.6.2.8 参考文献 36

2.6.2 略号及び用語定義一覧表

略号	用語定義
$APD_{30\,(90)}$	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/F3-hEPOR 細胞	Ba/F3 細胞にヒト EPO 受容体を発現させた細胞
Ba/F3-hMpl 細胞	Ba/F3 細胞にヒト TPO 受容体を発現させた細胞
BFU-E	前期赤芽球系前駆細胞
CFU-E	赤芽球コロニー形成細胞
CFU-G	顆粒球コロニー形成細胞
CFU-M	マクロファージコロニー形成細胞
CFU-Mk	巨核球コロニー形成細胞
C_{max}	最高血漿中薬物濃度
EC_{50}	50%有効濃度
E_{max}	最大薬理活性
EPO	エリスロポエチン
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	インターロイキン 3
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
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
PK	薬物動態
QTc	補正 QT
RBC	赤血球数
rhEPO	遺伝子組換えヒトエリスロポエチン
rhTPO	遺伝子組換えヒトトロンボポエチン
rmIL-3	遺伝子組換えマウスインターロイキン 3

STAT	シグナル伝達性転写因子
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

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験

ルストロンボパグは *in vitro* でマウス IL-3 依存性 ProB 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) を増殖させ，50%有効濃度 (EC_{50}) は 84.0 nmol/L であった．また，代謝物の増殖作用を検討した結果，ルストロンボパグ-脱ヘキシル体並びにルストロンボパグ-5-ケト体も増殖活性を示したが，ともにルストロンボパグよりも低かった (それぞれの EC_{50} : 34861.0 nmol/L，555.7 nmol/L)．ルストロンボパグの各種サイトカイン依存性細胞株に対する増殖作用を検討した結果，Ba/F3 細胞にヒト EPO 受容体を発現させた細胞 (Ba/F3-hEPOR 細胞)，ヒト顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) 依存性細胞 (NOMO-1 細胞) 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) 及びヒトインターロイキン 3 (IL-3) 依存性細胞株 (TF-1 細胞) に対して増殖活性を示さず，ルストロンボパグはヒト TPO 受容体に選択的に作用した．また，ルストロンボパグ及び光学異性体である (+)-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増殖・分化促進能を示した (EC_{50}：それぞれ 0.31 及び 0.19 μmol/L)．さらに，ルストロンボパグは Ba/F3-hMpl 細胞において，ヒト TPO と同様にヤヌスキナーゼ 2 (JAK2)，シグナル伝達性転写因子 (STAT) 3，STAT5 及び p42/44 マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAPK) のシグナル伝達系を活性化することが示された．

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) に対してルストロンボパグを 0.3 mg/kg/日以上の用量で反復投与すると，媒体投与に比べて有意な血小板造血作用を示すことを確認した．また，血小板の増加を裏付ける巨核球数の増加が骨髄及び脾臓で認められた．さらに，3 mg/kg/日の用量で 42 日間反復経口投与した場合に増加した血小板数は投与 28 日以降に定常状態を示すことが認められた．以上の結果より，ルストロンボパグがヒトで血小板造血作用を有することが示唆された．

2.6.2.1.2 副次的薬理試験

ルストロンボパグは EPO や G-CSF で誘導される造血系のコロニー形成には影響を及ぼさないことを確認した．

2.6.2.1.3 安全性薬理試験

ラットにルストロンボパグを 40，200 及び 1000 mg/kg の用量で単回経口投与し，一般症状及び行動に及ぼす影響を検討した．その結果，40 及び 1000 mg/kg 投与群で，媒体対照群に比して有意な自発運動量の亢進が認められたが，その変化は軽度かつ一過性であり，200 mg/kg 投与群では有意な変化は認められなかった．また，その他の観察項目には，ルストロンボパグに起因すると考えられる変化は認められなかった．

イヌにルストロンボパグを 100，300 及び 500 mg/kg の用量で単回経口投与し，心血管系への影響を評価したところ，いずれの用量においても血圧，心拍数及び心電図パラメータに影響を及ぼさなかった．また，イヌにルストロンボパグを 200 mg/kg/日の用量で 28 日間経口投与し，

心電図を観察した結果，ルストロンボパグ起因性と考えられる不整脈及び心電図パラメータの変化は認められなかった．

モルモットの右心室乳頭筋標本に，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活動電位持続時間を測定した結果，いずれの濃度でも，すべてのパラメータに対して影響を及ぼさなかった．また，ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子 (hERG) チャネルを発現させたヒト胎児腎臓細胞である HEK293 細胞に，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%であり，推定 50%阻害濃度 (IC_{50}) は，70.04 μmol/L (41.4 μg/mL) であった．

ラットにルストロンボパグを 40，200 及び 1000 mg/kg の用量で単回経口投与し，呼吸数，1 回換気量及び分時換気量に及ぼす影響を検討した結果，いずれの用量でも，すべてのパラメータに対して影響を及ぼさなかった．

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 *In vitro* における作用

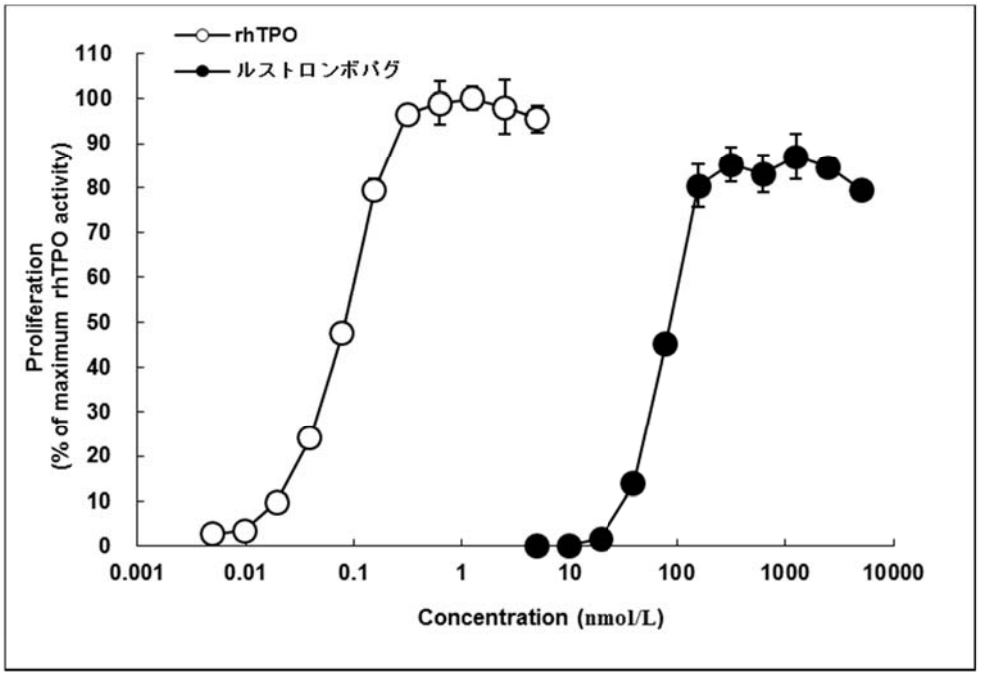
2.6.2.2.1.1 ヒト TPO 受容体発現細胞における増殖作用

評価資料 4.2.1.1-01
概要表 2.6.3.2.1.1

ルストロンボパグのヒト TPO 受容体への作用を Ba/F3-hMpl 細胞を用いてルストロンボパグ (濃度：4.88～5000 nmol/L) 及び遺伝子組換えヒト TPO (rhTPO) (濃度：0.00488～5 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，その相対増殖活性が 50%に達する濃度を 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 (図 2.6.2.2-1).

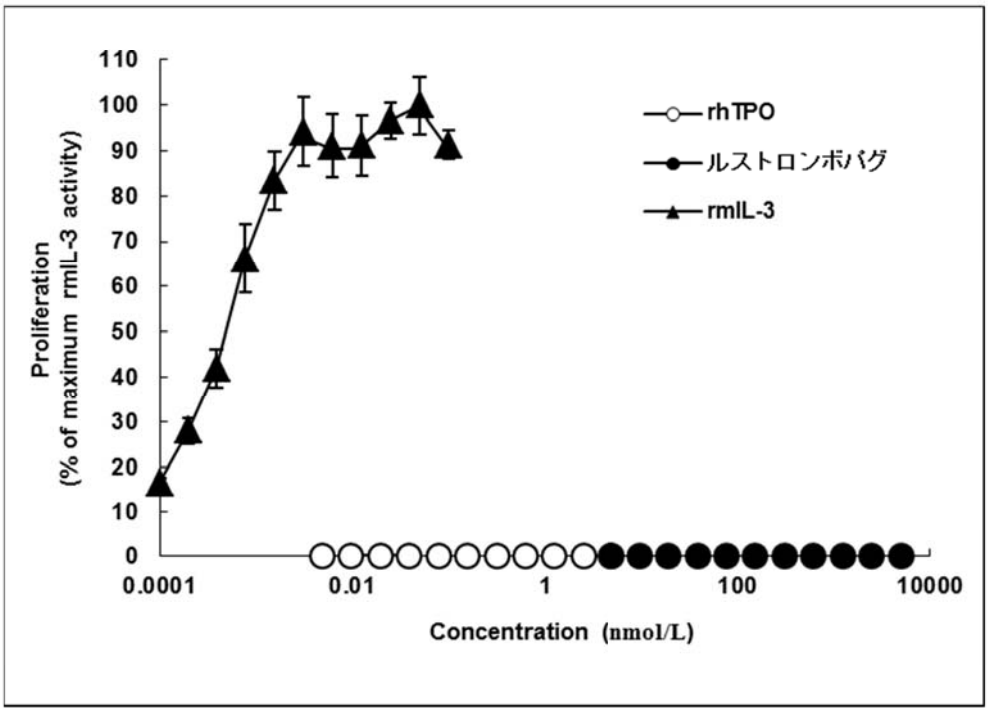
図 2.6.2.2-1　ルストロンボパグの Ba/F3-hMpl 細胞に対する増殖活性



平均値 ± 標準偏差 (n=6).
rhTPO の EC_{50} 値：0.08 nmol/L，ルストロンボパグの EC_{50} 値：84.0 nmol/L.

一方，ヒト TPO 受容体を発現していない Ba/F3 細胞に対しては，ルストロンボパグ並びに rhTPO は増殖活性を示さず，陽性対照の遺伝子組換えマウス IL-3 (rmIL-3) のみが増殖活性を示した (図 2.6.2.2-2).

図 2.6.2.2-2　ルストロンボパグの Ba/F3 細胞に対する増殖活性



平均値 ± 標準偏差 (n=6).
rmIL-3 の最大活性を 100%として EC_{50} 値を算出した.
rmIL-3 の EC_{50} 値：0.0005 nmol/L.

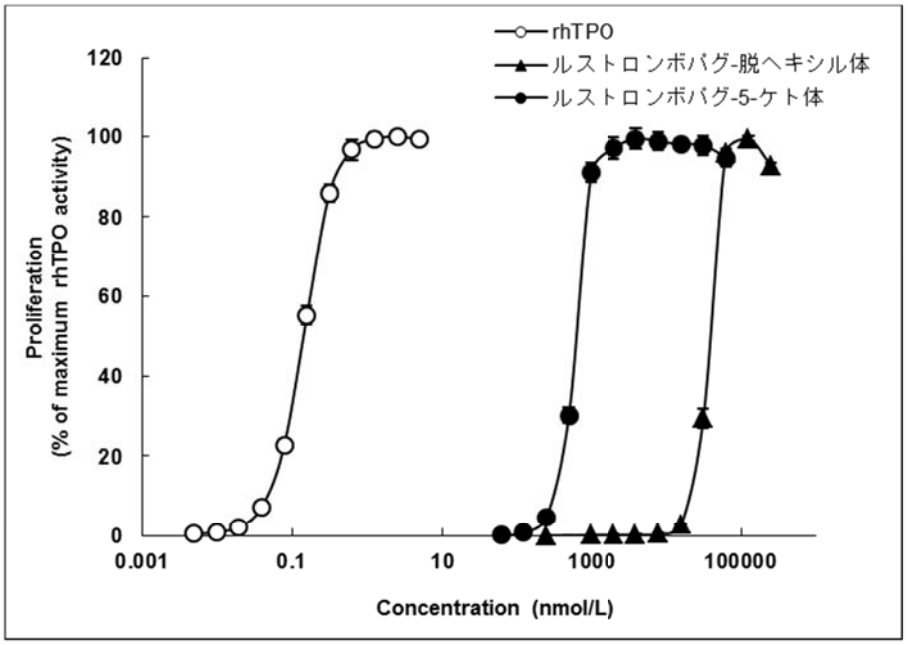
2.6.2.2.1.2 ヒト TPO 受容体発現細胞に対するルストロンボパグ代謝物の増殖作用

参考資料 4.2.1.1-11
概要表 2.6.3.2.1.2

ルストロンボパグの代謝物の薬理作用を評価する目的で，Ba/F3-hMpl 細胞を用い，ルストロンボパグの血漿中代謝物であるルストロンボパグ-脱ヘキシル体 (濃度:244～250000 nmol/L) 及びルストロンボパグ-5-ケト体 (濃度：61～62500 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%として EC_{50} を算出した．

その結果，ルストロンボパグ-脱ヘキシル体並びにルストロンボパグ-5-ケト体の EC_{50} 値はそれぞれ 34861.0 並びに 555.7 nmol/L であり，rhTPO の EC_{50} 値は 0.14 nmol/L であった (図 2.6.2.2-3).

図 2.6.2.2-3　ルストロンボパグ代謝物の Ba/F3-hMpl 細胞に対する増殖活性



平均値 ± 標準偏差 (n=6).
rhTPO の最大活性の平均値を 100%として EC_{50} 値を算出した.
rhTPO の EC_{50} 値：0.14 nmol/L,
ルストロンボパグ-脱ヘキシル体の EC_{50} 値 : 34861.0 nmol/L, ルストロンボパグ-5-ケト体の EC_{50} 値 : 555.7 nmol/L.

