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

2.6.6 毒性試験の概要文

塩野義製薬株式会社

目次

略号及び用語定義一覧表 4
2.6.6 毒性試験の概要文 5
2.6.6.1 まとめ 5
2.6.6.2 単回投与毒性試験 9
2.6.6.2.1 ラット単回経口投与毒性試験 9
2.6.6.2.2 イヌ単回経口投与毒性試験 9
2.6.6.3 反復投与毒性試験 10
2.6.6.3.1 ラット 10
2.6.6.3.1.1 1ヵ月反復経口投与毒性試験 10
2.6.6.3.1.2 6ヵ月反復経口投与毒性試験 11
2.6.6.3.2 イヌ 12
2.6.6.3.2.1 1ヵ月反復経口投与毒性試験及び追加試験 12
2.6.6.3.2.2 3ヵ月反復経口投与毒性試験 14
2.6.6.3.2.3 9ヵ月反復経口投与毒性試験 15
2.6.6.3.2.4 9ヵ月反復経口投与毒性試験における胆嚢の追加病理組織学的評価 16
2.6.6.4 遺伝毒性試験 17
2.6.6.4.1 細菌を用いる復帰突然変異試験 17
2.6.6.4.2 ほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験 17
2.6.6.4.3 げっ歯類骨髄細胞を用いる小核試験 17
2.6.6.5 がん原性試験 19
2.6.6.5.1 マウスがん原性試験 19
2.6.6.5.2 ラットがん原性試験 20
2.6.6.6 生殖発生毒性試験 22
2.6.6.6.1 ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 22
2.6.6.6.2 ラット胚・胎児発生に関する試験 23
2.6.6.6.3 ウサギ胚・胎児発生に関する試験 24
2.6.6.6.4 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 25
2.6.6.7 局所刺激性試験 27
2.6.6.8 その他の毒性試験 28
2.6.6.8.1 皮膚光毒性試験 28
2.6.6.8.2 PT及びAPTT延長に対するビタミンKの影響 28
2.6.6.8.3 遺伝子ノックインマウスにおける骨髄線維化ポテンシャルの検討試験 29
2.6.6.9 考察及び結論 31
2.6.6.9.1 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 31
2.6.6.9.1.1 反復投与毒性の概略ならびに安全域 31
2.6.6.9.1.2 PT，APTTの延長について 32
2.6.6.9.1.3 副腎への影響について 33

2.6.6.9.1.4 胆嚢の変化について 33
2.6.6.9.2 がん原性について 33
2.6.6.9.3 生殖発生毒性について 34
2.6.6.9.4 その他の毒性について 36
2.6.6.9.5 ルストロンボパグの TPO 受容体を介した毒性について 36
2.6.6.10 図表 38
2.6.6.11 参考文献 39

2.6.6 略号及び用語定義一覧表

略号	用語定義
ALP	アルカリフォスファターゼ
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ
APTT	活性化部分トロンボプラスチン時間
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	血漿中濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}24hr}$	時間 0 から 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
CK	クレアチンキナーゼ
C_{max}	最高血漿中濃度
Hb	ヘモグロビン
Ht	ヘマトクリット
MC	メチルセルロース
PEG	ポリエチレングリコール 400
PEG/Tween 80	Tween 80 を 5 w/w%含有するポリエチレングリコール 400
PT	プロトロンビン時間
RBC	赤血球数
TK	トキシコキネティクス
T_{max}	最高血漿中濃度到達時間
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

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6.1 まとめ

ルストロンボパグの安全性評価に関し，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，生殖発生毒性試験並びに皮膚光毒性試験などを実施した．安全性を評価するために実施した毒性試験の一覧を表 2.6.6.1-1 に示す．マウストロンボポエチン (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) を用いた骨髄線維化ポテンシャルの検討試験以外は，いずれも GLP 適用下で実施した．

表 2.6.6.1-1 ルストロンボパグの毒性試験一覧

試験の種類及び期間	動物種等	投与 (処置) 経路	GLP 適用
単回投与毒性試験	ラット及びイヌ	強制経口	適
反復投与毒性試験			
1 及び 6 ヵ月	ラット	強制経口	適
1，1 (追加)，3 及び 9 ヵ月	イヌ	強制経口	適
胆嚢の追加病理組織学的評価	イヌ	–	適
遺伝毒性試験			
細菌を用いる復帰突然変異試験	ネズミチフス菌，大腸菌	*In vitro*	適
ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験	チャイニーズハムスター肺由来培養細胞	*In vitro*	適
げっ歯類を用いる小核試験	マウス (骨髄細胞)	強制経口	適
がん原性試験			
104 週	マウス及びラット	強制経口	適
生殖発生毒性試験			
受 (授) 胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験	ラット	強制経口	適
胚・胎児発生に関する試験	ラット及びウサギ	強制経口	適
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	ラット	強制経口	適
その他の毒性試験			
皮膚光毒性試験	マウス	強制経口	適
PT 及び APTT 延長に対するビタミン K の影響	ラット	強制経口	適
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	マウス	強制経口	非

単回投与毒性試験

ラット及びイヌ単回経口投与毒性試験 (投与量 : 500 及び 2000 mg/kg) では，いずれも観察期間中に死亡例は発生しなかったことから，概略の致死量はラットとイヌともに 2000 mg/kg を超える量と判断した．

反復投与毒性試験

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) では，200 mg/kg/日投与群で血漿中アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 及びアスパラギン酸アミノトラ

ンスフェラーゼ (AST) 活性の上昇並びに赤血球系パラメータの値の減少，副腎皮質束状帯の単細胞壊死，前胃の過角化及び胸腺皮質のリンパ球減少が認められ，40 mg/kg/日以上の投与群において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，副腎の腫大と副腎皮質束状帯の肥大，表皮の過角化及び肥厚が認められた．副腎皮質束状帯の肥大は 1 ヵ月間の休薬により良好な回復性を示した．以上の結果から，無毒性量は 8 mg/kg/日と判断した．

ラット 6 ヵ月反復経口投与毒性試験 (投与量：2，20 及び 100 mg/kg/日) において，20 mg/kg/日以上の投与群で血漿中ナトリウム及びクロールの増加，尿たん白，肝臓の重量増加，副腎皮質球状帯の萎縮，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石灰沈着が認められた．また，100 mg/kg/日の投与群で PT あるいは APTT の延長，腎臓重量増加，並びに卵巣重量減少，肝臓の腫大，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た．これらの変化はいずれも 1 ヵ月間の休薬により，良好な回復性を示した．以上の結果から，無毒性量は 2 mg/kg/日と判断した．

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) では，10 mg/kg/日以上の投与群で副腎重量の減少を伴った束状帯細胞の萎縮あるいは胆嚢粘膜固有層の水腫が認められた．これらの変化は 1 ヵ月間の休薬により回復した．30 mg/kg/日以上の投与群の雌雄で血漿中 ALT 及び AST 活性の上昇が認められたが，肝臓に関連した病理組織学的変化は認められなかった．以上の結果から，無毒性量は 3 mg/kg/日と判断した．

イヌ 3 ヵ月反復経口投与毒性試験 (投与量：10，80 及び 600 mg/kg/日) 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，副腎皮質において軽度から中等度の脂肪滴減少が認められた．600 mg/kg/日投与群の雌雄で肝臓重量の増加がみられ，血漿中 AST，ALT 及びクレアチンキナーゼ (CK) 活性も上昇しているが，肝臓，心臓及び骨格筋に関連した病理組織学的変化は認められなかった．これらの変化は 1 ヵ月間の休薬により，良好な回復性を示した．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．

イヌ 9 ヵ月反復経口投与毒性試験 (投与量：3，10 及び 100 mg/kg/日) では，10 mg/kg/日以上の投与群の雌で血漿中 ALT 活性がわずかに上昇したが，肝臓に関連した病理組織学的変化は認められなかった．10 mg/kg/日以上の投与群の雄，100 mg/kg/日投与群の雌で，極軽度から軽度の胆嚢粘膜上皮の空胞化が認められ，オイルレッド O 染色とズダンブラック B 染色で陽性を示したことから脂質の蓄積が原因であることが判明した．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 ヵ月間の休薬により，良好な回復性を示した．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．

