

CTD 第 2 部

2.4 非臨床試験の概括評価

MSD 株式会社

目次

	頁
表一覧.....	4
図一覧.....	5
略号及び用語の定義.....	6
2.4.1 非臨床試験計画概略.....	9
2.4.A セクション A：グラゾプレビル.....	15
2.4.A.2 薬理試験.....	15
2.4.A.2.1 効力を裏付ける試験.....	15
2.4.A.2.1.1 In Vitro での効力を裏付ける試験.....	15
2.4.A.2.1.2 In Vivo での効力を裏付ける試験.....	17
2.4.A.2.2 副次的薬理試験.....	17
2.4.A.2.2.1 In Vitro での副次的薬理試験.....	17
2.4.A.2.2.2 In Vivo での副次的薬理試験.....	18
2.4.A.2.3 安全性薬理試験.....	18
2.4.A.2.4 薬力学的薬物相互作用.....	20
2.4.A.3 薬物動態試験.....	21
2.4.A.3.1 分析法及びバリデーション報告書.....	21
2.4.A.3.2 吸収.....	21
2.4.A.3.3 分布.....	21
2.4.A.3.3.1 組織分布（ラット）.....	21
2.4.A.3.3.2 組織分布（イヌ）.....	22
2.4.A.3.3.3 胎盤通過（ラット及びウサギ）.....	22
2.4.A.3.3.4 In Vitro 血漿蛋白結合及び血液／血漿中濃度比.....	22
2.4.A.3.4 代謝.....	23
2.4.A.3.4.1 In vivo 代謝（ラット、ウサギ、イヌ及びヒト）.....	23
2.4.A.3.4.2 In vitro 代謝（マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒト）.....	24
2.4.A.3.5 排泄.....	26
2.4.A.3.6 薬物動態的薬物間相互作用.....	26
2.4.A.3.7 その他の薬物動態試験.....	26
2.4.A.4 毒性試験.....	27
2.4.A.4.1 単回投与毒性試験.....	27
2.4.A.4.2 反復投与毒性試験.....	28
2.4.A.4.2.1 マウス.....	28
2.4.A.4.2.2 ラット.....	29
2.4.A.4.2.3 イヌ.....	30

2.4.A.4.3	遺伝毒性試験	32
2.4.A.4.3.1	In Vitro 試験	32
2.4.A.4.3.2	In Vivo 試験	32
2.4.A.4.4	がん原性試験	33
2.4.A.4.5	生殖発生毒性試験	33
2.4.A.4.5.1	受胎能及び早期胚発生に関する試験	33
2.4.A.4.5.2	胚・胎児発生に関する試験	33
2.4.A.4.5.3	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	34
2.4.A.4.5.4	幼若動物を用いた試験	34
2.4.A.4.6	局所忍容性試験	34
2.4.A.4.7	その他の毒性試験	34
2.4.A.4.7.1	抗原性試験	34
2.4.A.4.7.2	免疫原性試験	34
2.4.A.4.7.3	毒性発現の機序に関する試験	35
2.4.A.4.7.4	依存性	38
2.4.A.4.7.5	代謝物	39
2.4.A.4.7.6	不純物	39
2.4.A.4.7.7	その他の試験	41
2.4.B	セクション B：エルバスビル	43
2.4.B.2	薬理試験	43
2.4.B.2.1	効力を裏付ける試験	43
2.4.B.2.1.1	In Vitro での効力を裏付ける試験	43
2.4.B.2.1.2	In Vivo での効力を裏付ける試験	45
2.4.B.2.2	副次的薬理試験	46
2.4.B.2.2.1	In Vitro での副次的薬理試験	46
2.4.B.2.2.2	In Vivo での副次的薬理試験	46
2.4.B.2.3	安全性薬理試験	46
2.4.B.2.4	薬力学的薬物相互作用	47
2.4.B.3	薬物動態試験	48
2.4.B.3.1	分析法及びバリデーション報告書	48
2.4.B.3.2	吸収	48
2.4.B.3.3	分布	48
2.4.B.3.3.1	組織分布（ラット）	48
2.4.B.3.3.2	胎盤通過（ラット及びウサギ）	49
2.4.B.3.3.3	In Vitro 血漿蛋白結合及び血液／血漿中濃度比	49
2.4.B.3.4	代謝	49
2.4.B.3.4.1	In vivo 代謝（ラット、ウサギ、イヌ及びヒト）	49

2.4.B.3.4.2	In vitro 代謝（マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒト）	50
2.4.B.3.5	排泄	51
2.4.B.3.6	薬物動態的薬物間相互作用	51
2.4.B.3.7	その他の薬物動態試験	52
2.4.B.4	毒性試験	53
2.4.B.4.1	単回投与毒性試験	53
2.4.B.4.2	反復投与毒性試験	53
2.4.B.4.2.1	マウス	53
2.4.B.4.2.2	ラット	54
2.4.B.4.2.3	イヌ	54
2.4.B.4.3	遺伝毒性試験	55
2.4.B.4.3.1	In Vitro 試験	55
2.4.B.4.3.2	In Vivo 試験	55
2.4.B.4.4	がん原性試験	55
2.4.B.4.5	生殖発生毒性試験	56
2.4.B.4.5.1	受胎能及び早期胚発生に関する試験	56
2.4.B.4.5.2	胚・胎児発生に関する試験	56
2.4.B.4.5.3	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	56
2.4.B.4.5.4	出生児（幼若動物）での試験	57
2.4.B.4.6	局所忍容性試験	57
2.4.B.4.7	その他の毒性試験	57
2.4.B.4.7.1	抗原性試験	57
2.4.B.4.7.2	免疫原性試験	57
2.4.B.4.7.3	毒性発現の機序に関する試験	58
2.4.B.4.7.4	依存性	58
2.4.B.4.7.5	代謝物	58
2.4.B.4.7.6	不純物	58
2.4.B.4.7.7	その他	60
2.4.5	統合された考察及び結論	62
2.4.6	参考文献	75

表一覧

	頁
表2.4.A-1	安全性の確認が必要なグラゾプレビルの不純物及びそのヒト摂取量に対するラット摂取量比 40
表2.4.B-1	安全性の確認が必要なエルバスビルの不純物及びそのヒト摂取量に対するラット摂取量比 59
表2.4.A-2	グラゾプレビルの全身曝露量に基づいた安全域 65
表2.4.B-2	エルバスビルの全身曝露量に基づいた安全域 72

略号及び用語の定義

略号	定義	
MK-5172,	Grazoprevir	グラゾプレビル
MK-8742,	Elbasvir	エルバスビル
MK-5172A	Grazoprevir/Elbasvir combination	グラゾプレビル／エルバスビル配合錠
ALP	Alkaline phosphatase	アルカリフォスファターゼ
ALT	Alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST	Aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	Area under the Curve	曲線下面積
BCOP	Bovine corneal opacity and permeability assay	ウシ摘出角膜の混濁及び透過性試験
BCRP	Breast cancer resistance protein	乳癌耐性蛋白質
BDC	Bile duct-cannulated	胆管カニューレ
BSEP	Bile Salt Export Pump	胆汁酸トランスポーター
b.i.d.	Bis in die	1日2回投与
Cat A	Cathepsin A	カテプシン A
CC	Cellular cytotoxicity	細胞毒性
CES	Carboxylesterases	カルボキシエステラーゼ
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター
CL _p	Plasma clearance	血漿クリアランス
C _{max}	Observed maximum concentration	最高血漿中濃度
Ct	Threshold cycle number	サイクル閾値数
CTD	Common technical document	コモンテクニカルドキュメント
CYP	Cytochrome P450	チトクローム P450
DAA	Direct-acting antiviral agents	直接作用型抗ウイルス剤
DDI	Drug-drug interaction	薬物間相互作用
EC ₅₀	Concentration that reduces effective response by 50%	50%有効濃度
EC ₉₀	Concentration that reduces effective response by 90%	90%有効濃度
ESRD	End stage renal disease	末期腎不全
F	Oral bioavailability	経口投与時の絶対バイオアベイラビリティ
FOB	Functional observational battery	機能観察総合評価
GSH	Glutathione	グルタチオン
GLP	Good laboratory practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GLDH	Glutamate dehydrogenase	グルタミン酸脱水素酵素
GT	Genotype	遺伝子型
HBV	Hepatitis B virus	B型肝炎ウイルス
HIV	Human immunodeficiency virus	ヒト免疫不全ウイルス
HCV	Hepatitis C virus	C型肝炎ウイルス
hERG	Human ether-à-go-go-related gene	ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子
hr	Hour	時間
ICH	International Conference on	日米 EU 医薬品規制調和国際会議

2.4 非臨床試験の概括評価

略号	定義	
	Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use	
IC ₅₀	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
IK _r	Human ether-à-go-go-related gene (hERG) potassium channel current	ヒト ether-à-go-go-関連遺伝子 (hERG) カリウムチャンネル電流
IK _s	Slowly activating delayed rectifier cardiac potassium channel current	心筋緩徐活性化型遅延整流カリウムチャンネル電流
L	Liter	リットル
LC/MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析法
LE	Long Evans	ロングエバンス (Long Evans)
LLNA	Local lymph node assay	局所リンパ節アッセイ
MDCK	Madin-Darby canine kidney	Madin-Darby イヌ腎臓細胞
mg	Milligram	ミリグラム
mL	Milliter	ミリリットル
MRP	Multidrug resistance-associated protein	多剤耐性関連蛋白質
msec	Millisecond	ミリ秒
NOAEL	No-observed-adverse-effect level	無毒性量
NOEL	No-observed-effect level	無作用量
NS	Non-structural protein	非構造蛋白質
OAT	Organic anion transporter	有機アニオントランスポーター
OATP	Organic anion-transporting polypeptide	有機アニオン輸送ポリペプチド
OCT	Organic cation transporter	有機カチオントランスポーター
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
PAS	Periodic acid-Schiff	過ヨウ素酸シッフ
PBPK	Physiologically-based pharmacokinetic(s)	生理学的薬物動態
PEG	Polyethylene glycol	ポリエチレングリコール
P-gp	P-glycoprotein	P糖蛋白質
PK	Pharmacokinetic(s)	薬物動態
P.O.	Per os (Oral)	経口
QTc	HR-corrected QT interval	心拍数補正 QT 間隔
QWBA	Quantitative whole body autoradiography	定量的全身オートラジオグラフィ
RAV	Resistance-associated variants	耐性変異
RNA	Ribonucleic acid	リボ核酸
SAA	Serum amyloid A	血清アミロイド A
t _{1/2}	Elimination half-life	消失半減期
TCA	Taurocholic acid	タウロコール酸
T _{max}	Time to reach C _{max}	最高血漿中濃度到達時間
UGT1A1	Uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform 1A1	ウリジンニリン酸グルクロン酸転移酵素1A1
μM	Micromolar	マイクロモル濃度
V _{dss}	Steady state volume of distribution	定常状態での分布容積

2.4 非臨床試験の概括評価

略号	定義	
WI	Wistar Han	Wistar Han
w/w	Weight/weight	重量/重量

2.4.1 非臨床試験計画概略

グラゾプレビルはC型肝炎ウイルス（HCV）の非構造蛋白質（NS）3/4Aに可逆的に結合する大環状ペプチド構造の阻害薬であり、エルバスビルはHCV NS5Aに対する強力な低分子阻害薬である。これらの新規化合物は、慢性HCV感染治療に対して併用投与での開発が進められた。本モジュール2.4ではグラゾプレビル及びエルバスビルの非臨床プロファイルの要約を示す。前半をグラゾプレビルに関するセクションとして各パートのセクション番号の先頭にAを表示し、コモンテクニカルドキュメント（CTD）の配列順に並べた。次に、エルバスビルに関するデータをCTDの配列順に示し、各パートのセクション番号の先頭にBを表示した。考察及び結論の項[2.4.5項]では、両化合物を統合した考察を述べる。

要約すると、*in vitro*薬理試験の結果、グラゾプレビル（新規HCV NS3/4Aプロテアーゼ阻害薬）及びエルバスビル（新規HCV NS5A蛋白質阻害薬）はともに広範なHCV genotypeに対して活性を有することが示された。グラゾプレビルはnMレベルより低い濃度（EC₅₀値）でgenotype（GT）1、GT4及びGT6のHCVリボ核酸（RNA）複製を阻害し、GT3に対する活性はnMレベルであった。エルバスビルはpMレベルの濃度（EC₅₀値：4 pM以下）でGT1、GT4及びGT6のHCV複製を阻害し、GT3に対する活性（EC₅₀値：140 pM）はやや低かった。グラゾプレビル及びエルバスビルの併用投与は遺伝的障壁を高めることにより、HCV RNA複製阻害及び耐性出現の抑制において相加作用を示した。NS5B RNA依存性RNAポリメラーゼ阻害薬を追加併用することにより、両化合物の抗ウイルス活性は更に高まった。

グラゾプレビル及びエルバスビルの非臨床薬物動態（吸収、分布、代謝、消失）及び薬物間相互作用の可能性について個別に検討した。グラゾプレビルとエルバスビルの併用投与における薬物間相互作用の可能性については、各化合物の*in vitro*データを、利用可能な薬物間相互作用を評価する臨床試験成績[2.7.2.3.4項]と併せて検討した。グラゾプレビルとエルバスビルとの併用投与において、CYP3A又はP糖蛋白（P-gp）の阻害薬又は誘導薬、若しくはOATP1B1/1B3の阻害薬を併用する場合、薬物間相互作用の影響を受けやすいと考えられた。また、グラゾプレビル及びエルバスビルを併用投与する際に、腸管内濃度でCYP3A、P-gp及びBCRPを弱く阻害することが示唆された。重要なことに、グラゾプレビル及びエルバスビルは、互いの臨床薬物動態には影響を及ぼさない[2.7.2.3.4項]。

グラゾプレビル及びエルバスビル単独の毒性試験については、標準的な組合せの*in vitro*及び*in vivo*遺伝毒性試験、マウスで最大1ヵ月（エルバスビル）又は3ヵ月（グラゾプレビル）、ラットで最大6ヵ月、及びイヌで最大9ヵ月の反復経口投与毒性試験、並びに一連の生殖発生毒性試験が実施されている。さらに、併用投与の非臨床安全性評価を裏付けるために、単独投与の非臨床毒性試験の結果に加え、イヌのグラゾプレビル／エルバスビル1ヵ月間経口併用投与毒性試験の結果と併せて検討した。全体として、単独投与の非臨床毒性試験の結果からグラゾプレビルとエルバスビルに重複した毒性所見は認められず、また、イヌの併用投与毒性試験の結果から各化合物の毒性学的、又はトキシコキネティクスプロファイルに相互作用は認められなかった。

HCV GT1、GT3及びGT4の慢性感染患者向けに開発されたグラゾプレビル／エルバスビルの併用投与又は固定用量配合錠（別名 MK-5172A）は高い有効性及び良好な忍容性を有し、使用が簡便（1日1回投与）であり、ペグインターフェロンを使用しない短期投与レジメンが可能である。HCV GT1感染患者に対して、リバビリン不使用のグラゾプレビル／エルバスビル12週間投与レジメンが提案されている。グラゾプレビル及びエルバスビルの臨床推奨用量は、それぞれ100 mg 及び50 mg である。母集団薬物動態解析による日本人 HCV 感染患者（MK-5172-058試験）の定常状態におけるグラゾプレビル及びエルバスビルの血漿中曝露量の個別推定値に基づく AUC_{0-24hr} の幾何平均値はそれぞれ4.438及び2.775 $\mu\text{M}\cdot\text{hr}$ であり、 C_{max} 値はそれぞれ0.617及び0.177 μM であった[2.7.2.3.1.1 項]、[2.7.2.3.2.1 項]。

グラゾプレビル及びエルバスビルの化学構造をそれぞれ[図2.4- 1]及び[図2.4- 2]に示す。

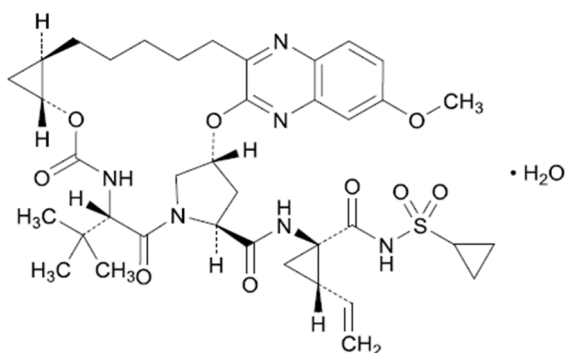


図 2.4- 1 グラゾプレビルの化学構造

グラゾプレビルの化学名は(1aR,5S,8S,10R,22aR)-5-tert-Butyl-N-{(1R,2S)-1-[(cyclopropylsulfonyl)carbamoyl]-2-ethenylcyclopropyl}-14-methoxy-3,6-dioxo-1,1a,3,4,5,6,9,10,18,19,20,21,22,22a-tetradecahydro-8H-7,10-methanocyclopropa[18,19][1,10,3,6]dioxadiazacyclononadecino[11,12-b]quinoxaline-8-carboxamide monohydrate である。試験報告書及び本申請文書中ではグラゾプレビルの別名 MK-5172及び XXXXXXXXXX も用いられている。

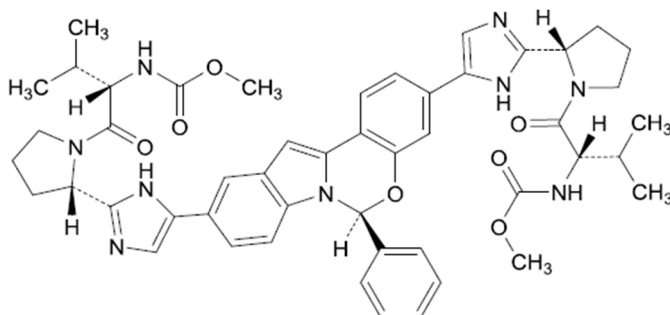


図 2.4- 2 エルバスビルの化学構造

エルバスビルの化学名は Dimethyl N,N'-([(6S)-6-phenyl-6H-indolo[1,2-c][1,3]benzoxazine-3,10-diyl]bis{1H-imidazole-5,2-diyl-(2S)-pyrrolidine-2,1-diyl}[(2S)-3-methyl-1-oxobutane-1,2-diyl]) biscarbamate である。試験報告書及び本申請文書中ではエルバスビルの別名 MK-8742及び ████████ も用いられている。

グラゾプレビルは HCV NS3/4A 蛋白質に可逆的に結合する大環状ペプチド構造の新規阻害薬である。HCV NS3/4A はウイルス複製に不可欠なセリンプロテアーゼであり、ウイルス RNA の翻訳後、NS3/4A はポリ蛋白質前駆体を4箇所の特異的に切断し、他の非構造蛋白質を成熟させる。NS3/4A 酵素活性を阻害する変異はウイルス複製を阻害する。バニプレビル、テラプレビル、シメプレビル及びパリタプレビル等の NS3/4A プロテアーゼ阻害薬が、臨床評価されている。

グラゾプレビルは、*in vitro* 及び細胞複製アッセイにおいて、GT1、GT4及び GT6由来の HCV NS3/4A プロテアーゼを、nM レベルより低い濃度 (EC₅₀値) で強力に阻害する。また、グラゾプレビルは nM レベルの濃度で GT3及び他の主要な HCV genotype に対する活性を保持し、レプリコン細胞を用いた試験での EC₅₀値は1.5~35 nM の範囲である。

グラゾプレビルは既存の HCV プロテアーゼ阻害薬の臨床試験において同定された、GT1a Q80K 及び R155K 等の多数の耐性変異 (RAV) に対して強力な活性を保持している。

生化学的及び細胞を用いたアッセイにおいて、グラゾプレビルの *in vitro* 活性及び阻害機序を検討した。精製酵素及びサブゲノムレプリコン細胞を用いて、HCV GT 1~6由来の NS3/4A プロテアーゼ及び耐性変異に対するグラゾプレビルの活性を評価した。耐性コロニー選択及びその後の逆遺伝学的手法を用いた活性の確認により、標的である NS3/4A に対するグラゾプレビルの活性が更に確認された。HCV 慢性感染チンパンジーを用いた試験において、グラゾプレビル経口投与の *in vivo* での概念実証 (proof-of-concept) が示された。グラゾプレビルの副次的薬理作用を評価するために、標的パネル (受容体、イオンチャネル、転写因子、生物活性蛋白質等) を用いた *in vitro* 結合及び酵素アッセイ (非標的活性) 及びヒトセリンプロテアーゼを用いた *in vitro* 結合及び酵素アッセイ (阻害薬選択性) を行った。慢性 HCV 感染患者ではヒト免疫不全ウイルス (HIV) 及び B 型肝炎ウイルス (HBV) との重複感染が多くみられることから、HIV 及び HBV 細胞培養モデルを用いて、両ウイルスに対するグラゾプレビルの活性を評価した。

エルバスビルは HCV NS5A 蛋白質の新規低分子阻害薬である。NS5A は HCV 複製に不可欠なウイルスのリン蛋白質であり、ヒトでの相同分子種は知られていない。NS5A はアポトーシス、細胞周期、自然免疫、膜生成など多くの細胞内プロセスに関与する多数の宿主蛋白質と相互作用しており、それらを妨げることはウイルス複製に不利に働く。NS5A は酵素活性を示さないが、ウイルス RNA の合成及びウイルス蛋白質の会合にとっては不可欠である。*In vitro* で RNA 結合を阻害するような重要な変異はウイルスの複製を阻害する。耐性コロニー選択試験において逆遺伝学に基づき阻害薬の活性低下を調べたところ、NS5A は阻害薬の標的分子であることが確認された。ダクラタスビル、レジパスビル及びオムビタスビルにより、この作用機序の臨床的有効性及び臨床的作用の実証 (proof-of-activity) がすでに示されている。