2.6.2.2.1.3 各種サイトカイン依存性細胞株に対する増殖作用

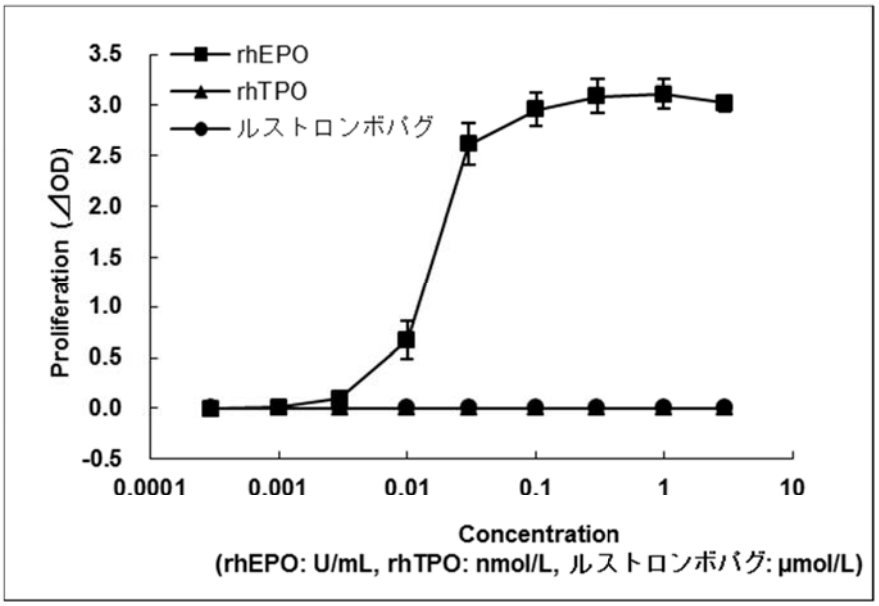
評価資料 4.2.1.1-02
概要表 2.6.3.2.1.3

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ルストロンボパグ (濃度：0.0003～3 μmol/L) の増殖活性を，Ba/F3-hEPOR 細胞，ヒト G-CSF 依存性細胞株である NOMO-1 細胞並びにヒト GM-CSF 及びヒト IL-3 依存性細胞株である TF-1 細胞を用いて検討した．

その結果，ルストロンボパグは Ba/F3-hEPOR 細胞，NOMO-1 細胞，及び TF-1 細胞に対して増殖活性を示さなかった．一方，陽性対照として用いた遺伝子組換えヒト EPO (rhEPO) は Ba/F3-hEPOR 細胞に対して (図 2.6.2.2-4)，遺伝子組換えヒト G-CSF (rhG-CSF) は NOMO-1 細胞に対して (図 2.6.2.2-5)，ヒト遺伝子組換え GM-CSF (rh-GM-CSF) 並びに遺伝子組換えヒト IL-3 (rhIL-3) は TF-1 細胞に対して (図 2.6.2.2-6)，それぞれ増殖活性を示した．

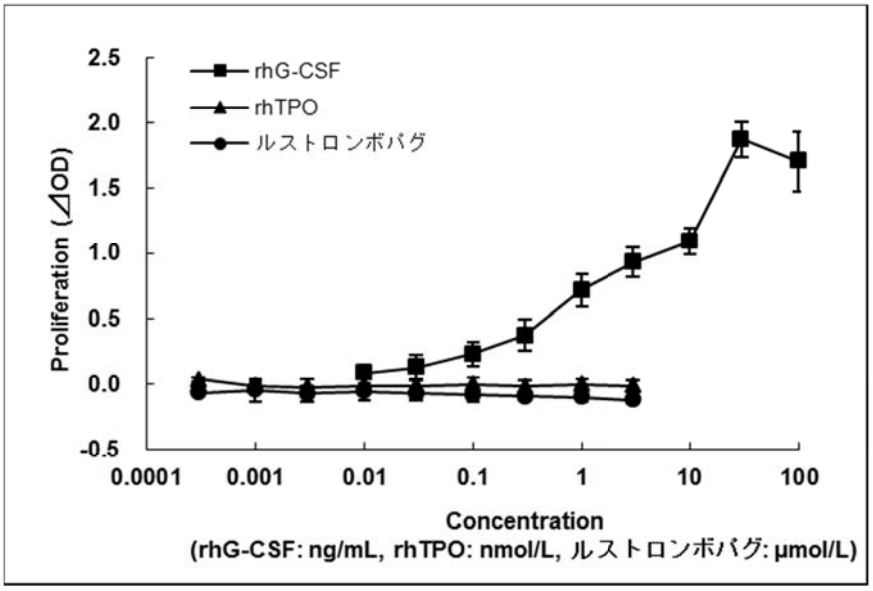
これらの結果から，ルストロンボパグはヒト EPO，G-CSF，GM-CSF 並びに IL-3 受容体に作用しないことが明らかになった (表 2.6.2.2-1).

図 2.6.2.2-4　ルストロンボパグの Ba/F3-hEPOR 細胞に対する増殖活性



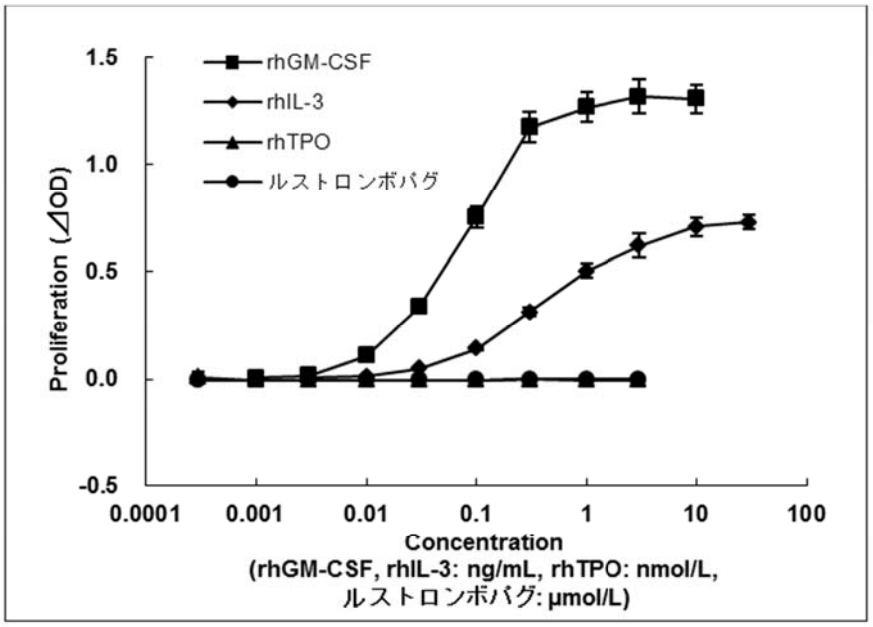
平均値 ± 標準偏差 (n=6).
増殖活性は ΔOD 値 (測定波長 450 nm，参照波長 650 nm) で示し，最大 OD 値の 50%を EC_{50} 値とした．
rhEPO の EC_{50} 値：0.0158 U/mL.

図 2.6.2.2-5　ルストロンボパグの NOMO-1 細胞に対する増殖活性



平均値 ± 標準偏差 (n=6).
増殖活性は ΔOD 値 (測定波長 450 nm，参照波長 650 nm) で示し，最大 OD 値の 50%を EC_{50} 値とした.
rhG-CSF の EC_{50} 値：4.65 ng/mL.

図 2.6.2.2-6　ルストロンボパグの TF-1 細胞に対する増殖活性



平均値 ± 標準偏差 (n=6).
増殖活性は ΔOD 値 (測定波長 450 nm，参照波長 650 nm) で示し，最大 OD 値の 50%を EC_{50} 値とした.
rhGM-CSF の EC_{50} 値：0.074 ng/mL，rhIL-3 の EC_{50} 値：0.451 ng/mL.

表 2.6.2.2-1　ルストロンボパグの各種サイトカイン依存性細胞に対する増殖活性のまとめ

Cell	Substance	Concentration range [a]	EC_{50} [b]
Ba/F3-hEPOR cells	rhEPO	0.0003 – 3 (U/mL)	0.0158 U/mL
	rhTPO	0.0003 – 3 (nmol/L)	–
	ルストロンボパグ	0.0003 – 3 (μmol/L)	–
NOMO-1 cells	rhG-CSF	0.01 – 100 (ng/mL)	4.65 ng/mL
	rhTPO	0.0003 – 3 (nmol/L)	–
	ルストロンボパグ	0.0003 – 3 (μmol/L)	–
TF-1 cells	rhGM-CSF	0.001 – 10 (ng/mL)	0.074 ng/mL
	rhIL-3	0.003 – 30 (ng/mL)	0.451 ng/mL
	rhTPO	0.0003 – 3 (nmol/L)	–
	ルストロンボパグ	0.0003 – 3 (μmol/L)	–

a：ルストロンボパグ及び各種サイトカインは 9 濃度で評価した.
b：EC_{50} 値は SAS® システムのシグモイドの最大薬理活性 (E_{max}) モデルで算出した.
–：算出不能.

2.6.2.2.1.4 シグナル伝達経路の解析

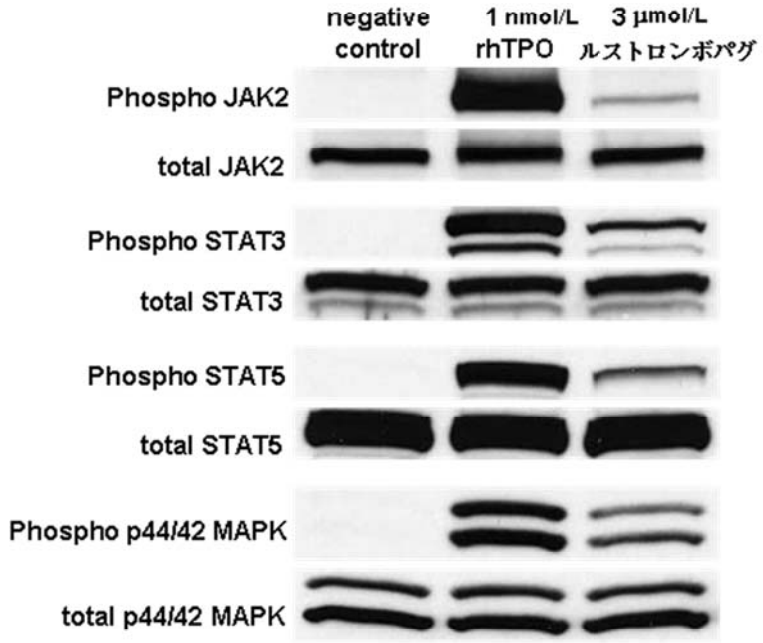
評価資料 4.2.1.1-03
概要表 2.6.3.2.1.4

ルストロンボパグが TPO 受容体に作用した後の細胞内シグナル伝達系への影響を明らかにするために, Ba/F3-hMpl 細胞における JAK2, STATs 並びに MAPK のリン酸化をウエスタンブロッティング法で検討した.

Ba/F3-hMpl 細胞をルストロンボパグ (3 μmol/L) 又は rhTPO (1 nmol/L) で 15 分間刺激した結果，ルストロンボパグは rhTPO と同様に JAK2，STAT3，STAT5，p44/42 MAPK のリン酸化を促進した (図 2.6.2.2-7).

このことから，ルストロンボパグは rhTPO と同様のシグナル伝達系を活性化することが示された.

図 2.6.2.2-7　Ba/F3-hMpl 細胞における JAK2，STATs 並びに MAPK に対する活性化作用



Negative control：0.03%ジメチルスルホキシド水溶液.

2.6.2.2.1.5 ヒト造血細胞に対する作用　(CFU アッセイ)

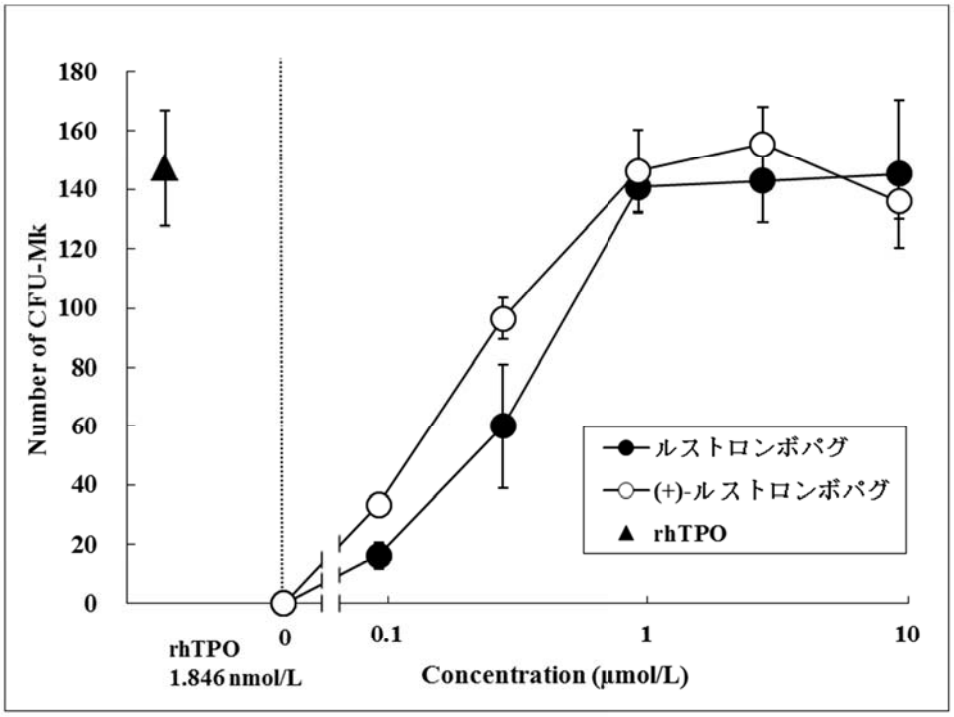
評価資料 4.2.1.1-04，4.2.1.1-05
概要表 2.6.3.2.1.5

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．

ルストロンボパグを添加して 12 日間培養することによって巨核球コロニーが形成された．rhTPO (1.846 nmol/L) 添加群における巨核球コロニー形成細胞 (CFU-Mk) 数の平均値は 147.3 となり (図 2.6.2.2-8)，この平均値の半分に達する濃度を EC_{50} と定義し，ルストロンボパグの EC_{50} 値をシグモイドの最大薬理活性 (E_{max}) モデルから算定した．

その結果，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巨核球コロニー形成能も評価したところ，EC_{50} 値は 0.19 μmol/L であった (表 2.6.2.2-2).

図 2.6.2.2-8　ルストロンボパグのヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞に対する作用



平均値 ± 標準偏差 (n=6).
rhTPO 並びにルストロンボパグ及びその光学異性体 (+)-ルストロンボパグによる巨核球コロニー形成細胞 (CFU-MK) 数を計測した.
rhTPO (1.846 nmol/L) の CFU-MK コロニー数の平均値：147.3.