遺伝毒性試験

細菌を用いる復帰突然変異試験，チャイニーズハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

及びマウス骨髄細胞を用いる *in vivo* 小核試験では，いずれも陰性の結果が得られ，ルストロンボパグに遺伝毒性は認められなかった．

がん原性試験

マウスに最大20 mg/kg/日 (雌雄) を，ラットに最大20 mg/kg/日 (雄) 若しくは2 mg/kg/日 (雌) を，それぞれ 104 週間反復経口投与し，がん原性を評価した結果，ルストロンボパグにがん原性は認められなかった．

生殖発生毒性試験

ラット受 (授) 胎能及び着床までの初期胚発生に関する経口投与試験 (投与量：4, 20 及び 100 mg/kg/日) では，100 mg/kg/日投与群の雄及び 20 mg/kg/日以上の投与群の雌で四肢に落屑が認められた．雌雄の生殖能及び初期胚の発生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，無毒性量は雄動物の一般毒性に関して 20 mg/kg/日，雌動物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．

ラット胚・胎児発生に関する経口投与試験 (投与量：4，12.5，40 及び 80 mg/kg/日) では，40 mg/kg/日以上の投与群で母動物の四肢に落屑並びに体重低値，体重増加抑制及び摂餌抑制が認められた．胎児に関しては，80 mg/kg/日投与群で胎児体重の低下及び胸骨分節の骨化数の低下，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，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．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，胚・胎児の発生毒性に関して 4 mg/kg/日と判断した．

ウサギ胚・胎児発生に関する経口投与試験 (投与量：100，300 及び 1000 mg/kg/日) では，母動物及び胎児の発生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 1000 mg/kg/日と判断した．

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 (投与量：1，4，12.5 及び 40 mg/kg/日) では，40 mg/kg/日投与群で妊娠 23 日に分娩異常に起因すると考えられる母動物の死亡が 1 例で認められた．また，母動物に四肢の落屑，体重低値，体重増加抑制，摂餌抑制及び妊娠期間の延長が認められた．出生児では，40 mg/kg/日投与群で生後 23 及び 39 日に同腹児の雄 2 例が死亡した．また，生後 4 日出生率の低下，児体重，背地走性スコア及び眼瞼開裂完了率の低値，尾の帯状 (環状) 狭窄変化 (生後 32～54 日)，雌の受胎率の低下，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，生後 4 日の同腹児数調整後の F1 余剰児において，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．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，並びに胸腰部短小過剰肋骨を除いた出生児の発生毒性に関して 12.5 mg/kg/日と判断した．出生児の胸腰部短小過剰肋骨に関しては 4 mg/kg/日と判断した．

その他の試験

皮膚光毒性試験 (投与量：50 及び 500 mg/kg) では，雌性 HR-1 系ヘアレスマウスにルストロンボパグを単回経口投与し，皮膚光毒性ポテンシャルを評価した．2 日間の観察期間中，本薬に起因する変化は認められなかったことから，ルストロンボパグに皮膚光毒性ポテンシャルはないと判断した．

ラット反復経口投与試験で認められた，PT 及び APTT の延長の原因を調べるために，ルストロンボパグとビタミン K_1 及び K_3 を 1 ヵ月間反復経口投与 (投与量：200 mg/kg/日) し，血液凝固因子に対する影響を調べた．その結果，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．また，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．ヒトでは通常の食事で充分量のビタミン K を摂取することができることから，ヒトに対して影響を及ぼす可能性は低いと考えられた．

TPOR-Ki/Shi マウスを用いてルストロンボパグの骨髄線維化ポテンシャルを検討した．ルストロンボパグを 8 週間反復経口投与した結果，類薬のエルトロンボパグ (市販名レボレード®) と同様に，投与量に依存した血小板造血作用を示した．また，ルストロンボパグ及びエルトロンボパグの高用量群では血小板増加作用に加え，病理学的検査では骨髄及び脾臓に細網線維の沈着が認められた．このことから，ルストロンボパグはヒト型 TPO 受容体を介して血小板を増加させるが，高用量では骨髄線維化発現のポテンシャルを有することが明らかとなった．また，その変化には回復性が認められた．

2.6.6.2 単回投与毒性試験

2.6.6.2.1 ラット単回経口投与毒性試験

評価資料 4.2.3.1-01
概要表 2.6.7.5.1

Sprague-Dawley 系ラット (各群雌雄 5 例) にルストロンボパグを 0 (対照群), 500 及び 2000 mg/kg の用量で単回経口投与し，14 日間観察した．対照群には媒体 [Tween 80 を 5 w/w%含有するポリエチレングリコール 400 (PEG/Tween 80)] を投与した．

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考えられる黄白色物を含んだ便が観察されたが，体重及び剖検による肉眼検査に影響は認められなかった．ラット単回経口投与毒性試験における概略の致死量は 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 [最高血漿中濃度 (C_{max})，時間 0 から 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積 ($AUC_{0\text{-}24hr}$)] に明らかな性差は認められなかった．500 mg/kg 投与群の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ が 2000 mg/kg 投与群よりも明らかに高値を示した．また，ルストロンボパグの光学異性体である (+)-ルストロンボパグの曝露量は，本薬に含まれる (+)-ルストロンボパグの割合 (2.48%) よりも低い値 (AUC 比率で 0.13%～0.55%) であったことから，ラットの生体内において (+)-ルストロンボパグへのキラル反転は起こらないことが示唆された．

2.6.6.2.2 イヌ単回経口投与毒性試験

評価資料 4.2.3.1-02
概要表 2.6.7.5.2

ビーグルイヌ (各群雌雄 1 例) にルストロンボパグを 0 (対照群), 500 及び 2000 mg/kg の用量で単回経口投与し，14 日間観察した．対照群には媒体 (PEG/Tween 80) を投与した．

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対照群，500 及び 2000 mg/kg 投与群の雌雄で軟便や水様便の排泄が認められ，500 及び 2000 mg/kg 投与群の雌では嘔吐も観察された．体重，摂餌量，尿検査，血液学的検査及び血液化学的検査において，影響はみられなかった．イヌ単回経口投与毒性試験における概略の致死量は 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 投与群の方が 500 mg/kg 投与群より低かった．また，(+)-ルストロンボパグの曝露量は本薬に含まれる (+)-ルストロンボパグの割合 (2.48%) よりも低い値 (AUC 比率で 0.68%～1.0%) であったことから，イヌの生体内においても (+)-ルストロンボパグへのキラル反転は起こらないことが示唆された．

2.6.6.3 反復投与毒性試験

2.6.6.3.1 ラット

2.6.6.3.1.1 1ヵ月反復経口投与毒性試験

評価資料 4.2.3.2-01
参考資料 4.2.3.2-08
概要表 2.6.7.6，2.6.7.7.1

(1) 用量設定根拠

概要表 2.6.7.6 に示すように，Sprague-Dawley 系ラット (各群雌雄 4 例) にルストロンボパグを 0 (対照群)，20，100 及び 500 mg/kg/日の用量で 2 週間反復経口投与し，予備的に毒性を評価した．対照群には媒体 (PEG/Tween 80) を投与した．その結果，100 及び 500 mg/kg/日投与群の雄で APTT が延長したが，その他に特記すべき毒性所見は認められなかった．

上記の結果から，500 mg/kg/日の用量では明らかな毒性は認められなかったため，1 ヵ月反復経口投与試験では 1000 mg/kg/日を最高用量に設定した．また，以下の用量として，公比 5 で減じた 200，40 及び 8 mg/kg/日を設定した．

(2) 試験方法及び成績

Sprague-Dawley 系ラット (各群雌雄 12 例) にルストロンボパグを 0 (対照群)，8，40，200 及び 1000 mg/kg/日の用量で 1 ヵ月間反復経口投与し，毒性を検討した．また，対照群及び 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，毒性の回復性を検討した．対照群には媒体 (PEG/Tween 80) を投与した．