エルバスビルは NS5A の強力な低分子阻害薬であり、100種類を超える標的分子パネルに対するスクリーニングにおいて NS5A への選択性が認められた。エルバスビルは HCV のすべての主要な genotype に対してダクラタスビル及びレジパスビルよりも強力な活性を示し、GT1a、GT1b、GT2a、GT4a、GT5a 及び GT6での EC₅₀値は4 pM 以下である。エルバスビルの GT3に対する活性 (EC₅₀値：140 pM) はやや低く、自然耐性である31M 多型を有する GT2b に対しては nM レベルの活性 (EC₅₀値：3.4 nM) であった。エルバスビルは他の阻害薬 (ダクラタスビル、レジパスビル等) でみられる臨床で同定された RAV (NS5A の28、30、31及び93位) に対してより高い活性を示す。

エルバスビルの *in vitro* 活性を、細胞を用いたアッセイで評価した。サブゲノムレプリコン細胞を用いて、HCV GT 1~6由来の NS5A 及び耐性変異に対するエルバスビルの活性を評価した。de novo 耐性コロニー選択及びその後の逆遺伝学を用いた確認により、標的である NS5A に対するエルバスビルの活性が更に裏付けられた。HCV 感染に対する NS5A 阻害薬の位置付けについては、臨床での概念実証 (proof-of-concept) がすでに示されていることから、*in vivo* 試験は実施しなかった。エルバスビルの副次的薬理作用を評価するために、受容体、イオンチャネル、転写因子、生物活性蛋白質などの標的パネルを用いた一連の *in vitro* 結合及び酵素アッセイにより、非標的に対する活性評価を行った。慢性 HCV 感染患者ではヒト免疫不全ウイルス (HIV) 及び B 型肝炎ウイルス (HBV) との重複感染が多くみられることから、HIV 及び HBV 細胞培養モデルを用いて、両ウイルスに対するエルバスビルの交差反応について評価した。

グラゾプレビル及びエルバスビル単独での検討に加えて、両阻害薬の *in vitro* 併用試験を行った。この試験では、異なる作用機序をもつ両化合物を併用することにより耐性出現をさらに抑制し、阻害効果が増強されるとの仮説を検証した。GT1a レプリコン細胞では両薬物の併用により HCV RNA 複製が相加的に阻害された。また、NS5B RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ阻害薬を追加併用することにより、両化合物の抗ウイルス活性は更に増強された。NS3/4A 領域及び NS5A 領域、さらに NS5B 領域でみられる特徴的な RAV は、エルバスビル及びグラゾプレビルに対する交差耐性を示さなかった。これら薬物の併用により遺伝的障壁は更に高くなり、耐性の出現はより強固に抑制された。グラゾプレビル及びエルバスビルはリバビリンと併用される場合があることから、GT1a レプリコン細胞を用いた *in vitro* 併用試験を実施した。リバビリンとの併用において、グラゾプレビル及びエルバスビルはそれぞれ拮抗作用を示さなかった。

グラゾプレビル及びエルバスビル単独投与による心血管系、呼吸系及び神経行動学的作用を検討するための安全性薬理試験 (*in vitro* 及び *in vivo*) を、日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH) S7A 及び S7B ガイドラインに準拠して実施した。追加の探索的スクリーニングアッセイでは、ラット及びイヌでのエルバスビルの血清生化学的プロファイルを検討し、ラットの主要臓器又は組織 (グラゾプレビルでは肝臓のみ、エルバスビルでは肝臓、腎臓、骨格筋及び心臓のみ) での種々の生理学的又は病理学的機能に関わるパスウェイでの変化を評価するため、グラゾプレビル又はエルバスビルに関連した遺伝子発現の変化を同定した。その結果、これらの試験において懸念と

なる作用は認められなかった。

非臨床毒性試験で用いた動物種（ラット、ウサギ及びイヌ）並びにヒトでのグラゾプレビル及びエルバスビルの薬物動態、吸収、分布、代謝及び排泄を包括的に評価した。動物において、グラゾプレビルは肝臓に選択的に分布し、血漿中濃度に比べて肝臓中濃度の方が高かった（エルバスビルではみられず）。したがって、ラット及びイヌを用いてグラゾプレビルの血漿及び肝臓での薬物動態を評価した。グラゾプレビル及びエルバスビルの血漿蛋白結合率及び血液／血漿分配比を動物種間で比較した。ヒトでのグラゾプレビル及びエルバスビルの酸化的代謝に関与する主要CYP分子種及びグラゾプレビル及びエルバスビルの吸収、分布及び消失に関与するトランスポーターを同定するために、*in vitro* 試験を実施した。グラゾプレビル及びエルバスビルは臨床で互いに併用投与されるのみならず、他の薬剤とも併用されることから、主なCYP分子種、カルボキシエステラーゼ（CES）1、CES2、カテプシンA（CatA）、UGT1A1、及び市販薬の消失に重要なトランスポーターに対する、グラゾプレビル及びエルバスビルの阻害又は誘導能の有無を評価した。グラゾプレビル及びエルバスビルの非臨床薬物動態評価（*in vitro* 及び *in vivo*）の結果、非臨床毒性試験で用いた動物種（ラット、ウサギ、イヌ）の選択妥当性及びグラゾプレビルとエルバスビルの併用、又はこれらの併用に加えてさらに他の薬剤を併用する場合の薬物間相互作用に関する注意喚起を支持する成績を得た。

グラゾプレビル及びエルバスビル単独の毒性試験については、標準的な組合せの *in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験、マウスで最大1ヵ月（エルバスビル）又は3ヵ月（グラゾプレビル）、ラットで最大6ヵ月、及びイヌで最大9ヵ月の反復経口投与毒性試験、並びに一連の生殖発生毒性試験が実施されている。CD1マウス及び／又は *rasH2*野生型マウスを用いて用量設定試験を行い、それぞれのマウスを用いて実施予定の短期又は長期がん原性試験での投与量を検討したが、臨床で予定される併用連続投与期間が6ヵ月未満であり、慢性あるいは再発性の病態の治療において間欠的な方法で頻繁に用いられるものではなく、標準的な組合せの遺伝毒性試験でいずれの遺伝毒性も認められず、慢性毒性試験で増殖性の徴候も認められなかったことから、ICH S1A ガイダンスに従って、グラゾプレビル及びエルバスビルのがん原性試験は実施しなかった。臨床試験（PN003試験）[資料5.3.5.1.2: 5172P003]において、高用量のグラゾプレビルをペグインターフェロン及びリバビリンと併用投与した患者の一部で遅発性のトランスアミナーゼ上昇がみられたことから、異なる系統のマウスを用いたグラゾプレビルの単独投与探索試験を追加で実施した。これら試験では、マウス（高用量でトランスアミナーゼ上昇を示した唯一の動物種）の用量設定試験でみられた肝胆道系の変化を更に詳しく調べられるようにデザインした。エルバスビル単独でイヌに1ヵ月間経口投与し、その後3ヵ月間休薬した試験を実施し、イヌの反復投与毒性試験においてエルバスビル投与と関連してリンパ系組織内にみられたリン脂質症の回復性について評価した。グラゾプレビル／エルバスビル併用に対する安全性は、イヌの1ヵ月間経口併用投与毒性試験により評価した。非臨床試験において、標的器官は異なるものの、イヌはグラゾプレビル又はエルバスビルの投与時に病理組織学的標的器官が確認された動物種であった。

非臨床毒性試験で用いた被験物質のバッチを[2.6.7.A.4 項]、[2.6.7.B.4 項]に示す。重要な毒性試験は「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）」を遵守し、ICH ガイドラインに準拠して実施した。グラゾプレビル及びエルバスビルの毒性試験概括表（[2.6.6.1 項]の[表 2.6.6-1]）において別途記載のない限り、試験はすべて Merck Research Laboratories（West Point, Pennsylvania, 米国）又は Laboratories Merck Sharp & Dohme Chibret, Centre de Recherche（Riom, フランス）で実施した。米国及びフランスは経済協力開発機構（OECD）の加盟国であり、OECD データ相互承認システムが適用される。GLP 陳述書はすべての GLP 試験報告書に含まれている。すべての重要な試験で、同一試験内又は同条件下で同調製物を同用量投与した別試験によりトキシコキネティクス評価を実施した。

グラゾプレビル及びエルバスビルの非臨床プロファイルの要約を以下のセクション A 及び B にそれぞれ示す。考察及び結論の項[2.4.5 項]では両化合物についての考察をまとめて述べる。

2.4.A セクション A : グラゾプレビル

2.4.A.2 薬理試験

グラゾプレビルは HCV NS3/4A プロテアーゼの強力かつ特異的な阻害薬であり、慢性 HCV 感染に対する経口治療薬として開発中である。これまでに実施されたグラゾプレビルの非臨床薬理試験の一覧を薬理試験概括表[2.6.3.A.1項]に示す。

グラゾプレビルは HCV NS3/4A に可逆的に結合する大環状ペプチド構造の阻害薬である。HCV NS3/4A セリンプロテアーゼは HCV ポリ蛋白質を4箇所の特異的に切断し、この活性はウイルス複製に不可欠である。したがって、HCV の複製は、プロテアーゼ活性を阻害することにより、阻害される。グラゾプレビルの *in vitro* 薬理試験では、酵素アッセイ及び細胞複製アッセイを用いて翻訳の評価を行った。NS3/4A の酵素活性では、時間分解蛍光法を用いてペプチド基質の加水分解をモニターすることにより評価した。この *in vitro* 酵素アッセイを用いて、GT1~6に対するグラゾプレビルの活性を評価した。細胞を用いた複製評価では、確立された HCV レプリコンモデルを用い、DNA プロブプロテクションアッセイ又は TaqMan™ アッセイのいずれかによる定量的解析を行った。既存及び臨床開発中の HCV 治療薬（エルバスビルを含む）との *in vitro* 併用試験を行い、薬物間の作用（相加作用／相乗作用又は拮抗作用）を評価した。グラゾプレビル及びエルバスビル併用による *in vitro* での耐性抑制の評価では GT1a レプリコン細胞での耐性コロニー出現状況をモニターした。レプリコン細胞に対する併用投与時の活性から出現した RAV を同定し、その特徴を調べた。HCV 慢性感染チンパンジーを用いた試験ではグラゾプレビルの経口投与による臨床作用が実証（proof-of-activity）された。

副次的薬理試験ではグラゾプレビルの選択性及び非標的活性を評価した。ヒトセリンプロテアーゼ及び一連の非標的パネル（酵素、受容体、イオンチャンネル、プロドラッグの代謝に関わる酵素等）に対するグラゾプレビルの活性を評価した。また、細胞モデルを用いて、グラゾプレビルの HIV 及び HBV 阻害作用を評価した。

グラゾプレビルの心血管系、呼吸系及び神経行動学的作用を評価するために、ICH S7A 及び S7B ガイドラインに準拠した安全性薬理試験（*in vitro* 及び *in vivo* 試験）を実施した。

2.4.A.2.1 効力を裏付ける試験

2.4.A.2.1.1 *In Vitro* での効力を裏付ける試験

グラゾプレビルは広範な HCV genotype に対して活性を示す強力な NS3/4A プロテアーゼ阻害薬である。ペプチド加水分解に基づく酵素アッセイにおけるグラゾプレビルの活性（IC₅₀値）は、全 genotype に対して nM 未満の値を示した。

GT1での活性（IC₅₀値）は pM レベルであり、GT1以外の酵素に対する活性は0.034~0.135 nM の範囲であるが、例外として GT3a に対する IC₅₀値は0.69 nM であった[資料4.2.1.1.6: MK-5172 PD006][2.6.3.A.1項]。

プロテアーゼ分泌型アルカリフォスファターゼ（ProSEAP）表現型アッセイ及び HCV レプリコンアッセイによりグラゾプレビルの活性を評価した。グラゾプレビルの活性は両アッセイで同程

度であり、GT1分離株に対する活性値は nM レベルより更に低い値を示した[資料4.2.1.1.1: MK-5172 PD001][資料4.2.1.1.5: MK-5172 PD005][2.6.3.A.1項]。GT1a 及び GT1b レプリコン細胞に対するグラゾプレビルの EC₅₀値はそれぞれ0.4 nM 及び0.5 nM であった[資料4.2.1.1.5: MK-5172 PD005][2.6.3.A.1項][資料4.2.1.1.13: MK-5172A PD016][2.6.3.A.1項][2.6.3.B.1項]。完全長 GT4a レプリコン (EC₅₀値0.3 nM) 及び GT6a (EC₅₀値0.2 nM) に対する活性は同程度であった。相同 GT2a レプリコン (EC₅₀値2.3 nM) 及び GT2b (EC₅₀値3.7 nM) 又は GT5a (EC₅₀値1.5 nM) 由来の NS3/4A をコードするキメラレプリコンに対する活性はやや低かった[資料4.2.1.1.5: MK-5172 PD005][2.6.3.A.1項]。キメラ GT3a (GLA) レプリコンに対する活性低下 (EC₅₀値7.6 nM) がみられ、この結果は酵素アッセイのデータと一致していた。完全長 GT3a (S52) レプリコンに対する活性低下 (EC₅₀値35 nM) はより顕著であった。ただし、S52プロテアーゼドメインのみを含むキメラレプリコンに対する活性は、キメラ GLA に対する活性と一致していた。参照配列以外にも、グラゾプレビルは臨床分離株及びサブタイプに対して広範な活性を示した[資料4.2.1.1.5: MK-5172 PD005][2.6.3.A.1項]。代表的な GT3a 患者分離株に対する活性 (EC₅₀値) は2~7 nM の範囲であった。GT4及び GT6患者分離株に対する活性 (EC₅₀値) の推定値はすべて nM レベルより更に低く、GT5a 分離株に対する活性 (EC₅₀値) は数 nM 濃度の範囲であった。グラゾプレビルの活性は40%正常ヒト血清存在下で1/3未満に低下した (EC₅₀値: 1.1 nM)。

グラゾプレビルの活性低下について、他のプロテアーゼ阻害薬の非臨床試験及び臨床試験で報告された変異をコードするように遺伝子を組み換えた GT1a、GT1b、GT2a、GT3a、GT4a 又は GT5a レプリコン細胞株のパネルを用いて検討した[資料4.2.1.1.5: MK-5172 PD005][2.6.3.A.1項]。最も著しい活性低下を生じたアミノ酸変異は、GT1b では R155G/T/W、A156T/V 及び D168A/F/G/H/I/K/L/T/V/Y であり、GT1a では Y56H 及び D168A/G/H/I/K/T/V であった。グラゾプレビルは GT1a の Q80K 及び第一世代プロテアーゼ阻害薬で高頻度に生じる RAV の多くに対し活性を保持していた[資料4.2.1.1.8: MK-5172A PD010][2.6.3.A.1項][2.6.3.B.1項]。GT3で同定された RAV による活性低下 (1/7以下) は大きくなかった。

他のクラスの HCV 直接作用型抗ウイルス剤 (DAA) でみられた RAV に対する交差耐性の可能性を検討するため、これらの阻害薬クラスに特徴的な RAV を有するレプリコンに対するグラゾプレビルの活性を調べた。NS5A 阻害薬で高頻度に生じる RAV のパネル及び NS5B スクレオシド及び非スクレオシド阻害薬への重要な耐性変異に対し、グラゾプレビルによる活性は保持されていた[資料4.2.1.1.5: MK-5172 PD005][2.6.3.A.1項]。

レプリコン含有 Huh-7細胞及び HeLa 細胞を用いて評価したグラゾプレビルの細胞毒性は低かった。いずれの細胞においても、CC₅₀値は60 µM を上回った[資料4.2.1.1: MK-5172 PD003][2.6.3.A.1項]。

GT 1~6に対する de novo 耐性コロニー選択試験を行った。グラゾプレビルの濃度は、genotype の種類に応じて EC₅₀値の最大30倍までとした[資料4.2.1.1.2: MK-5172 PD002][2.6.3.A.1項]。GT1b では、グラゾプレビルによる選択圧の結果、アミノ酸残基の156位及び168位での変異が単離された。他のグループの耐性ゲノムは41位及び156位での変異をコードしていた。GT1a、GT2a、GT3a、GT4a、GT5a 及び GT6a レプリコンに対してもコロニー選択を行った[資料4.2.1.1.2: MK-5172

PD002][2.6.3.A.1項]。すべての処置において168位での変異が認められた。特に、GT1a、GT4a、GT5a 及び GT6a では D168 A/E/G/N/V 変異が認められた。GT2a 選択では、Y56H 及び A156T/V 変異が最も多くみられた。GT3a 選択では、検討したすべての薬物濃度で Q168R（活性は約1/4に低下）がみられた。

GT1a レプリコン細胞を用い、グラゾプレビルとインターフェロン α 、リバビリン、MK-8876（NS5B ポリメラーゼの非ヌクレオシド阻害薬）、MK-2248（NS5B ポリメラーゼのヌクレオシド阻害薬）及びエルバスビルとの併用時における抗ウイルス活性を評価し、MacSynergy™ 及びサイクル閾値数（Ct）の直接解析（RNA 量に変換せず）により定量化した。HCV RNA 複製阻害の評価より、グラゾプレビルはインターフェロン α 、リバビリン、MK-8876[資料4.2.1.1: MK-5172 PD003] [2.6.3.A.1項]及びエルバスビル[資料4.2.1.1.7: MK-5172A PD008][2.6.3.A.1項][2.6.3.B.1項]との併用により相加作用を示し、MK-2248[資料4.2.1.1.12: MK-2248A PD001] [2.6.3.A.1項][2.6.3.B.1項]との併用では相加作用～相乗作用を示し、いずれの併用においても拮抗作用は示さなかった。検討したいずれの併用濃度においても細胞毒性は認められなかった。

GT1a レプリコン細胞での耐性出現に対するエルバスビル及びグラゾプレビル併用時の活性を評価した。耐性コロニー出現を抑制するためには、各薬物単独では EC₉₀値のそれぞれ100倍及び1000倍の濃度のグラゾプレビル及びエルバスビルが必要であった。両薬物を併用した場合、各薬物の EC₉₀値の10倍の濃度で耐性コロニーの出現が抑制され、併用により少なくとも相加作用を示すことが示唆された[資料4.2.1.1.7: MK-5172A PD008][2.6.3.A.1項] [2.6.3.B.1項]。両薬物併用時の EC₉₀値を上回る濃度で選択された耐性コロニーのクローン配列を解析した結果、連鎖した変異（両薬物の標的分子での2箇所以上の変異）がみられたことより、併用により耐性発現に対する遺伝的障壁が高くなることが示された。

2.4.A.2.1.2 In Vivo での効力を裏付ける試験

HCV GT1慢性感染チンパンジーにおいてグラゾプレビルの活性が確認された。グラゾプレビル 1 mg/kg b.i.d.の7日間投与により、GT1b 感染チンパンジーの血漿中 HCV RNA 量は4～5 log 減少した。GT1a 感染チンパンジーでは、グラゾプレビル投与によりウイルス負荷が約3.5 log 減少し、投与中止後間もなく血中ウイルス量のリバウンドが認められた。耐性ウイルスのクローン配列を解析した結果、耐性変異株では R155K のアミノ酸変異が認められた[資料4.2.1.1.4: MK-5172 PD004][2.6.3.A.1項]。しかし、R155K 変異ウイルスに感染させたチンパンジーにおいても、グラゾプレビルは極めて有効であり、ウイルス量を約2 log 減少させた。

2.4.A.2.2 副次的薬理試験

2.4.A.2.2.1 In Vitro での副次的薬理試験

HCV NS3/4A はセリンプロテアーゼであることから、ヒトセリンプロテアーゼを介した反応に対するグラゾプレビルの阻害作用を測定した。グラゾプレビルはエラスターゼ及びトリプシンに対して優れた選択性（IC₅₀値>100 μ M）を示したが、キモトリプシンに対しては373,750倍の選択性を示したものの、わずかな阻害作用（IC₅₀値：1.495 μ M）が認められた[資料4.2.1.1.6: MK-5172

PD006][2.6.3.A.1項]。[REDACTED]で実施した各種酵素及び受容体などの非標的分子を対象とした一連のアッセイにおいて、計11の分子で阻害作用の EC_{50} 値が100 μ Mを下回った[資料4.2.1.2.1: MK-5172 PD007][2.6.3.A.1項]。阻害活性はすべて1 μ Mを上回ったことから、GT1b 酵素に対する選択性係数はすべて1,000,000倍を上回った。

グラゾプレビルはHCVヌクレオチド・プロドラッグの代謝に関与するCES1、CES2及びCat Aを阻害しなかった[資料4.2.1.2.4: MK-5172A PD012][2.6.3.A.1項][2.6.3.B.1項]。したがって、グラゾプレビルがCES1/2及びCat Aを介したプロドラッグ及び他の治療薬の代謝に影響を及ぼす可能性はない。

HIV及びHBVに対するグラゾプレビルの活性を検討するために、MT4細胞を用いたHIV多重感染アッセイ及びHepG2.2.15細胞を用いたHBV複製アッセイを行った。グラゾプレビルは、8.4 μ Mの濃度でHIVに対する活性を示さず[資料4.2.1.2.3: MK-5172A PD011][2.6.3.A.1項][2.6.3.B.1項]、10 μ Mの濃度でHBVに対する活性を示さなかった[資料4.2.1.2.5: MK-5172A PD014][2.6.3.A.1項][2.6.3.B.1項]。したがって、GT1aレプリコンに対する活性(EC_{50} 値0.4 nM)と比較した特異係数(選択性の差)は 1×10^4 を上回る。HCV患者の多くでHIV重複感染がみられることから、グラゾプレビルはHIV治療薬と併用される可能性がある。既存のHIV治療薬10剤(テノホビル、エムトリシタビン、ダルナビル、アタザナビル、ラルテグラビル、ドルテグラビル、エファビレンツ、リルピビル、エンフビルチド、マラビロク)との併用によるHIV複製阻害活性を検討した試験において、グラゾプレビルは100 nMの濃度でマラビロクの EC_{50} 値を1.2倍(0.38 ± 0.03 nM から 0.45 ± 0.03 nM)に増加させた(p値=0.03)。検討したグラゾプレビルの濃度範囲(15~500 nM)では他のHIV治療薬に対する影響は認められなかった。GT1aレプリコン細胞において、臨床濃度のHIV治療薬はグラゾプレビルの阻害能に影響を及ぼさなかった[資料4.2.1.2.6: MK-5172A PD015][2.6.3.A.1項、2.6.3.B.1項]。