表 2.6.2.2-2　ルストロンボパグのヒト造血幹細胞に対する作用

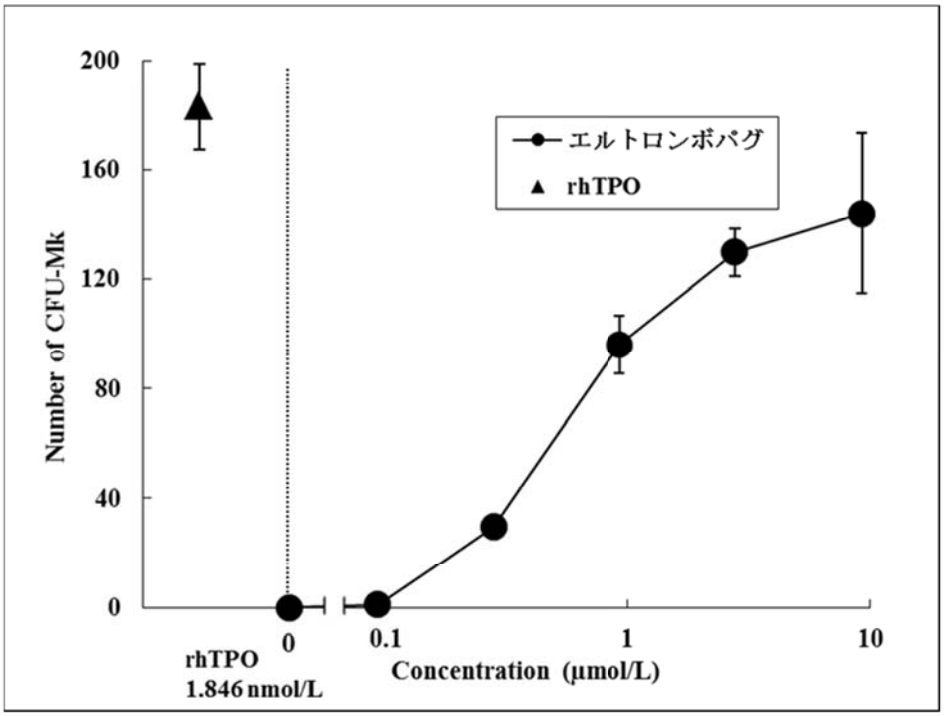
Substance	Concentration range	EC_{50}
Medium	–	–
rhTPO	1.846 nmol/L	–
ルストロンボパグ	0.0923 – 9.23 (μmol/L)	0.31 μmol/L
(+)-ルストロンボパグ	0.0923 – 9.23 (μmol/L)	0.19 μmol/L

rhTPO (1.846 nmol/L) の最大活性を 100%として EC_{50} 値を算出した.
EC_{50} 値は SAS®システムのシグモイドの最大薬理活性 (E_{max}) モデルで算出した.

同様に，対照化合物としてエルトロンボパグを用いてヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞に対する巨核球コロニー形成能を検討した.

rhTPO (1.846 nmol/L) 添加群における CFU-Mk 数の平均値は 182.8 となり (図 2.6.2.2-9)，ルストロンボパグと同様に EC_{50} 値を算定した結果, EC_{50} 値は 0.86 μmol/L であった (表 2.6.2.2-3).

図 2.6.2.2-9　エルトロンボパグのヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞に対する作用



平均値 ± 標準偏差 (n=6).
rhTPO 並びにエルトロンボパグによる巨核球コロニー形成細胞 (CFU-MK) 数を計測した.
rhTPO (1.846 nmol/L) の CFU-MK コロニー数の平均値：182.8.

表 2.6.2.2-3　エルトロンボパグのヒト造血幹細胞に対する作用

Substance	Concentration range	EC_{50}
Medium	–	–
rhTPO	1.846 nmol/L	–
エルトロンボパグ	0.0923 – 9.23 (μmol/L)	0.86 μmol/L

rhTPO (1.846 nmol/L) の最大活性を 100%として EC_{50} 値を算出した.
EC_{50} 値は SAS®システムのシグモイドの最大薬理活性 (E_{max}) モデルで算出した.

2.6.2.2.2 *In vivo* における作用 (1)

評価資料 4.2.1.1-06，4.2.1.1-07，4.2.1.1-08
概要表 2.6.3.2.2.1，2.6.3.2.2.2，2.6.3.2.2.3

ルストロンボパグは *in vitro* でヒト TPO 受容体を発現した細胞の増殖を促すが，マウス TPO 受容体発現細胞には増殖活性を示さなかった．そのためマウス 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) を用いてルストロンボパグの血小板造血作用を検討した．評価には 12 週齢の雌性 TPOR-Ki/Shi マウスを 1 群あたり 8 例用いた．

ルストロンボパグ (投与量：0.3，1，3 及び 10 mg/kg/日) あるいは媒体 [0.5%メチルセルロース (MC) 水溶液] を 1 日 1 回 21 日間反復経口投与し，群分け時 (Day 0)，投与 7 日後 (Day 8)，14 日後 (Day 15)，21 日後 (Day 22) に眼窩静脈より採血し，血小板数を測定した．

その結果，ルストロンボパグは Day 8 から用量依存的に媒体対照群に比べ有意な血小板数の増加を惹起し，血小板数は Day 22 まで経日的に増加した (表 2.6.2.2-4)．ルストロンボパグを 21 日間反復経口投与した場合，0.3 mg/kg/日以上の用量で媒体対照群に比べ有意に血小板数を増加させた．

表 2.6.2.2-4　TPOR-Ki/Shi マウスにルストロンボパグを反復経口投与後の血小板造血作用

Group	Platelet ($\times 10^4$/μL)			
	Day 0	Day 8	Day 15	Day 22
Vehicle	158.1 ± 12.6	178.1 ± 11.7	166.2 ± 15.9	169.0 ± 8.8
0.3 mg/kg/日	159.5 ± 12.7	226.5 ± 14.2**	230.4 ± 19.9**	235.4 ± 18.3**
1 mg/kg/日	157.2 ± 11.9	278.9 ± 19.3**	300.3 ± 19.1**	326.3 ± 24.5**
3 mg/kg/日	159.4 ± 10.7	316.3 ± 32.1**	380.9 ± 34.7**	424.7 ± 43.0**
10 mg/kg/日	156.2 ± 11.0	316.0 ± 40.2**	404.6 ± 56.6**	467.8 ± 68.1**

平均値 ± 標準偏差 (n=8).
** : P <0.01 (媒体投与群との Dunnett's test による比較).

同様に，対照化合物であるエルトロンボパグ (投与量：2，10，50 mg/kg/日) の血小板造血作用を検討した．

その結果，10 及び 50 mg/kg の用量で，媒体対照群に比べ有意な血小板数の増加が認められた (表 2.6.2.2-5)．エルトロンボパグを 21 日間反復経口投与した場合，2 mg/kg/日では薬効を示さなかったが，10 mg/kg/日以上の投与量で媒体対照群に比べ有意に血小板数を増加させた．

表 2.6.2.2-5 TPOR-Ki/Shi マウスにエルトロンボパグを反復経口投与後の血小板造血作用

Group	Platelet ($\times 10^4/\mu L$)			
	Day 0	Day 8	Day 15	Day 22
Vehicle	162.1 ± 7.3	176.9 ± 7.1	169.1 ± 17.0	171.4 ± 12.5
2 mg/kg/日	163.1 ± 12.2	203.0 ± 19.7	183.1 ± 10.6	188.2 ± 8.9
10 mg/kg/日	162.1 ± 9.7	274.9 ± 31.9**	267.1 ± 33.4**	274.9 ± 34.0**
50 mg/kg/日	161.9 ± 14.5	452.9 ± 63.7**	596.1 ± 83.0**	690.9 ± 84.6**

平均値 ± 標準偏差 (n=8).
** : P <0.01 (媒体投与群との Dunnett's test による比較).

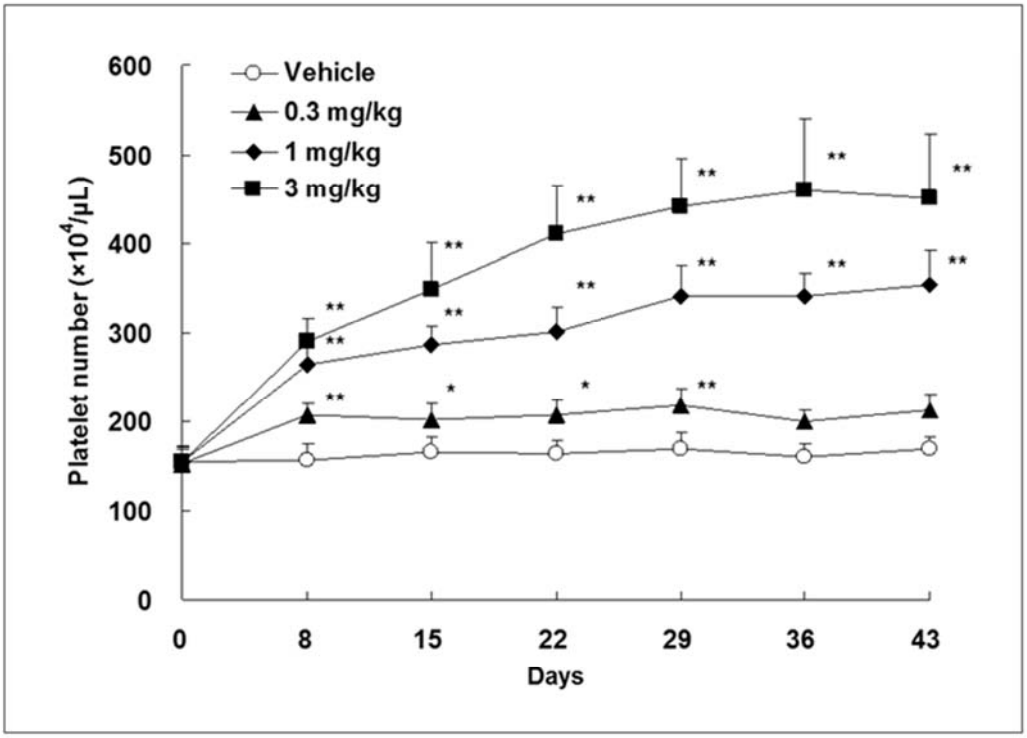
また，ルストロンボパグを 42 日間 (6 週間) 反復経口投与したときの血小板造血作用を TPOR-Ki/Shi マウスで検討した．

ルストロンボパグ (投与量：0.3，1 及び 3 mg/kg/日) あるいは媒体 (0.5% MC 水溶液) を 1 日 1 回 42 日間反復経口投与し，7 日間間隔で眼窩静脈より採血し，血小板数の推移を調べた．

Day 8 以降, ルストロンボパグのいずれの用量でも媒体投与群に比べ有意な血小板数の増加が認められた (図 2.6.2.2-10)．ルストロンボパグの 0.3 mg/kg/日の用量では Day 8 以降，血小板数は一定に推移した．また，1 及び 3 mg/kg/日の投与量でも Day 29 以降，血小板数はほぼ一定の値で推移した．

以上の結果から，3 mg/kg/日のルストロンボパグを 42 日間反復経口投与した場合でも，血小板数の増加は媒体投与群の 3 倍以内であり，Day 29 以降はほぼ一定の値で推移することが示された．

図 2.6.2.2-10　TPOR-Ki/Shi マウスに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数の推移



平均値 ± 標準偏差 (n = 10).
投与 7 日毎に血小板数を測定した．Day 0 は投与前を示す.
** : P <0.01 (媒体投与群との Dunnett's test による比較).
 * : P <0.05 (媒体投与群との Dunnett's test による比較).

2.6.2.2.3 *In vivo* における作用 (2)

評価資料 4.2.1.1-09
概要表 2.6.3.2.3.1

ルストロンボパグ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 TPOR-Ki/Shi マウス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．評価には，10～11 週齢の雌性 TPOR-Ki/Shi マウスを 1 群あたり 12 例用いた．

ルストロンボパグ (投与量：0.3 及び 10 mg/kg/日)，対照化合物であるエルトロンボパグ (投与量：10 及び 50 mg/kg/日) あるいは媒体 (0.5% MC 水溶液) を 1 日 1 回 21 日間反復経口投与した．最終投与翌日 (Day 22) にペントバルビタール麻酔下で腹部の大静脈より採血し，血液学的検査として血小板をはじめとする血球成分の分画と数値測定 (各用量 4 例)，血液凝固系検査 (各用量 4 例) 及び血液化学的検査 (各用量 3 又は 4 例) を実施するとともに，骨髄や脾臓を含めた諸器官・組織について病理組織学的検査 (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．

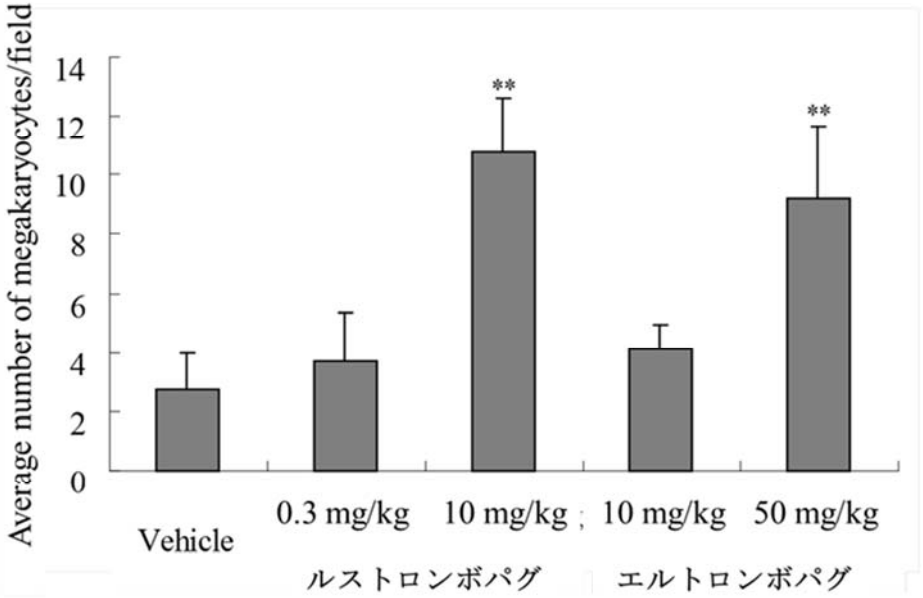
その結果，ルストロンボパグの 10 mg/kg/日投与群及びエルトロンボパグの 50 mg/kg/日投与群では媒体対照群に比べ有意な血小板数の増加が認められた (表 2.6.2.2-6)．血小板数の増加が巨核球数の増加に起因するものかを検討した結果，骨髄の巨核球数の計測において巨核球数の有意な増加が認められた (図 2.6.2.2-11)．さらに，病理組織学的検査では，骨髄や脾臓以外にも，ルストロンボパグの 10 mg/kg/日投与群では肺や肝臓で，エルトロンボパグの 50 mg/kg/日投与群では肺で巨核球の増加が認められた．これらの薬効及びそれを裏付ける指標の変化以外に，ルストロンボパグの 10 mg/kg/日投与群及びエルトロンボパグの 50 mg/kg/日投与群では赤血球数 (RBC)，ヘモグロビン (Hb) 量及びヘマトクリット (Ht) 値の有意な減少が認められ，血液化学的検査では乳酸脱水素酵素 (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．

表 2.6.2.2-6　TPOR-Ki/Shi マウスにルストロンボパグ又はエルトロンボパグを 21 日間反復経口投与した後の血小板造血作用並びに赤血球系パラメータの変動

Group	Platelet ($\times 10^4/\mu L$)	RBC ($\times 10^6/\mu L$)	Hb (g/dL)	Ht (%)
Vehicle	167.7 ± 8.5	9.51 ± 0.52	14.8 ± 0.9	44.0 ± 2.6
ルストロンボパグ 0.3 mg/kg/日	186.4 ± 4.1	9.02 ± 0.08	14.0 ± 0.2	41.9 ± 1.0
ルストロンボパグ 10 mg/kg/日	458.3 ± 31.5 **	8.64 ± 0.28 *	13.4 ± 0.5 *	39.9 ± 1.6 *
エルトロンボパグ 10 mg/kg/日	213.7 ± 16.9	9.13 ± 0.22	14.2 ± 0.3	42.5 ± 0.6
エルトロンボパグ 50 mg/kg/日	496.9 ± 63.9 **	8.75 ± 0.26 *	13.9 ± 0.3	40.9 ± 0.6 *

平均値 ± 標準偏差 (n=4).
** : P <0.01 (媒体投与群との Dunnett's test による比較).
* : P <0.05 (媒体投与群との Dunnett's test による比較).