試験期間を通じてルストロンボパグによる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，一部の例では投与期間終了時にも認められた．投与期間終了時の血液学的検査では，40 mg/kg/日以上の投与群の雄及び 200 mg/kg/日投与群の雌で PT あるいは APTT の延長が認められた．また，200 mg/kg/日投与群の雌では赤血球数 (RBC)，ヘマトクリット (Ht) 値及びヘモグロビン (Hb) 濃度が低値を示した．投与期間終了時の血液化学的検査では，200 mg/kg/日投与群の雌雄で AST，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質の減少が認められた．投与期間終了時の器官重量では，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．投与期間終了時の肉眼検査では，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．また，200 mg/kg/日投与群の雌雄で前胃の過角化及び胸腺皮質リンパ球の減少が認められた．なお，200 mg/kg/日投与群の雌 1 例が投与期間の後期に腹部膨満を示し，剖検において胸水及び腹水が認められ，全身の臓器は蒼白化していた．この個体の病理組織学的検査で，腎臓の尿細管の軽度な壊死，硝子円柱，尿細管拡張，中等度の尿細管再生，糸球体及びボウマン嚢の上皮の空胞化が認められた．1000 mg/kg/日投与群の 1 ヵ月回復試験終了時には，これらの変化のうち，落

層，被毛粗剛，PT の延長，表皮の過角化と肥厚及び副腎皮質束状帯の肥大は良好な回復性を示した．なお，最も高い曝露を示した 200 mg/kg/日投与群で認められた前胃の過角化及び胸腺皮質リンパ球の軽度な減少の他，PT あるいは APTT を除く血液学的及び血液化学的検査値の変動，腹部膨満を示した雌 1 例で認められた変化は，当該用量の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 (C_{max}，$AUC_{0\text{-}24hr}$) は，200 mg/kg/日以上で用量の増加に伴う増大は認められず，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．40 mg/kg/日以上の投与群で PT あるいは APTT の延長，副腎の腫大と皮質束状帯の肥大あるいは表皮の過角化及び肥厚が認められた．

以上の結果から，ラット 1 ヵ月反復経口投与毒性試験の無毒性量は 8 mg/kg/日と判断した．

2.6.6.3.1.2 6 ヵ月反復経口投与毒性試験

評価資料 4.2.3.2-02
概要表 2.6.7.7.2

(1) 用量設定根拠

上述した，ラット 1 ヵ月反復経口投与毒性試験では，40 mg/kg/日以上の投与群で PT あるいは APTT の延長，副腎の腫大と皮質束状帯の肥大，表皮の過角化及び肥厚がみられ，無毒性量は 8 mg/kg/日と判断した．

以上の結果から，本試験の最高用量を 100 mg/kg/日とし，以下 20 及び 2 mg/kg/日を設定した．

(2) 試験方法及び成績

Sprague-Dawley 系ラット (各群雌雄 12 例) にルストロンボパグを 0 (対照群)，2，20 及び 100 mg/kg/日の用量で 6 ヵ月間反復経口投与し，毒性を検討した．また，対照群及び 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，毒性の回復性を検討した．対照群には媒体 (PEG/Tween 80) を投与した．

ルストロンボパグによる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．また，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．また，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が，2 mg/kg/日投与群で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 2～20 mg/kg/日の用量の範囲までは用量の増加に伴い増大したが，20～100 mg/kg/日投与群では用量比以下で増大した．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た上に，雌では反復投与により曝露量が増える傾向も認められた．

以上の結果から，ラット 6 ヵ月反復経口投与毒性試験の無毒性量は 2 mg/kg/日と判断した．

2.6.6.3.2 イヌ

2.6.6.3.2.1 1 ヵ月反復経口投与毒性試験及び追加試験

評価資料 4.2.3.2-03，4.2.3.2-04
参考資料 4.2.3.2-09
概要表 2.6.7.6，2.6.7.7.3，2.6.7.7.4

(1)　用量設定根拠

概要表 2.6.7.6 に示すように, ビーグルイヌ (各群雌雄 1 例) にルストロンボパグを 0 (対照群), 50 及び 250 mg/kg/日の用量で 2 週間反復経口投与し，毒性を予備的に検討した．対照群には媒体 (PEG/Tween 80) を投与した．その結果，病理組織学的検査において，ルストロンボパグ投与群のすべての個体の胆嚢粘膜に軽度の炎症性細胞浸潤と水腫が認められたが，重篤な毒性所見は認められなかった．

血漿中ルストロンボパグの曝露量 ($AUC_{0\text{-}24hr}$) は 50 及び 250 mg/kg/日投与群で明らかな違いは認められなかった．

被験物質の PEG/Tween 80 懸濁液をゼラチンカプセルに充填して投与する本試験では, 技術的限界量である 300 mg/kg/日を最高用量に設定し，以下，30，10 及び 3 mg/kg/日を設定した．

(2)　試験方法及び成績

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)，3，10，30 及び 300 mg/kg/日の用量で 1 ヵ月間反復経口投与し，毒性を検討した．また，対照群及び 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，毒性の回復性を検討した．対照群には媒体 (PEG/Tween 80) を投与した．

試験期間を通じて死亡例は発生しなかった．投与期間終了時の肉眼検査では，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た．投与期間終了時の病理組織学的検査では，リンパ球の浸潤を伴う胆嚢粘膜固有層の軽度な水腫が 10 mg/kg/日以上の投与群の雌雄で認められた．また，副腎では皮質束状帯細胞の軽度な萎縮が 10 mg/kg/日以上の投与群の雌雄で認めら

れ，軽度な重量減少を伴っていた．なお，ホルモンの動きに関連する下垂体の変化は認められなかった．投与期間終了時の血液化学的検査では，30 mg/kg/日以上の投与群の雌雄で血漿中 AST 及び ALT 活性の上昇及び，300 mg/kg/日投与群の雌では肝臓重量増加が認められたが，病理組織学的検査では肝臓に変化は認められなかった．10 mg/kg/日以上の投与群の雌雄で少量の泥状便及び水様便の排泄頻度が増加した．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/日と 300 mg/kg/日の用量で曝露量に明らかな差はなかった．また，全投与群の曝露量に性差及び反復投与による明らかな影響はなかった．

3 mg/kg/日投与群の雄 1 例及び雌 1 例並びに 10 mg/kg/日投与群の雄 1 例の心電図検査で第 2 度房室ブロックが認められ，3 mg/kg/日投与群の雄 1 例と 300 mg/kg/日投与群の雄 1 例で PR 延長が認められたが，これらの所見は明らかな用量依存性を示さず，また，対照群においても PR 延長を示す例 (雄 1 例) が認められた．

さらに，安全性薬理フォローアップ試験として，1 ヵ月投与毒性試験 (以降，本体試験と表記) で使用された媒体 (PEG/Tween 80) をビーグルイヌに 3 日間反復経口投与して，心電図に対する影響を検討した結果，第 2 度房室ブロックの発生が認められたが，いずれの投与群においても，心臓には病理組織学的変化は認められなかった．そのため，本体試験の投薬群で認められた第 2 度房室ブロックは，媒体に起因する可能性が考えられる [2.6.2.4.2.1 項参照]．しかし，本試験の対照群に明らかな第 2 度房室ブロックを認めなかったため，ルストロンボパグに起因性する可能性を完全には否定できなかった．

そこで，心電図への影響のない媒体 [0.5%メチルセルロース (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)，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．対照群には媒体の 0.5% MC を投与した．その結果，いずれの動物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}, $AUC_{0\text{-}24hr}$) は，本体試験で PEG/Tween 80 を媒体とした際の 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として，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 28 日間反復経口投与して，本体試験の 10 mg/kg/日群とほぼ同等の曝露量で心電図に対する影響を検討した結果，心電図パラメータへの影響は認められなかった [2.6.2.4.2.2 項参照]．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第 2 度房室ブロックは，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 の投与により発現したと考えられる．

以上のように，ルストロンボパグの 1 ヵ月反復経口投与により，胆嚢水腫，副腎萎縮，血漿中トランスアミナーゼ活性の上昇，便性状の変化並びに第 2 度房室ブロックが 10，30 又は 300 mg/kg/日投与群で発現した．第 2 度房室ブロックは，3 mg/kg/日投与群でも認められたものの，本試験の 3 mg/kg/日投与時と同等の曝露条件下で，媒体を変更して行った 1 ヵ月間投与による追加試験で心電図への影響は認められないことを確認した．以上の結果から，イヌ 1 ヵ月反復

経口投与毒性試験の無毒性量は 3 mg/kg/日と判断した.