2.4.A.2.2 In Vivoでの副次的薬理試験

実施していない。

2.4.A.2.3 安全性薬理試験

グラゾプレビルの心血管系、中枢神経系及び呼吸系に対する作用を検討するために、ICH S7A及びS7Bガイドラインに準拠したin vitro及びin vivo安全性薬理試験を実施した。

グラゾプレビルの安全性薬理試験の一覧を安全性薬理試験概括表([2.6.2.A.4項]の[表2.6.2.A-28])に示す。

グラゾプレビルは、標準的なホールセルパッチクランプ法を用いたアッセイにおいて、hERGチャネルを異種発現させたCHO-K1細胞でのヒトether-a-go-go関連遺伝子(hERG)カリウムチャネル電流(IK_r)を阻害し、その IC_{50} 値は25 μ Mであった[資料4.2.1.3.2: TT#[REDACTED]-4721][2.6.3.A.4項]。このhERGアッセイは蛋白質非存在下で行われ、ヒトでのグラゾプレビルの蛋白結合率が98%を上回ることを考慮すると、 IK_r の IC_{50} 値はHCV感染患者(100 mg)での非結合 C_{max} 値の3,000倍を上回る。さらに、27及び96 μ M(実測濃度)ではhERG電流のゲート特性に対するみかけの作用

が認められた。このみかけの作用はグラゾプレビルの臨床推奨用量（100 mg）での非結合 C_{max} 値よりも高濃度でみられたことから、安全性上の懸念はないと考えられる。また、PatchXpress 法を用いて探索的に心筋緩徐活性型遅延整流カリウムチャンネル電流（IKs）及びヒト心筋細胞ナトリウムチャンネル電流（INav1.5）に対するグラゾプレビルの作用を検討したところ、検討した最高濃度（30 μM ）においても IKs 又は INav1.5 に対する作用は認められなかった[資料4.2.1.3.1: TT#■■■■-3064][2.6.3.A.4項]。

心血管系試験において、覚醒下のイヌにグラゾプレビル5、20及び600 mg/kg を経口投与したところ[資料4.2.1.3.3: TT#■■■■-5651][2.6.3.A.4項]、20 mg/kg/日群以上でグラゾプレビルに関連した変化が認められ、その内訳は、20 mg/kg/日群以上での用量非依的な心拍数の増加（最大変化：+42 bpm [42%]）及びQT 間隔の短縮（最大変化：-17 msec [-7%]）、600 mg/kg/日群での PR 間隔の短縮（最大変化：-8 msec [-9%]）であった。心血管系機能に関する無作用量は5 mg/kg であった。イヌの1ヵ月間経口投与毒性試験[資料4.2.3.2.9: TT#■■■■-1151][2.6.7.A.7F 項]におけるこの用量での C_{max} 値（11.5 μM ）は日本人 HCV 感染患者（100 mg）でのグラゾプレビルの C_{max} 値の約19倍に相当する。上記の心血管系の変化の程度は軽度であった。イヌの1ヵ月間経口投与毒性試験（最高用量600 mg/kg/日）での ECG 検査又は組織形態学的評価において、心血管系の変化は認められなかった[資料4.2.3.2.9: TT#■■■■-1151][2.6.7.A.7F 項]。したがって、心血管系の機能に関する無毒性量は600 mg/kg 以上であった。イヌの1ヵ月間経口投与毒性試験[資料4.2.3.2.9: TT#■■■■-1151][2.6.7.A.7F 項]におけるこの用量での C_{max} 値（105 μM ）は日本人 HCV 感染患者（100 mg）でのグラゾプレビルの C_{max} 値の約170倍に相当する。さらに、治療用量を上回る用量での QTc 臨床試験において、グラゾプレビル1600 mg を単回経口投与された健康被験者にグラゾプレビルに関連した QTc の変化は認められなかった[2.7.2.2.5.1項]。

グラゾプレビル及びエルバスビルの併用時に、相乗的又は相加的な心血管系の変化が生じる可能性はないと考えられる。グラゾプレビルの安全性薬理試験でみられた心血管系の変化の毒性学的意義は低く、エルバスビルの安全性薬理試験においても心血管系の変化は認められなかった[2.4.B.2.3項]。

覚醒下のイヌにグラゾプレビル5、20及び600 mg/kg を経口投与し、グラゾプレビルの呼吸機能及び体温に対する作用を検討した[資料4.2.1.3.3: TT#■■■■-5651][2.6.3.A.4項]。呼吸機能及び体温に対するグラゾプレビルに関連した変化は認められなかった。

グラゾプレビルの神経行動学的作用を検討するために、ラットの1ヵ月間毒性試験の投与第1日に機能観察総合評価(FOB)を実施した。検討した用量は、限界用量である1000 mg/kg[資料4.2.3.2.4: TT#■■■■-1152][2.6.3.A.4項]及び到達可能な最大曝露量が得られる用量である200 mg/kg b.i.d.[資料4.2.3.2.6: TT#■■■■-1120][2.6.3.A.4項]とした。1000 mg/kg 及び200 mg/kg b.i.d.において、グラゾプレビルに関連した作用は認められなかった。200 mg/kg b.i.d.投与後の C_{max} 値は評価できなかった。ただし、ラットの探索的単回・反復経口投与トキシコキネティクス試験で測定された50 mg/kg 単回経口投与時の C_{max} 値27.8 μM は日本人 HCV 感染患者（100 mg）での C_{max} 値の約45倍に相当する[資料4.2.3.2.5: TT#■■■■-1102][2.6.7.A.6項]。

探索的スクリーニングアッセイでは、ラットにグラゾプレビル200 mg/kg/日を1日1回、7日間投

与し、肝臓での種々の生理学的又は病理学的機能に関連したパスウェイの変化を調べた[資料 4.2.1.3.5: TT#■■■-9637][2.6.3.A.4項]。遺伝子発現変化の程度から、グラゾプレビルはラットの肝機能にほとんど影響を及ぼさないことが示された。

以上、十分に最適化された安全性薬理試験モデルにおいて、心血管系、中枢神経系及び呼吸機能に対するグラゾプレビルに関連した懸念となる作用は認められなかった[2.6.3.A.4項]。グラゾプレビル及びエルバスビル単独投与時の安全性薬理プロファイル（エルバスビルの安全性薬理プロファイルの詳細については[2.6.3.B.4項]参照）より、心血管系、呼吸系又は中枢神経系に対する相乗的又は相加的変化の可能性は考えられない。

2.4.A.2.4 薬力学的薬物相互作用

グラゾプレビルの薬力学的薬物相互作用をみた *in vivo* 試験は実施していない。
[資料 4.2.1.1.4: MK-5172 PD004]

2.4.A.3 薬物動態試験

グラゾプレビルの薬物動態試験一覧表を[2.6.5.A.1 項]に示す。

2.4.A.3.1 分析法及びバリデーション報告書

非臨床薬物動態試験は、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）下では実施しなかった。非臨床薬物動態試験（非 GLP）の分析法を[2.6.4.A.2 項]に示す。

トキシコキネティクス試験では、GLP 下でバリデートされた液体クロマトグラフィ／タンデム質量分析法（LC/MS/MS）により、血漿中及び肝臓中のグラゾプレビル濃度を測定した[2.6.4.A.2 項]。

2.4.A.3.2 吸収

ラット及びイヌにグラゾプレビルを静脈内投与したときの平均血漿クリアランス（ CL_p ）はそれぞれ27.8及び5.2 mL/min/kg、消失半減期（ $t_{1/2}$ ）はそれぞれ1.4及び3.0時間、定常状態での分布容積（ V_{dss} ）はそれぞれ3.1及び0.7 L/kg であった[2.6.5.A.3 項]。グラゾプレビルの経口投与時の絶対バイオアベイラビリティ（F）はラット及びイヌともに低かった（12%～13%）[2.6.4.A.3 項]。胆管カニューレ処置したラット及びイヌを用いた試験で吸収率が約40%と推定されたことから[2.6.4.A.3.1 項] [2.6.4.A.3.3 項]、グラゾプレビルのFが低い理由は、吸収が高くないことに加え、肝臓での初回通過効果によるものと示唆された。

2.4.A.3.3 分布

2.4.A.3.3.1 組織分布（ラット）

白色ラット（Wistar Han）及び有色ラット（Long Evans）に ^{14}C グラゾプレビルを50 mg/kg 単回経口投与した際の組織分布を定量的全身オートラジオグラフィにより評価した[2.6.5.A.4 項] [2.6.5.A.5 項]。白色ラット及び有色ラットにおけるグラゾプレビルの分布パターンは類似していた[2.6.5.A.4 項] [2.6.5.A.5 項]。グラゾプレビルの組織分布は限定的で、放射能は消化管及び肝臓で主に認められた[2.6.5.A.4 項] [2.6.5.A.5 項]。放射能が肝臓に選択的に分布したことは、グラゾプレビルがラット *oatp1b2* の基質であることと一貫している[2.6.4.A.7.1 項]。グラゾプレビルが P-gp の基質であることから期待された通り、グラゾプレビル及び薬物由来放射能の脳への分布はわずかであった[2.6.4.A.4.1 項]。有色ラットでは、投与後8時間にブドウ膜に低濃度（494 ng equiv./g）の放射能が検出されたが、投与後24時間までには定量下限を下回ったことから、グラゾプレビル及び薬物由来放射能はメラニンに結合しないことが示唆された[2.6.5.A.4 項] [2.6.5.A.5 項]。大部分の組織で、放射能は投与後24時間までにほぼ完全に消失し、投与後168時間までに消化管及び肝臓を含むすべての組織で放射能はほぼ完全に消失した[2.6.5.A.4 項] [2.6.5.A.5 項]。

ラットを用いた別の試験では、複数の用量（5、25及び100 mg/kg）を経口投与した際の肝臓及び血漿中グラゾプレビル濃度の経時的推移を検討した[2.6.4.A.4.1 項]。検討したすべての時点で、肝臓中濃度は血漿中濃度より高かった[2.6.5.A.7 項]。肝臓／血漿中濃度比が約400（血漿中濃度約

0.1 μM 未満) から5 (血漿中濃度51.1 μM) に低下したことから、取り込み過程の飽和が示唆された[2.6.5.A.7 項]。血漿中曝露量 ($\text{AUC}_{0-\infty}$) は投与量の増加に伴い用量比を超えて増加した。一方、肝臓中曝露量は経口用量5及び25 mg/kg の間では投与量の増加に伴い用量比例的に増加したが、25及び100 mg/kg の間では投与量の増加に伴い用量比を下回る増加を示した[2.6.5.A.7 項]。明確な濃度推移曲線を示した25 mg/kg 群では、終末消失相での血漿中濃度と肝臓中濃度は並行して減少し、推定消失半減期は約7時間であった[2.6.5.A.7 項]。

2.4.A.3.3.2 組織分布 (イヌ)

イヌにグラゾプレビル1又は5 mg/kg を経口投与した際の肝臓及び血漿中濃度を検討した[2.6.5.A.8 項]。イヌでの結果はラットでの結果と類似しており、すべての時点で肝臓中濃度が血漿中濃度より高かった。また、ラットと同様にイヌでも、肝臓／血漿中濃度比は血漿中濃度の増加に伴い低下したことから、肝臓への取り込みの飽和が示された。肝臓／血漿中濃度比は約70 (血漿中濃度約0.04 μM 未満) から5 (血漿中濃度8.33 μM) に低下した[2.6.5.A.8 項]。イヌにおいても、終末消失相の血漿クリアランスは終末消失相の肝臓クリアランスをよく説明するものであり、推定消失半減期は約9時間であった[2.6.5.A.8 項]。グラゾプレビルは投与後72時間後までにイヌの肝臓から完全に消失した [2.6.5.A.8 項]。

2.4.A.3.3.3 胎盤通過 (ラット及びウサギ)

グラゾプレビルは妊娠ラット及び妊娠ウサギの胎盤を通過した[2.6.5.A.13 項]。胎児／母動物血漿中濃度比は、ラット及びウサギでそれぞれ0.0138～0.894及び0.0128～0.0706であった[2.6.5.A.13 項]。

2.4.A.3.3.4 In Vitro 血漿蛋白結合及び血液／血漿中濃度比

グラゾプレビルの血漿蛋白結合率は高く、その結合率は検討したすべての動物種で同程度であり、非結合型分率はラット、ウサギ、イヌ及びヒトでそれぞれ0.016 \pm 0.002、0.014 \pm 0.001、0.009 \pm 0.001及び0.012 \pm 0.001であった[2.6.5.A.9 項]。検討した濃度範囲 (0.1～10 μM) で非結合型薬物濃度は一定であった[2.6.5.A.9 項]。グラゾプレビルはヒト血清アルブミン及び α 1-酸性糖蛋白に結合し、10 μM までの濃度で飽和はみられなかった[2.6.5.A.10 項]。

腎機能障害者及び対応する対照健康被験者の血漿検体を用いた検討 (in vitro) では、腎機能障害によってグラゾプレビルの血漿蛋白結合が変化しないことが示唆された。重度の腎機能障害者、透析実施中の末期腎不全者、及び対応する対照健康被験者の非結合型分率は、それぞれ0.022 \pm 0.004、0.018 \pm 0.005及び0.017 \pm 0.003であった[2.6.5.A.11 項]。また、様々な程度の肝機能障害者の血漿検体を用いた検討 (in vitro) では、肝機能障害によってグラゾプレビルの血漿蛋白結合は変化しないことが示された。軽度肝機能障害者及び対応する対照健康被験者の非結合型分率はそれぞれ0.017 \pm 0.003及び0.012 \pm 0.002、中等度肝機能障害者及び対照健康被験者ではそれぞれ0.021 \pm 0.010及び0.017 \pm 0.002、重度肝機能障害者及び対照健康被験者ではそれぞれ0.019 \pm 0.003及び0.017 \pm 0.003であった[2.6.5.A.11 項]。

In vitro での平衡状態での血液／血漿中濃度比は、検討した濃度範囲（0.1～10 μM）でグラゾプレビル濃度に非依存的で、平均濃度比はラット、イヌ及びヒトでそれぞれ0.6、0.5及び0.7であった[2.6.5.A.12 項]。これらの動物種でグラゾプレビルの血球移行性は低く、血液クリアランスは血漿クリアランスよりもやや高いことが示唆された。

2.4.A.3.4 代謝

2.4.A.3.4.1 In vivo 代謝（ラット、ウサギ、イヌ及びヒト）

ラット、ウサギ、イヌ及びヒトにおける³H又は¹⁴Cグラゾプレビルの in vivo での代謝を検討した。その結果、検討したすべての動物種で代謝及び未変化体の胆汁中排泄がグラゾプレビルの消失に寄与していることが示唆された[2.6.4.A.5.1 項]。検討した動物種及びヒトでの主要代謝経路は酸化的代謝であり、血中代謝物はほとんど又はまったく検出されなかった[2.6.4.A.5.1 項]。

胆管カニューレ処置した雄性 Wister Han ラット（5 mg/kg 経口投与）、胆管カニューレ処置した雄性ビーグル犬（0.5 mg/kg 静脈内又は1 mg/kg 経口投与）及び無処置の雌性 Dutch Belted ウサギ（200 mg/kg 経口投与）を用いて³H又は¹⁴Cグラゾプレビルの代謝を検討した[2.6.5.A.14 項]。ラットでは、放射能は胆汁及び糞中にそれぞれ投与量の28.1%及び72.8%排泄され、尿中に排泄された放射能はごくわずか（0.4%）であった[2.6.5.A.17 項]。ラット胆汁及び糞中代謝物は、複数のマイナーな酸化代謝物（M1a、M3、M4a、M4b、M5、M7a 及び M9）及び酸化代謝物のグルタチオン抱合体（M8）であった[図 2.4.A-1] [2.6.5.A.14 項]。イヌでのグラゾプレビルの消失及び代謝はラットと同様であった。イヌに静脈内投与したとき、グラゾプレビルは胆汁中（投与量の74%、酸化代謝物と未変化体がほぼ等量）、糞中（投与量の22%）及び尿中（投与量の1%未満）に排泄された[2.6.5.A.14 項] [2.6.5.A.17 項]。イヌ胆汁中の代謝物（M3、M4a、M4b 及び M7a）はラット胆汁中でも認められ、グラゾプレビルの代謝は動物種間で類似していた[図 2.4.A-1] [2.6.5.A.14 項]。経口投与後の糞中の放射能プロファイリングの結果、未変化体及び代謝物 M10（おそらく腸内細菌代謝により生成される）のみが検出された[2.6.5.A.14 項] [2.6.4.A.5.1.3 項]。³H又は¹⁴Cグラゾプレビルを経口投与したラット及びイヌの血漿中からは、未変化体のみが検出された[2.6.5.A.14 項]。ラット及びイヌと同様に、ウサギ糞中に排泄された放射能は主に未変化体であり、マイナーな酸化代謝物（M1a、M3、M4a、M4b、M5、M7a 及び M9）もいくつか認められた[図 2.4.A-1] [2.6.5.A.14 項]。ウサギ血漿中の放射能は、未変化体及びマイナー代謝物（M3、M4a、M4b 及び M7）であった[2.6.5.A.14 項]。

全体的に、非臨床動物種とヒトでのグラゾプレビルの代謝は類似していた。ヒトに¹⁴Cグラゾプレビル186～188 mg（平均196 μCi）を経口投与したとき、ほとんどすべての放射能が糞中に排泄され（投与量の110%）、尿中排泄率は投与量の0.29%のみであった[2.6.5.A.17 項]。糞中の代謝プロファイルに基づくと、グラゾプレビル及び M10（おそらく消化管内で生成・滞留するグラゾプレビルの細菌産物）[2.6.4.A.5.1.4 項]が投与量の80%、酸化代謝物（及びそれらの細菌産物）が投与量の22%を占めていた[2.6.5.A.14 項]。

生理学的薬物動態（PBPK）モデルで推定されたヒトにおけるグラゾプレビルの吸収率は約50%であった [2.7.2.3.1.2.1 項]。代謝試験のデータとあわせて考えると、ヒトでのグラゾプレビルの

消失には胆汁中排泄と代謝がほぼ同程度で寄与していることが示唆された。また、ヒトで認められたすべての代謝物〔ただし、M11a/b（投与量の約8%）及びM14（投与量の約4%）を除く〕は非臨床試験で用いた動物種においても認められた[2.6.4.A.5.1.4 項]。ラット及びイヌと同様に、ヒト血漿中の放射能の成分は未変化体のみであった[2.6.4.A.5.1.1 項] [2.6.4.A.5.1.3 項] [2.6.4.A.5.1.4 項]。

2.4.A.3.4.2 In vitro 代謝（マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒト）

ラット、ウサギ、イヌ及びヒトの肝ミクロソーム及び肝細胞、並びにマウスの肝ミクロソームを用いて、グラゾプレビルの in vitro での代謝を評価した。In vitro での代謝は動物種間で類似しており、主要代謝経路はいずれも酸化代謝であった[2.6.5.A.15 項]。ラット、ウサギ、イヌ及びヒト肝調製物では8種類の酸化代謝物が同定され、それらの代謝物は、水酸化（M1a、M4a、M4b、M7a 及び M9）、酸化的 O-脱アルキル化（M3）、ビニルシクロプロピルアミド基の酸化的脱離（M5）並びに、酸化及びグルタチオン抱合（M8）によって生成した[図 2.4.A-1] [2.6.5.A.15 項]。腸内細菌の代謝によるものと考えられる代謝物（M10、M11a 及び M11b）を除いて、in vitro 代謝物から in vivo 代謝物が予測可能であった。マウス肝ミクロソームのインキュベーションでは微量の代謝物（M3、M4a、M4b 及び M10）が認められた[2.6.5.A.15 項]。ヒト肝調製物で認められた代謝物は、ラット、ウサギ及びイヌの肝調製物でも認められた[2.6.5.A.15 項]。

[³H]又は[¹⁴H]グラゾプレビル並びに、ラット及びヒト肝ミクロソーム及びヒト肝細胞を用いて、グラゾプレビルの化学反応性代謝物の生成について検討した。ラット及びヒトにおいて、グラゾプレビルは NADPH 依存性の蛋白共有結合を示し、還元型グルタチオン又はリトナビルの添加により蛋白共有結合率が低下した[2.6.5.A.16 項]。

蛋白共有結合率がリトナビル又は還元型グルタチオンの添加及び NADPH 非存在下で低下したことから、化学反応性代謝物の生成は CYP 依存的であり、細胞内の内因性抗酸化物質／求核物質が保護的役割を果たすことが示唆される。化学反応性代謝物の生成を示唆する代謝物がヒト排泄物中に検出されなかったことから、ヒトでは化学反応性中間代謝物の生成は、あるとしてもわずかであることが示唆される[2.6.5.A.17 項] [2.6.5.A.14 項]。