図 2.6.2.2-11　TPOR-Ki/Shi マウスにルストロンボパグ又はエルトロンボパグを 21 日間反復経口投与した後の骨髄中の巨核球数



平均値 ± 標準偏差 (n = 9 又は 10).
投与 21 日後 (Day 22) の骨髄中の巨核球数を示す．骨髄組織の 5 視野で巨核球を計測した．
** : P <0.01 (媒体投与群との Dunnett's test による比較).

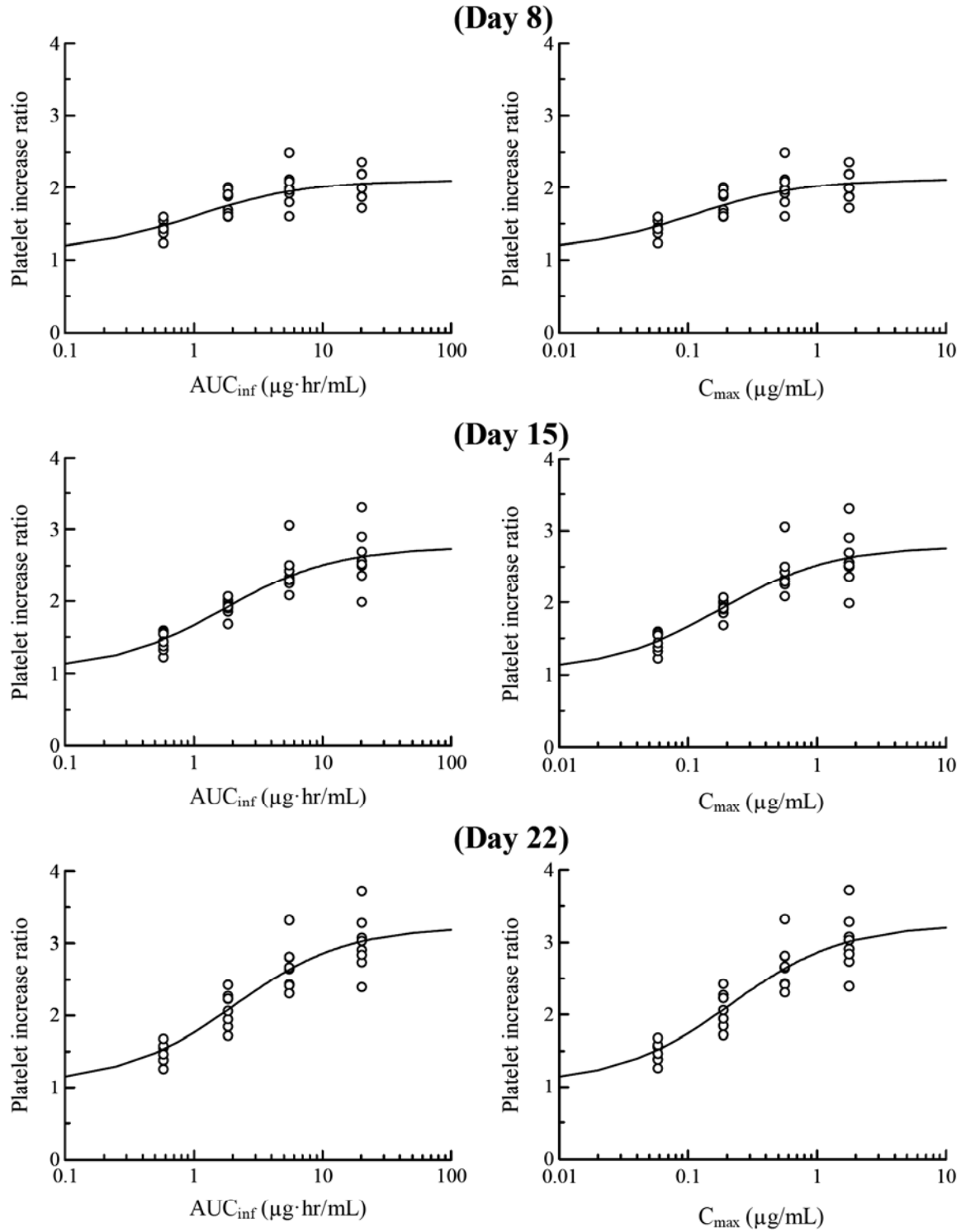
2.6.2.2.4 TPOR-Ki/Shi マウスを用いた PK/PD 解析

評価資料 4.2.1.1-10
概要表 2.6.3.2.4

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 TPOR-Ki/Shi マウスの血小板造血作用 [薬力学 (PD)] 及びルストロンボパグ (投与量 : 0.3，3 及び 10 mg/kg) を単回経口投与したときの TPOR-Ki/Shi マウスにおける血漿中薬物濃度 [薬物動態 (PK)] のデータに基づいて PK/PD 解析を行った．PK データに線形性が認められたことから，3 mg/kg の PK データを用いて，1 mg/kg 単回経口投与時の PK データを推定した．

Day 8，15 又は 22 の血小板増加率 (Day 8，15 又は 22 の血小板数 / Day 0 の血小板数) とルストロンボパグの血漿中濃度との関係を検討した (図 2.6.2.2-12)．その結果，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．さらに，血小板が 1.5 倍増加したときの AUC_{inf} 並びに C_{max} を算出した結果，AUC_{inf} は Day 8，15 及び 22 で 0.664，0.639 及び 0.529 μg·hr/mL であり，C_{max} は 0.0662，0.0642 及び 0.0555 μg/mL であった．

図 2.6.2.2-12 血小板増加率とルストロンボパグの AUC_{inf} 並びに C_{max} との相関性



2.6.2.3 副次的薬理試験

2.6.2.3.1 造血系コロニー形成能に与える影響

評価資料 4.2.1.2-01
概要表 2.6.3.3.1

ルストロンボパグ (濃度 : 0.25 及び 1 μmol/L) 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 陽性細胞を用いてルストロンボパグと rhEPO (濃度 : 0.05 及び 3 U/mL) 及び rhG-CSF (濃度 : 1 及び 10 ng/mL)とともに培養し，形成されるコロニー数を計測した.

その結果，ルストロンボパグは赤血球系コロニー [前期赤芽球系前駆細胞 (BFU-E) 及び赤芽球コロニー形成細胞 (CFU-E)] や，顆粒球・マクロファージ系コロニー [顆粒球コロニー形成細胞 (CFU-G) 及びマクロファージコロニー形成細胞 (CFU-M)] を形成させなかった．また，ルストロンボパグは，rhEPO 又は rhG-CSF と併用しても，それぞれが誘導する赤血球系又は顆粒球・マクロファージ系コロニーの形成に影響は認められなかった (表 2.6.2.3-1 及び表 2.6.2.3-2).

以上の結果から，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.

表 2.6.2.3-1　ルストロンボパグと EPO による造血系コロニー形成作用

Substance (units)	Concentration			Number of erythroid colonies	P value
ルストロンボパグ (μmol/L)	0.25			0.0 ± 0.0	–
	1			0.0 ± 0.0	–
rhEPO (U/mL)	0.05			62.7 ± 11.1	–
	3			89.8 ± 9.2	–
rhEPO (U/mL) + ルストロンボパグ (μmol/L)	0.05	+	0.25	66.5 ± 11.1	0.7293 [a]
	0.05	+	1	74.0 ± 6.7	0.1142 [a]
	3	+	0.25	91.2 ± 8.2	0.9663 [b]
	3	+	1	94.3 ± 13.7	0.6915 [b]

平均値 ± 標準偏差 (n=6).
rhEPO とルストロンボパグの併用により形成される赤血球系コロニー数を計測し，rhEPO のみで形成される赤血球系コロニー数と比較した.
a : 0.05 U/mL の rhEPO との比較 (Dunnett's test).
b : 3 U/mL の rhEPO との比較 (Dunnett's test).

表 2.6.2.3-2　ルストロンボパグと G-CSF による造血系コロニー形成作用

Substance (units)	Concentration			Number of granulocytic colonies	P value
ルストロンボパグ (μmol/L)		0.25		0.0 ± 0.0	–
		1		0.0 ± 0.0	–
rhG-CSF (ng/mL)		1		1.7 ± 0.5	–
		10		53.7 ± 10.0	–
rhG-CSF (ng/mL) + ルストロンボパグ (μmol/L)	1	+	0.25	1.3 ± 0.5	0.5467 [a]
	1	+	1	1.8 ± 0.8	0.8502 [a]
	10	+	0.25	58.7 ± 8.3	0.5535 [b]
	10	+	1	60.8 ± 9.2	0.3240 [b]

平均値 ± 標準偏差 (n=6).
rhG-CSF とルストロンボパグの併用により形成される顆粒球系コロニー数を計測し, rhG-CSF のみで形成される顆粒球系コロニー数と比較した.
a：1 ng/mL の rhG-CSF との比較 (Dunnett's test).
b：10 ng//mL の rhG-CSF との比較 (Dunnett's test).

2.6.2.4 安全性薬理試験

概要表 2.6.3.4.1

2.6.2.4.1 安全性薬理コアバッテリー試験

安全性を薬理学的観点から評価する目的で，ルストロンボパグの中枢神経系，心血管系及び呼吸系に対する作用を，GLP 適用下にて検討した．

2.6.2.4.1.1 中枢神経系

評価資料 4.2.1.3-01

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 週齢，各群 8 例) に単回経口投与し，投与前と投与後 1，2，4 及び 8 時間における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．対照群には媒体 [Tween 80 を 5%含有するポリエチレングリコール 400 (PEG/Tween 80)] を投与した．

その結果，ルストロンボパグの 40 及び 1000 mg/kg 投与群で，媒体対照群に対して有意な自発運動量 (単位エリアの横断回数又は立ち上がり回数) の亢進が，投与 1 又は 2 時間後に認められたが，その変化は投与前の自発運動量を下回る軽度かつ一過性であり，200 mg/kg 投与群では有意な変化は観察されず，用量依存性は認められなかった．また，その他のいずれの一般症状及び行動の観察項目にも，ルストロンボパグに起因すると考えられる変化は認められなかった．

2.6.2.4.1.2 心血管系

2.6.2.4.1.2.1 無麻酔イヌの血圧，心拍数及び心電図に対する作用

評価資料 4.2.1.3-02

媒体 (0.5% 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 日間の投与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，投与前と投与 1，2，4，8 及び 24 時間後の血圧，心拍数並びに心電図 [PR 間隔，QRS 時間，QT 間隔及び補正 QT (QTc)] を測定した．また，投与 1，2，4，8 及び 24 時間後の血漿中ルストロンボパグ濃度を測定した．

その結果，いずれの用量においても血圧，心拍数及び心電図パラメータに影響を及ぼさなかった．100, 300 及び 500 mg/kg 経口投与時の 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．

2.6.2.4.1.2.2 モルモット乳頭筋標本の心筋活動電位に対する作用

評価資料 4.2.1.3-03

雄性 Hartley 系モルモット (4～5 週齢) から摘出した右心室乳頭筋標本を 1 群あたり 5 例使用した．ルストロンボパグをジメチルスルホキシドに溶解し，0.1，1 及び 10 µmol/L (0.06，0.59 及び 5.92 µg/mL) の濃度で標本に適用し，0.5 Hz 電気刺激時に観察される活動電位波形から，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，APD_{90}とAPD_{30}の差であるAPD_{30-90}を算出して，これらのパラメータを評価した．なお，本試験における最高濃度 10 μmol/L (5.92 μg/mL) は，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}が 250 ng/mL であり [2.7.2.2.3.2 項参照]，またヒトにおけるたん白結合率が，99.9%以上と極めて高い値である [2.6.4.4.4.項参照] ことを考慮すると，充分高い濃度である．

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．

2.6.2.4.1.2.3 hERG チャネル発現細胞のイオン電流に対する作用

評価資料 4.2.1.3-04

hERG チャネルを発現させた HEK293 細胞を 1 群あたり 5 例使用した．ルストロンボパグをジメチルスルホキシドに溶解し，0.1，1 及び 10 μmol/L (0.06，0.59 及び 5.92 μg/mL) の濃度で細胞に適用し，遅延整流K^+電流を測定した．

その結果，ルストロンボパグの 0.1，1 及び 10 μmol/L の濃度において，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．本試験の最高濃度である 10 μmol/L においても抑制率は 50%に到達しなかったが，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．

2.6.2.4.1.3 呼吸系

評価資料 4.2.1.3-05

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 週齢，各群 6 例) に単回経口投与し，投与前と投与 1，2，4 及び 8 時間後における呼吸数，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．対照群には媒体 (PEG/Tween 80) を投与した．

その結果，ルストロンボパグは，いずれの用量においても，いずれのパラメータに影響を及ぼさなかった．

2.6.2.4.2 安全性薬理フォローアップ試験

2.6.2.4.2.1 PEG/Tween 80 のイヌ心電図に対する影響

参考資料 4.2.1.3-07

イヌ 1 ヵ月反復経口投与毒性試験の心電図検査で，ルストロンボパグの 3 及び 10 mg/kg/日投与群 (それぞれ 2/6 及び 1/6 例) に第 2 度房室ブロックが観察され，3 及び 300 mg/kg/日投与群並びに媒体 (PEG/Tween 80) 投与群 (いずれも 1/6 例) にも PR 延長が認められた [2.6.6.3.2.1 項参照]．そこで，PEG/Tween 80 の心電図に対する影響を検討するため，雌性ビーグルイヌを 1 群あたり 3～4 例使用し，0.5% MC 水溶液の 1.5 mL/kg/日 (対照)，PEG/Tween 80 の 1.5 及び 5 mL/kg/日投与群の 3 日間反復経口投与時における心電図への影響を，ホルター心電図測定法により検討した．各投与時の投与 3 時間前から投与 6 時間後まで測定し，不整脈の観察及び心電