2.6.6.3.2.2 3 ヵ月反復経口投与毒性試験

評価資料 4.2.3.2-05
概要表 2.6.7.7.5

(1) 用量設定根拠

1 ヵ月反復投与毒性試験では，10 mg/kg/日投与群で軽度の副腎束状帯の萎縮及び胆嚢粘膜固有層の水腫が認められた．また，30 及び 300 mg/kg/日投与群の雌雄では，AST 及び ALT 活性の上昇が認められたが，肝臓において病理組織学的変化は認められなかったことから，無毒性量は 3 mg/kg/日と判断した.

また，1 ヵ月毒性試験で使用した媒体が，心電図に影響を与えることが示唆されたため，媒体を PEG/Tween 80 から 0.5% MC に変更した．媒体の変更に伴い，両媒体を用いたトキシコキネティクス (TK) 試験を実施して経口投与時の曝露を確認したところ，0.5% MC 媒体を用いた際に 600 mg/kg 投与群の曝露量は PEG/Tween 80 媒体を用いたときの 300 mg/kg 投与群の曝露量とほぼ同等であった.

上記の結果から，本試験の最高用量を 600 mg/kg/日とし，以下の用量に 80 及び 10 mg/kg/日を設定した.

(2) 試験方法及び成績

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)，10，80 及び 600 mg/kg/日の用量で 3 ヵ月間反復経口投与し毒性を検討した．また，対照群及び 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，毒性の回復性を検討した．対照群には媒体 (0.5% MC) を投与した.

試験期間を通じて死亡例は発生しなかった．80 mg/kg/日の雌 1 例及び 600 mg/kg/日の雌雄全例で白色便が認められたが，未吸収の被験物質の排泄に起因したものと考えられ，毒性学的意義はないと判断した．600 mg/kg/日投与群の雌雄で投与 13 週目に血小板数のわずかな増加が認められ，また，投与 4 週目及び 13 週目に APTT の短縮が認められたが，その他の凝固系の異常に関連する所見は認められなかったことから，これら変化の毒性学的意義はないと判断した．血液化学的検査では，600 mg/kg/日投与群の雌雄で投与 4 週目及び 13 週目に AST，ALT，CK 活性のわずかな上昇及び総コレステロールのわずかな増加が認められた.

投与期間終了時の肉眼検査では，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．さらに，これらの群で十二指腸，空腸の粘膜固有層に軽度な脂肪様空胞が認められた．上述したように総コレステロールの増加がみられていることから，十二指腸及び空腸のこれらの所見は，脂質の吸収代謝に対するルストロンボパグの作用と考えられ，小腸での障害を示しているものではなく，毒性学的意義はないと判断した．600 mg/kg/日投与群の雌雄で肝臓重量の増加がみられ，AST，ALT 及び CK 活性も上昇しているが，肝臓，心臓及び骨格筋に関連した病理組織学的変化は認められなかった．600

mg/kg/日投与群で認められた前述の変化は，1 ヵ月回復試験終了時には，良好な回復性を示した．

体重，摂餌量の推移，眼科学的検査，心電図及び尿検査では，ルストロンボパグに起因した変化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}，$AUC_{0\text{-}24hr}$) は用量比以下で増大した．曝露量に明らかな性差は認められず，反復投与による明らかな影響も認められなかった．

本試験では，80 mg/kg/日以上の投与群の雄及び 600 mg/kg/日投与群の雌で，主に肝臓機能に関連する臨床検査値及び副腎に軽度から中等度の毒性変化が認められた．以上の結果から，イヌ 3 ヵ月反復経口投与毒性試験の無毒性量は雄で 10 mg/kg/日，雌で 80 mg/kg/日と判断した．

2.6.6.3.2.3 9 ヵ月反復経口投与毒性試験

評価資料 4.2.3.2-06
概要表 2.6.7.7.6

(1)　用量設定根拠

3 ヵ月反復投与毒性試験では，80 mg/kg/日以上の投与群の雄及び 600 mg/kg/日投与群の雌で，副腎皮質の軽度から中等度の脂肪滴減少が認められた．また，600 mg/kg/日投与群の雌雄で，AST 及び ALT 活性等の上昇が認められたが，ルストロンボパグに起因した病理組織学的変化は認められなかった．無毒性量は雄で 10 mg/kg/日，雌で 80 mg/kg/日と判断した．

上記の結果から，本試験の最高用量を 100 mg/kg/日とし，以下 10 及び 3 mg/kg/日を設定した．

(2)　試験方法及び成績

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)，3，10 及び 100 mg/kg/日の用量で 9 ヵ月間反復経口投与し毒性を検討した．また，対照群及び 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，毒性の回復性を検討した．対照群には媒体 (0.5% MC) を投与した．

試験期間を通じて死亡例は発生しなかった．投与期間中の血液化学的検査では，10 mg/kg/日以上の雌で ALT 活性のわずかな上昇が認められた．この変化は，関連する臨床検査値に変化がないこと及び肝臓に関連した病理組織学的変化が認められないことから，毒性学的意義はないと判断した．投与期間終了時の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．副腎及び胆嚢のこれらの変化は 1 ヵ月回復試験終了時には，良好な回復性を示した．

投与期間，回復期間を通じて，動物の一般状態，体重，摂餌量の推移，眼科学的検査，心電図，尿検査，血液学的検査，肉眼検査及び器官重量にルストロンボパグに起因した変化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}，$AUC_{0\text{-}24hr}$) は用量の増加に伴い増大した．曝露量に明らかな性差は無く，反復投与による明らかな影響も認められなかった．

本試験では，10 mg/kg/日以上の投与群の雄若しくは 100 mg/kg/日の投与群の雌で胆嚢及び副腎に軽度な毒性変化が認められた．以上の結果から，イヌ 9 ヵ月反復経口投与毒性試験におけ

る無毒性量は雄で 3 mg/kg/日，雌で 10 mg/kg/日と判断した.

2.6.6.3.2.4 9ヵ月反復経口投与毒性試験における胆嚢の追加病理組織学的評価

評価資料 4.2.3.2-07
概要表 2.6.7.7.7

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.

ビーグルイヌにルストロンボパグの 0 (対照群)，3，10 及び 100 mg/kg/日を 9ヵ月間投与した群 (各群雌雄 4 例) と 1ヵ月間の休薬後の対照群及び 100 mg/kg/日投与群 (各群雌雄 3 例) の胆嚢組織標本を用いてオイルレッド O 染色及びズダンブラック B 染色により脂質の有無を，また，アルシアンブルー–過ヨウ素酸シッフ染色によりムコ多糖の有無を確認した.

その結果，9ヵ月投与後では，10 mg/kg/日投与群の雌雄各 1/4 例及び 100 mg/kg/日投与群の全例の胆嚢粘膜上皮の空胞はオイルレッド O 染色とズダンブラック B 染色で染色され，アルシアンブルー–過ヨウ素酸シッフ染色では染色されなかった．また，1 ヵ月間の休薬後では，100 mg/kg/日投与群の雌雄各 2/3 例でオイルレッド O 染色とズダンブラック B 染色で陽性を示し，アルシアンブルー–過ヨウ素酸シッフ染色では染色されなかった.

以上の結果より，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は脂肪の蓄積が原因であることが判明した.