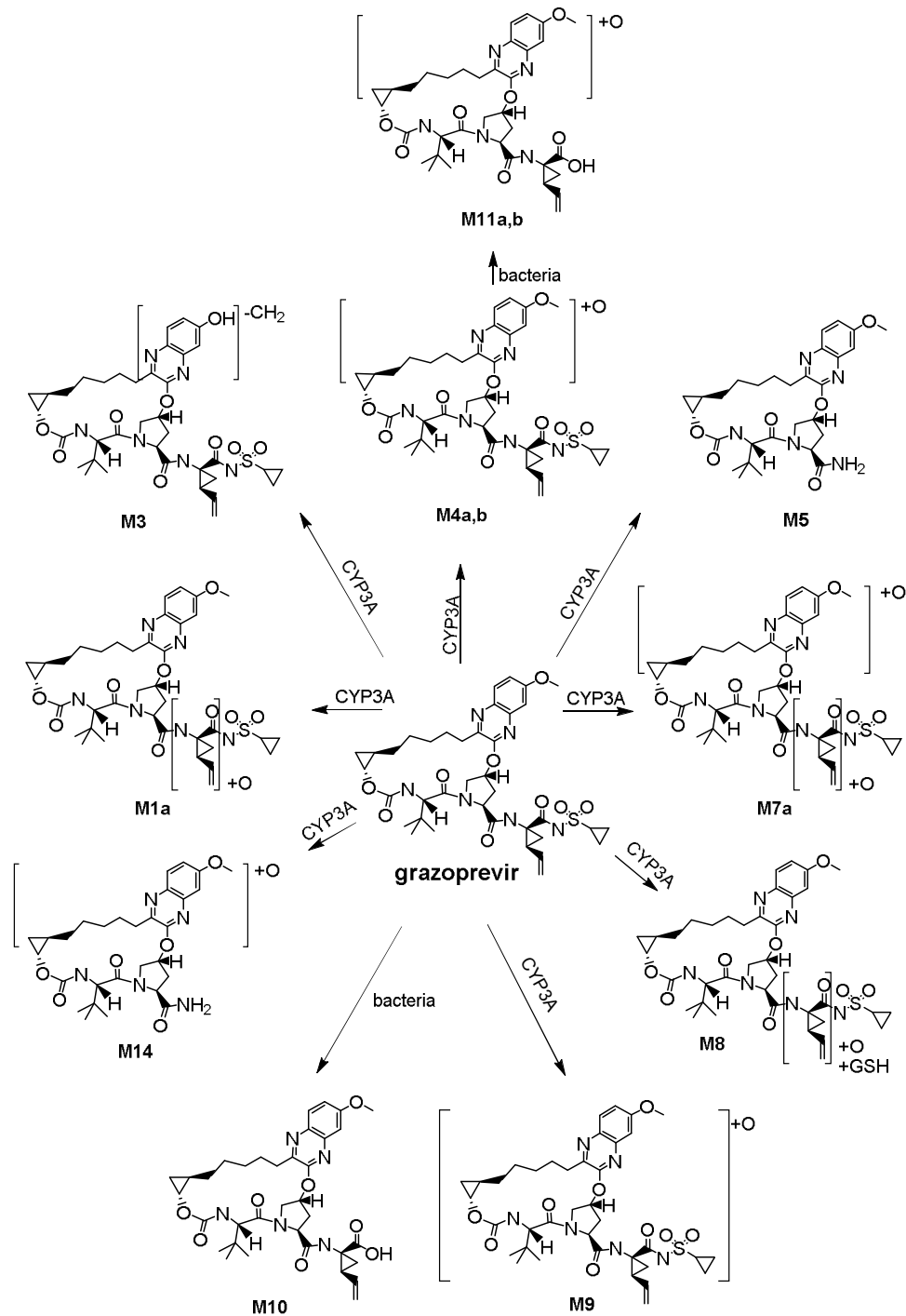


図 2.4.A-1 マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒトにおける
[³H]又は[¹⁴C]グラゾプレビルの推定代謝経路

[2.6.5.A.14 項]、[2.6.5.A.15 項]

2.4.A.3.5 排泄

検討したすべての動物種（ラット、Dutch belted ウサギ、ビーグル犬）及びヒトにおいて、グラゾプレビルの主要消失経路は胆汁中又は糞中排泄であり、腎排泄はごくわずかであった。胆管カニューレ処置したラットに ^3H グラゾプレビル5 mg/kg を経口投与した際、放射能は胆汁（投与量の28.1%）、糞（投与量の72.8%）及び尿中（投与量の0.4%）に排泄され、総回収率は101.3%であった[2.6.5.A.17 項]。無処置のウサギに200 mg/kg を経口投与した際、投与後72時間までに放射能は糞（投与量の77.3%）及び尿中（投与量の1.4%）に排泄され、総回収率は78.7%であった[2.6.5.A.17 項]。胆管カニューレ処置したイヌに0.5 mg/kg を静脈内投与した際は、胆汁（投与量の74.3%）、糞（投与量の22.0%）及び尿中（投与量の0.5%）に、1 mg/kg を経口投与した際には、胆汁（投与量の27.8%）、糞（投与量の26.3%）及び尿中（投与量の3.4%）に排泄された[2.6.5.A.17 項]。健康被験者に186～188 mg を経口投与した際、グラゾプレビルはほぼ完全に糞中（投与量の110%）に排泄され、尿中への排泄（投与量の0.29%）はごくわずかであった[2.6.5.A.17 項]。

授乳ラットに25、100又は200 mg/kg/日（1日2回）を経口投与した際、グラゾプレビルは乳汁中に排泄され、乳汁／母動物血漿中濃度比は0.538～0.866であった[2.6.5.A.18 項]。

2.4.A.3.6 薬物動態的薬物間相互作用

グラゾプレビルが薬物間相互作用の影響を受ける可能性を *in vitro* で検討した。グラゾプレビルの酸化的代謝には主に CYP3A が寄与している[2.6.5.A.19 項]。また、グラゾプレビルは OATP1B1、OATP1B3及び P-gp の基質である[2.6.5.A.23 項]。したがって、グラゾプレビルは、CYP3A 及び P-gp を阻害又は誘導する化合物、又は OATP1B1又は OATP1B3を阻害する化合物によって薬物間相互作用を受ける可能性がある。In vitro において、LLC-PK1細胞でのグラゾプレビルの見かけの膜透過性は良好であった ($P_{app} = 19 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$) [2.6.5.A.23 項]。

グラゾプレビルが薬物間相互作用の影響を及ぼす可能性についても *in vitro* で検討した。グラゾプレビルは腸管の CYP3A ($IC_{50} = 73 \mu\text{M}$) を阻害する可能性を示したが、他の主な CYP 分子種、UGT1A1、CES1、CES2又は Cat A に対する阻害作用はみられなかった[2.6.5.A.25 項] [2.6.2.A.3.1.2 項] [2.6.5.A.28 項]。グラゾプレビルは CYP3A 又は CYP2C8のいずれに対しても時間依存的阻害作用を示さなかった[2.6.5.A.26 項]、[2.6.5.A.27 項]。初代培養ヒト肝細胞とインキュベーションしたとき、グラゾプレビルによる CYP3A4、CYP1A2又は CYP2B6の誘導は認められなかった[2.6.5.A.31 項]。In vitro データからは、グラゾプレビルは P-gp、OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3又は OCT2を阻害しないと予測されたが、腸管の BCRP を阻害する可能性は除外できない[2.6.4.A.7.2 項]。

臨床相互作用試験において、グラゾプレビルは CYP3A 及び P-gp、並びに OATP1B1及び OATP1B3の基質であり、CYP3A 及びBCRPの弱い阻害薬であることが確認された[2.6.4.A.7.2 項]。

2.4.A.3.7 その他の薬物動態試験

その他の薬物動態試験は実施しなかった。

2.4.A.4 毒性試験

ラット及びイヌの反復投与毒性試験（それぞれ最大6及び9ヵ月間）及び CD1マウス／rasH2野生型マウスの用量設定試験（それぞれ3及び1ヵ月間）を実施し、グラゾプレビルの毒性プロファイルを評価した。生殖発生毒性の評価にはラット及びウサギを用いた。遺伝毒性試験として、細菌及び哺乳類細胞を用いた *in vitro* アッセイ並びにラットを用いた *in vivo* 小核試験を行った。がん原性試験については、グラゾプレビルのヒトでの投与期間は6ヵ月間未満であり、慢性あるいは再発性の病態の治療において間欠的な方法で頻繁に用いられるものではなく、一連の遺伝毒性試験において遺伝毒性は認められず、慢性毒性試験において増殖性の徴候は認められなかったことから、ICH S1A ガイダンスに従い、試験は実施しなかった。さらに、臨床試験（PN003試験）において高用量グラゾプレビルとペグインターフェロン及びリバビリンを併用投与された HCV 感染患者の一部で遅発性のトランスアミナーゼの上昇が認められたことから[資料5.3.5.1.2: 5172P003]、3系統のマウスを用いた探索的試験を実施し、マウスの用量設定試験でみられた肝・胆道系の変化について更に検討した。マウスはグラゾプレビルの高用量投与でトランスアミナーゼ上昇を示した唯一の非臨床動物種であった。イヌの1ヵ月間経口併用投与毒性試験ではグラゾプレビルとエルバスビルの併用投与時の非臨床安全性を評価した。非臨床試験において、標的器官は異なるものの、イヌはグラゾプレビル又はエルバスビルの投与時に病理組織学的変化が確認された動物種であった。

グラゾプレビルの非臨床毒性試験の一覧を毒性試験概括表（[2.6.6.1 項]の[表2.6.6-1]）に示す。

グラゾプレビルの標的器官は肝・胆道系（マウス、ラット及びイヌ）、雄性生殖器（マウス及びイヌ）、消化管（マウス、ラット及びイヌ）、腎臓（マウスのみ）及び脾臓／骨髄（イヌのみ）であった。これらの器官で認められた所見は、性質（炎症、変性又は壊死のいずれの所見も伴わない）及び程度から考えて毒性学的意義は限定的であると考えられ、その高い安全域（35倍超）から臨床用量（100 mg）レベルでは外挿性がないと考えられた。rasH2野生型マウス、CD1マウス、ラット及びイヌでのグラゾプレビルの NOAEL はそれぞれ100 mg/kg/日（ $AUC_{0-24\text{ hr}} = 164 \mu\text{M}\cdot\text{hr}$ ）、200 mg/kg/日（ $AUC_{0-24\text{ hr}} = 820 \mu\text{M}\cdot\text{hr}$ ）、200 mg/kg b.i.d.（ $AUC_{0-24\text{ hr}} = 445 \mu\text{M}\cdot\text{hr}$ ）及び15 mg/kg/日（ $AUC_{0-24\text{ hr}} = 367 \mu\text{M}\cdot\text{hr}$ ）であった。これらの投与量は、HCV 感染患者にグラゾプレビル（100 mg）を投与したときの全身曝露量と比較してそれぞれ約37倍（rasH2野生型マウス）、約185倍（CD1マウス）、約100倍（ラット）及び約83倍（イヌ）に相当する。グラゾプレビルに遺伝毒性は認められず、出生前及び出生後の発生に関していずれの毒性も認められなかった。

2.4.A.4.1 単回投与毒性試験

独立した単回投与毒性試験は実施していないが、ICH M3 (R2)ガイダンスに従い、反復経口投与毒性試験においてグラゾプレビルの急性毒性を評価した。グラゾプレビルの最大投与量は、マウスでは500 mg/kg、ラットでは1000 mg/kg [全身曝露量の最高値は200 mg/kg b.i.d.（400 mg/kg/日）投与時] 及びイヌでは600 mg/kg であった。いずれの動物種においても、単回投与後の死亡は認められず、急性毒性を示唆する変化は認められなかった[2.4.A.4.2 項]。したがって、グラゾプレビルの概略の致死量は雌雄マウスで500 mg/kg 超、雌雄ラットで1000 mg/kg 超及び雌雄イヌで

600 mg/kg 超であった。

2.4.A.4.2 反復投与毒性試験

2.4.A.4.2.1 マウス

rasH2野生型マウス（1ヵ月間投与）[資料 4.2.3.2.1: TT#■■■-6034][2.6.7.A.7A 項]及び CD1マウス（3ヵ月間投与）[資料4.2.3.2.2: TT#■■■-6038][2.6.7.A.7B 項]を用いて用量設定試験を行い、実施する可能性のあったマウスの長期がん原性試験での投与量を検討した。20、100、200及び500 mg/kg/日の投与量で評価を行った。

rasH2野生型マウスの1ヵ月間用量設定試験において、投与期間中に100 mg/kg/日以上以上の群の雌雄で、投薬に関連した変化がみられた。500 mg/kg/日群では、雌雄で体重減少がみられ、対照群と比べて、雌では総白血球及びリンパ球数の減少（それぞれ-37%及び-43%）、雄では総白血球、好中球、リンパ球及び好酸球数の増加（それぞれ+63%、+53%、+61%及び+350%）、雌雄では赤血球数の増加（軽度）、他の赤血球系パラメータ（平均赤血球容積、ヘモグロビン、ヘモグロビン濃度）の減少及び血小板数の増加（軽度）がみられた。血清生化学的検査値の変化として、対照群と比べて、雌雄で総ビリルビン／直接ビリルビン（最高47倍）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST：最高2倍）、アラニン・アミノトランスフェラーゼ（ALT：最高5倍）及びアルカリフォスファターゼ（ALP：2倍未満）の増加、雌雄で血清総蛋白、アルブミン及びグロブリンの減少（軽度）並びにグルコース、リン及びコレステロールの増加（軽度）、雄1例で血中尿素窒素の増加がみられた。200 mg/kg/日群では、対照群と比べて、雌ではグラゾプレビルに関連した総白血球及びリンパ球数の減少（ともに-41%）、雄では血小板数の増加（軽度）がみられた。血清生化学的検査値の変化については、雌雄で総ビリルビン／直接ビリルビンの増加（最高8倍）、雌のみで血清 ALT（2倍未満）、ALP（個別）及びリンの増加（軽度）並びに血清総蛋白、アルブミン及びグロブリンの減少（軽度）、雌雄でコレステロールの増加がみられた。100 mg/kg/日群では、グラゾプレビルに関連した変化は、雌のみでの総白血球及びリンパ球数の減少（軽度）、雌雄でのコレステロールの増加（軽度）、雄1例のみでの総ビリルビンの増加（軽度）のみであった。

100 mg/kg/日以上以上の群の雌及び200 mg/kg/日以上以上の群の雄で、剖検・病理組織学的検査においてグラゾプレビルに関連した変化が認められた。500 mg/kg/日群では、グラゾプレビルに関連した変化として、腎尿細管上皮の変性（雌雄）、肝細胞サイズの増大（ごく軽度～軽度、雌雄）並びに肝重量の増加及び肝臓サイズの増大（及び顕著な小葉構造の明瞭化、雄のみ）、門脈周囲部の肝細胞細胞質の軽度の淡明化〔肝細胞のグリコーゲン量の増加（PAS 染色及び透過電子顕微鏡にて確認）と一致、雌〕、小腸絨毛の萎縮がみられた。200 mg/kg/日群では、肝細胞サイズの増大（雄のみ）及び肝重量の増加がみられたが、500 mg/kg/日群と比較して全体的にその発現頻度及び程度は低かった。100 mg/kg/日群では、グラゾプレビルに関連した変化は肝重量の増加（雌のみ）であった。500 mg/kg/日群の雌雄及び200 mg/kg/日群の雄2例の他の組織で組織形態学的変化が認められたが、これらの動物での一般状態の低下による二次的なものと考えられた。

以上の結果から、100 mg/kg/日群で認められた変化は、軽度の臨床病理学的変化及び肝重量の増加のみであり、病理組織学的変化を伴わなかったことから、これらの所見の毒性学的意義は低

いと考えられた。よって、rasH2野生型マウスの1ヵ月間用量設定試験のNOAELは100 mg/kg/日であった。100 mg/kg/日の全身曝露量 ($AUC_{0-24\text{hr}} = 164 \mu\text{M}\cdot\text{hr}$) は HCV 感染患者にグラゾプレビル (100 mg) を投与したときの全身曝露量の約37倍に相当する。

CD1マウスの3ヵ月間経口投与用量設定試験において、投薬に関連した計画外の死亡が投与15日に500 mg/kg/日群の1例でみられた。死亡例以外の動物でみられたグラゾプレビルに関連した生前の所見は rasH2野生型マウスの1ヵ月間経口投与用量範囲探索試験でみられたものと概して類似していたが、変化の程度は rasH2野生型マウスのものよりもおおむね低かった。200 mg/kg/日以下の群では、対照群と比べて、総ビリルビン (最高3倍)、ALP (2倍未満)、ALT (2倍未満、雌のみ) 及びグルコース (最高+11%、雄のみ) の軽度の増加がみられた。これらの変化は軽微で、組織形態学的所見との関連はみられなかったことから、毒性学的意義は低いと考えられた。剖検・病理組織学的検査においてグラゾプレビルに関連した変化が200 mg/kg/日以上群でみられた。腎臓及び肝臓での変化は、rasH2野生型マウスの1ヵ月間経口投与用量範囲探索試験でみられたものと類似していた。さらに、胆嚢では限局性の炎症が500 mg/kg/日群 (雌雄各1例) で認められた。他の組織での組織形態学的変化が500 mg/kg/日群の雌雄動物で認められたが、これらの動物の一般状態の悪化による二次的なものと考えられた。200 mg/kg/日群で肝重量の増加に関連した門脈周囲部における肝細胞細胞質の淡明化を伴うごく軽度～軽度の肝細胞サイズの増大がみられたが、これらの程度や壊死あるいは炎症がみられていないことから、毒性学的意義は低いと考えられた。

以上の結果から、CD1マウスの3ヵ月間経口投与用量設定試験のNOAELは200 mg/kg/日であった。200 mg/kg/日の全身曝露量 ($AUC_{0-24\text{hr}} = 820 \mu\text{M}\cdot\text{hr}$) は HCV 感染患者にグラゾプレビル (100 mg) を投与したときの全身曝露量の約185倍に相当する。

2.4.A.4.2.2 ラット

ラットを用いた7日間投与の1試験[資料4.2.3.2.3: TT#■■■-2525][2.6.7.A.6 項]、1ヵ月間投与の2試験[資料4.2.3.2.4: TT#■■■-1152][2.6.7.A.7C 項]、[資料4.2.3.2.6: TT#■■■-1120][2.6.7.A.7D 項]及び6ヵ月間投与の1試験[資料4.2.3.2.7: TT#■■■-6014][2.6.7.A.7E 項]により、グラゾプレビルの毒性を評価した。

雌ラットの7日間試験において、検討した最高用量 (200 mg/kg/日) までの用量で毒性学的に意味のある変化は認められなかった。この用量での平均血漿中曝露量は $634.8 \mu\text{M}\cdot\text{hr}$ であったが、個々の血漿中曝露量は大きく変動し、その値は204～1631 $\mu\text{M}\cdot\text{hr}$ の範囲であった。

1ヵ月間投与した最初の試験で、最高用量は限界用量である1000 mg/kg/日とした。この用量での血漿中曝露量 ($AUC_{0-24\text{hr}}$) は $24.3 \mu\text{M}\cdot\text{hr}$ にとどまった。検討の結果、1000 mg/kg/日用調製物 (懸濁液) の物理特性により吸収が制限され、その結果、血漿中全身曝露量が低いことが判明した。グラゾプレビルは懸濁液よりも水溶液で吸収性が良いと考えられたため、以降の1及び6ヵ月間試験での高用量は水溶液中として最大可能投与量である200 mg/kg の b.i.d.投与 (合計400 mg/kg/日) とした。ラットにおいて、50 mg/kg/日、200 mg/kg/日及び200 mg/kg b.i.d. (合計400 mg/kg/日) の用量を6ヵ月間評価した。グラゾプレビルに関連した剖検前の所見は、検討した全用量での投与後の流涎 (一過性)、血清総ビリルビン値の増加 (ごく軽度、対照群での最高値0.2 mg/dL に対し、

200 mg/kg/日群の雌1例：0.3 mg/dL、対照群の雌雄での最高値0.2 mg/dL に対し、200 mg/kg b.i.d. 群の雌雄：雌15例中4例及び雄15例中2例で0.3 mg/dL 及び0.4 mg/dL) 並びに血清ナトリウム、クロライド及びカリウム値の減少（軽度、200 mg/kg/b.i.d.群の雌）であった。流涎は一般的に投与後間もなく発現し、軽微かつ一過性であったことから、グラゾプレビルの中枢神経系への作用ではなく、嗜好上の理由によるものと判断され、毒性学的意義は低いと考えられた。血清生化学変化についても、その程度は軽微であり、病理組織学的変化を伴わなかったことから、毒性学的意義は低いと考えられた。グラゾプレビルに関連した剖検での所見は、腺胃粘膜の限局性出血（200 mg/kg/b.i.d.群、雄）であった。

200 mg/kg b.i.d. 群での全身曝露量は雄（ $AUC_{0-24\text{hr}} = 525 \pm 168 \mu\text{M}\cdot\text{hr}$ ）と雌（ $AUC_{0-24\text{hr}} = 365 \pm 81.7 \mu\text{M}\cdot\text{hr}$ ）で同程度であり、また200 mg/kg/日群（1日1回投与、 $AUC_{0-24\text{hr}} = 419 \pm 68.4 \mu\text{M}\cdot\text{hr}$ ）での全身曝露量とも同程度であることから、この局所出血は、グラゾプレビル（200 mg/kg b.i.d.）と胃粘膜の長期にわたる連日の直接的な接触によるものと考えられた。性差は、体重の大きい雄では、雌よりも200 mg/kg b.i.d.の投与容量が大きかったためと考えられた。6ヵ月間投与後のラットの胃での慢性変化は認められないことから、雄で認められた本所見の毒性学的意義は低いと考えられた。これらの結果から、ラットでのNOAELは200 mg/kg b.i.d.であった。この用量での血漿中全身曝露量（ $AUC_{0-24\text{hr}} = 445 \mu\text{M}\cdot\text{hr}$ ）は、HCV 感染患者にグラゾプレビル（100 mg）を投与した時の全身曝露量の約100倍に相当する。

2.4.A.4.2.3 イヌ

イヌでの9日間経口投与毒性試験[資料4.2.3.2.8: TT#■■■■-1119][2.6.7.A.6 項]、1ヵ月間経口投与毒性試験（TT#■■■■-1151）[2.6.7.A.7F 項]及び9ヵ月間経口投与毒性試験[資料4.2.3.2.10: TT#■■■■-6015][2.6.7.A.7G 項]において、グラゾプレビルの毒性を評価した。

9日間漸増忍容性試験におけるグラゾプレビルに関連した変化は、検討した最高用量（300 mg/kg/日、 $AUC_{0-24\text{hr}} = 1689 \mu\text{M}\cdot\text{hr}$ ）での有害性のない嘔吐及び軽微な臨床病理学的変化〔総ビリルビン増加（試験開始前値の3倍）、雄1例〕のみであった。