図パラメータ (PR 間隔，QRS 時間，QT 間隔及び QTc) の解析を実施した．

その結果, 対照群においては, 投与 3 日間でいずれも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/day 投与群では，投与 1 日目から，全例で第 2 度房室ブロックが認められた (それぞれ 37 及び 88 回)．また，投与 2 及び 3 日目においても，同様に全例で第 2 度房室ブロックが観察された．心電図パラメータ解析の結果，これらは Wenckebach 型の第 2 度房室ブロックであった．その他の心電図パラメータに関しては，PEG/Tween 80 の影響は認められなかった．

2.6.2.4.2.2 ルストロンボパグナトリウム塩の 28 日間反復経口投与におけるイヌ心電図に対する作用

評価資料 4.2.1.3-06

媒体 PEG/Tween 80 の影響を除くため, 本試験では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．雄性ビーグルイヌを用いて，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，投与 7 日前，投与開始 1，7，14 及び 28 日後にホルター心電計による心電図を記録した．群構成は，媒体 (pH を約 9.4 に調製した注射用水) 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．各投与の 24 時間前から投与 23 時間後まで心電図を記録し，第 2 度房室ブロック等の不整脈を観察した．また，投与開始 1，7，14 及び 28 日後の投与前，投与 1，2，4，6 及び 8 時間後における心電図の PR 間隔，QRS 時間，QT 間隔及び QTc を解析した．さらに，投与開始 1，7，14 及び 28 日後の投与前，投与 1，2，4，6 及び 8 時間後において，ルストロンボパグの血漿中濃度を測定した．

その結果，投与開始 1 日目の投与前までに，媒体投与群の 1 例 (個体 No.113) で 3 回，ルストロンボパグナトリウム塩投与群の 1 例 (個体 No.125) で 12 回の第 2 度房室ブロックが認められた. 後者 (個体 No.125) は, 馴化期間中である投与 7 日前においても, 3 回の第 2 度房室ブロックが観察されており，先天的に房室ブロックを有しているイヌと判断された．この個体を除いたルストロンボパグナトリウム塩投与群 5 例においては，投与 1，14 及び 28 日後のルストロンボパグナトリウム塩投与後に第 2 度房室ブロックは観察されず, 投与 7 日後に 2 例 (個体 No.123 及び 124) で各 1 回の第 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の投与前や投与 14 日後よりも少なかった (表 2.6.2.4-1). また, 各投与日における心電図の PR 間隔, QRS 時間，QT 間隔及び QTc に，媒体投与群とルストロンボパグナトリウム塩投与群で有意差は認められず，両群での心電図パラメータへの影響に差は無いものと判断された．

本試験における血漿中ルストロンボパグの C_{max} (Day 28：17.26 µg/mL，表 2.6.2.4-2) 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，2.6.7.7.3 項参照) とほぼ同じであった．また，投与 14 及び 28 日後に，投与群の中で最も高い C_{max} を示したイヌでも，第 2 度房室ブロックは観察されなかった．したがって，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．

表 2.6.2.4-1　ルストロンボパグナトリウム塩 (200 mg/kg/日) の 28 日間反復投与イヌ心電図試験での第 2 度房室ブロック発現数

Day	投与群	個体 No.	投与前		投与時刻	投与後	
			投与前日 [a]	投与当日 [b]		投与当日 [c]	投与翌日 [d]
1	媒体	111	0	0	10:11	0	0
		112	0	0	10:12	0	0
		113	0	3	10:13	0	0
	ルストロンボパグ	121	0	0	10:11	0	0
		122	0	0	10:12	0	0
		123	0	0	10:13	0	0
		124	0	0	10:14	0	0
		125 [e]	10	2	10:14	10	0
		126	0	0	10:15	0	0
7	媒体	111	0	0	10:15	0	0
		112	0	0	10:16	0	0
		113	0	0	10:17	0	0
	ルストロンボパグ	121	0	0	10:15	0	0
		122	0	0	10:16	0	0
		123	0	0	10:17	1	0
		124	0	1	10:19	1	0
		125	6	1	10:20	13	0
		126	0	0	10:20	0	0
14	媒体	111	0	0	10:06	0	0
		112	0	0	10:07	3	0
		113	0	0	10:08	0	0
	ルストロンボパグ	121	0	0	10:06	0	0
		122	0	0	10:07	0	0
		123	0	0	10:08	0	0
		124	0	0	10:09	0	0
		125	11	0	10:10	41	0
		126	0	0	10:10	0	0
28	媒体	111	0	0	10:03	0	0
		112	0	0	10:04	1	0
		113	0	0	10:05	0	0
	ルストロンボパグ	121	0	0	10:03	0	0
		122	0	0	10:04	0	0
		123	1	0	10:06	0	0
		124	0	0	10:07	0	0
		125	12	7	10:07	62	0
		126	0	0	10:06	0	0

a：投与前日のおよそ 10:00～24:00，b：投与当日のおよそ 0:00 から投与直前まで，
c：投与当日の投与直後からおよそ 24:00 まで，d：投与翌日のおよそ 0:00～9:00，
e：投与 7 日前の 23 時間 (10:00～9:00) において，3 回の第 2 度房室ブロックが発現.

表 2.6.2.4-2　ルストロンボパグナトリウム塩 (200 mg/kg/日) の 28 日間反復投与イヌ心電図試験での TK パラメータ

Day	ルストロンボパグ		
	C_{max} (μg/mL)	$AUC_{0\text{-}8hr}$ (μg·hr/mL)	T_{max} (hr)
1	10.99	64.99	4.7
7	15.68	99.24	4.3
14	17.29	110.40	3.8
28	17.26	113.95	4.2

$AUC_{0\text{-}8hr}$：時間 0 から 8 時間までの血漿中薬物濃度－時間曲線下面積

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

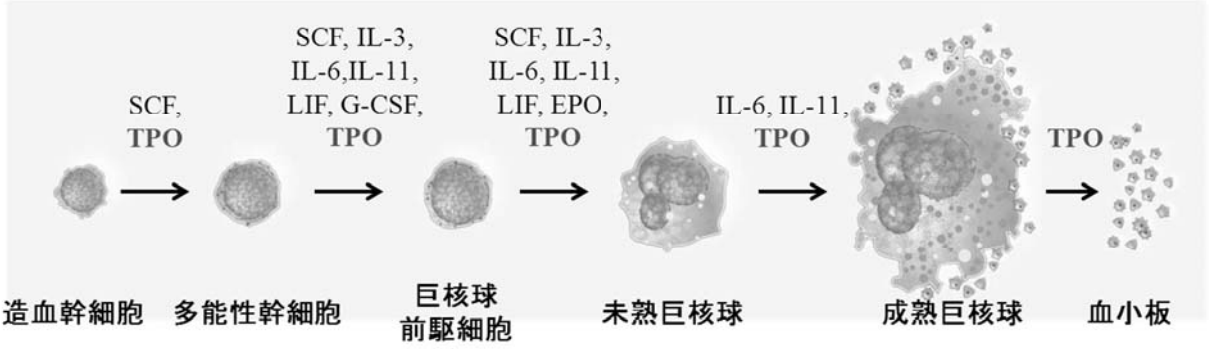
該当する試験なし.

2.6.2.6 考察及び結論

2.6.2.6.1 *In vitro* 血小板産生作用

巨核球造血には，図 2.6.2.6-1 に示すように IL-3，IL-6，IL-11，EPO，G-CSF など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 [1,2,3].

図 2.6.2.6-1　造血幹細胞の分化とサイトカイン



N Engl J Med, 1998 [3] 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．

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 [4,5]，転写因子の STAT3，STAT5，Vav が活性化される [6]．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 [7] 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)[8] も活性化されることが知られている．

ルストロンボパグは，経口投与で薬効を発揮する低分子ヒト TPO 受容体作動薬として開発を進めている化合物であり，同様の薬効を示す低分子ヒト TPO 受容体作動薬としてエルトロンボパグ (市販名レボレード®) が知られている．エルトロンボパグはヒト 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巨核球造血を促進させて血小板を増加させる [9]．そこで，一部の検討については既承認のエルトロンボパグを対照化合物としてルストロンボパグの薬理活性を比較検討した．

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，及びヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞を用いた巨核球コロニー形成能を *in vitro* で評価した．さらに，ヒト TPO 受容体発現細胞を用いてルストロンボパグの TPO 受容体を介するシグナル伝達系の解析を行った．副次的な薬理作用の検討として，ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞を用いて，巨核球以外の造血系細胞への分化の可能性を検討し，ルストロンボパグと EPO 及び G-CSF を併用した時の造血系コロニー形成に与える影響についても検討した．

ヒト TPO 受容体に対するルストロンボパグの作用を Ba/F3-hMpl 細胞を用いて検討した．そ

の結果，ヒト TPO と同様に細胞増殖活性 (EC_{50}：ヒト TPO = 0.08 nmol/L，ルストロンボパグ = 84.0 nmol/L) を示した．一方，ヒト TPO 受容体を発現していない細胞 (Ba/F3 細胞) に対しては増殖活性を示さなかった．

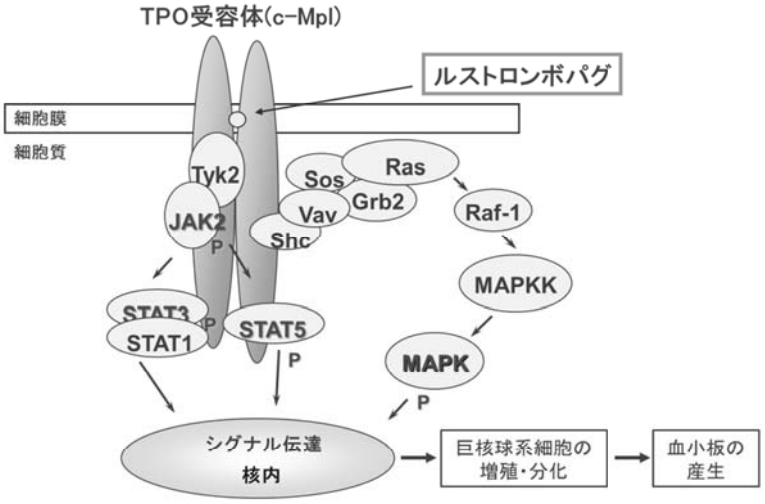
ルストロンパグを健康成人に単回経口投与したときの血漿中代謝物検索の結果から，代謝物としてルストロンボパグ-脱ヘキシル体及びルストロンボパグ-5-ケト体が検出されている [2.7.2.2.1.4 項参照]．そこで，ルストロンボパグ-脱ヘキシル体及びルストロンボパグ-5-ケト体のヒト TPO 受容体への作用を Ba/F3-hMpl 細胞で調べた．その結果，両代謝物は，ともに細胞増殖活性を示したが (EC_{50}：ルストロンボパグ-脱ヘキシル体 = 34861.0 nmol/L，ルストロンボパグ-5-ケト体 = 555.7 nmol/L)，ルストロンボパグの細胞増殖活性よりも明らかに低く，ヒト血漿中代謝物としての生成量も少ないことから，本薬を投与したときの血小板造血作用に対する寄与は少ないと考えられる．

また，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．EPO 受容体に対しては Ba/F3-hEPOR 細胞を，G-CSF 受容体に対しては NOMO-1 細胞 [10] を，GM-CSF 及び IL-3 受容体に対しては TF-1 細胞 [11] を，それぞれ用いた．これらのサイトカイン依存性細胞株に対するルストロンボパグの増殖活性を調べたところ，ヒト TPO と同様に，ルストロンボパグは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 EPO，G-CSF，GM-CSF 並びに IL-3 受容体のいずれにも作用せず，ヒト TPO 受容体に選択的に作用するものと考えられる．

次に，ルストロンボパグの血小板造血作用を明らかにするために，ヒト骨髄由来の CD34 陽性細胞からの巨核球への分化能について巨核球コロニーアッセイを用いて検討した．ヒト TPO による巨核球コロニー形成能の最大活性を 100%としてルストロンボパグ，光学異性体である (+)-ルストロンボパグ及び対照化合物のエルトロンボパグの EC_{50} 値を算出した．その結果，ルストロンボパグの EC_{50} 値は 0.31 μmol/L，(+)-ルストロンボパグの EC_{50} 値は 0.19 μmol/L 及びエルトロンボパグの EC_{50} 値は 0.86 μmol/L を示したことから，ルストロンボパグと(+)-ルストロンボパグはともにヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞から巨核球系細胞への分化誘導を促進させることがわかった．しかし，原薬中に含まれる (+)-ルストロンボパグは微量であり，生体内ではルストロンボパグから (+)-ルストロンボパグへのキラル反転は生じないことから (2.6.4.3 項参照)，(+)-ルストロンボパグの血小板造血への寄与は非常に低いと考えられる．

ルストロンボパグのシグナル伝達経路の活性化について，ルストロンボパグが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．その結果，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 2.6.2.6-2 に示す．

図 2.6.2.6-2　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, STAT1 (3, 5) : シグナル伝達性転写因子 1 (3, 5), 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タンパク質の 1 種.
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.

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 Ras-MAPK 経路を活性化することにより巨核球系細胞の増殖・分化を促進させ，血小板を産生させるものと考えられる.