2.6.6.4 遺伝毒性試験

2.6.6.4.1 細菌を用いる復帰突然変異試験

評価資料 4.2.3.3-01
概要表 2.6.7.8.1

ルストロンボパグの復帰突然変異誘発性を評価するため，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 2 回実施した．用量設定試験の結果を基にして，156，313，625，1250，2500 及び 5000 µg/プレートの用量で実施した．

TA1535 の S9 mix 非存在下条件及び TA1537 の S9 mix 存在下及び非存在下条件の 2500 µg/プレート以上の用量で生育阻害作用が認められた．一方，TA98，TA100 及び WP2*uvrA* では S9 mix の有無に関わらず，生育阻害作用は認められなかった．なお，いずれの処理条件においても，1250 µg/プレート以上の用量でプレート上にルストロンボパグ由来の析出物が認められた．すべての菌株において，S9 mix の有無に関わらず，いずれの処理用量においても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．

以上の成績から，ルストロンボパグの細菌を用いる復帰突然変異試験は陰性と判断した．

2.6.6.4.2 ほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験

評価資料 4.2.3.3-02
概要表 2.6.7.8.2

ルストロンボパグの染色体異常誘発性を評価するため，チャイニーズハムスター培養細胞 (CHL/IU) 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．用量設定試験の結果を基にして，細胞毒性が 50%以上を示す用量を最高用量に設定した．

S9 mix 非存在下条件の 6 時間処理 (22.2，33.3 及び 50.0 µg/mL) 及び 24 時間連続処理 (14.8，22.2 及び 33.3 µg/mL) 並びに S9 mix 存在下条件の 6 時間処理 (19.8, 29.6 及び 44.4 µg/mL) のいずれの処理条件においても，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．

以上の成績から，ルストロンボパグのチャイニーズハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験は陰性と判断した．

2.6.6.4.3 げっ歯類骨髄細胞を用いる小核試験

評価資料 4.2.3.3-03
概要表 2.6.7.9.1

ルストロンボパグの *in vivo* における染色体異常誘発性を評価するため，CD1(ICR) マウスを用いて小核試験を実施した．用量設定試験では 2000 mg/kg/日で雌雄マウスに死亡例は認められず，一般状態に雌雄差も認められなかったことから，雄性マウスのみを使用し，2000 mg/kg/日を最高用量に設定した．

各群5例の雄性マウスを用いてルストロンボパグを0 (陰性対照群), 500, 1000及び2000 mg/kg/日の用量で1日1回2日間経口投与し，最終投与後24時間目に骨髄塗抹標本を作製した．陰性対照群には媒体 (PEG/Tween 80) を投与した．

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 (MNPCE) の頻度を求めたが，MNPCE 頻度の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，いずれの投与群において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．

以上の成績から，ルストロンボパグのマウス小核試験は陰性と判断した．

2.6.6.5 がん原性試験

2.6.6.5.1 マウスがん原性試験

評価資料 4 2.3.4-01
参考資料 4.2.3.4-03
概要表 2.6.7.10.1，2.6.7.10.2

(1)　用量設定根拠

概要表 2.6.7.10.1 に示すように，ルストロンボパグを 0 [媒体対照群：100%ポリエチレングリコール 400 (PEG) 投与]，10，40 及び 120 mg/kg/日 (各群雌雄 10 例) の用量で投与したマウス 13 週間反復経口投与がん原性予備試験では，投与期間中に本薬に起因した死亡例の発生はなく，一般状態の変化，体重及び摂餌量の変化は認められなかった．血液化学的検査では，120 mg/kg/日投与群の雄で ALT，AST 及び尿素，120 mg/kg/日投与群の雌で ALP の値が媒体対照群より高値を示した．ルストロンボパグを投与したすべての群の雄でビリルビンの高値，すべての群の雌でトリグリセリドの低値が認められ，すべての投与群の雌雄でリン濃度が高値を示したが，いずれの用量においても血液学的検査，器官重量，肉眼検査及び病理組織学的検査には，ルストロンボパグに起因した変化は認められなかった．投与 13 週目の血漿中ルストロンボパグの曝露量 ($AUC_{0\text{-}24hr}$) は，10，40 及び 120 mg/kg/日投与群の雄でそれぞれ 97.1，200 及び 714 μg·hr/mL，雌でそれぞれ 39.0，220 及び 534 μg·hr/mL であった．

以上の結果から，本試験の用量設定にあたっては，20 mg/kg/日を投与した際の曝露量 ($AUC_{0\text{-}24hr}$) は，約 100 μg·hr/mL と推定され，本試験の開始当時に適応として考えていた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における予定臨床投与量 (1 mg/日) 投与時の曝露量 (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，20 mg/kg/日を 104 週がん原性試験の高用量として設定した．低用量には臨床予定曝露量の 3 倍付近で無影響量と推定される 2 mg/kg/日を設定した．

(2)　試験方法及び成績

CD1(ICR) マウス (各群雌雄 60 例) に，ルストロンボパグを 0 (水及び媒体対照群)，2，6 及び 20 mg/kg/日の用量で 104 週反復経口投与し，がん原性を評価した．対照群には水対照群と媒体対照群を設け，媒体対照群には 100% PEG を投与した．

最終投与時 (104 週) の生存動物数 [0 (水対照)，0 (媒体対照)，2，6 及び 20 mg/kg/日投与各群で，雄：それぞれ 33，31，34，27 及び 34 例，雌：それぞれ 22，27，28，26 及び 20 例]，体重，摂餌量は両対照群と同程度であった．ルストロンボパグ投与に起因した一般状態及び血液学的検査の異常は認められなかった．病理組織学的検査では，本薬に起因した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}，$AUC_{0\text{-}24hr}$) 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明らかな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，本申請の適応である慢性肝疾患における観血的手技前の血小板産生促進のための予定臨床用量 (3 mg/

日）での曝露量（$AUC_{0\text{-}24hr}$：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，本薬に起因した腫瘍及び非腫瘍性病変の発生増加はなく，マウスでは，がん原性は認められなかった．

2.6.6.5.2 ラットがん原性試験

評価資料 4.2.3.4-02
参考資料 4.2.3.4-04
概要表 2.6.7.10.1，2.6.7.10.3

(1)　用量設定根拠

概要表 2.6.7.10.1 に示すように，ルストロンボパグを 0 (媒体対照群：100% PEG 投与)，10，20 及び 100 mg/kg/日（各群雌雄 10 例）の用量で投与したラット 13 週間反復経口投与がん原性予備試験では，投与期間中に本薬に起因した死亡例の発生はなく，一般状態の変化，体重及び摂餌量の変化は認められなかった．血液化学的検査では，20 mg/kg/日以上の投与群の雄で血漿中アルブミン，100 mg/kg/日投与群の雌で ALT 及び AST が媒体対照群より高値を示し，20 mg/kg/日以上の投与群の雌で血漿中カリウムが媒体対照群より低値を示した．肉眼検査では，20 mg/kg/日以上の投与群の雄及び 10 及び 100 mg/kg/日投与群の雌で副腎の暗色化が認められ，病理組織学的に 20 mg/kg/日以上の投与群の雄及び 10 mg/kg/日以上の投与群の雌で副腎皮質束状帯の肥大が認められた．

また，ルストロンボパグを 0 (媒体対照群：PEG/Tween 80 投与)，2，20 及び 100 mg/kg/日（各群雌雄 12 例）の用量で投与したラット 6 ヵ月間反復経口投与毒性試験では，試験期間を通じて本薬に起因した死亡例，一般状態の変化，体重及び摂餌量の変化は認められなかった．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．

以上の結果から，104 週がん原性試験の雄の最高用量として，腎臓で器質的変化が認められたことから，20 mg/kg/日を最大耐量と判断し，以下 6 及び 2 mg/kg/日を設定した．一方，雌で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，最高用量として，雄の最大耐量相当の曝露になると考えられる 2 mg/kg/日を設定し，以下 1 及び 0.5 mg/kg/日を設定した．

(2)　試験方法及び成績

Sprague-Dawley 系ラット（各群雌雄 65 例）に，ルストロンボパグを雄には 0 (水及び媒体対照群)，2，6 及び 20 mg/kg/日の用量で，雌には 0 (水及び媒体対照群)，0.5，1 及び 2 mg/kg/日の用量で，それぞれ 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を設け，媒体対照群には 100% PEG を投与した．

最終投与時（104 週）の生存動物数　[雄：0 (水対照)，0 (媒体対照)，2，6 及び 20 mg/kg/日投与各群で，それぞれ 24，29，26，30 及び 29 例，雌：0 (水対照)，0 (媒体対照)，0.5，1 及び 2 mg/kg/日投与各群で，それぞれ 29，25，20，17 及び 18 例]，体重，摂餌量は両対照群と同程度であった．一般状態，眼科検査，尿検査，血液学的検査及び血液化学的検査では，本薬の投与に起因

した異常は認められなかった.

肉眼検査では,副腎の暗色化の発現頻度が 6 mg/kg/日以上の投与群の雄及び 1 mg/kg/日以上の投与群の雌で両対照群と比較して増加したが,関連する病理組織学的変化は認められなかった.

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.