1ヵ月間経口投与毒性試験では5、20及び600 mg/kg/日の用量について検討した。600 mg/kg/日群では、グラゾプレビルに関連した所見は、嘔吐、赤血球系パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン、網状赤血球、ヘマトクリット）の平均値の減少（軽度）、平均総ビリルビン値の増加（軽度～中等度、対照群と比較して最高5倍）及び精巣精上皮の変性であった。これらの変化はほとんど有害ではないと判断された。嘔吐は動物の一般状態に影響を及ぼさなかった。血液学的変化の程度はごく軽度であり、関連した組織形態学的変化は認められなかった。ビリルビン増加の程度は中等度であり、他の肝機能検査項目（AST、ALT、ALP）及び関連した組織形態学的変化は認められなかった。精上皮の変性は全動物で認められ、その程度はごく軽度～軽度であり、回復性があると考えられた[資料4.3: 1]。20 mg/kg/日群では、グラゾプレビルに関連した所見は総ビリルビン値の2倍（試験開始前値との比較）の増加（雄1例）のみであり、その程度は低く、他の肝・胆道系検査項目（AST、ALT、ALP）の増加及び関連した組織形態学的変化は認められないことから、毒性学的意義は低いと考えられた。これらの結果に基づき、1ヵ月間経口投与毒性試験のNOAELは

20 mg/kg/日であった。この用量での血漿中全身曝露量 ($AUC_{0-24\text{hr}} = 497 \mu\text{M}\cdot\text{hr}$) は HCV 感染患者にグラゾプレビル (100 mg) を投与したときの全身曝露量の約112倍に相当する。

イヌの1ヵ月間経口投与毒性試験の結果に基づき、9ヵ月間経口投与毒性試験では5、15及び300 mg/kg/日について検討した。不十分な摂餌量又は食欲不振による過度の体重減少及び他の毒性徴候がみられたことから、雌雄各1例を早期屠殺し、投与12週目に投与量を100 mg/kg/日に減量した。300 mg/kg/日群では、体重及び摂餌量減少以外にグラゾプレビルに関連した変化として、無形便／液状便 (雌のみ) 及び投与後の嘔吐の増加 (同時対照群との比較)、糞便の黄色化、皮膚及び眼 (眼球結膜) の黄色化 (1例)、赤血球系パラメータの減少 (軽度)、フィブリノーゲン及び血小板の増加、血清総ビリルビンの増加 (対照群と比べて最高11倍、ほとんどの動物で主に直接ビリルビンの増加)、血清 ALP の増加 (4倍未満、雄のみ)、血清コレステロールの一過性の減少 (軽微)、尿中ビリルビンの増加がみられた。100 mg/kg/日投与の27週間でみられたグラゾプレビルに関連した生前の所見は、300 mg/kg/日投与時の最初の11週間でみられた所見とおおむね類似しており、無形便／液状便 (雌のみ) 及び投与後の嘔吐 (雌のみ) の増加、糞便の黄色化、体重減少及び不十分な摂餌量／食欲不振 (雄1例)、大部分の赤血球系パラメータの減少 (軽度)、フィブリノーゲン及び血小板の増加、血清総ビリルビンの増加 (対照群と比べて最高7倍、主に直接ビリルビン)、血清 ALP の増加 (4倍未満)、血清コレステロールの減少 (軽微、一過性、雄1例) 並びに尿中ビリルビンの増加 (雄1例) であった。また、100 mg/kg/日では、赤血球系パラメータの減少、平均赤血球数の増加 (雄、投与38週)、網状赤血球数の平均値/個別値の増加及び一部の動物で有核赤血球の出現がみられ、これらは再生性の反応である可能性が示唆された。300/100 mg/kg/日群では、最終剖検例及び早期屠殺例 (雌雄) において、グラゾプレビルに関連した変化が認められた。最終剖検例でみられたグラゾプレビルに関連した肉眼的所見は胆汁量の増加を伴う胆嚢拡張 (全例) であった。また、歯肉粘膜並びに白色脂肪組織及び／又は大動脈の黄色化が雄3例中2例で認められたが、本所見に関連した特異的な組織形態学的な変化は認められなかった。器官重量測定では、グラゾプレビルに関連した平均肝重量の増加 (雌雄、本所見に関連した特異的な組織形態学的な変化は認めず) 及び平均精巣重量の減少が認められた。病理組織学的検査ではグラゾプレビルに関連した変化が肝臓、胆嚢、精巣、精巣上体、脾臓及び骨髄で認められた。肝臓では、類洞細胞での色素沈着 (ヘモジデリン、ごく軽度～軽度) 及び大型胆管内腔における微石症 (ごく軽度) が雌雄で時折認められた。胆嚢内腔の微石症 (ごく軽度) も雌雄で認められた。胆管及び胆嚢内腔の微石症と関連した病理組織学的変化は認められなかった。脾臓では、色素沈着 (ヘモジデリン) の増加 (雄) 及び髄外造血の増加 (雌雄) が認められた。骨髄では、赤血球系細胞の過形成がみられ (雄1例)、血液学的検査における赤血球系パラメータの変化と関連すると考えられた。雄性生殖器では、精細管の変性 (中等度～重度) がみられ、この所見は精巣重量の減少と関連しており、その結果、精巣上体管には変化はないがその内腔における精子数の減少 (より重度) がみられた。最終剖検例でみられた所見のほとんどは早期屠殺例でもみられた (胆管・胆嚢の微石症を除く)。さらに、早期屠殺例の雄では、色素沈着 (ヘモジデリン)、骨髄過形成、及び十二指腸での限局性炎症がみられた。早期屠殺例での一般状態悪化の原因は特定されなかった。さらに、早期屠殺例の雌 ($AUC_{0-24\text{hr}} = 3240 \mu\text{M}\cdot\text{hr}$) 及び雄 ($AUC_{0-24\text{hr}} = 3610 \mu\text{M}\cdot\text{hr}$)

での血漿中全身曝露量は、最終剖検例の一部の個体での全身曝露量（最高 $AUC_{0-24\text{hr}} = 5540 \mu\text{M}\cdot\text{hr}$ ）よりも低かった。300/100 mg/kg/日は最大耐量を超える用量であったが、高い曝露比を考えると、この用量でみられた毒性はヒトでのリスクには該当しないと考えられた。300/100 mg/kg/日での血漿中全身曝露量（ $AUC_{0-24\text{hr}} = 2300 \mu\text{M}$ ）は HCV 感染患者にグラゾプレビル（100 mg）を投与したときの全身曝露量の約518倍に相当する。

15 mg/kg/日群でみられたグラゾプレビルに関連した変化は、血清総ビリルビン増加（ごく軽度～軽度、対照群と比べて最高3倍、雌雄）、大型胆管及び胆嚢内腔の微石症（ごく軽度、雌1例、組織自体の変化は認めず）及び精巣重量減少と関連した精細管の変性（ごく軽度、雄1例）のみであった。ビリルビン増加は軽度で、肝・胆道系検査項目（AST、ALT、ALP）の変化はなく、関連した組織形態学的変化が認められないことから毒性学的意義は低いと考えられた。大型胆管及び胆嚢内腔の微石症もごく軽度で、胆嚢又は肝臓での組織形態学的変化が認められないことから毒性学的意義は低いと考えられた。精巣の変化（雄1例）はごく軽度であり、生殖細胞集団の減少は精原細胞以降のより成熟した細胞タイプのみ限定され、セルトリ細胞及びライディッヒ細胞に顕著な変化はなく、回復性を有すると考えられた[資料4.3: 1]。また、精巣上体では病理組織学的な変化は認められず、精巣上体の精子数にも影響は認められなかったことから、精巣の変化は軽微であり、本所見の毒性学的意義は低いと考えられる。

これらの結果に基づき、イヌの9ヵ月間経口投与毒性試験における NOAEL は15 mg/kg/日であった。この用量での血漿中全身曝露量（ $AUC_{0-24\text{hr}} = 367 \mu\text{M}\cdot\text{hr}$ ）は HCV 感染患者にグラゾプレビル（100 mg）を投与したときの全身曝露量の約83倍に相当する。5 mg/kg/日では、グラゾプレビルに関連した変化は認められなかった。この用量での血漿中全身曝露量（ $AUC_{0-24\text{hr}} = 69.3 \mu\text{M}\cdot\text{hr}$ ）は HCV 感染患者にグラゾプレビル（100 mg）を投与したときの全身曝露量の約16倍に相当する。

2.4.A.4.3 遺伝毒性試験

2.4.A.4.3.1 In Vitro 試験

グラゾプレビルは細菌を用いた変異原性試験において遺伝毒性を示さず[資料4.2.3.3.1.1: TT#■■■-8000][2.6.7.A.8A 項]、チャイニーズハムスター卵巣細胞を用いた染色体異常試験において陰性であった[資料4.2.3.3.1.2: TT#■■■-8600][2.6.7.A.8B 項]。これらの試験で用いた最高濃度はそれぞれ限界濃度又は細胞毒性により制限される濃度であった。

2.4.A.4.3.2 In Vivo 試験

グラゾプレビルは、ラットの in vivo 小核試験において、限界用量である1000 mg/kg/日までの用量で陰性であり[資料4.2.3.3.2.1: TT#■■■-8813][2.6.7.A.9A 項]、到達可能な最大曝露が得られる用量である200 mg/kg b.i.d.（合計400 mg/kg/日）までの用量で陰性であった[資料4.2.3.3.2.2: TT#■■■-8734][2.6.7.A.9B 項]。後者の用量での血漿中全身曝露量（ $AUC_{0-24\text{hr}} = 212 \mu\text{M}\cdot\text{hr}$ ）は HCV 感染患者にグラゾプレビル（100 mg）を投与したときの全身曝露量の約48倍に相当する。

2.4.A.4.4 がん原性試験

ヒトでのグラゾプレビルの投与期間は6ヵ月間未満であり、慢性あるいは再発性の病態の治療において間欠的な方法で頻繁に用いられるものではなく、標準的な組合せの遺伝毒性試験でいずれの遺伝毒性も認められず、慢性毒性試験でいずれの腫瘍増殖の徴候も認められなかった。これらのことから、患者の寿命の相当な期間にわたって規則的に投薬されることが予想されるものではなく、ICH S1A ガイダンスに基づき、がん原性試験は実施しなかった。

2.4.A.4.5 生殖発生毒性試験

2.4.A.4.5.1 受胎能及び早期胚発生に関する試験

性的に成熟した雌雄ラットを用いて、到達可能な最大曝露量が得られる用量である200 mg/kg b.i.d. までの用量での経口投与受胎能試験を実施した[資料4.2.3.5.1.1: TT#■■■■-7260][2.6.7.A.12A 項]。雌雄の受胎能パラメータ及び一般的な毒性パラメータにおいてグラゾプレビルに関連した変化は認められず、雌雄の受胎能パラメータ及び一般的な毒性パラメータの NOEL は200 mg/kg b.i.d. (合計400 mg/kg/日) 以上であった。この用量での血漿中全身曝露量 ($AUC_{0-24\text{hr}} = 212 \mu\text{M}\cdot\text{hr}$ 、1ヵ月間経口投与毒性試験の投与4週に測定) は HCV 感染患者にグラゾプレビル (100 mg) を投与したときの全身曝露量の約48倍に相当する。

2.4.A.4.5.2 胚・胎児発生に関する試験

ラットを用いて、到達可能な最大血漿中全身曝露量が得られる用量である200 mg/kg b.i.d. (合計400 mg/kg/日) までの用量での胚・胎児発生毒性試験を実施し、出生前の評価を行った[資料4.2.3.5.2.2: TT#■■■■-7050][2.6.7.A.13A 項]。グラゾプレビルに関連した母体又は胚・胎児発生毒性は認められず、母体及び胚・胎児発生毒性に関する NOEL は200 mg/kg b.i.d.以上であった。この用量での血漿中全身曝露量 ($AUC_{0-24\text{hr}} = 217 \mu\text{M}\cdot\text{hr}$) は HCV 感染患者にグラゾプレビル (100 mg) を投与したときの全身曝露量の約49倍に相当する。

ウサギを用いた予備的な経口投与胚・胎児発生毒性試験では、100%ポリエチレングリコール (PEG) 400を媒体としてグラゾプレビルを50 mg/kg/日、200 mg/kg/日及び200 mg/kg b.i.d. (合計400 mg/kg/日) で妊娠ウサギに投与した[資料4.2.3.5.2.10: TT#■■■■-7040][2.6.7.A.11 項]。全身曝露量は $3.61 \mu\text{M}\cdot\text{hr}$ までしか到達せず、対照群及び200 mg/kg b.i.d.群では、過量の媒体 (投与された PEG の総容量: 2 mL/kg/日) に関連した毒性が認められた。そのため、ウサギの胚・胎児発生毒性試験では静脈投与用ナノ粒子懸濁液を投与することとした。静脈内投与探索試験では、200 mg/kg/日で母動物2例に用量制限毒性となる死亡がみられ、当該投与群への投与は中止した[資料4.2.3.5.2.12: TT#■■■■-7001][2.6.7.A.11 項]。静脈内投与胚・胎児発生毒性試験では25、50及び100 mg/kg/日をウサギに投与した結果[資料4.2.3.5.2.13: TT#■■■■-7300][2.6.7.A.13B 項]、母動物及び胚・胎児発生に関する NOEL は100 mg/kg/日であった。この用量での血漿中全身曝露量 ($AUC_{0-24\text{hr}} = 76.1 \mu\text{M}\cdot\text{hr}$) は HCV 感染患者にグラゾプレビル (100 mg) を投与したときの全身曝露量の約17倍に相当する。

2.4.A.4.5.3 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

F₀世代の雌ラットにグラゾプレビル25及び100 mg/kg/日を1日1回あるいは200 mg/kg b.i.d. (合計400 mg/kg/日)を経口投与し、F₁世代の発生、発育、行動、生殖成績及び受胎能に対する作用を評価した[資料4.2.3.5.3.1: TT#■■■■-7010][2.6.7.A.14 項]。いずれの用量においてもF₀及びF₁世代での変化は認められず、F₀世代での母動物毒性及びF₁世代での発生毒性に関するNOELは200 mg/kg b.i.d.以上であった。母動物での100 mg/kg/日の最大血漿中全身曝露量 (AUC_{0-24hr} = 155 µM•hr) はHCV感染患者にグラゾプレビル (100 mg) を投与したときの全身曝露量の約35倍に相当する。

2.4.A.4.5.4 幼若動物を用いた試験

本申請では小児へのグラゾプレビルの投与は意図していない。しかし、グラゾプレビルの非臨床試験 (試験開始時におおむね性的に未成熟の幼若動物を用いた試験) 及び臨床試験では、年齢に関連した安全性の大きな懸念は認められなかった。さらに、グラゾプレビルはラットの乳汁中に移行するため、ラットの出生後発生毒性試験において、授乳中の幼若ラットはグラゾプレビルに間接的に曝露された。したがって、一連の非臨床試験は小児の適応での臨床開発を裏付ける上で適切と考えられる。

2.4.A.4.6 局所忍容性試験

化合物の作業時安全に関するデータを取得するための試験として局所刺激性試験 [ウシ角膜を用いる混濁度及び透過性 (BCOP) 試験及びウサギの急性皮膚刺激性/腐食性試験] を実施した。

BCOP 試験の結果、グラゾプレビルは非刺激性に分類された [資料4.2.3.6.1: TT#■■■■-7866][2.6.7.A.16 項]。

ニュージーランド白色ウサギを用いた試験において、グラゾプレビルは皮膚刺激性を示さなかった[資料4.2.3.6.2: TT#■■■■-7865][2.6.7.A.16 項]。

2.4.A.4.7 その他の毒性試験

2.4.A.4.7.1 抗原性試験

通常の反復投与毒性試験において、グラゾプレビルの抗原性に起因すると考えられる所見又は変化は認められなかったため、抗原性試験は実施しなかった。

2.4.A.4.7.2 免疫原性試験

ICH S8ガイドライン「医薬品の免疫毒性試験に関するガイドライン」の2.1.1項に概説されている免疫毒性を示唆する所見、すなわち、顕著な血液学的変化 (白血球又はリンパ球の変化)、脾臓、胸腺、リンパ節又は骨髄の臓器重量又は組織像の変化、血清免疫グロブリン濃度の変化を示す血清グロブリン濃度の変化、感染発生率の増加、腫瘍発現率の増加はいずれもみられなかった。2.2項の「重要性に基づいた評価」のとおり、一つの要因でもそれが重要な所見である場合、又は単独では十分な根拠とならないが二つ以上の要因が認められた場合には、免疫毒性試験を追加で実

施する必要がある場合がある。ラット及びイヌを用いたグラゾプレビルの毒性試験では、免疫毒性の懸念はみられなかったことから、追加の試験を不要とした。

化合物の作業時安全性に関するデータを得るため試験として、マウスの局所リンパ節試験（LLNA）を実施した。本試験においてグラゾプレビルには皮膚感作性はないと考えられた[資料4.2.3.7.2.1: TT# -7864][2.6.7.A.17 項]。

2.4.A.4.7.3 毒性発現の機序に関する試験

臨床試験（PN003試験）において高用量のグラゾプレビルをペグインターフェロン及びリバビリンと併用した患者の一部で、遅発性のトランスアミナーゼ上昇が認められたことから[資料5.3.5.1.2: 5172P003]、rasH2野生型マウス並びに rasH2野生型マウスの親系統である C57BL/6及びBALB/c マウスを用いて探索的試験を実施した。マウスは、トランスアミナーゼ上昇を示した唯一の非臨床動物種であり、rasH2野生型マウスは中でも最も顕著な増加を示した系統であった。これらの試験の目的は、rasH2野生型マウスの用量設定試験でみられたトランスアミナーゼ上昇を含む肝・胆道系の変化を更に検討し、臨床試験（PN003試験）でみられた遅発性トランスアミナーゼ上昇を評価する非臨床モデル候補を模索することであった。

これらの評価項目を検討するため、rasH2野生型マウスの12週間経口投与探索試験（回復期間12週間）を実施した[資料4.2.3.7.3.1: TT# -6034][2.6.7.A.18A 項]。投与期間は臨床試験（PN003試験）と同様とした。12週間の無処置回復期間を通して、投与期間中にみられた変化の回復性を評価した。投与量は200及び500 mg/kg/日とした。評価した血清生化学的パラメータはアルブミン、AST、ALT、ALP、グルタミン酸脱水素酵素（GLDH）及び総／直接ビリルビンのみとした。グラゾプレビル投与の約2、4、8及び12週後及び約12週の無処置回復期間後に予定した剖検を行った。肝臓、胆嚢、小腸・大腸及びパイエル板（腸切片に存在した場合）の病理組織学的検査を行った。

500 mg/kg/日群では、投与4日目にグラゾプレビルに関連した予定外の死亡、及び200 mg/kg/日以上の群での忍容性が不良であることを示す体重増加の減少（病理組織学的変化を伴う）がみられた。200 mg/kg/日以上群で認められたグラゾプレビルに関連した血清生化学的変化の性質及び程度は rasH2野生型マウスの1ヵ月間経口投与用量設定試験での変化と概して類似していた。これらの変化は最初の検査時（グラゾプレビル投与開始後約2週）から認められ、投与期間中にその程度は進行せず、回復期間開始後約8週で消失した。病理組織学的検査では、グラゾプレビルに関連した肝臓の変化（肝重量増加・肝臓肥大を伴う肝細胞サイズの用量依存的な増大及び肝細胞細胞質の淡明化）の性質及び程度は rasH2野生型マウスの最初の1ヵ月間経口投与用量設定試験のものと類似していた。肝臓の炎症又は壊死は認められなかった。肝臓の変化は12週間の無処置回復期間終了時に回復した。以上に加えて、200 mg/kg/日以上群でグラゾプレビルに関連した胆嚢の変化として、好中球性細胞浸潤が500 mg/kg/日群の雌雄（雌：ごく軽度～中等度、雄：ごく軽度～軽度）及び200 mg/kg/日群の雌数例（ごく軽度）でみられた。500 mg/kg/日群（雌雄少数例）でのみ、びらん（ごく軽度、多くは好中球性細胞浸潤に関連）もみられた。隣接した肝臓組織の限局性壊死を伴う胆嚢壁の限局性壊死（ごく軽度）が500 mg/kg/日群の雄1例でみられたが、これは限局性のびらん性変化が進行した可能性がある。胆嚢上皮の過形成（ごく軽度～軽度）が

500 mg/kg/日群（雌雄）で主に投与開始後約8週に認められた。これらの胆嚢の変化は12週間の無処置回復期間終了時までには回復した。

肝・胆道系の変化以外では、小腸（1ヵ月間用量設定試験において同定された標的器官）にも所見が認められた。絨毛の萎縮（500 mg/kg/日群）及び上皮の空胞化（200 mg/kg/日以上群）が認められたが、そのほとんどが十二指腸に局限していた。これらの上皮性の変化は、空腸でもときに認められたが、小腸（回腸）の他の部位又は大腸（盲腸、結腸）では認められなかったことから、グラゾプレビルの局所作用によるものと考えられた。これらの下流組織での細胞間薬物濃度は血流により同程度であると想定されるが、胆汁流入（胆汁中排泄はグラゾプレビルの主要排泄経路）部位から遠位であるために管腔内濃度は低く、グラゾプレビルの局所的な刺激性が裏付けられると考えられた。さらに、200 mg/kg/日群の雄でみられた上皮の空胞化（投与開始2週後ではみられず）を除いて、投与期間を通じて腸の変化がみられたが、その発現頻度及び程度に意味のある変動は認められず、12週間の無処置回復期間終了時までには回復した。さらに、500 mg/kg/日群では投与12週後に精巣重量の減少が認められたが、12週間の無処置回復期間終了時までには回復した。この試験の目的は同じマウス系統を用いた短期の先行試験でみられた肝・胆道系の変化のみを探索することであったため、投与12週後の rasH2野生型マウスでの雄性生殖器の組織形態学的検査は行わなかった。

結論として、本試験でみられた肝・胆道系及び胃腸系の変化は、rasH2野生型マウスの1ヵ月間経口投与用量設定試験[資料 4.2.3.2.1: TT#■■■-6034][2.6.7.A.7A 項]又は CD1マウスの3ヵ月間経口投与用量設定試験[資料4.2.3.2.2: TT#■■■-6038][2.6.7.A.7B 項]でみられた所見と一致していた。血清生化学的变化（AST、ALT、ALP 又はビリルビン増加）は試験早期にみられたが、投与期間中には進行せず、8週間以上の無処置回復期間時には完全に回復した。肝臓の病理組織学的変化は投与期間中には進行せず、完全に回復した。胆嚢の病理組織学的変化は投与期間中に程度がやや増大したが無処置回復期間終了時には完全に回復した。