2.6.2.6.2 *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 E5501 (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，チンパンジー [9] やヒト胎児肝臓由来 CD34 陽性細胞を移植した NOD/SCID マウス [12] 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共通に発現している TPO 受容体膜貫通領域のアミノ酸配列の 499 番目のヒスチジン (H499) が必須であることが知られており [13]，ヒスチジンの重要性について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て検討した. ブチザミドはルストロンボパグの側鎖のヘキシル基をターシャルブチル基に，メチル基をノルマルプロピル基に変換したものであり，分子量はルストロンボパグと同じであり，薬理活性も極めて類似している [14]. ブチザミドはヒト TPO 受容体膜貫通部位のヒスチジンをロイシンに変換した Ba/F3-hMplH499L 細胞には増殖活性を示さず，マウス TPO 受容体膜貫通部位のロイシンをヒスチジンに変換した Ba/F3-mMplL490H 細胞では増殖活性を示した [14]. この結果から，ルストロンボパグの反応にも，ブチザミドと同様に H499 が必須と考えられ，TPO 受容体に作用してシグナル伝達経路を活性化すると推察された. 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．

TPOR-Ki/Shi マウスにルストロンボパグを 0.3 mg/kg/日以上の用量で 1 日 1 回 21 日間反復経口投与すると，投与 7 日後から用量依存的に媒体投与群に比べ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．TPOR-Ki/Shi マウスにおける PK/PD 解析から，血小板増加率は AUC_{inf} 並びに C_{max} と相関しており，ルストロンボパグの血漿中濃度が増加するに従って，血小板増加率も上昇することが示された．これは TPOR-Ki/Shi マウスを用いることにより，ルストロンボパグのヒト型 TPO 受容体を介した血小板造血作用が評価できることを示している．また，ヒトへの外挿性を健康成人での国内反復投与試験 (M0613) の結果に基づいて検討した．その結果，健康成人での血小板数が 50%増加したとき (0.5 mg 群) の C_{max} は 0.0389 µg/mL，AUC_{inf} は 0.703 µg·hr/mL を示した [2.7.2.2.2.2 項参照]．TPOR-Ki/Shi マウスにルストロンボパグを 14 日間投与し，血小板が 50%増加したときの C_{max} は 0.0642 µg/mL，AUC_{inf} は 0.639 µg·hr/mL であったことから，TPOR-Ki/Shi マウスの結果は，健康成人の血漿中濃度と近似した数値であり，臨床成績を予測するモデルとして有効であることが示唆された．次に，TPOR-Ki/Shi マウスにルストロンボパグを 0.3，1 及び 3 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回 42 日間 (6 週間) 反復経口投与し，血小板数をモニタリングした．最高用量の 3 mg/kg/日投与群では，Day 29 以降，血小板数は一定の値で推移したことから，投与期間に依存して血小板産生が亢進し続ける可能性は低いと考えられる．

TPOR-Ki/Shi マウスにおけるルストロンボパグの血小板造血作用を裏付けるために，骨髄での巨核球産生亢進を TPOR-Ki/Shi マウスで評価した．ルストロンボパグを 10 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回 21 日間反復経口投与することにより，骨髄及び脾臓で巨核球の産生亢進像が病理組織学的検査で認められ，有意な骨髄の巨核球数増加も認められた．これらの巨核球数の亢進は *in vitro* で認め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* でも生じ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 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になった．

2.6.2.6.3 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 と G-CSF の併用療法が行なわれている [15]．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 並びに 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の 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巨核球系コロニーを形成させる濃度においても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を増減させる作用は認められなかった．同様に，ルストロンボパグは，顆粒球･マクロファージ系コロニーを形成させず, G-CSF とルストロンボパグを併用した場合でも，G-CSF 単独で形成されるコロニー数を増減させることはなかった．この結果から，ルストロンボパグは EPO 及び G-CSF による造血系コロニー形成に影響を及ぼさないことが示された. 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.

2.6.2.6.4 安全性薬理試験

ラットを用いた中枢神経系及び呼吸系試験では, ルストロンボパグの 40, 200 及び 1000 mg/kg の用量の単回経口投与で, 40 及び 1000 mg/kg 投与群が媒体対照群に比して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，いずれの用量でも影響は認められなかった．自発運動量の亢進も，軽度かつ一過性であり，他の一般症状観察項目において，中枢神経系への影響を示唆するような結果が認められていないことから，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.

心血管系に対しても，イヌへの 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，モルモット乳頭筋を用いた心筋活動電位試験において，ルストロンボパグは 10 µmol/L (5.92 µg/mL) の濃度まで影響を示さず，hERG 発現細胞でのテールピーク電流抑制率も，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%以上と極めて高い値であり [2.6.4.4.4.項参照], 慢性肝疾患による血小板減少症患者に 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 であること [2.7.2.2.3.2 項参照] から，これらの *in vitro* 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における心電図検査で, 媒体として PEG/Tween 80 を使用した際に，ルストロンボパグの 3 及び 10 mg/kg/日投与群で第 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，上記の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せず，また心電図パラメータに影響は認められなかった．一方，PEG/Tween 80 を 1.5 及び 5 mL/kg/日で 3 日間反復経口投与した結果，投与 1 日目から全例で第 2 度房室ブロックが認められ，投与 2 及び 3 日目においても同様であったことから，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，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.

ルストロンボパグを慢性肝疾患による血小板減少症患者に 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，中枢神経系及び呼吸系試験に用いた雄性ラットにおいて，ルストロンボパグを 40 及び 1000 mg/kg/日の用量で 1 ヵ月反復経口投与した場合，投与 1 日目における 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，心血管系評価に用いたイヌでは，ルストロンボパグを 500 mg/kg の用量で単回経口投与した場合の C_{max} は 7.63 µg/mL であり，ナトリウム塩を 200 mg/kg/日の用量で 28 日間反復経口投与した場合の C_{max} は 17.3 µg/mL であった．したがって，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極めて低いと考えられる.

2.6.2.7 図表

図表は本文中に記載した.

2.6.2.8 参考文献

1. Lok S, Kaushansky K, Holly RD, et al. Cloning and expression of murine thrombopoietin platelet production in vivo. Nature 1994; 369: 565-8.
2. 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.
3. Kaushansky K. Drug Therapy "Thrombopoietin". N Engl J Med 1998; 339:746-54.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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; 93(10): 1495-504.
15. 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.

ムルプレタ錠 3mg

第 2 部 (モジュール 2) : CTD の概要 (サマリー)

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3 薬理試験概要表

塩野義製薬株式会社

目次

略号及び用語定義一覧表 3
2.6.3　薬理試験概要表 4
2.6.3.1　薬理試験：　一覧表 4
2.6.3.2　効力を裏付ける試験 7
2.6.3.2.1　*In vitro* における作用 7
2.6.3.2.1.1　ヒト TPO 受容体発現細胞における増殖作用 7
2.6.3.2.1.2　ヒト TPO 受容体発現細胞に対するルストロンボパグ代謝物の増殖作用 9
2.6.3.2.1.3　各種サイトカイン依存性細胞株に対する増殖作用 10
2.6.3.2.1.4　シグナル伝達経路の解析 11
2.6.3.2.1.5　ヒト造血細胞に対する作用 12
2.6.3.2.2　*In vivo* における作用(1) 13
2.6.3.2.2.1　TPOR-Ki/Shi マウスにおけるルストロンボパグの血小板造血作用の検討 13
2.6.3.2.2.2　TPOR-Ki/Shi マウスにおけるエルトロンボパグの血小板造血作用の検討 14
2.6.3.2.2.3　ルストロンボパグの TPOR-Ki/Shi マウスにおける 6 週間反復投与での血小板造血作用 15
2.6.3.2.3　*In vivo* における作用 (2) 16
2.6.3.2.3.1　ルストロンボパグの TPOR-Ki/Shi マウスにおける巨核球産生及び造血への影響 16
2.6.3.2.4　TPOR-Ki/Shi マウスにおける PK/PD 解析 17
2.6.3.3　副次的薬理試験 18
2.6.3.3.1　造血系コロニー形成能に与える影響 18
2.6.3.4　安全性薬理試験 19
2.6.3.4.1　安全性薬理試験成績 19
2.6.3.5　薬力学的薬物相互作用試験 20

2.6.3 略号及び用語定義一覧表

略号	用語定義
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
BFU-E	前期赤芽球系前駆細胞
BaF3-hEPOR 細胞	Ba/F3 細胞にヒト EPO 受容体を発現させた細胞
Ba/F3-hMpl 細胞	Ba/F3 細胞にヒト TPO 受容体を発現させた細胞
CFU-E	赤芽球コロニー形成細胞
CFU-G	顆粒球コロニー形成細胞
CFU-M	マクロファージコロニー形成細胞
CFU-Mk	巨核球コロニー形成細胞
C_{max}	最高血漿中薬物濃度
EC_{50}	50%有効濃度
E_{max}	最大薬理活性
EPO	エリスロポエチン
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
hERG	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
IC_{50}	50%阻害濃度
IL-3	インターロイキン 3
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
MC	メチルセルロース
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
PK	薬物動態
rhEPO	遺伝子組換えヒトエリスロポエチン
rhTPO	遺伝子組換えヒトトロンボポエチン
rmIL-3	遺伝子組換えマウスインターロイキン 3
STAT3	シグナル伝達性転写因子 3
STAT5	シグナル伝達性転写因子 5
TPO	トロンボポエチン

2.6.3　薬理試験概要表

2.6.3.1　薬理試験：　一覧表

被験物質：ルストロンボパグ，エルトロンボパグ

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	試験報告書添付場所
効力を裏付ける試験					
In vitro における作用					
ヒトトロンボポエチン (TPO) 受容体発現細胞における増殖作用	Ba/F3 細胞にヒト TPO 受容体を発現させた細胞 (Ba/F3-hMpl 細胞)，Ba/F3 細胞	*In vitro*	塩野義製薬	S-888711-EB-121-N	4.2.1.1-01
各種サイトカイン依存性細胞株に対する増殖作用	Ba/F3 細胞にヒト EPO 受容体を発現させた細胞 (Ba/F3-hEPOR 細胞)，NOMO-1 細胞，TF-1 細胞	*In vitro*	塩野義製薬	S-888711-EB-158-N	4.2.1.1-02
シグナル伝達経路の解析	Ba/F3-hMpl 細胞	*In vitro*	塩野義製薬	S-888711-EB-122-N	4.2.1.1-03
ヒト造血細胞に対する作用					
ルストロンボパグのヒト造血幹細胞に対する作用 (CFU アッセイ)	ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞	*In vitro*	塩野義製薬	R-888711-EB-063-N	4.2.1.1-04
エルトロンボパグのヒト造血幹細胞に対する作用 (CFU アッセイ)	ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞	*In vitro*	塩野義製薬	R-888711-EB-064-N	4.2.1.1-05
In vivo における作用 (I)					
TPOR-Ki/Shi マウスにおけるルストロンボパグの血小板造血作用の検討	TPOR-Ki/Shi マウス	経口投与	塩野義製薬	R-888711-EB-042-N	4.2.1.1-06
TPOR-Ki/Shi マウスにおけるエルトロンボパグの血小板造血作用の検討	TPOR-Ki/Shi マウス	経口投与	塩野義製薬	R-888711-EB-043-N	4.2.1.1-07
ルストロンボパグの TPOR-Ki/Shi マウスにおける 6 週間反復投与での血小板造血作用	TPOR-Ki/Shi マウス	経口投与	塩野義製薬	S-888711-EB-131-N	4.2.1.1-08

(続く)

2.6.3.1 薬理試験： 一覧表 (続き)

被験物質：ルストロンボパグ

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号 [a]	試験報告書添付場所
効力を裏付ける試験					
In vivo における作用 (2)					
ルストロンボパグの TPOR-Ki/Shi マウスにおける巨核球産生及び造血への影響	TPOR-Ki/Shi マウス	経口投与	塩野義製薬	R-888711-EB-084-N	4.2.1.1-09
TPOR-Ki/Shi マウスを用いた PK/PD 解析	TPOR-Ki/Shi マウス	経口投与	塩野義製薬	S-888711-EB-124-N	4.2.1.1-10
ヒト TPO 受容体発現細胞に対するルストロンボパグ代謝物の増殖作用	Ba/F3-hMpl 細胞	*In vitro*	塩野義製薬	S-888711-EB-189-R	4.2.1.1-11
副次的薬理試験					
造血系コロニー形成能に与える影響	ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞	*In vitro*	塩野義製薬	S-888711-EB-159-N	4.2.1.2-01
安全性薬理試験					
中枢神経系					
一般症状及び行動に及ぼす影響	ラット/Sprague-Dawley	経口，単回，0，40，200，1000 mg/kg	[redacted]	R-888711-SF-071-L ([redacted]06-2360)	4.2.1.3-01
心血管系					
血圧，心拍数及び心電図に及ぼす影響	イヌ/ビーグル	経口，単回，0，100，300，500 mg/kg	[redacted]	R-888711-SF-073-L ([redacted]06-4362)	4.2.1.3-02
心電図に及ぼす影響	イヌ/ビーグル	経口，反復 28 日間，0，200 mg/kg	[redacted]	R-888711-SF-103-L ([redacted]07-4644)	4.2.1.3-06
心電図に及ぼす影響	イヌ/ビーグル	経口，反復 3 日間，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)]	[redacted]	R-888711-SF-088-N ([redacted]07-4487)	4.2.1.3-07
乳頭筋標本の心筋活動電位に及ぼす影響	モルモット/Hartley	*In vitro*，0.1，1，10 μmol/L	[redacted]	R-888711-SF-074-L ([redacted]06-9363)	4.2.1.3-03
心筋イオンチャネルに及ぼす影響	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子 (hERG) チャネル発現ヒト胎児腎臓細胞 (HEK293 細胞)	*In vitro*，0.1，1，10 μmol/L	[redacted]	R-888711-SF-075-L ([redacted]06-9364)	4.2.1.3-04

(続く)

2.6.3.1 薬理試験： 一覧表 (続き)

被験物質：ルストロンボパグ

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号 [a]	試験報告書添付場所
呼吸系 呼吸数, 1 回及び分時換気量に及ぼす影響	ラット/Sprague-Dawley	経口，単回，0，40，200，1000 mg/kg	[redacted]	R-888711-SF-072-L ([redacted]06-2361)	4.2.1.3-05
薬力学的薬物相互作用					
該当なし					

a：( ) 内は試験委託先の試験番号.

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

2.6.3.2.1 *In vitro* における作用

2.6.3.2.1.1 ヒト TPO 受容体発現細胞における増殖作用

被験物質：ルストロンボパグ
試験報告書添付場所：4.2.1.1-01
試験番号：S-888711-EB-121-N

細胞	Ba/F3-hMpl 細胞並びに Ba/F3 細胞				
評価項目	細胞増殖活性				
評価方法	Ba/F3 細胞 [マウスインターロイキン 3 (IL-3) 依存性 pro B 細胞株] 並びに Ba/F3 細胞にヒト TPO 受容体を発現させた Ba/F3-hMpl 細胞を作製し，細胞にルストロンボパグ，ヒト TPO (rhTPO) 並びにマウス IL-3 (rmIL-3) を添加し，96 穴プレートで 37°C で 3 日間培養した．WST-8 試薬を加え，マイクロプレートリーダーで測定波長 450 nm (参照波長 650 nm) で測定した．Ba/F3-hMpl 細胞並びに Ba/F3 細胞において，それぞれヒト TPO 添加群並びにマウス IL-3 添加群の最大増殖活性の平均値を 100%とし，その相対増殖活性が 50%に達する濃度を 50%有効濃度 (EC_{50}) と定義し算定した．				
結果	ルストロンボパグは Ba/F3-hMpl 細胞の増殖を促進させ，EC_{50} 値は 84.0 nmol/L であった．				
Ba/F3-hMpl 細胞に対する増殖活性 (ヒト TPO の最大活性に対する相対増殖活性率)					
ルストロンボパグ			rhTPO		
濃度 (nmol/L)	増殖活性 (%)[a]	EC_{50} (nmol/L)	濃度 (nmol/L)	増殖活性 (%)[a]	EC_{50} (nmol/L)
4.88	0.2 ± 0.2	84.0	0.00488	2.7 ± 0.6	0.08
9.77	0.2 ± 0.2		0.00977	3.5 ± 0.3	
19.5	1.6 ± 0.3		0.0195	9.8 ± 0.7	
39.1	13.8 ± 0.9		0.0391	24.0 ± 1.7	
78.1	45.2 ± 1.5		0.0781	47.5 ± 1.6	
156	80.4 ± 4.7		0.156	79.5 ± 2.4	
313	85.1 ± 3.9		0.313	96.6 ± 2.0	
625	83.1 ± 4.3		0.625	99.0 ± 4.7	
1250	87.0 ± 5.1		1.25	100.0 ± 2.5	
2500	84.6 ± 2.0		2.5	98.1 ± 6.1	
5000	79.4 ± 1.8		5	95.5 ± 3.0	
a：平均値 ± 標準偏差 (n=6).					