検体起因性の非腫瘍性増殖性病変として，0.5，1 及び 2 mg/kg/日投与群の雌で両対照群と比較して，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，ホルモンの動きに関連するその他の臓器の膣，子宮，乳腺及び下垂体では変化は認められなかったことから，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}，$AUC_{0\text{-}24hr}$) 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 週間反復経口投与したときに，最大耐量の投与でも本薬に起因した腫瘍の発生増加はなく,ラットでも,がん原性は認められなかった.

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

2.6.6.6.1 ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

評価資料 4.2.3.5-01
概要表 2.6.7.11，2.6.7.12.1

(1) 用量設定根拠

ラット 1 ヵ月反復投与毒性試験 (投与量：8，40，200 及び 1000 mg/kg/日) (2.6.6.3.1.1 項参照) では，試験期間を通じて死亡例は発生せず，体重にルストロンボパグ投与の影響は認められなかった．200 mg/kg/日以上の投与群では，雌で四肢と腹部に被毛粗剛並びに四肢と足蹠に落屑が認められた．血漿中ルストロンボパグの曝露量 (C_{max}，$AUC_{0\text{-}24hr}$) は 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．

概要表 2.6.7.11 に示すように，ラット胚・胎児発生に関する用量設定試験 (投与量：8，40，200 及び 1000 mg/kg/日，投与期間：妊娠 7～17 日) において，投与期間中に 200 mg/kg/日投与群の全母動物が死亡した．また，後述するラット胚・胎児発生に関する試験 (投与量：4，12.5，40 及び 80 mg/kg/日，投与期間：妊娠 7～17 日) では，試験期間を通じて死亡例は発生しなかったが，40 mg/kg/日以上の投与群で母動物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，本試験の最高用量は，親動物にルストロンボパグ投与による影響が予想される 100 mg/kg/日を設定し，以下，用量反応性を確認するため，20 及び 4 mg/kg/日を設定した．

(2) 試験方法及び成績

Sprague-Dawley 系ラット (各群雌雄 20 例) にルストロンボパグを 0 (対照群)，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．雄動物には交配前 28 日間及び交配期間を経て剖検前日まで (合計 63～66 日)，雌動物には交配前 14 日間及び交配期間を経て妊娠 7 日まで投与した．雌動物は妊娠 13 日に帝王切開した．対照群には媒体 (PEG/Tween 80) を投与した．

試験期間を通じて雌雄親動物に死亡例は発生せず，体重，摂餌量及び器官の肉眼検査にルストロンボパグ投与による影響は認められなかった．100 mg/kg/日投与群の雄並びに 20 mg/kg/日以上の投与群の雌において，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，ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する経口投与試験の無毒性量は，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．

2.6.6.6.2 ラット胚・胎児発生に関する試験

評価資料 4.2.3.5-02
参考資料 4.2.3.5-05，4.2.3.5-06
概要表 2.6.7.11，2.6.7.13.1

(1) 用量設定根拠

概要表 2.6.7.11 に示すように，ラット胚・胎児発生に関する用量設定試験 (投与量：8，40，200 及び 1000 mg/kg/日，投与期間：妊娠 7～17 日) では，投与期間中に 200 mg/kg/日投与群の全母動物が死亡した．40 及び 1000 mg/kg/日投与群では，母動物に四肢の落屑，体重増加抑制，胎児の体重低値及び胸腰部短小過剰肋骨発現率の増加が認められた．また，1000 mg/kg/日投与群では，口蓋裂 (2 母動物の 5 胎児) 発現率の増加傾向が認められた．

概要表 2.6.7.11 に示すように，妊娠動物の TK を測定するために，ルストロンボパグを 8，40，100，200 及び 1000 mg/kg の用量で妊娠 7 日に単回経口投与した．血漿中ルストロンボパグの曝露量 ($AUC_{0\text{-}24hr}$) は，それぞれ，169.76，668.26，1236.27，1875.69 及び 937.94 μg·hr/mL であり，200 mg/kg 投与群における曝露が最も高く，200 mg/kg 投与群と 1000 mg/kg 投与群との間で曝露の逆転現象が認められた．1000 mg/kg 投与群の $AUC_{0\text{-}24hr}$ は 40 mg/kg 投与群よりも高く，100 mg/kg 投与群よりも低かった．

以上の結果から，本試験では，上述した 1000 mg/kg/日投与群で認められた口蓋裂を精査するために，1000 mg/kg/日投与群と同等の曝露が予想される 80 mg/kg/日を最高用量に設定した．次の用量として，母動物及び胎児にルストロンボパグ投与の悪影響が予想される 40 mg/kg/日を設定し，以下，用量反応性を確認するため，12.5 及び 4 mg/kg/日を設定した．

(2) 試験方法及び成績

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)，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．母動物は妊娠 20 日に帝王切開した．対照群には媒体 (PEG/Tween 80) を投与した．

試験期間を通じて母動物に死亡，流産及び早産は発生せず，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．40 及び 80 mg/kg/日投与群で四肢の落屑，並びに体重低値，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，黄体数，着床数，着床前及び着床後死亡率，生存胎児数，並びに性比にルストロンボパグ投与の影響は認められなかった．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．外表，胎盤及び内部器官の形態にルストロンボパグ投与の影響は認められなかった．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．上述の用量設定試験で認められた 1000 mg/kg/日投与群における胎児の口蓋裂の増加傾向は，本試験では認められず，再現性がなかったことから，これはルストロンボパグ投与の影響ではないと判断した．

血漿中ルストロンボパグの曝露量 (C_{max}，$AUC_{0\text{-}24hr}$) は 4～40 mg/kg/日の用量の範囲では用量の増加に伴って増大したが，80 mg/kg/日投与群の曝露量は 40 mg/kg/日投与群と同程度であった．

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．

以上の結果より，ラット胚・胎児発生に関する経口投与試験の無毒性量は，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．

2.6.6.6.3 ウサギ胚・胎児発生に関する試験

評価資料 4.2.3.5-03
参考資料 4.2.3.5-07，4.2.3.5-08
概要表 2.6.7.11，2.6.7.13.2

(1) 用量設定根拠

概要表 2.6.7.11 に示すように，非妊娠の日本白色種ウサギ 2 週間反復投与毒性試験 (投与量：30，100，300 及び 1000 mg/kg/日) では，試験期間を通じて死亡例は発生せず，一般状態，体重，摂餌量及び剖検所見にルストロンボパグ投与の影響は認められなかった．

概要表 2.6.7.11 に示すように，ウサギ胚・胎児発生に関する用量設定試験 (投与量：30，100，300 及び 1000 mg/kg/日，投与期間：妊娠 6～18 日) では，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．母動物の一般状態，体重，摂餌量及び器官の肉眼検査では，ルストロンボパグ投与の影響は認められなかった．胚・胎児に関して，黄体数，着床数，着床前及び着床後死亡率，生存胎児数並びに性比に，ルストロンボパグ投与の影響は認められなかったが，1000 mg/kg/日投与群で胎児体重及び胎盤重量の低値傾向が認められた．外表，胎盤，内部器官及び骨格の形態並びに骨化進行度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，本試験の用量は，生殖発生毒性試験ガイドラインで 1 日の投与限界量として規定されている 1000 mg/kg/日を最高用量に設定し，以下，用量反応性を確認するため，100 及び 300 mg/kg/日を設定した．

(2) 試験方法及び成績

日本白色種の妊娠ウサギ (各群 17～19 例) にルストロンボパグを 0 (対照群)，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．母動物は妊娠 28 日に帝王切開した．対照群には媒体 (0.1 w/v% Tween 80 を含む 0.5 w/v% MC 水溶液) を投与した．

試験期間を通じて母動物に死亡，流産及び早産は発生せず，一般状態，体重，摂餌量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．胚・胎児において，黄体数，着床数，着床前及び着床後死亡率，生存胎児数，性比並びに胎児体重にルストロンボパグ投与の影響はみられなかった．外表，胎盤，内部器官及び骨格の形態並びに骨化進行度においても，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/日の用量の範囲では用量の増加に伴って増大したが，1000 mg/kg/日投与群の曝露量は 300 mg/kg/日投与群と同程度であった．また，300 及び 1000 mg/kg/日投与において，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，ウサギ胚・胎児発生に関する経口投与試験の無毒性量は，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．