肝・胆道系変化に対するマウス系統差を更に検討するため、C57BL/6及び BALB/c マウス (rasH2野生型の親系統) を用いた1ヵ月間探索的試験を実施した[資料4.2.3.7.3.2: TT#■■■-6039][2.6.7.A.18B 項]。検討した用量は200及び500 mg/kg/日とした。血清生化学的及び剖検及び病理組織学的評価の対象は肝・胆道系の変化のみに限定した。両系統において、グラゾプレビルに関連した計画外の死亡（500 mg/kg/日群、C57BL/6マウスでは投与4日目、BALB/c マウスでは投与9日目）及び体重増加の変化が認められた。200及び500 mg/kg/日群でみられたグラゾプレビルに関連した血清生化学変化は rasH2野生型マウスでの変化と概して類似した性質であったが、程度は rasH2野生型マウスよりも低かった。たとえば、両系統における ALT 上昇は最高でも2倍であり、AST 上昇は伴わなかった。それに対して、rasH2野生型マウスでは、ALT 上昇（最高4倍）と AST 上昇（最高2倍）が同時に認められた。グラゾプレビルに関連した剖検所見の性質は rasH2野生型マウスのものと概して類似していたが、程度は限局性の肝臓の壊死を除いて rasH2野生型マウスよりも低かった。限局性の肝臓の壊死は雌雄 BALB/c マウスの200 mg/kg/日以上群でみられ（200 mg/kg/日：ごく軽度～軽度、500 mg/kg/日群：～中等度）、関連した混合性細胞浸潤が雌でのみみられた。この所見の原因は不明であり、投与約24時間後の肝臓又は肝臓 - 胆嚢中のグラゾプレビル濃度は

BALB/c マウス (200 mg/kg/日群 : 116 μ M、500 mg/kg/日群 : 187 μ M) よりも rasH2野生型マウス (200 mg/kg/日群 : 169 μ M、500 mg/kg/日群 : 490 μ M) 及び C57BL/6マウス (200 mg/kg/日群 : 143 μ M、500 mg/kg/日群 : 291 μ M) の方が高いことから、肝臓又は肝臓 - 胆嚢中グラゾプレビル濃度の差異では説明できない。さらに、BALB/c マウスでは、いずれの用量においても AST 上昇はみられず、500 mg/kg/日群の雄でのみ ALT 上昇がみられたことから、200 mg/kg/日以上以上の群の雌雄 BALB/c マウスでみられた限局性の肝臓の壊死と AST 又は ALT 上昇との関連は認められなかった。

異なる系統のマウスを用いた上記の探索的試験の結果、rasH2野生型マウスがトランスアミナーゼ上昇に対して最も感受性の高い系統であった。しかし、このマウスモデルは、臨床試験 (PN003 試験) でみられた遅発性のトランスアミナーゼ上昇に対して必ずしも最適な非臨床モデルとはいえない。マウスでのトランスアミナーゼ上昇は投与初期からみられ、投与中の進行又は回復はみられなかった。それに対して、臨床試験 (PN003 試験) において高用量グラゾプレビルをペグインターフェロン及びリバビリンを併用時の患者でみられたトランスアミナーゼ上昇は、一般的に投与約8週後にみられ、概して投与継続中に回復した。

膜ベシクルを用いた *in vitro* アッセイにおいて、グラゾプレビルはヒト胆管膜トランスポーター (BSEP、MRP2、MRP3及びMRP4) を阻害した[2.4.A.3.6 項]。マウス、ラット及びイヌを用いた毒性発現の機序に関する試験では、グラゾプレビルによる胆管膜トランスポーター阻害により、肝臓又は血清中での胆汁酸の蓄積、若しくは肝臓又は回腸での胆汁酸輸送及び代謝に関連する遺伝子の転写の変化が生じ、その結果非臨床動物種でみられた肝・胆道系の変化が引き起こされるかどうかを調べた。血漿中及び肝臓中の胆汁酸濃度 (rasH2野生型マウス、C57BL/6マウス、BALB/c マウス、ラット及びイヌ)、及び肝臓又は回腸での胆汁酸輸送及び代謝に関連する遺伝子の転写の変化 (rasH2野生型マウス、C57BL/6マウス、BALB/c マウス) を調べた。さらに、rasH2野生型マウスにおける肝障害及び炎症バイオマーカー [血清 miRNA 種 (miR 122及び miR 192)、High Mobility Group Box-1 (HMGB1)、血清アミロイド A (SAA) 及びサイトカイン] についても調べた。

rasH2野生型マウスの500 mg/kg/日群では、グラゾプレビルに関連した、血清及び肝臓中のタウリン抱合型胆汁酸の増加 [血清中 : タウロコール酸 (TCA) が最高39倍 (雄) 及び9倍 (雌)、肝臓中 : TCA が2倍 (雄のみ)]、血清中の総遊離型胆汁酸の増加 (最高19倍) 並びに肝臓での胆汁酸の輸送及び代謝に関連した遺伝子発現の変化が認められた。200 mg/kg/日群では、グラゾプレビルに関連した、肝臓での胆汁酸の輸送及び代謝に関連した遺伝子発現の変化が認められた。これらの変化は投与期間を通じてみられ、用量依存的であったが、投与期間の長さに依存しなかった。500 mg/kg/日群でのみ、グラゾプレビルに関連した SAA 及びいくつかのサイトカイン (GRO/KC 及び IL-6) の散発的な増加もみられた。SAA 及び評価したサイトカインは、血清中の炎症バイオマーカーであり、肝臓特異的ではない。これらの増加は本試験の胆嚢又は小腸でみられた回復性の炎症と関連する可能性がある。12週間の無処置回復期間終了時には、評価したいずれのパラメータ (血清胆汁酸を除く) にグラゾプレビルに関連した変化は認められず、上記の変化は完全に回復性があることが示された。胆汁酸濃度は、高用量群の雌では対照群のレベルにまで回復したが、高用量群の雄では最高レベルから減少したものの、対照群のレベルは上回ったま

まであり、回復する傾向にとどまった。これは、雄での血清中胆汁酸の増加は投与期間中が最大であったことを考えると、妥当なものと考えられる。

C57BL/6及びBALB/cマウスの500 mg/kg/日群では、グラゾプレビルに関連した、複数の種類の血清タウリン抱合型胆汁酸（TCA等）の増加が認められた（C57BL/6マウス：雌5.5倍及び雄3.3倍、BALB/cマウス：雄3.0倍）。また、肝臓での胆汁酸の輸送及び代謝に関連した遺伝子発現の変化が両系統マウスの雌雄でみられた。200 mg/kg/日群では、グラゾプレビルに関連した、肝臓での胆汁酸の輸送及び代謝に関連した遺伝子発現の変化が両系統のマウスで認められた。

血清中胆汁酸濃度の測定は、ラット6ヵ月間経口投与毒性試験の対照群及び高用量群〔200 mg/kg b.i.d.（合計400 mg/kg/日）〕並びにイヌ9ヵ月間経口投与毒性試験の対照群及び高用量群（300/100 mg/kg/日）についてのみ行った。ラットの高用量群では、グラゾプレビルに関連した血清中胆汁酸（遊離型又は抱合型）の変化は認められなかった。イヌの300 mg/kg/日群では、グラゾプレビルに関連した総タウリン抱合型胆汁酸（TCAを含む）及び総遊離型胆汁酸の増加が認められた（それぞれ、最高12、13及び7倍）。高用量群の用量を100 mg/kg/日に減量した後も、グラゾプレビルに関連した総タウリン抱合型胆汁酸（TCAを含む）及び総遊離型胆汁酸の増加が認められたが、その程度は低かった（それぞれ、最高5、6及び5倍）。

以上の検討の結果、胆汁酸〔総タウリン抱合型（主に最も量の多いTCA）及び遊離型〕の増加がマウス（rasH2野生型、C57BL/6、BALB/c）及びイヌではみられたが、ラットではみられなかった。マウス及びイヌにおいて胆汁酸の変化がみられた用量での血漿又は肝臓中曝露量はおおむねラットの最大曝露量を上回っており、これがラットで変化が認められなかった理由と考えられる。さらに、試験を実施した全系統のマウスの肝臓では、胆汁酸の輸送及び代謝に関連した遺伝子発現の変化がみられた。このような変化を示す化合物の情報が十分に得られていないため確定的ではないが、マウス及びイヌにおいて、HCV感染患者でのグラゾプレビル曝露量を2桁以上も上回る（rasH2野生型マウス：約75倍、イヌ：約518倍）用量のグラゾプレビルではin vivoで胆汁酸トランスポーターに作用することが示唆された。

血清中胆汁酸の増加を示したイヌでは肝臓の炎症又は壊死はみられず、血清中胆汁酸の増加を示さなかったBALB/c雌マウスでは限局性の肝臓の壊死がみられたことから、非臨床動物種におけるグラゾプレビルによる血清中胆汁酸の変化と肝臓の変化の間に関連性はないと考えられた。

非臨床動物種において、グラゾプレビルによる血清中胆汁酸の変化と胆管の所見（胆嚢又は胆管の組織形態学的変化及び血清中総／直接ビリルビンの顕著な増加）の関連性を示す証拠は限られている。ただし、血清中胆汁酸の変化を示した動物種（マウス及びイヌ）では、胆嚢又は胆管の組織形態学的変化及び血清中総／直接ビリルビンの顕著な増加がみられたことから、関連する可能性は排除できない。しかし、マウス及びイヌでみられた胆管の変化は、rasH2野生型マウス、CD1マウス及びイヌの反復投与試験でのNOAELでの高い安全域（rasH2野生型マウス：約37倍、CD1マウス：約185倍、イヌ：約83倍）を考慮すると、ヒトへの外挿性はないものと考えられた。

2.4.A.4.7.4 依存性

アルビノ及び有色ラットに¹⁴Cグラゾプレビル50 mg/kgを単回経口投与した際のQWBAの結果

果、グラゾプレビルは脳血液関門を容易に通過しないことが示された[2.4.A.3.3.1 項]。さらに、エルバスビルの薬理作用及び副次的薬理作用からは薬物乱用の可能性は認められず[2.4.A.2.2 項]、標準的な反復投与毒性試験においても向精神作用（鎮静又は刺激作用）は認められなかった[2.4.A.4.2 項]。したがって、動物での依存性試験は実施しなかった。

2.4.A.4.7.5 代謝物

ヒト血漿中に代謝物は検出されなかった[2.4.A.3.4.1 項]。したがって、グラゾプレビルは ICH M3 (R2)ガイドランスでの代謝物の安全性評価に関する要件を満たすことから、個々の代謝物についての試験は実施しなかった。さらに、ヒト糞中でのみ検出された少量の代謝物 M11a/b（投与量の約8%）及び M14（投与量の約4%）を除いて、ヒト排泄物中のグラゾプレビル代謝物はすべて、ラット、ウサギ又はイヌにおいても生成された。なお、代謝物 M11a 及び M11b はいずれも M4a 及び M4b の腸内由来生成物と考えられており、代謝物 M14は、ラット胆汁・糞中及びウサギ糞中に存在する代謝物 M5の水酸化物であると考えられている[2.6.4.A.5.1.4 項]。

2.4.A.4.7.6 不純物

個々の不純物についての非臨床試験は実施しなかった。すべての不純物は、非臨床毒性試験において評価したバッチに含まれていたことにより安全性が評価されたか[表2.4.A- 1]、原薬の不純物に関する ICH Q3A (R2)ガイドラインにて規定された安全性確認の必要な閾値を超えないものであった。さらに、ICH M7ガイドラインに従って、不純物の潜在的変異原性について評価した。変異原性不純物及び管理の詳細については[3.2.S.3.2 項（グラゾプレビル）]を参照のこと。

表 2.4.A-1 安全性の確認が必要なグラゾプレビルの不純物及びそのヒト摂取量に対するラット摂取量比

不純物	規格上限 (%)	不純物濃度 (%) ^a	ラットでの不純物の総1日摂取量 (mg/kg) ^b	ヒトでの不純物の総1日摂取量 (mg/kg) ^c	体重あたりの用量 (mg/kg) の倍数 ^d	ラットでの不純物の総1日摂取量 (mg/m ²) ^e	ヒトでの不純物の総1日摂取量 (mg/m ²) ^f	体表面積あたりの摂取量 (mg/m ²) の比 ^g
不純物A*	■	■	■	■	240	■	■	39
不純物B*	■	■	■	■	93	■	■	15

a ラットの1ヵ月間毒性試験 (GLP 準拠) (TT# ■-1120) [2.6.6.A.3.6 項] で用いられた非臨床試験用ロット番号 ■ に基づく。本ロットは遺伝毒性試験 (GLP 準拠) にも用いられた [2.6.6.A.4 項]。
 b ラットの総1日摂取量はラットの1ヵ月間毒性試験 (GLP 準拠) での NOAEL である 400 mg/kg/日 (200 mg/kg b.i.d. として投与) に基づき算出した (TT# ■-1120) [2.6.6.A.3.6 項]。
 c 患者の体重を 60 kg と仮定し、グラゾプレビルの用量を 100 mg として算出した。
 d 用量倍数はヒトの総1日摂取量 (mg/kg) に対するラットの総1日摂取量 (mg/kg) の比として算出した。
 e ラットでの mg/kg から mg/m² への換算係数 6 に基づく。すなわち、mg/kg × 6 = ラットでの用量 (mg/m²)。
 f 成人での mg/kg から mg/m² への換算係数 37 に基づく。すなわち、mg/kg × 37 = 成人での用量 (mg/m²)。
 g 用量倍数はヒトの総1日摂取量 (mg/m²) に対するラットの総1日摂取量 (mg/m²) の比として算出した。

* 新薬承認情報提供時に置き換え

2.4.A.4.7.7 その他の試験

2.4.A.4.7.7.1 光毒性試験

グラゾプレビルは波長領域290～700 nm で光吸収を示し[3.2.S.3.1 項 (グラゾプレビル)]、モル吸光係数は1000 L/mol/cm を上回ったため、雄性有色ラットを用いた光毒性試験を実施した[資料4.2.3.7.7.1: TT#■■■-9002][2.6.7.A.17 項]。グラゾプレビル [50 mg/kg/日、200 mg/kg b.i.d. (1日総投与量400 mg/kg/日)] による雄有色ラットの眼及び皮膚に対する光毒性は認められず、グラゾプレビルには光毒性の懸念がないことが示された。さらに、非有色及び有色ラットに¹⁴C] グラゾプレビル50 mg/kg を単回経口投与した場合の定量的全身オートラジオグラフィ (QWBA) の結果、グラゾプレビルの日光の照射を受ける組織 (皮膚及び眼) への分布は低く、組織／血漿曝露比も低く、これらの組織での滞留時間は短かった[2.4.A.3.3.1 項]。

2.4.A.4.7.7.2 併用投与試験

グラゾプレビル及びエルバスビルをそれぞれ単独投与したときの非臨床安全性試験の結果、毒性の重複あるいはグラゾプレビル／エルバスビル併用投与に関する懸念を生じる要因は特に認められなかった (B 項、エルバスビル参照)。したがって、ICH M3 (R2) ガイダンスの質疑応答集 (R2)、配合剤のための毒性試験・質問9に従い、非臨床グラゾプレビル／エルバスビル併用投与毒性試験の実施は不要と判断された。しかしながら、グラゾプレビル／エルバスビルの臨床プログラム開始時には、HCV 治療における DAA 製剤の併用投与を担保するための非臨床安全性試験の実施が要求される規制状況となることを考慮し、グラゾプレビル／エルバスビルを5/0、0/25及び5/25 mg/kg/日の用量で投与するイヌの1ヵ月間経口併用投与毒性試験を実施した[資料4.2.3.7.7.2: TT#■■■-6051][2.6.7.A.18C 項]。本試験でみられた投与に関連した変化は、グラゾプレビル／エルバスビル5/25及び0/25 mg/kg/日群でのリンパ節並びに小腸 (パイエル板) 及び／又は大腸の消化管関連リンパ系組織におけるリンパ系組織の空胞化 (形態学的にリン脂質症に一致) のみであり、これはエルバスビル投与によるものであった。エルバスビルとグラゾプレビルを併用投与した場合に、毒性学的に意味のある差異は認められなかった。また、エルバスビル及びグラゾプレビルの平均全身曝露量及び平均 C_{max} は各用量で同程度であったことから、各化合物のトキシコキネティクス・プロファイルにおける相互作用も認められなかった。本試験でみられたリン脂質症の毒性学的意義は低く、グラゾプレビル／エルバスビル併用投与の NOAEL は5/25 mg/kg/日 (HCV 感染患者に併用投与したときの全身曝露量の約14/3倍に相当する) であった。

グラゾプレビルとリバビリン及びソホスブビル併用投与の非臨床及び臨床経験からは、HCV 感染患者でのグラゾプレビルとリバビリン又はソホスブビル併用投与に関する懸念は特に認められていない[資料4.3: 6]、[資料4.3: 7]、[資料4.3: 8]。したがって、ICH M3 (R2) ガイダンスの質疑応答集 (R2)、配合剤のための毒性試験・質問9に従い、グラゾプレビルとリバビリン又はソホスブビル併用投与の非臨床毒性試験は実施しなかった。

2.4.A.4.7.7.3 その他

HCV 感染チンパンジーを用いた薬力学試験のための用量選択試験として、8日間経口投与忍容

性試験を実施し、アカゲザル雌雄各1匹にグラゾプレビル10 mg/kg/日を投与した[資料4.2.3.7.7.3: TT#■■-1059][2.6.7.A.17 項]。グラゾプレビル投与に関連した所見は認められなかった。10 mg/kg/日での $AUC_{0-24\text{ hr}}$ は0.61 $\mu\text{M}\cdot\text{hr}$ (雌) 及び0.70 $\mu\text{M}\cdot\text{hr}$ (雄) であった。

ヒト全血を用いた *in vitro* 試験において、グラゾプレビルの静脈内投与用製剤による赤血球の溶血は認められなかった[資料4.2.3.7.7.4: TT#■■-7867][2.6.7.A.17 項]。

2.4.B セクション B : エルバスビル

2.4.B.2 薬理試験

エルバスビルは HCV NS5A 蛋白質の強力かつ特異的な阻害薬であり、慢性 HCV 感染の経口治療薬として開発された。エルバスビルの非臨床薬力学試験の一覧を薬理試験概括表[2.6.3.B.1項]に示す。

エルバスビルは、HCV 複製に必須の蛋白質である HCV NS5A に対する強力な低分子阻害薬である。NS5A は既知の酵素機能をもたないため、確立したレプリコン細胞を用いたアッセイによりリード化合物の最適化を行った。次いで、NS5A の標的分子としての妥当性を、活性低下を基にした逆遺伝学的手法を用い、耐性選択により検証した。サブゲノムレプリコン細胞株パネルを用いて、HCV GT 1~6 (genotype 特異的な RAV を有するものを含む) 由来の NS5A 配列に対するエルバスビルの活性を評価した。既知の耐性変異に対する活性測定に加えて、de novo 耐性の用量依存的な抑制活性 (レプリコンに対する EC₉₀値の倍数) を調べた。エルバスビルとリバビリン及び他の DAA (グラゾプレビルを含む) との併用について検討し、HCV 複製阻害及び耐性出現抑制における相互作用を評価した。他の NS5A 阻害薬において臨床的作用の実証 (proof-of-activity) はすでに示されていることから、HCV 感染の非臨床モデルを用いたエルバスビルの薬理活性の検討は行わなかった。

エルバスビルの特異性を確認するため、副次的薬理試験を実施した。100種類を超える酵素、輸送体、受容体及び生物活性蛋白質からなるパネルに対するエルバスビルの in vitro での性質を調べた。それに加えて、CES1、CES2及び Cat A を介したプロドラッグの代謝に対するエルバスビルの阻害能を評価した。細胞を用いたモデル系により、エルバスビルの HIV 及び HBV 阻害能を評価した。

エルバスビルの心血管系及び呼吸系に対する作用並びに神経行動学的作用を検討するため、安全性薬理試験 (in vitro 及び in vivo) は ICH S7A 及び S7B ガイドラインに準拠して実施した。

2.4.B.2.1 効力を裏付ける試験

2.4.B.2.1.1 In Vitro での効力を裏付ける試験

すべての genotype 由来の NS5A 配列を含むサブゲノムレプリコン細胞株のパネルを用いて、エルバスビルの活性を評価した。エルバスビルは、HCV GT1a (EC₅₀値: 4 pM)、GT1b (EC₅₀値: 3 pM)、GT2a (31L) (EC₅₀値: 3 pM)、GT3a (EC₅₀値: 140 pM)、GT4a (EC₅₀値: 3 pM)、GT5a (EC₅₀値: 1 pM) 及び GT6d (EC₅₀値: 3 pM) に対して高い活性を示し、EC₅₀値は pM 濃度の範囲 (3~14 pM) である[資料4.2.1.1.9: MK-8742 PD002][資料4.2.1.1.13: MK-5172A PD016][2.6.3.B.1項] [2.6.3.A.1項]。GT2b レプリコンに対する活性はそれよりも低く、EC₅₀値は3.4 nM である。この活性低下は主に GT2 NS5A 配列内の L31M アミノ酸変異による。エルバスビルの活性は40%正常ヒト血清存在下では1/10に低下した。すべての genotype に対するエルバスビルの活性データの要約を[表2.6.2: B.1] [2.6.2.B.2.1.1.1項]に示す。