(続く)

2.6.3.2.1.1 ヒト TPO 受容体発現細胞における増殖作用 (続き)

被験物質：ルストロンボパグ
試験報告書添付場所：4.2.1.1-01
試験番号：S-888711-EB-121-N

細胞	Ba/F3-hMpl 細胞並びに Ba/F3 細胞							
結果	ルストロンボパグは Ba/F3 細胞の増殖を促進させなかった.							
Ba/F3 細胞に対する増殖活性 (rmIL-3 の最大活性に対する相対増殖活性率)								
ルストロンボパグ			rhTPO			rmIL-3		
濃度 (nmol/L)	増殖活性 (%)[a]	EC_{50} (nmol/L)	濃度 (nmol/L)	増殖活性 (%)[a]	EC_{50} (nmol/L)	濃度 (nmol/L)	増殖活性 (%)[a]	EC_{50} (nmol/L)
4.88	0.1 ± 0.1		0.00488	0.2 ± 0.2		0.0001	16.5 ± 0.9	
9.77	0.0 ± 0.0		0.00977	0.1 ± 0.2		0.0002	27.9 ± 2.8	
19.5	0.0 ± 0.0		0.0195	0.1 ± 0.1		0.00039	41.9 ± 4.3	
39.1	0.0 ± 0.0		0.0391	0.1 ± 0.1		0.00078	66.2 ± 7.6	
78.1	0.0 ± 0.0		0.0781	0.0 ± 0.0		0.00156	83.4 ± 6.5	
156	0.0 ± 0.0	−	0.156	0.0 ± 0.0	−	0.00313	94.1 ± 7.5	0.0005
313	0.0 ± 0.0		0.313	0.0 ± 0.1		0.00625	91.0 ± 6.9	
625	0.0 ± 0.0		0.625	0.0 ± 0.0		0.0125	91.1 ± 6.5	
1250	0.0 ± 0.0		1.25	0.0 ± 0.0		0.025	96.6 ± 3.9	
2500	0.0 ± 0.0		2.5	0.0 ± 0.0		0.05	100.0 ± 6.3	
5000	0.0 ± 0.0		5	0.0 ± 0.0		0.1	91.3 ± 3.1	

a：平均値 ± 標準偏差 (n=6).
−：算出不能

2.6.3.2.1.2 ヒト TPO 受容体発現細胞に対するルストロンボパグ代謝物の増殖作用

被験物質：ルストロンボパグ-脱ヘキシル体
ルストロンボパグ-5-ケト体
試験報告書添付場所：4.2.1.1-11
試験番号：S-888711-EB-189-R

細胞	Ba/F3-hMpl 細胞
評価項目	細胞増殖活性
評価方法	Ba/F3 細胞にヒト TPO 受容体を発現させた Ba/F3-hMpl 細胞を作製し，細胞にルストロンボパグ代謝物のルストロンボパグ-脱ヘキシル体，ルストロンボパグ-5-ケト体並びにヒト TPO (rhTPO) を添加し，96 穴プレートで 37°C で 3 日間培養した．WST-8 試薬を加え，マイクロプレートリーダーで測定波長 450 nm (参照波長 650 nm) で測定した．Ba/F3-hMpl 細胞において，ヒト TPO 添加群の最大増殖活性の平均値を 100%としてその相対増殖活性が 50%に達する濃度である EC_{50} 値を算定した．
結果	ルストロンボパグ代謝物は Ba/F3-hMpl 細胞の増殖を促進させ，ルストロンボパグ-脱ヘキシル体並びにルストロンボパグ-5-ケト体の EC_{50} 値は 34861.0 nmol/L，555.7 nmol/L であった．

Ba/F3-hMpl 細胞に対する増殖活性 (ヒト TPO の最大活性に対する相対増殖活性率)

ルストロンボパグ-脱ヘキシル体			ルストロンボパグ-5-ケト体			rhTPO		
濃度 (nmol/L)	増殖活性(%)[a]	EC_{50} (nmol/L)	濃度 (nmol/L)	増殖活性(%)[a]	EC_{50} (nmol/L)	濃度 (nmol/L)	増殖活性(%)[a]	EC_{50} (nmol/L)
244	0.0 ± 0.0	34861.0	61	0.0 ± 0.1	555.7	0.00488	0.4 ± 0.1	0.14
488	0.0 ± 0.0		122	0.7 ± 0.1		0.00977	0.8 ± 0.1	
977	0.1 ± 0.1		244	4.6 ± 0.4		0.0195	2.2 ± 0.2	
1953	0.1 ± 0.1		488	30.1 ± 1.9		0.0391	7.3 ± 0.3	
3906	0.1 ± 0.1		977	91.0 ± 2.3		0.0781	22.7 ± 1.3	
7813	0.4 ± 0.2		1953	97.0 ± 2.7		0.156	55.1 ± 2.3	
15625	2.6 ± 0.4		3906	99.5 ± 2.5		0.313	86.0 ± 2.1	
31250	29.4 ± 2.3		7813	98.9 ± 2.3		0.625	96.8 ± 2.6	
62500	95.9 ± 0.9		15625	98.1 ± 1.4		1.25	99.5 ± 1.8	
125000	99.5 ± 0.6		31250	97.9 ± 2.4		2.5	100.0 ± 1.5	
250000	92.7 ± 0.7		62500	94.7 ± 2.3		5	99.3 ± 1.2	

a：平均値 ± 標準偏差 (n=6).

2.6.3.2.1.3 各種サイトカイン依存性細胞株に対する増殖作用

被験物質：ルストロンボパグ
試験報告書添付場所：4.2.1.1-02
試験番号：S-888711-EB-158-N

細胞	Ba/F3-hEPOR 細胞，NOMO-1 細胞並びに TF-1 細胞
評価項目	細胞増殖活性
試験方法	Ba/F3 細胞にヒトエリストポエチン (EPO) 受容体を発現させて作製した細胞 (Ba/F3-hEPOR 細胞)，ヒト顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) 依存性細胞株 (NOMO-1 細胞) 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 依存性細胞株 (TF-1) を用いて，細胞にルストロンボパグ，ヒト TPO (rhTPO)，ヒト EPO (rhEPO)，ヒト G-CSF，ヒト GM-CSF 並びにヒト IL-3 (rhIL-3) を添加し，96 穴プレートで 37°C で 3 又は 4 日間培養した．WST-8 試薬を加え，マイクロプレートリーダーで測定波長 450 nm (参照波長 650 nm) で測定した．増殖活性は ΔOD 値で示し，最大 OD 値の 50%を EC_{50} 値とした．
結果	ルストロンパグ並びにヒト TPO は 3 種のサイトカイン依存性細胞株の増殖を促進させなかった．

ルストロンボパグの各種サイトカイン依存性細胞に対する増殖活性

細胞	被験物質	濃度	EC_{50}
Ba/F3-hEPOR 細胞	rhEPO	0.0003 – 3 (U/mL)	0.0158 U/mL
	rhTPO	0.0003 – 3 (nmol/L)	–
	ルストロンボパグ	0.0003 – 3 (μmol/L)	–
NOMO-1 細胞	rhG-CSF	0.01 – 100 (ng/mL)	4.65 ng/mL
	rhTPO	0.0003 – 3 (nmol/L)	–
	ルストロンボパグ	0.0003 – 3 (μmol/L)	–
TF-1 細胞	rhGM-CSF	0.001 – 10 (ng/mL)	0.074 ng/mL
	rhIL-3	0.003 – 30 (ng/mL)	0.451 ng/mL
	rhTPO	0.0003 – 3 (nmol/L)	–
	ルストロンボパグ	0.0003 – 3 (μmol/L)	–

–：算出不能

2.6.3.2.1.4 シグナル伝達経路の解析

被験物質：ルストロンボパグ
試験報告書添付場所：4.2.1.1-03
試験番号：S-888711-EB-122-N

細胞	Ba/F3-hMpl 細胞
評価項目	ヤヌスキナーゼ 2 (JAK2)，シグナル伝達性転写因子 (STAT) 3，STAT5 並びに p44/43 マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAPK) のリン酸化
評価方法	Ba/F3-hMpl 細胞にルストロンボパグ (3 μmol/L) とヒト TPO (rhTPO：1 nmol/L) を添加し，37°C で 15 分培養した．培養後，細胞を回収し，JAK2，STAT3，STAT5 並びに p44/42 MAPK のリン酸化をウエスタンブロッティング法により測定した．
結果	ルストロンボパグはヒト TPO と同様に JAK2，STAT3，STAT5 並びに p44/42 MAPK をリン酸化させた．

2.6.3.2.1.5 ヒト造血細胞に対する作用

ルストロンボパグのヒト造血幹細胞に対する作用（CFU アッセイ）
エルトロンボパグのヒト造血幹細胞に対する作用（CFU アッセイ）

被験物質：ルストロンボパグ
(+)-ルストロンボパグ
エルトロンボパグ
試験報告書添付場所：4.2.1.1-04, -05

細胞	ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞					
評価項目	巨核球コロニー形成能 (CFU-Mk アッセイ)					
評価方法	ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞にルストロンボパグ，光学異性体の (+)-ルストロンボパグ並びにエルトロンボパグ (濃度：0.0923～9.23 μmol/L) を添加後 37°C で 12 日間培養し，抗 GPIIb/IIIa 抗体陽性の巨核球コロニー (CFU-Mk) 数を計測した．ヒト TPO (1.846 nmol/L) 添加群の巨核球コロニー数の平均値を 100%として半分に達する濃度を EC_{50} と定義し，ルストロンボパグ，光学異性体 (+)-ルストロンボパグ並びにエルトロンボパグの EC_{50} 値をシグモイドの最大薬理活性 (E_{max}) モデルから算定した．					
結果	ルストロンボパグ，(+)-ルストロンボパグ並びにエルトロンボパグは CD34 陽性細胞から巨核球コロニーを形成し，EC_{50} 値は，それぞれ 0.31 μmol/L，0.19 μmol/L 並びに 0.86 μmol/L であった．					
	ルストロンボパグ		(+)-ルストロンボパグ		エルトロンボパグ	
濃度 (μmol/L)	CFU-Mk 数	EC_{50} (μmol/L)	CFU-Mk 数	EC_{50} (μmol/L)	CFU-Mk 数	EC_{50} (μmol/L)
0.0923	16.2 ± 3.1	0.31	33.3 ± 4.4	0.19	1.0 ± 1.3	0.86
0.2769	60.0 ± 6.9		96.5 ± 21.1		29.7 ± 3.7	
0.923	140.8 ± 14.2		146.2 ± 8.6		96.2 ± 10.5	
2.769	143.0 ± 12.5		155.5 ± 14.2		129.8 ± 8.6	
9.23	145.3 ± 6.1		136.0 ± 25.3		144.0 ± 29.2	
媒体	CFU-Mk 数：0.3 ± 0.5				CFU-Mk 数：0.0 ± 0.0	
ヒト TPO (1.846 nmol/L)	CFU-Mk 数：147.3 ± 19.6				CFU-Mk 数：182.8 ± 15.9	
CFU-Mk 数：平均値 ± 標準偏差 (n=6).						
試験番号	R-888711-EB-063-N				R-888711-EB-064-N	

2.6.3.2.2 *In vivo* における作用(1)

2.6.3.2.2.1 TPOR-Ki/Shi マウスにおけるルストロンボパグの血小板造血作用の検討

被験物質：ルストロンボパグ
試験報告書添付場所：4.2.1.1-06
試験番号：R-888711-EB-042-N

動物	TPOR-Ki/Shi マウス (マウス TPO 受容体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マウス)
雌雄 / 動物数	雌 / 8 匹
摂餌条件	摂食
媒体	0.5%メチルセルロース (MC) 水溶液
投与ルート	経口
投与検体	ルストロンボパグ
用量 (mg/kg/日)	0 (媒体), 0.3, 1, 3, 10 (21 日間反復投与)
測定項目	血小板数
測定日	群分け時 (Day 0), 投与 7 日後 (Day 8), 14 日後 (Day 15), 21 日後 (Day 22) (初回投与日は Day 1)
結果	ルストロンボパグの 21 日間反復経口投与で血小板数は Day 8 から用量依存的に増加し，0.3 mg/kg/日以上の用量で媒体投与群に比べ有意な血小板数の増加が認められた.

	血小板数 ($\times 10^4/\mu L$)			
群	Day 0	Day 8	Day 15	Day 22
Vehicle	158.1 ± 12.6	178.1 ± 11.7	166.2 ± 15.9	169.0 ± 8.8
0.3 mg/kg/日	159.5 ± 12.7 (0.9979)	226.5 ± 14.2 (0.0025)	230.4 ± 19.9 (0.0016)	235.4 ± 18.3 (0.0057)
1 mg/kg/日	157.2 ± 11.9 (0.9995)	278.9 ± 19.3 (<0.0001)	300.3 ± 19.1 (<0.0001)	326.3 ± 24.5 (<0.0001)
3 mg/kg/日	159.4 ± 10.7 (0.9982)	316.3 ± 32.1 (<0.0001)	380.9 ± 34.7 (<0.0001)	424.7 ± 43.0 (<0.0001)
10 mg/kg/日	156.2 ± 11.0 (0.9922)	316.0 ± 40.2 (<0.0001)	404.6 ± 56.6 (<0.0001)	467.8 ± 68.1 (<0.0001)

血小板数：平均値 ± 標準偏差 (n=8).
各採血日における血小板数を媒体投与群とルストロンボパグ投与群を比較した．括弧内に Dunnett's test による P 値を示す.