2.6.6.6.4 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

評価資料 4.2.3.5-04
概要表 2.6.7.11，2.6.7.14.1

(1) 用量設定根拠

上述したラット胚・胎児発生に関する経口投与試験 (投与量 : 4，12.5，40 及び 80 mg/kg/日，投与期間 : 妊娠 7～17 日) を参考に，本試験の最高用量は，母動物に軽度な毒性並びに胎児の骨格変異の発現が予想される 40 mg/kg/日を設定し，以下，用量反応性を見るために，12.5，4 及び 1 mg/kg/日を設定した．

(2) 試験方法及び成績

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), 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．母動物は自然分娩させ，F1 出生児の離乳後に解剖した．F1 出生児は，性成熟後に雌雄を交配させ，雄は交配後に剖検し，雌は妊娠 15 日に帝王切開した．対照群には媒体 (PEG/Tween 80) を投与した．なお，本試験では，上述したラット胚・胎児発生に関する試験で認められた 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軽度な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おいて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/日投与群において，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 出生児において，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，死亡前に顕著な体重の低値及び一般状態の異常 (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た．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，これら出生児の死亡は，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．

生殖機能検査において，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．これらの結果から，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，いずれの投与群においても，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．これらの結果から，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，ラット出生前及び出生後の発生並びに母体に関する経口投与試験の無毒性量は，母動物の一般毒性及び生殖毒性に関して 12.5 mg/kg/日，胸腰部短小過剰肋骨を除く次世代の発生毒性に関して 12.5 mg/kg/日，次世代の胸腰部短小過剰肋骨に関して 4 mg/kg/日と判断した．

2.6.6.7 局所刺激性試験

本薬は経口投与適用のため局所刺激性試験は実施しなかった.

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 皮膚光毒性試験

評価資料 4.2.3.7-01
概要表 2.6.7.17.1

(1) 試験方法及び成績

雌性 HR-1 系ヘアレスマウス (1 群 5 又は 10 例) にルストロンボパグを 0 (対照群), 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．対照群には媒体 (PEG/Tween 80) を投与した．

陽性対照物質として 8-メトキシソラレンを用いた．ルストロンボパグ投与の約 4 時間後又は 8-メトキシソラレン投与の約 0.5 時間後からマウスに紫外線 (290～400 nm) の照射を約 1 時間 (10 J/cm^2) 行った．紫外線曝露から 2 日間，マウスにおける皮膚反応の有無を調べた．さらに，ルストロンボパグを別途投与したマウスの血液を採取し，血漿中ルストロンボパグ濃度を調べた．

2 日間の観察期間中，各ルストロンボパグ投与群において一般状態及び体重に本薬に起因する変化はみられなかった．陽性対照物質である 8-メトキシソラレンを投与されたマウスでは，光毒性を示す皮膚反応が認められた．

50 及び 500 mg/kg 投与群の血漿中ルストロンボパグの曝露量は，それぞれ C_{max} で 61.6 及び 96.3 μg/mL，$AUC_{0\text{-}24hr}$ で 957 及び 1650 μg· hr/mL であり，用量比以下で増加した．最高血漿中濃度到達時間 (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り一般状態及び皮膚に変化は認められなかったことから，皮膚光毒性ポテンシャルは無いと判断した．

2.6.6.8.2 PT 及び APTT 延長に対するビタミン K の影響

評価資料 4.2.3.7-02
概要表 2.6.17.1.2

(1) 用量設定根拠

上述したラット 1 ヵ月反復経口投与試験では，40 mg/kg/日以上の投与群の雄及び 200 mg/kg/日投与群の雌で PT あるいは APTT の延長が認められた．PT 及び APTT の延長はビタミン K の欠乏や肝障害によって起こることが知られているが，1 ヵ月反復経口投与試験では病理組織学的検査において肝臓の変化は認められなかったことから，ビタミン K が関与している可能性が考えられた．このことから，ルストロンボパグ投与の血液凝固系に対する影響を調べるため，ラットで PT 及び APTT が延長する 200 mg/kg/日の用量を 1 ヵ月間投与し，ビタミン K の併用投与による影響を調べた．

(2) 試験方法及び成績

Sprague-Dawley 系ラット (各群雄 6 例) にルストロンボパグを 0 (対照群) 及び 200 mg/kg/日の用量で 1 ヵ月間反復経口投与し，ビタミン K_1 の 0.1 及び 0.3 mg/kg/日，ビタミン K_3 の 0.1 及び 0.3 mg/kg/日及び媒体を経口により併用投与した [ルストロンボパグ (mg/kg/日)/ビタミン K

(mg/kg/日)：0/0，200/0，200/0.1 (K_1)，200/0.3 (K_1)，200/0.1 (K_3)，200/0.3 (K_3)]．対照群にはルストロンボパグの媒体として PEG/Tween 80，ビタミン K_1 若しくは K_3 の媒体として注射用水を経口投与した．

ルストロンボパグ及びビタミン K_1 若しくは K_3 を 1 ヵ月間投与した結果，血液学的検査において，ルストロンボパグの単独投与群 (200/0) では，PT 及び APTT の延長と同時に，ビタミン K 依存性凝固因子である II，VII，IX 及び X 因子活性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 (V，VIII，XI，XII 因子) については変化が認められなかった．しかし，ルストロンボパグとビタミン K_1 若しくは K_3 を併用投与した群では，いずれの用量においても血液凝固時間は正常であった．

ルストロンボパグ 200 mg/kg/日の単独投与とビタミン K_1 若しくは K_3 を併用投与した群の血漿中ルストロンボパグの曝露量 (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．

2.6.6.8.3 遺伝子ノックインマウスにおける骨髄線維化ポテンシャルの検討試験

参考資料 4.2.3.7-03
概要表 2.6.7.17.1.3

(1)　用量設定根拠

TPO 受容体作動薬の長期間の投薬により 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ことが類薬のエルトロンボパグから想定されるが，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，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，雌)を用いて，ルストロンボパグ及びエルトロンボパグの骨髄線維化ポテンシャルを検討した．

効力を裏付ける試験として実施した，血小板造血作用を確認するための試験において，TPOR-Ki/Shi マウスにルストロンボパグを反復経口投与した際に，対照群と比較して血小板数を有意に増加させる最小用量は 0.3 mg/kg/日であったことから 0.3 mg/kg/日を低用量として設定した．一方，明らかに血小板を増加させる用量は 10 mg/kg/日であったことから高用量として設定した．また，同試験におけるエルトロンボパグの用量については，ルストロンボパグの 0.3 及び 10 mg/kg/日と同程度に血小板を増加させる用量として 10 及び 40 mg/kg/日を設定した．両薬剤の薬理作用が認められるこれらの用量を用いて，骨髄線維化ポテンシャルを検討した [2.6.2.2.2 及び 2.6.2.2.3 項参照]．

(2)　試験方法及び成績

TPOR-Ki/Shi マウスにルストロンボパグを 0 (対照群)，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，ルストロンボパグの骨髄線維化ポテンシャルを GLP 及び信頼性基準適用

外で評価した (各群雌 5 例). また，ルストロンボパグと同様にヒト型 TPO 受容体作動薬であるエルトロンボパグを対照化合物として用い，0 (対照群)，10 及び 40 mg/kg/日の用量でルストロンボパグと同様の期間，経口投与した(各群雌 5 例). 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 (各群雌 3 例) を設け，毒性及びその回復性を検討した．対照群には媒体 (0.5% MC) を投与した．

投与期間中，両被験物質に起因した死亡例は発生せず，体重にも影響は認められなかった．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で用量に応じた同程度の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ことから，TPOR-Ki/Shi マウスに発現しているヒト型 TPO 受容体が，正常に機能し血小板を上昇させていることを確認した．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，脂肪髄，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において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，ルストロンボパグ及びエルトロンボパグはともに TPOR-Ki/Shi マウスで血小板造血作用を示し，同様に高用量群では骨髄の線維化を惹起することが明らかとなった．また，8 週間投与後に認められた骨髄の線維化は，ルストロンボパグ及びルエルトロンボパグともに回復性を示すことが明らかとなった．

2.6.6.9 考察及び結論

2.6.6.9.1 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

2.6.6.9.1.1 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 2.6.6.9-1 に示す．

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 ヵ月反復投与により，病理組織学的検査で副腎皮質束状帯の萎縮，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．

また，各種非臨床試験で用いたいずれの用量においても，(+)-ルストロンボパグのルストロンボパグに対する曝露量の割合は本剤に含まれる (+)-ルストロンボパグの割合とほぼ同じ若しくは低い値であったことから，ラット，ウサギ及びイヌの生体内でキラル反転が起こらないことを確認した．

表 2.6.6.9-1　反復投与毒性試験における主な毒性所見

動物種	投与期間	投与経路	投与量 (mg/kg/日)	主な毒性所見
ラット	1 ヵ月	経口	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	経口	2，20 及び 100	≥ 20 mg/kg/日：副腎皮質球状帯の萎縮，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	経口	3，10，30 及び 300	≥ 10 mg/kg/日：副腎皮質束状帯の萎縮，胆嚢粘膜固有層の水腫
	3 ヵ月	経口	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	経口	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

臨床使用時のヒトでの安全性を考察するために，各反復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 2.6.6.9-2 に示す．本薬は，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．ラット及びイヌの 1 ヵ月反復投与毒性試験の無毒性量は 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ことが考えられた．投与期間においても臨床で使用される以上の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.