Genotype 特異的な NS5A 参照配列に加えて、GT 1~6由来の患者分離株から作製したレプリコ

ンに対するエルバスビルの活性を調べた。エルバスビルは GT1a 及び GT1b 患者分離株に対して活性を示し、それらの活性変化はほとんどみられず、EC₅₀値は3～10 pM の範囲であった[資料4.2.1.1.9: MK-8742 PD002][2.6.3.B.1項]。GT2患者分離株に対するエルバスビルの活性はより大きく変動し、EC₅₀値は0.003～20 nM の範囲であったが、これは主に GT2b 患者分離株内の31M によるものである（ただし、コンテキスト配列による可能性もある）[表2.6.2.B-3][資料4.2.1.1.11: MK-8742 PD009][2.6.3.B.1項]。エルバスビルは GT3a 患者分離株に対して活性を示し[資料4.2.1.1.9: MK-8742 PD002][2.6.3.B.1項]、EC₅₀値は3～0.4 nM の範囲であったが、28位、30位及び31位に RAV を有する DT3i 及び GT3g サブタイプに対する活性はそれよりも低かった。エルバスビルは様々な GT4サブタイプに対する活性を保持し、EC₅₀値はほとんどの分離株に対して pM レベルより低かった。エルバスビルは GT5a 患者分離株に対しても活性を示し、EC₅₀値は0.4～1 pM の範囲であった。エルバスビルは様々な GT6患者サブタイプに対して pM レベルより低い濃度から nM レベルの活性を保持していた[資料4.2.1.1.10: MK-8742 PD003][2.6.3.B.1項]。最も感受性の低いサブタイプである GT6n 患者分離株では28位、30位及び93位でのアミノ酸変異がみられ、EC₅₀値は2.7 nM であった。したがって、エルバスビルの活性低下には、特定の患者分離株の複数のアミノ酸変異による特徴的な RAV が必要であることから、耐性に対する遺伝的障壁が高いことが示された[資料4.2.1.1.9: MK-8742 PD002][資料4.2.1.1.10: MK-8742 PD003][2.6.3.B.1項]。

GT1a の非臨床又は臨床試験でみられた既知の変異をコードする HCV genotype 由来のレプリコンを用いて、エルバスビルの活性を評価した。エルバスビルは多数の RAV（特に GT1a、GT1b 及び GT4a 由来）に対して活性を示した。エルバスビルの活性はレジパスビル及びオムビタスビルよりも高く、GT1a 由来の RAV よりも GT1b 由来の RAV に対して高い活性を示した。GT1b では、他の NS5A 阻害薬により誘発された特徴的なすべての RAV でみられたエルバスビルの活性低下はわずかであり（1/20未満）、EC₅₀値は50 pM 以下であった。それに対して、GT1a では、最も大きな活性低下がみられた変異により、エルバスビルの活性が2～3 log 減少した。以上のデータは、GT1b に対するベースライン RAV の影響は GT1a よりも小さいことを示唆している。エルバスビルは、特に GT1a、GT1b、GT2a 及び GT3a での Y93H 変異に対して活性低下を示したが、既存の NS5A 阻害薬（レジパスビル及びオムビタスビル）よりも活性低下の程度は小さかった。GT1a に対するエルバスビルの活性を低下させたその他の RAV は、L31M/V 及び Q30D/E/H/K/R であった。GT2a、GT5a 及び GT6a では、F/L28S/F 及び L31F での置換により活性低下が認められた[資料4.2.1.1.9: MK-8742 PD002][2.6.3.B.1項]。GT2b では天然型の耐性多型31M によりエルバスビルへの耐性が生じた。安定発現レプリコンでのアッセイに加えて、より迅速に処理出来る一過性導入ウイルスアッセイを用いて、GT1a における既知の耐性について評価した[資料4.2.1.1.8: MK-5172A PD010][2.6.3.B.1項][2.6.3.A.1項]。RAV の検討に用いた両細胞モデル系において、同様の結果が得られた。

エルバスビルの細胞毒性は低く、Huh7レプリコン細胞、HeLa、HepG2、HEK293T、Hep3B 及び MT4細胞において、CC₅₀値は25 µM を上回った[資料4.2.1.2.3: MK-5172A PD011][2.6.3.B.1項]、[2.6.3.A.1項]。

他のクラスの HCV DAA 阻害薬由来の RAV に対する交差耐性の可能性を検討するために、これ

らの阻害薬由来の特徴的な RAV を有するレプリコンに対するエルバスビルの活性を調べた。その結果、これらの RAV においてもエルバスビルは活性を保持しており、NS3プロテアーゼ阻害薬又はNS5Bポリメラーゼのヌクレオシド及び非ヌクレオシド阻害薬により選択されたRAVに対する活性低下もみられず、交差耐性が生じる可能性はないことが示された[資料4.2.1.1.9: MK-8742 PD002][2.6.3.B.1項]。

GT1～6に対する de novo 耐性コロニー選択試験を行った。エルバスビルの濃度は、genotype の種類に応じて EC₉₀値の最大10,000倍までとした。概して、耐性コロニー数はエルバスビルの濃度増加に伴い減少した。耐性コロニーから分離された RNA の配列解析より、変異は主に28位、30位、31位及び93位で生じていた。GT1a では、主に Q30及び Y93での変異が活性低下に関与していた。GT2a、GT2b 及び GT3a ではそれぞれ F28S、Y93H 及び Y93H でのアミノ酸変異の結果、著しい (>1000倍) 活性低下が生じた。GT1b 及び GT4a での耐性に対するエルバスビルの遺伝的障壁は高く、耐性獲得には概して2箇所のヌクレオチド変異が必要であった。耐性獲得に関与する主な変異は GT5a では L28F 及び L31F、GT6では F28S 及び L31F のアミノ酸変異であった。エルバスビルの活性を解析した結果、これらの genotype の主要部位での変異により最大の活性低下 (>1/1000倍) がみられた[資料4.2.1.1.9: MK-8742 PD002][資料4.2.1.1.10: MK-8742 PD003][2.6.3.B.1項]。

GT1a レプリコン細胞におけるエルバスビルと HCV プロテアーゼ阻害薬グラゾプレビル、リバビリン及びNS5Bポリメラーゼヌクレオシド阻害薬 MK-2248との併用時の抗ウイルス活性を評価し、MacSynergy™ 及びサイクル閾値 (Ct) 数の直接解析 (RNA 量に変換せず) により定量化した [資料4.2.1.1.7: MK-5172A PD008][資料4.2.1.1.12: MK-2248A PD001] [2.6.3.B.1項] [2.6.3.A.1項]。HCV RNA 複製阻害では、エルバスビルはリバビリンとの相加作用～相乗作用、グラゾプレビルとの相加作用及び MK-2248との相乗作用を示し、いずれも拮抗作用は認められなかった。検討したいずれの併用濃度においても細胞毒性は認められなかった。

GT1a レプリコン細胞での耐性出現に対するエルバスビル及びグラゾプレビル併用時の活性を調べた。耐性コロニー出現を抑制するためには、個々の薬物として、EC₉₀値のそれぞれ100倍及び1000倍の濃度のグラゾプレビル及びエルバスビルが必要であった。併用した場合は、各化合物の EC₉₀値の10倍の濃度で耐性コロニーの出現が抑制され、この併用による作用は少なくとも相加的であることが示唆された[資料4.2.1.1.7: MK-5172A PD008][2.6.3.B.1項] [2.6.3.A.1項]。両薬剤の併用投与時の EC₉₀値を超える濃度で選択された耐性コロニーのクローン配列を解析した結果、連鎖した変異 (両薬剤の標的分子での2箇所以上の変異) がみられたことより、併用により耐性発現に対する遺伝的障壁が高くなることが示された。

2.4.B.2.1.2 In Vivo での効力を裏付ける試験

HCV 感染に対する HCV NS5A 阻害薬の臨床的概念実証 (proof-of-concept) が確立しているため、実施しなかった。

2.4.B.2.2 副次的薬理試験

2.4.B.2.2.1 In Vitro での副次的薬理試験

社において、エルバスビルの非標的分子に対する作用を検索した。116種類の酵素的又は放射リガンド結合アッセイの結果、エルバスビルによる著しい活性は認められなかった[資料4.2.1.2.2: MK-8742 PD001][2.6.3.B.1項]。酵素アッセイでは、IC₅₀値が10 μM 未満の標的分子が3つ同定された[資料4.2.1.2.2: MK-8742 PD001][2.6.3.B.1項]。IC₅₀値が1 μM 未満であった標的はラットの非選択的セリン／スレオニンキナーゼ PKC (0.877 μM) のみであり、HCV GT1 レプリコン (レプリコン EC₉₀値) との特異係数 (選択性の差) は>100,000倍離れていた。

エルバスビルはプロドラッグの代謝に関与する CES1、CES2及び Cat A に対する活性を示さなかった[資料4.2.1.2.4: MK-5172A PD012][2.6.3.B.1項] [2.6.3.A.1項]。

HIV 及び HBV に対するエルバスビルの活性を検討するために、MT4細胞を用いた HIV 多重感染アッセイ及び HepG2.2.15細胞を用いた HBV 複製アッセイを行った。エルバスビルは、8.4 μM の濃度では HIV に対する活性を示さず[資料4.2.1.2.3: MK-5172A PD011][2.6.3.B.1項] [2.6.3.A.1項]、10 μM の濃度では HBV に対する活性を示さなかった[資料4.2.1.2.5: MK-5172A PD014] [2.6.3.B.1項] [2.6.3.A.1項]。したがって、GT1a レプリコンに対する活性 (EC₉₀値6 pM) と比較した特異度は1×10⁶を上回る。HCV 患者の多くで HIV 重複感染がみられ、エルバスビルが HIV 治療薬と併用される可能性がある。既存の10種の HIV 治療薬 (テノホビル、エムトリシタビン、ダルナビル、アタザナビル、ラルテグラビル、ドルテグラビル、エファビレンツ、リルピビル、エンフビルチド、マラビロク) との併用による HIV 複製阻害活性を検討した試験において、エルバスビルの臨床濃度 (30~500 nM) による他の HIV 治療薬に対する影響は認められなかった。逆に、GT1a レプリコン細胞において、臨床濃度の HIV 治療薬はエルバスビルの阻害能に影響を及ぼさなかった[資料4.2.1.2.6: MK-5172A PD015][2.6.3.B.1項] [2.6.3.A.1項]。

2.4.B.2.2.2 In Vivo での副次的薬理試験

実施せず。

2.4.B.2.3 安全性薬理試験

エルバスビルの心血管系、呼吸系及び神経行動学的作用を検討するために、ICH S7A 及び S7B ガイドラインに準拠した in vitro 及び in vivo 安全性薬理試験を実施した。

エルバスビルの安全性薬理試験の一覧を安全性薬理試験概括表 ([2.6.2.B.4項]の[表2.6.2.B-31]) に示す。

標準的な電位固定 (voltage clamp) 法を用いたアッセイにおいて、試験可能な最大濃度 (10 μM) のエルバスビルは、異種発現させた hERG チャネルの IK_r を5.2%しか阻害しなかった[資料4.2.1.3.12: TT#-4703][2.6.3.B.4項]。PatchXpress 法を用いて、探索的にエルバスビルの IK_s 及び INav1.5に対する作用についても評価した[資料4.2.1.3.7: TT#-3196][2.6.3.B.4項]。試験可能な最大濃度 (30 μM) では IK_s に対する作用は認められず、INav1.5の阻害の程度 (17%) はわずかであった。これらのアッセイは蛋白質非存在下で行われており、ヒトでのエルバスビルの蛋白結合率は

99%を上回ることを考慮すると、 IK_r IC_{50} 値は HCV 感染患者（50 mg）での非結合 C_{max} 値の5,500倍を上回る。

心血管系試験において、覚醒下のイヌにエルバスビル0.5、2及び50 mg/kg を経口投与したところ[資料4.2.1.3.11: TT#■■■-5474][2.6.3.B.4項]、最高用量においても心血管系の変化は認められなかった。したがって、心血管系の変化に関する無作用量は50 mg/kg 以上である。テレメトリー動物では薬物動態検討用の検体を採取しなかったが、イヌの14日間経口投与毒性試験[資料4.2.3.2.17: TT#■■■-6013] [2.6.7.B.7E 項]で25 mg/kg を単回投与したときの C_{max} 値は0.59 μ M であり、これは日本人 HCV 感染患者（50 mg）での C_{max} 値の約3.3倍に相当する。

覚醒下のイヌに0.5、2及び50 mg/kg を単回経口投与し、エルバスビルの呼吸機能及び体温に対する作用を検討した[資料4.2.1.3.13: TT#■■■-5606][2.6.3.B.4項]。呼吸機能及び体温においてエルバスビルに関連した変化は認められなかった。

エルバスビルの神経行動学的作用を検討するために、14日間経口投与毒性試験の投与第1日に機能観察総合評価（FOB）を実施した。検討した用量は100、300 mg/kg 及び1000 mg/kg b.i.d.（合計2000 mg/kg/日）であった。エルバスビルに関連した神経行動学的変化は認められなかった。1000 mg/kg b.i.d. の1日投与後の薬物動態検討用検体は採取しなかったが[資料4.2.3.2.5: TT#■■■-1102][2.6.3.A.4項]、雄ラットの探索的7日間忍容性試験[資料4.2.3.2.12: TT#■■■-2901][2.6.7.B.6 項]での750 mg/kg の7日間連日投与後の C_{max} 値は1.14 μ M であり、日本人 HCV 感染患者（50 mg）での C_{max} 値の約6.4倍に相当した。

追加の探索的スクリーニングアッセイでは、ラット及びイヌでの血清生化学的プロファイルを検討し、ラットの主要臓器又は組織（肝臓、腎臓、骨格筋及び心臓）での種々の生理学的又は病理学的機能に関連したパスウェイの変化を示す遺伝子発現の変化を評価した。その結果、これらの試験において懸念となる作用は認められなかった。

以上、十分に特徴付けられた安全性薬理実験モデルにおいて、心血管系、中枢神経系及び呼吸機能に対するエルバスビルに関連した作用は認められなかった[2.6.3.B.4項]。エルバスビル及びグラゾプレビル単独投与時の安全性薬理プロファイル（グラゾプレビルの安全性薬理プロファイルの詳細については[2.6.3.A.4項]参照）に基づき、心血管系、呼吸又は中枢神経系に対する相乗的又は相加的变化はないと考えられる。

2.4.B.2.4 薬力学的薬物相互作用

エルバスビルの薬力学的薬物相互作用をみた *in vivo* 試験は実施していない。

2.4.B.3 薬物動態試験

エルバスビルの薬物動態試験一覧表を[2.6.5.B.1 項]に示す。

2.4.B.3.1 分析法及びバリデーション報告書

非臨床薬物動態試験は、GLP 下では実施しなかった。非臨床薬物動態試験（非 GLP）の分析法を[2.6.4.B.2 項]に示す。

トキシコキネティクス試験では、GLP 下でバリデートされた LC/MS/MS 法により、血漿中及び肝臓中のエルバスビルの濃度を測定した[2.6.4.B.2 項]。

2.4.B.3.2 吸収

Wistar Han ラット、Dutch Belted ウサギ、ビーグル犬及びカニクイザルを用いて、エルバスビルの薬物動態について検討した。ラット、イヌ及びサルでのエルバスビルの血漿クリアランスは中程度（それぞれ24、8.4及び5.2 mL/min/kg）であり、分布容積はそれぞれ5.0、3.0及び2.7 L/kg、半減期はそれぞれ4.2、7.7及び16時間であった[2.6.5.B.3 項]。

エルバスビルの F は、ラットでは低く（3%～9%）、イヌでは中程度（約35%）であった[2.6.5.B.3 項]。静脈内及び経口投与時の薬物動態、並びに胆管カニューレ処置した動物での排泄データを総合的に判断した結果、これらの動物種での吸収率は約10%～40%と推定された[2.6.4.B.3.1 項] [2.6.4.B.3.3 項]。T_{max} はやや長く、3～5時間であった[2.6.5.B.3 項]。ラット及びイヌともに、経口投与時の曝露量は投与量の増加に伴い用量比を下回る増加を示した。これは、おそらく溶解度が低いことにより吸収が制限されたためと考えられる[2.6.5.B.3 項] [2.6.6.B.3.8 項] [表2.6.6.B-15]。

2.4.B.3.3 分布

2.4.B.3.3.1 組織分布（ラット）

白色ラット（Wistar Han）及び有色ラット（Long Evans）に¹⁴Cエルバスビルを30 mg/kg 単回経口投与した際の組織分布を定量的全身オートラジオグラフィにより評価した[2.6.5.B.4 項]。エルバスビルはほとんどの組織（肝臓等）に広く分布したが、P-gp の基質であるため、脳への分布はわずかであった[2.6.5.B.4 項] [2.6.5.B.19 項]。白色ラットでは投与後7日までに脾臓、腎皮質、肝臓及びハーダー腺を除くすべての組織で、有色ラットでは投与後28日までに眼球ブドウ膜を除くすべての組織で、総放射能は定量下限を下回った[2.6.5.B.4 項] [2.6.5.B.5 項]。早い測定時点では、眼球ブドウ膜の総放射能濃度は低く、有色ラットと白色ラットで同程度であったが、有色ラットでは、その後の時間経過に伴い眼球ブドウ膜からの放射能の消失が緩徐となった[2.6.5.B.4 項] [2.6.5.B.5 項]。有色ラットの眼球ブドウ膜において放射能の滞留がみられたことから、エルバスビルがメラニンに結合する可能性がある。薬物のメラニンへの結合は光毒性を生じる場合があるが、非臨床試験にてエルバスビルの光毒性の可能性を検討した結果、光毒性の懸念は認められなかった[2.6.6.B.8.7.1.1 項]。

2.4.B.3.3.2 胎盤通過（ラット及びウサギ）

妊娠ラット及び妊娠ウサギに、妊娠6又は7日目から妊娠20日目にかけてエルバスビル1000 mg/kg/日を経口投与し、妊娠20日目の胎盤通過について評価した。エルバスビルはラット及びウサギの胎盤を通過し、胎児血漿中濃度は母動物血漿中濃度の0.6%～2%であった[2.6.5.B.11 項]。

2.4.B.3.3.3 In Vitro 血漿蛋白結合及び血液／血漿中濃度比

エルバスビルの血漿蛋白結合率は高かった。マウス、ラット、イヌ、サル及びヒトにおける非結合型分率は0.001未満であり、濃度非依存的であった[2.6.5.B.7 項]。ウサギ血漿中の非結合型分率はやや高く、0.012であった[2.6.5.B.7 項]。エルバスビルはヒト血清アルブミン及び α_1 -酸性糖蛋白に結合し、このため、血漿中の非結合型分率は低かった[2.6.5.B.8 項]。In vitro では、腎機能障害者及び肝機能障害者でエルバスビルの血漿蛋白結合率に変化は認められなかった[2.6.5.B.9 項]。

エルバスビルの血球中への選択的移行性は認められず、血液／血漿中濃度比は、ラット、イヌ、サル及びヒトでそれぞれ0.6、0.9、0.6及び0.6であった[2.6.5.B.10 項]。したがって、これらの動物種では、エルバスビルの血液クリアランスは血漿クリアランスよりやや高かった。

2.4.B.3.4 代謝

2.4.B.3.4.1 In vivo 代謝（ラット、ウサギ、イヌ及びヒト）

胆管カニューレ処置した雄性 Wister Han ラットに ^{14}C エルバスビルを5 mg/kg 静脈内投与した際、エルバスビルは主に未変化体として胆汁（投与量の20.1%）、尿（投与量の16.2%）及び糞中（投与量の20.2%）に排泄され、総回収率は投与量の56.5%であった[2.6.5.B.12 項]。酸化代謝物（m2及び m3）も投与量の15.4%が胆汁中に排泄された[2.6.5.B.12 項]。代謝物 m2及び m3は、エルバスビルの単純な水酸化によって生成される[図 2.4.B-1]。胆管カニューレ処置したイヌに ^{14}C エルバスビル1 mg/kg を静脈内投与した際、投与量のうち微量（約4%）が酸化代謝物 m2及び m3として胆汁及び糞中に排泄された[2.6.5.B.12 項]。エルバスビルを経口投与したラット及びイヌの血漿中プロファイルから、これらの動物種では循環血中にエルバスビルのみが存在することが示唆された[2.6.5.B.12 項]。

無処置の Dutch Belted ウサギに ^{14}C エルバスビル100 mg/kg を経口投与した際、投与量の大部分が糞中（70%）に排泄され、エルバスビル関連物質の尿中排泄率（投与量の1%）はわずかであった[2.6.5.B.14 項]。ウサギ糞中の放射能は未変化体のみであった[2.6.5.B.12 項]。いくつかのマイナーな酸化代謝物（m1a、m1b、m2、m2a、m2b、m2c、m3及び m4）は、質量分析法でのみ検出された[2.6.5.B.12 項]。ウサギ血漿においても、放射能は未変化体のみであり、微量の酸化代謝物 m2b 及び m4が質量分析法により検出された[2.6.5.B.12 項]。

非臨床試験動物種におけるエルバスビルの代謝は、ヒトでの代謝と同様であった。これら動物種の糞尿中から検出された酸化代謝物 m2及び m3は、ヒト排泄物（糞）においても検出され、ヒトではその他の代謝物は検出されなかった[2.6.5.B.12 項]。ヒト血漿中から検出された薬物由来物

質は未変化体のみであった [2.6.5.B.12 項]。

ヒトにおいて *in vivo* で生成される代謝物 (m2及び m3) はラット、ウサギ及びイヌにおいても生成されることから、これら動物種を毒性試験で使用することは妥当であるとする[2.6.5.B.12 項]。

2.4.B.3.4.2 In vitro 代謝 (マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒト)

マウス、ラット、イヌ及びヒトの肝ミクロソーム及び肝細胞でのエルバスビルの代謝率は低かった。ヒトでみられた代謝物は動物の肝調製物でもみられた。ラット、ウサギ、イヌ及びヒトの肝調製物では、2種類の一酸化代謝物 m2及び m3が同定された[2.6.5.B.13 項]。ラット、イヌ及びヒトの肝細胞では、ごく微量の二酸化代謝物 m1も検出された[2.6.5.B.13 項]。マウス肝細胞では m2が検出された[2.6.5.B.13 項]。