2.6.3.2.2.2 TPOR-Ki/Shi マウスにおけるエルトロンボパグの血小板造血作用の検討

被験物質：エルトロンボパグ
試験報告書添付場所：4.2.1.1-07
試験番号：R-888711-EB-043-N

動物	TPOR-Ki/Shi マウス
雌雄 / 動物数	雌 / 8 匹
摂餌条件	摂食
媒体	0.5% MC 水溶液
投与ルート	経口
投与検体	エルトロンボパグ
用量 (mg/kg/日)	0 (媒体), 2, 10, 50 (21 日間反復投与)
測定項目	血小板数
測定日	群分け時 (Day 0), 投与 7 日後 (Day 8), 14 日後 (Day 15), 21 日後 (Day 22) (初回投与日は Day 1)
結果	エルトロンボパグの 21 日間反復経口投与で Day 8 から媒体投与群に比べ, 10, 50 mg/kg/日の用量で有意な血小板数の増加が認められた.

	血小板数 ($\times 10^4/\mu L$)			
群	Day 0	Day 8	Day 15	Day 22
Vehicle	162.1 ± 7.3	176.9 ± 7.1	169.1 ± 17.0	171.4 ± 12.5
2 mg/kg/日	163.1 ± 12.2 (0.9959)	203.0 ± 19.7 (0.3727)	183.1 ± 10.6 (0.8739)	188.2 ± 8.9 (0.8091)
10 mg/kg/日	162.1 ± 9.7 (1.0000)	274.9 ± 31.9 (<0.0001)	267.1 ± 33.4 (0.0006)	274.9 ± 34.0 (0.0003)
50 mg/kg/日	161.9 ± 14.5 (1.0000)	452.9 ± 63.7 (<0.0001)	596.1 ± 83.0 (<0.0001)	690.9 ± 84.6 (<0.0001)

血小板数：平均値 ± 標準偏差 (n=8).
各採血日における血小板数を媒体投与群とエルトロンボパグ投与群を比較した. 括弧内に Dunnett's test による P 値を示す.

2.6.3.2.2.3 ルストロンボパグの TPOR-Ki/Shi マウスにおける 6 週間反復投与での血小板造血作用

被験物質：ルストロンボパグ
試験報告書添付場所：4.2.1.1-08
試験番号：S-888711-EB-131-N

動物	TPOR-Ki/Shi マウス						
雌雄 / 動物数	雌 / 10 匹						
摂餌条件	摂食						
媒体	0.5% MC 水溶液						
投与ルート	経口						
投与検体	ルストロンボパグ						
用量 (mg/kg/日)	0 (媒体), 0.3, 1, 3 [(42 日 (6 週) 間反復投与)]						
測定項目	血小板数						
測定日	群分け時(Day 0), 投与 7 日後 (Day 8), 14 日後 (Day 15), 21 日後 (Day 22), 28 日後 (Day 29), 35 日後 (Day 36), 42 日後 (Day 43) (初回投与日は Day 1)						
結果	ルストロンボパグのいずれの用量においても Day 8 以降，媒体投与群に比べ，有意に血小板数が増加した．血小板数は，3 mg/kg/日を 42 日間反復投した場合でも媒体群の 3 倍以内であり，Day 29 以降はほぼ一定の値で推移した．						
	血小板数 ($\times 10^4/\mu L$)						
群	Day 0	Day 8	Day 15	Day 22	Day 29	Day 36	Day 43
Vehicle	155.5 ± 17.9	157.2 ± 17.5	166.0 ± 16.6	163.6 ± 15.3	169.0 ± 19.4	159.9 ± 15.6	170.5 ± 12.4
0.3 mg/kg/日	153.5 ± 16.1 (0.9864)	207.3 ± 13.7 (<0.0001)	202.4 ± 18.6 (0.0342)	207.8 ± 17.0 (0.0132)	219.7 ± 16.5 (0.0063)	199.8 ± 14.4 (0.1144)	214.2 ± 17.2 (0.0727)
1 mg/kg/日	154.8 ± 16.8 (0.9993)	264.9 ± 29.3 (<0.0001)	285.7 ± 21.1 (<0.0001)	300.5 ± 27.4 (<0.0001)	341.3 ± 35.0 (<0.0001)	341.5 ± 26.0 (<0.0001)	353.3 ± 38.7 (<0.0001)
3 mg/kg/日	154.8 ± 17.2 (0.9994)	290.8 ± 25.6 (<0.0001)	348.3 ± 52.8 (<0.0001)	410.2 ± 55.4 (<0.0001)	441.9 ± 53.7 (<0.0001)	459.7 ± 79.7 (<0.0001)	450.2 ± 73.2 (<0.0001)
血小板数：平均値 ± 標準偏差 (n=10). 各採血日における血小板数を媒体投与群とエルトロンボパグ投与群を比較した．括弧内に Dunnett's test による P 値を示す．							

2.6.3.2.3 *In vivo* における作用 (2)

2.6.3.2.3.1 ルストロンボパグの TPOR-Ki/Shi マウスにおける巨核球産生及び造血への影響

被験物質：ルストロンボパグ
　　エルトロンボパグ
試験報告書添付場所：4.2.1.1-09
試験番号：R-888711-EB-084-N

動物	TPOR-Ki/Shi マウス
雌雄 / 動物数	雌 / 12 匹
摂餌条件	摂食
媒体	0.5% MC 水溶液
投与ルート	経口
用量 (mg/kg/日)	0 (vehicle)，0.3，10 (ルストロンボパグ)，10，50 (エルトロンボパグ)[21 日間反復投与]
測定項目	病理学的検査，血液生化学検査 (各用量 3 又は 4 例)，血液学的検査 (各用量 4 例)，血液凝固系検査 (各用量 4 例)，病理組織学的検査及び骨髄の巨核球数の計測 (各用量 9 又は 10 例)
結果	ルストロンボパグの 10 mg/kg/日投与群並びにエルトロンボパグの 50 mg/kg/日投与群では，媒体投与群に比べ，有意に血小板数が増加した．骨髄の巨核球数の計測において，巨核球数の有意な増加を認め，病理組織学的検査で脾臓，肝臓，肺での巨核球の増加を認めた．赤血球数，ヘモグロビン量及びヘマトクリット値の有意な減少と乳酸脱水素酵素活性の上昇を認めたが，いずれも軽度のものであった．血液凝固系検査では特記すべき変化はなかった．

群	血小板数 ($\times 10^4/\mu L$)	赤血球数 ($\times 10^6/\mu L$)	ヘモグロビン量 (g/dL)	ヘマトクリット値 (%)	骨髄内の巨核球数 (number/field)
Vehicle	167.7 ± 8.5	9.51 ± 0.52	14.8 ± 0.9	44.0 ± 2.6	2.8 ± 1.2
ルストロンボパグ 0.3 mg/kg/日	186.4 ± 4.1	9.02 ± 0.08	14.0 ± 0.2	41.9 ± 1.0	3.7 ± 1.6
ルストロンボパグ 10 mg/kg/日	458.3 ± 31.5 **	8.64 ± 0.28 *	13.4 ± 0.5 *	39.9 ± 1.6 *	10.8 ± 1.8 **
エルトロンボパグ 10 mg/kg/日	213.7 ± 16.9	9.13 ± 0.02	14.2 ± 0.3	42.5 ± 0.6	4.1 ± 0.8
エルトロンボパグ 50 mg/kg/日	496.9 ± 63.9 **	8.75 ± 0.26 *	13.9 ± 0.3	40.9 ± 0.6 *	9.2 ± 2.5 **

平均値 ± 標準偏差 (n=4，9 又は 10).
*：$P < 0.05$，**：$P < 0.01$，媒体投与群との Dunnett's test による比較.

2.6.3.2.4 TPOR-Ki/Shi マウスにおける PK/PD 解析

被験物質：ルストロンボパグ
試験報告書添付場所：4.2.1.1-10
試験番号：S-888711-EB-124-N

動物	TPOR-Ki/Shi マウス
PD 値	ルストロンボパグ (0.3，1，3，10 mg/kg) の 21 日間反復経口投与における Day 8，15，22 の血小板増加率 [R-888711-EB-042-N]
PK 値	ルストロンボパグ (0.3，3，10 mg/kg) を単回経口投与した時点での時間 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} ：0.583，5.54，20.3 μg·hr/mL)，最高血漿中薬物濃度 (C_{max}，：0.0584，0.565，1.78 μg/mL) [R-888711-PB-083-N]
評価項目	PK/PD 解析
評価方法	Day 8，15 及び 22 の血小板増加率 (Day 8，15 及び 22 の血小板数/Day 0 の血小板数) と AUC_{inf} 並びに C_{max} との相関性を E_{max} モデルから算出した．
結果	血小板増加率と AUC_{inf} 並びに C_{max} との相関性が認められた．血小板が 1.5 倍増加したときの AUC_{inf} 並びに C_{max} を算出した結果，$AUC_{0\text{-}inf}$ は Day 8，15 及び 22 で 0.664，0.639 及び 0.529 μg·hr/mL であり，C_{max} は 0.0662，0.0642 及び 0.0555 μg/mL であった．

2.6.3.3 副次的薬理試験

2.6.3.3.1 造血系コロニー形成能に与える影響

被験物質：ルストロンボパグ
試験報告書添付場所：4.2.1.2-01
試験番号：S-888711-EB-159-N

細胞	ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞	
評価項目	赤血球系コロニー形成並に顆粒球系コロニー形成能	
試験方法	ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞にルストロンボパグ (濃度：0.25，1 μmol/L)，ヒト EPO (rhEPO：0.05，3 U/mL) 並びにヒト G-CSF (rhG-CSF：1, 10 ng/mL) を添加後 37°C で 14 日間培養し，抗ヒトグリコフィリン A 抗体陽性の赤血球系コロニー (BFU-E, CFU-E) を計測し，rhEPO とルストロンボパグの併用により形成される赤血球系コロニー数と rhEPO で形成される赤血球系コロニー数を比較した．また，抗ヒト CD14 抗体と抗ヒト CD66b 抗体陽性の顆粒球系コロニー (CFU-G，CFU-M) を計測し，rhG-CSF とルストロンボパグの併用により形成される顆粒球系コロニー数と rhG-CSF で形成される顆粒球系コロニー数を比較した．	
結果	ルストロンボパグは BFU-E 及び CFU-E の赤血球系コロニーを形成せず，EPO によるコロニー形成に影響を与えなかった．	ルストロンボパグは CFU-G 及び CFU-M の顆粒球系コロニーを形成せず，G-CSF によるコロニー形成に影響を与えなかった．

EPO によるコロニー形成に影響

被験物質	濃度	コロニー数	P 値
ルストロンボパグ (μmol/L)	0.25	0.0 ± 0.0	−
	1	0.0 ± 0.0	−
rhEPO (U/mL)	0.05	62.7 ± 11.1	−
	3	89.8 ± 9.2	−
rhEPO (U/mL)	0.05 + 0.25	66.5 ± 11.1	0.7293[a]
+	0.05 + 1	74.0 ± 6.7	0.1142[a]
ルストロンボパグ (μmol/L)	3 + 0.25	91.2 ± 8.2	0.9663[b]
	3 + 1	94.3 ± 13.7	0.6915[b]

コロニー数：平均値 ± 標準偏差 (n=6).
a：0.05 U/mL の rhEPO との比較 (Dunnett's test).
b：3 U/mL の rhEPO との比較 (Dunnett's test).

G-CSF によるコロニー形成に影響

被験物質	濃度	コロニー数	P 値
ルストロンボパグ (μmol/L)	0.25	0.0 ± 0.0	−
	1	0.0 ± 0.0	−
rhG-CSF (ng/mL)	1	1.7 ± 0.5	−
	10	53.7 ± 10.0	−
rhG-CSF (ng/mL)	1 + 0.25	1.3 ± 0.5	0.5467[a]
+	1 + 1	1.8 ± 0.8	0.8502[a]
ルストロンボパグ (μmol/L)	10 + 0.25	58.7 ± 8.3	0.5535[b]
	10 + 1	60.8 ± 9.2	0.3240[b]

コロニー数：平均値 ± 標準偏差 (n=6).
a：1 ng/mL の rhG-CSF との比較 (Dunnett's test).
b：10 ng/mL の rhG-CSF との比較 (Dunnett's test).

2.6.3.4 安全性薬理試験

2.6.3.4.1 安全性薬理試験成績

被験物質：ルストロンボパグ

評価対象となる組織	試験の種類	動物種/系統	投与方法	投与量[a] (mg/kg)	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP適用	試験番号[b] [試験報告書添付場所]
中枢神経系	一般症状及び行動に及ぼす影響	ラット/Sprague-Dawley	経口	0，40，200，1000	雄 8/群	40 及び 1000：軽度かつ一過性の自発運動量の亢進	適	R-888711-SF-071-L ([redacted]06-2360) [4.2.1.3-01]
心血管系	血圧，心拍数及び心電図に及ぼす影響	イヌ/ビーグル	経口	0，100，300，500	雄 4/群	影響なし	適	R-888711-SF-073-L ([redacted]06-4362) [4.2.1.3-02]
	心電図に及ぼす影響	イヌ/ビーグル	経口	0，200 28 日間反復投与	雄 3～6/群	影響なし	適	R-888711-SF-103-L [redacted]07-4644) [4.2.1.3-06]
	心電図に及ぼす影響	イヌ/ビーグル	経口	PEG/Tween 80 (1.5，5 mL/kg)，3 日間反復	雌 3～4/群	第 2 度房室ブロック発現	非	R-888711-SF-088-N ([redacted]07-4487) [4.2.1.3-07]
	乳頭筋標本の心筋活動電位に及ぼす影響	モルモット/Hartley	*In vitro*	0.1，1，10 μmol/L	5 例/群[c]	影響なし	適	R-888711-SF-074-L ([redacted]06-9363) [4.2.1.3-03]
	心筋イオンチャネルに及ぼす影響	hERG チャネル発現ヒト胎児腎臓細胞 (HEK293 細胞)	*In vitro*	0.1，1，10 μmol/L	5 例/群	hERG 電流抑制率；0.1：17.0%，1：29.0%，10：38.3% 推定 50%阻害濃度 (IC_{50}) = 70.04μmol/L	適	R-888711-SF-075-L ([redacted]06-9364) [4.2.1.3-04]
呼吸系	呼吸数，1 回及び分時換気量に及ぼす影響	ラット/Sprague-Dawley	経口	0，40，200，1000	雄 6/群	影響なし	適	R-888711-SF-072-L ([redacted]06-2361) [4.2.1.3-05]

a：特にことわりがない限り単回投与.
b：( ) 内は試験委託先の試験番号.
c：モルモットより摘出した乳頭筋標本 5 例/群.

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当する試験なし.