表 2.6.6.9-2　反復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	投与経路	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 $AUC_{0\text{-}24hr}$)
ラット	1 ヵ月	経口	8，40，200 及び 1000	8	19.4 (93.1 μg·hr/mL)
	6 ヵ月	経口	2，20 及び 100	2	7.4 (35.7 μg·hr/mL)
イヌ	1 ヵ月	経口	3，10，30 及び 300	3	7.9 (38.1 μg·hr/mL)
	3 ヵ月	経口	10，80 及び 600	♂：10	3.9 (18.6 μg·hr/mL)
				♀：80	20.2 (96.9 μg·hr/mL)
	9 ヵ月	経口	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.

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]，正常動物の反復経口投与毒性試験及び生殖発生毒性試験で認められた変化はルストロンボパグの TPO 受容体への作用によるものでは無いと考えられる.

2.6.6.9.1.2 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 (表 2.6.6.9-2)，充分な安全域があると判断した．ラット 1 ヵ月毒性試験と同じ施設で実施した 1 ヵ月投与による追加試験において [2.6.6.8.2 項参照]，PT 及び APTT の延長と同時に，ビタミン K 依存性凝固因子である II，VII，IX 及び X 因子活性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活性 (V，VIII，XI，XII 因子) については変化が認められなかった．さらに，本追加試験において，ルストロンボパグとともにビタミン K_1，K_3 を併用投与した動物における血液凝固時間は正常であった．これらのことから，ルストロンボパグはラットにおいてビタミン K 依存性血液凝固因子活性の低下をもたらし，そのために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 は体重 1 kg あたり 1 μg とされており，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 [1]，通常生活において充分量のビタミン K を摂取していると考えられる.

以上のことから，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.

2.6.6.9.1.3 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，特に内分泌に影響する可能性が考えられた．そこで，ヒトへの内分泌に対する影響を確認するため，第 1 相国内反復投与試験 (M0163) 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, 血漿中コルチゾール，尿中コルチゾール，尿中 17-ヒドロキシコルチコステロイド，17-ケトステロイドを測定した．その結果，0.5 mg 投与の被験者 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，その他被験者において，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．

2.6.6.9.1.4 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オイルレッド O 染色及びズダンブラック B 染色に陽性反応を示したことから，蓄積した脂肪であることが判明した．対照群のイヌの胆嚢粘膜上皮においても散在性の脂肪滴が高頻度に認められており，100 mg/kg/日投与群の胆嚢粘膜上皮における軽度に増加した空胞は，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．また，胆嚢粘膜上皮で認められた変化は，軽度な空胞の増加以外に，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，イヌ 9 ヵ月反復投与試験で認められた胆嚢上皮における空胞の増加は，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．

2.6.6.9.2 がん原性について

ルストロンボパグのマウス及びラット 104 週がん原性試験において，本薬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．

なお，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無いが，血小板減少症治療薬として多岐にわたる疾患が開発候補として考えられたため，本薬の長期投与が必要となる疾患への開発の可能性を踏まえ実施している．

2.6.6.9.3 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一般状態の変化は，四肢の落屑であった．この変化は，ラット 1 ヵ月毒性試験でも認められた変化であることから，ルストロンボパグ投与の影響であると判断した．ラット生殖発生毒性試験で認められたこの変化は，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，投与期間が長くなるにつれて，低用量で発現する傾向が認められた．一方，本薬の 1 ヵ月毒性試験における血漿中ルストロンボパグ濃度には雌雄差が認められ，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，この所見の発現は本薬の曝露量 ($AUC_{0\text{-}24hr}$) と関連していると考えられる．雄動物及び非妊娠雌動物の体重並びに摂餌量にルストロンボパグ投与の影響は認められなかったが，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．また，無毒性量におけるラット及びウサギの妊娠母動物の血漿中ルストロンボパグの曝露量 ($AUC_{0\text{-}24hr}$：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 $AUC_{0\text{-}24hr}$：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血漿中ルストロンボパグ濃度 (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血漿中ルストロンボパグ濃度 (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，胚・胎児の発生毒性に関する無毒性量は 1000 mg/kg/日と判断した．無毒性量における妊娠母動物の血漿中ルストロンボパグ濃度 ($AUC_{0\text{-}24hr}$: 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，胚発生において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において，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 [2, 3, 4]. 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において，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血漿中ルストロンボパグ濃度 ($AUC_{0\text{-}24hr}$: 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の関する試験において，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おいて，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において乳汁中に移行することが示されている [2.6.4.6.7 項参照] ことから，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，短小過剰肋骨を除く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，妊娠母動物の血漿中ルストロンボパグ濃度 (胚・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，生殖発生毒性試験において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，この時の最小無毒性量は 4 mg/kg/日であり，4 mg/kg/日を母動物に投与した際の血漿中ルストロンボパグ濃度 ($AUC_{0\text{-}24hr}$) 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明らかに上回る場合にのみ使用し，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．

2.6.6.9.4 その他の毒性について

ヘアレスマウスを用いた，皮膚光毒性試験ではいずれの用量においても，一般状態及び皮膚に変化は認められなかったことから，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．

2.6.6.9.5 ルストロンボパグの TPO 受容体を介した毒性について

前述のように，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 [2.6.2.6.1 項参照]．ルストロンボパグはヒト型 TPO 受容体に特異的に作用する作動薬である．また，類薬のエルトロンボパグ(市販名レボレード®) でもヒトとチンパンジー以外では血小板造血作用は確認できず，種特異性が認められる [2.6.2.6.2 項参照]．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ことが示唆されている [5]．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 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，ルストロンボパグ並びにエルトロンボパグの骨髄に及ぼす影響を GLP 及び信頼性基準適用外で調べた．

ルストロンボパグ及びエルトロンボパグを TPOR-Ki/Shi マウスへ 3 及び 8 週間反復経口投与したところ，ルストロンボパグ及びエルトロンボパグをそれぞれ 0.3 及び 10 mg/kg/日で投与し

た際に，いずれの用量においても血小板造血作用が認められたが，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ことから [6]，ノックインマウスにおける血漿中 TGF-β を測定したところ，ルストロンボパグ及びエルトロンボパグを高用量で投与した群では，対照群と比較して有意な TGF-β の増加が認められたが，その程度に薬剤間の違いは認められなかった．

このことから，本薬においてもエルトロンボパグと同様に高用量を投与した際には，ヒト型 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される際には，骨髄線維化作用が認められる可能性があることは否定できない．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．

2.6.6.10 図表

図表は本文中の適切な場所に記載した.

2.6.6.11 参考文献

1. 平成 24 年国民健康・栄養調査報告 厚生労働省　平成 24 年
2. 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.
3. 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.
4. Wickramaratne GA. The Post-natal Fate of Supernumerary Ribs in Rat Teratogenicity Studies. J Appl Toxicol 1988; 8 (2): 91-4.
5. 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)
6. Chagraoui H. Prominent role of TGF-β1 in thrombopoietin-induced myelofibrosis in mice. Blood 2002; 100 (10): 3495-503.