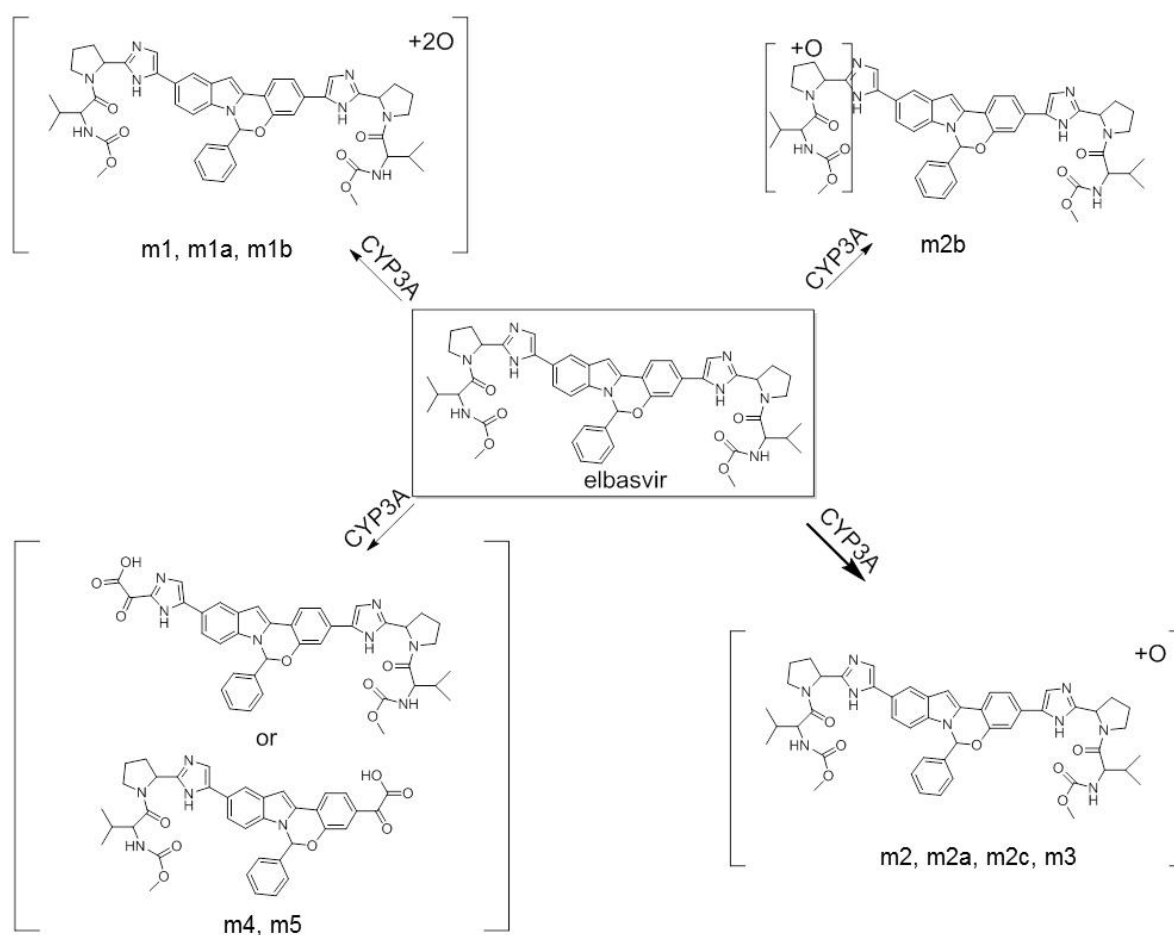


図 2.4.B-1 マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒトにおける
[³H]又は[¹⁴C]エルバスビルの推定代謝経路

[2.6.5.B.12 項]、[2.6.5.B.13 項]

2.4.B.3.5 排泄

胆管カニューレ処置した Wister Han ラット、無処置の Dutch Belted ウサギ、胆管カニューレ処置したビーグル犬及びヒトにおけるエルバスビルの消失を検討した。検討したすべての動物種及びヒトにおいて、エルバスビルは未変化体として主に胆汁排泄により消失した[2.6.5.B.12 項][2.6.5.B.14 項]。経口投与後の尿中への排泄は、すべての動物種でごくわずか（2%未満）であった[2.6.5.B.14 項]。

ラットに¹⁴C]エルバスビルを5 mg/kg 静脈内投与した際、放射能は胆汁（投与量の41.0%）、糞（投与量の30.0%）、尿（投与量の16.9%）中に排泄され、ケージ洗浄液（投与量の1.0%）を含む総回収率は89.0%であった[2.6.5.B.14 項]。ラットに³H]エルバスビルを30 mg/kg 経口投与した際、放射能は糞（投与量の61.0%）、胆汁（投与量の7.8%）、尿（投与量の0.8%）中に排泄され、ケージ洗浄液（投与量の0.1%）を含む総回収率は69.8%であった[2.6.5.B.14 項]。胆管カニューレ処置したラットで静脈内投与量の30%が糞中に排泄されたことから、ラットでは、エルバスビルは腸管から分泌されると考えられた[2.6.5.B.14 項]。イヌでの排泄はラットと類似しており、¹⁴C]エルバスビルを1 mg/kg 静脈内投与した際、放射能は胆汁（投与量の37.8%）、糞（投与量の27.9%）、尿（投与量の3.3%）中に排泄され、ケージ洗浄液（投与量の0.5%）を含む総回収率は69.4%であった[2.6.5.B.14 項]。糞及び胆汁中に排泄された放射能の大部分は未変化体であったことから、エルバスビルの主要消失経路は腸内分泌及び胆汁中排泄であることが示唆された[2.6.5.B.12 項]。イヌでは、酸化的代謝の消失への寄与はわずかであった[2.6.5.B.12 項]。無処置のウサギに¹⁴C]エルバスビルを100 mg/kg 経口投与した際、放射能はほぼ糞中（投与量の70%）に排泄され、尿及びケージ洗浄液（投与量の1%）からの回収はわずかであった[2.6.5.B.14 項]。健康男性被験者に¹⁴C]エルバスビルを50～51 mg 経口投与した際、エルバスビルはほぼ完全に糞中（投与量の94%）に排泄され、尿中排泄率（投与量の0.2%）はごくわずかであった[2.6.5.B.14 項]。

エルバスビルは、授乳ラットの乳汁中に排泄された。妊娠6日目～授乳14日目にエルバスビル1000 mg/kg/日を経口投与した際、投与2時間後の母体の血漿／乳汁中濃度比は 4.15 ± 0.264 であった[2.6.5.B.15 項]。

2.4.B.3.6 薬物動態的薬物間相互作用

In vitro 試験の結果から、エルバスビルは CYP3A 及び P-gp の阻害及び誘導により影響を受ける可能性がある。ヒト肝ミクロソーム又は遺伝子組換え CYP 分子種、及び特異的な阻害薬を用いた試験において、エルバスビルの酸化的代謝は主に CYP3A が寄与することが示された[2.6.5.B.16 項]。特定のトランスポーターを発現した細胞を用いたアッセイでは、エルバスビルは P-gp の基質であった[2.6.5.B.19 項]。In vitro では、エルバスビルは OATP1B1 又は OATP1B3 の基質ではないと考えられた[2.6.5.B.19 項]。宿主細胞株 (MDCKII 細胞) での受動的膜透過性 ($0.7 \sim 4.7 \times 10^{-6}$ cm/s) は低く、エルバスビルが BCRP の基質であるかどうかは判断できなかった[2.6.5.B.19 項]。

In vitro 試験の結果から、エルバスビルは薬物間相互作用を生じる可能性は低いと考えられた。ヒト肝ミクロソームにおいて、エルバスビルは主要な CYP 分子種 (CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6 又は 3A4) を阻害しなかった[2.6.5.B.20 項]。また、エルバスビルは CYP3A の時間依

存的阻害薬ではなかった[2.6.5.B.20 項]。In vitro において、エルバスビルは臨床での C_{max} (0.177 μM) より2桁高い濃度で UGT1A1を弱く阻害した ($IC_{50} = 70.9 \pm 12.7 \mu\text{M}$) [2.6.5.B.22 項] [2.7.2.3.2.1 項]。したがって、エルバスビルは臨床的に意味のある UGT1A1阻害薬とは考えられない。ヒト肝細胞とインキュベートした際、エルバスビルは CYP3A4、CYP1A2又は CYP2B6を誘導しなかった [2.6.5.B.24 項]。In vitro において、エルバスビルは P-gp、OATP1B1、OATP1B3及び BCRP を阻害する可能性を示したが、OAT1、OAT3又は OCT2を阻害しなかった[2.6.5.B.23 項]。

薬物間相互作用を評価する臨床試験成績から、エルバスビルは CYP3A 及び P-gp の基質であり、P-gp 及び BCRP を軽度に阻害するが、OATP1B1又は OATP1B3は阻害しないことが確認された [2.7.2.3.4.1 項]。

2.4.B.3.7 その他の薬物動態試験

その他の薬物動態試験は実施しなかった。

2.4.B.4 毒性試験

ラット及びイヌの反復投与毒性試験（それぞれ最大6及び9ヵ月間）並びに rasH2野生型マウスの1ヵ月間用量設定試験を実施し、エルバスビルの毒性プロファイルを評価した。生殖発生毒性の評価にはラット及びウサギを用いた。遺伝毒性試験として、細菌及び哺乳類細胞を用いた *in vitro* アッセイ並びにラットを用いた *in vivo* 小核試験を行った。がん原性試験については、エルバスビルのヒトでの投与期間は6ヵ月間未満であり、慢性あるいは再発性の病態の治療において間欠的な方法で頻繁に用いられるものではなく、一連の遺伝毒性試験において遺伝毒性は認められず、慢性毒性試験において増殖性の徴候は認められなかったことから、ICH S1A ガイダンスに従い、試験は実施しなかった。イヌの反復投与毒性試験においてリンパ系組織で認められたエルバスビルに関連したリン脂質症の回復性を評価するために、イヌの3ヵ月間の休薬期間を設けた1ヵ月間経口投与毒性試験を実施した。イヌの1ヵ月間経口併用投与毒性試験ではエルバスビルとグラゾプレビル併用投与時の非臨床安全性を評価した。非臨床試験において、標的器官は異なるものの、イヌはグラゾプレビル又はエルバスビルの投与時に病理組織学的変化が確認された動物種であった。

エルバスビルの非臨床毒性試験の一覧を毒性試験概括表（[2.6.6.1 項]の[表2.6.6-1]）に示す。

エルバスビルの異なる非臨床試験用経口調製物（ポリソルベート80又はビタミン E TPGS 含有調製物、HPMCAS-LF 又は HPMCP を含有する非晶質分散体調製物）を検討した結果、ポリソルベート80調製物を用いた場合の曝露量が最も高かった。したがって、毒性試験では、エルバスビルの5又は10% (w/w) ポリソルベート80/脱イオン水調製物を選択した。反復投与毒性試験での最高用量（1000 mg/kg/日）はおおむね ICH M3 (R2) ガイダンスに基づく限界量であった。ラット及びイヌでのエルバスビル投与（最大1000 mg/kg/日）の忍容性は概して良好であった。エルバスビルに関連した組織形態学的変化は、イヌのリンパ系組織における可逆的かつ有害でないリン脂質症（ごく軽度～軽度）のみであった。

2.4.B.4.1 単回投与毒性試験

独立した単回投与毒性試験は実施していない。ただし、ICH M3 (R2) ガイダンスに従い、反復経口投与毒性試験[最大投与量はマウス:1000 mg/kg、ラット:1000 mg/kg b.i.d.(1日投与量2000 mg/kg/日)、イヌ:1000 mg/kg]においてエルバスビルの急性毒性を評価した。これらの動物種において、死亡及び急性毒性を示す所見は認められなかった[2.4.B.4.2 項]。したがって、概略の致死量は、雌雄マウス及びイヌでは1000 mg/kg 超、雌雄ラットでは1000 mg/kg b.i.d. (1日投与量2000 mg/kg/日) 超であった。

2.4.B.4.2 反復投与毒性試験

2.4.B.4.2.1 マウス

rasH2野生型マウスを用いた1ヵ月間経口投与用量設定試験を実施し、実施する可能性のあった短期のがん原性試験で用いる用量を検討した。検討した用量は10、50、300及び1000 mg/kg/日であった[資料4.2.3.2.11: TT#■■■■-6047][2.6.7.B.6 項]。最高用量（1000 mg/kg/日）までの用量でエルバ

スビルに関連した変化は認められず、NOELは1000 mg/kg/日以上であった。この用量で得られた血漿中全身曝露量 ($AUC_{0-24\text{ hr}} = 151 \mu\text{M}\cdot\text{hr}$) はHCV感染患者にエルバスビル (50 mg) を投与したときの全身曝露量の約54倍に相当する。

2.4.B.4.2.2 ラット

ラットにおいて、7日間[資料4.2.3.2.12: TT#■■■■-2901][2.6.7.B.6 項]、14日間[資料4.2.3.2.13: TT#■■■■-6014][2.6.7.B.7A 項]、3ヵ月間[資料4.2.3.2.15: TT#■■■■-6024][2.6.7.B.7C 項]及び6ヵ月間[資料4.2.3.2.16: TT#■■■■-6033][2.6.7.B.7D 項]の経口投与毒性試験を実施し、エルバスビルの毒性を評価した。

雄ラットを用いた7日間試験では、最高用量 (750 mg/kg/日、 $AUC_{0-24\text{ hr}} = 15.9 \mu\text{M}\cdot\text{hr}$) までの用量でエルバスビルに関連した変化は認められなかった。

14日間経口投与毒性試験で最高用量は1000 mg/kg b.i.d. (合計2000 mg/kg/日) とし、3及び6ヵ月間経口投与毒性試験での最高用量は1000 mg/kg/日とした。1000 mg/kg b.i.d.群と1000 mg/kg/日群の間で、曝露量の顕著な差は認められなかった。1000 mg/kg b.i.d.群で糞便の白色化がみられ、未吸収のエルバスビルの糞中排泄が示唆されたことから、エルバスビルの経口バイオアベイラビリティには上限があると考えられた。糞便の白色化 (1000 mg/kg b.i.d.群) 以外の被験物質に関連した変化は、好中球及びコレステロールの増加 (ごく軽度～軽度、1000 mg/kg b.i.d.群)、主に摂餌量の減少を伴う体重増加の減少 (軽度、300 mg/kg/日以上)、流涎及び尿比重減少を伴う尿量増加 (30 mg/kg/日以上) であった。これらの変化はごく軽度～軽度であり、すべての試験において一貫して被験物質との関連があるとは判断されず、動物の一般状態に影響を及ぼさず、剖検時の組織形態学的所見を伴わなかった。したがって、これらの変化の毒性学的意義は低く、ラットでのNOAELは1000 mg/kg/日以上であった。この用量での血漿中全身曝露量 ($AUC_{0-24\text{ hr}} = 21.9 \mu\text{M}\cdot\text{hr}$) はHCV感染患者にエルバスビル (50 mg) を投与したときの全身曝露量の約8倍に相当する。

2.4.B.4.2.3 イヌ

イヌにおいて14日間[資料4.2.3.2.17: TT#■■■■-6013][2.6.7.B.7E 項]、3ヵ月間[資料4.2.3.2.18: TT#■■■■-6025][2.6.7.B.7F 項]及び9ヵ月間[資料4.2.3.2.19: TT#■■■■-6030][2.6.7.B.7G 項]の経口投与毒性試験を実施し、エルバスビルの毒性を評価した。

これらの試験でみられた被験物質に関連した生前の変化は、糞便の色調の変化(白色／薄茶色、未吸収の被験物質の糞中排泄によると考えられた)、嘔吐 (散発性)、摂餌量の減少 (散発的) に伴う体重減少 (一過性) (1000 mg/kg/日) のみであった。イヌの3ヵ月間休薬期間を設けた1ヵ月間毒性試験[資料4.2.3.7.7.6: TT#■■■■-1031][2.6.7.B.17A 項]において、これらの生前の変化は一般的には動物の健康状態に影響を及ぼさず、組織形態学的所見との関連は認められず、投与終了後速やかに回復した。したがって、毒性学的意義は低いと考えられた。

剖検時のエルバスビルに関連した変化は、胃、小腸 (パイエル板) 及び大腸の消化管関連リンパ系組織、リンパ節及び胆嚢の孤立リンパ小節 (25及び1000 mg/kg/日) 並びに脾臓 (1000 mg/kg/日のみ) 内の空胞化であった。この変化は、巨大泡沫細胞 (リンパ系組織の濾胞域中のマクロフ

アージと形態学的に一致)の存在を特徴とした。この空胞性変化は透過電子顕微鏡検査によりマクロファージ中のミエリン形態の出現が認められ、ライソソームでのリン脂質の蓄積(リン脂質症)と一致した。リンパ系組織に空胞化に関連するその他の変化がみられていないこと、特にリンパ様細胞の減少又は炎症/壊死、血液学的変化(白血球・リンパ球数減少、循環血中の異常血液細胞)は認められなかった。この変化の程度はごく軽度～軽度であり、1ヵ月試験と9ヵ月間試験の間で頻度及び程度の差は認められなかった。さらに、この変化はイヌの1ヵ月間毒性試験の3ヵ月間休薬期間後に回復した[資料4.2.3.7.7.6: TT#■■■■-1031][2.6.7.B.17A 項]。

イヌの毒性試験においてリンパ系組織でみられたリン脂質症については、程度が軽度であり、リンパ系組織での毒性(リンパ様細胞の減少、炎症又は壊死)又は血液学的検査異常(白血球・リンパ球数減少、循環血中の異常血液細胞)が認められないことから、有害ではなく、毒性学的意義は低いと考えられた。また、短期試験でみられた組織での変化の程度は、より長期間の投与でも進行せず、長期曝露に伴う毒性学的影響は認められず(リン脂質症の所見以外の機能的又は組織病理学的変化は認めず)、回復性が認められた。したがって、イヌでのNOAELは1000 mg/kg/日以上であった。この用量での血漿中全身曝露量($AUC_{0-24\text{hr}} = 16.6 \mu\text{M}\cdot\text{hr}$)はHCV感染患者にエルバスビル(50 mg)と投与したときの全身曝露量の約6倍に相当する。

2.4.B.4.3 遺伝毒性試験

2.4.B.4.3.1 In Vitro 試験

エルバスビルは細菌変異原性試験において遺伝毒性を示さず[資料4.2.3.3.1.3: TT#■■■■-8239][2.6.7.B.8A 項]、チャイニーズハムスター卵巣細胞を用いた染色体異常試験[資料4.2.3.3.1.4: TT#■■■■-8536][2.6.7.B.8B 項]及びチャイニーズハムスター卵巣細胞を用いた探索的小核試験[資料4.2.3.3.1.5: TT#■■■■-8688][2.6.7.B.8 項]において陰性であった。これらの試験で用いた最高濃度は限界濃度又は溶解度により制限される濃度であった。

2.4.B.4.3.2 In Vivo 試験

エルバスビルは、ラットのin vivo小核試験試験において、1000 mg/kg b.i.d.(合計2000 mg/kg/日)[資料4.2.3.3.2.3: TT#■■■■-8730][2.6.7.B.9 項]及び[資料4.2.3.2.13: TT#■■■■-6014][2.6.7.B.9A 項]までの用量で陰性であった。最高用量は限界量の1日2回投与(1000 mg/kg b.i.d.)であった。

2.4.B.4.4 がん原性試験

ヒトでのエルバスビルの投与期間は6ヵ月間未満であり、慢性あるいは再発性の病態の治療において間欠的な方法で頻繁に用いられるものではなく、標準的な組み合わせの遺伝毒性試験でいずれの遺伝毒性も認められず、慢性毒性試験で増殖性の徴候も認められなかった。これらのことから、患者の寿命の相当な期間にわたって規則的に投薬されることが予想されるものではなく、ICH S1A ガイダンスに基づき、がん原性試験は実施しなかった。

2.4.B.4.5 生殖発生毒性試験

2.4.B.4.5.1 受胎能及び早期胚発生に関する試験

性的に成熟した雌雄ラットにエルバスビル50、300及び1000 mg/kg/日を投与し、受胎能に対するエルバスビルの作用を検討した[資料4.2.3.5.1.2: TT#■■■■-7290][2.6.7.B.12A 項]。雌の受胎能パラメータにおいて被験物質に関連した変化は認められなかった。1000 mg/kg/日群の雄では、ごく軽度の精子数(精巣上部尾部1gあたり)の減少(対照群と比較して14%減少)が認められた。しかし、生殖成績、受胎能、胚/胎児生存率、精巣重量平均値及び精子の運動性などのいずれの生殖パラメータにも投与に関連した影響はみられず、ラット及びイヌの反復投与毒性試験[2.4.B.4.2 項]において病理組織学的な精巣変化もみられなかったことから、この精子数の減少の毒性学的意義は低いと考えられた。雌雄の受胎能パラメータに関する NOAEL は1000 mg/kg/日以上であった。この用量での血漿中全身曝露量 [AUC_{0-24 hr} = 17.3 µM・hr (ラット3カ月間毒性試験)] は HCV 感染患者にエルバスビル (50 mg) を投与したときの全身曝露量の約6倍に相当する。一般毒性パラメータの変化 (300 mg/kg/日以上群の雌雄での体重増加又は摂餌量の一過性の減少のみ) は、その程度が低く、一過性であったことから、毒性学的意義は低いと考えられた。したがって、一般毒性パラメータの NOAEL は1000 mg/kg/日以上であった。

2.4.B.4.5.2 胚・胎児発生に関する試験

ラット[資料4.2.3.5.2.14: TT#■■■■-7175][2.6.7.B.11 項] [資料4.2.3.5.2.15: TT#■■■■-7170][2.6.7.B.13A 項] 及びウサギ [資料4.2.3.5.2.16: TT#■■■■-7185][2.6.7.B.11 項] [資料4.2.3.5.2.17: TT#■■■■-7180][2.6.7.B.13B 項]を用いて、エルバスビルの限界量 (1000 mg/kg/日) まで投与し胚・胎児発生毒性を評価した。いずれの動物種においても被験物質に関連した発生毒性は認められず、両動物種での発生毒性に関する NOEL は1000 mg/kg/日以上であった。1000 mg/kg/日群のラットでのみ母体変化 (平均体重増加量の軽度の減少) が認められたが、その程度は低いことから、毒性学的意義は低いと考えられた。両動物種での母体毒性に関する NOAEL は1000 mg/kg/日以上であった。1000 mg/kg/日での血漿中全身曝露量 [AUC_{0-24 hr} = 21.8 µM・hr (ラット) 及び39.4 µM・hr (ウサギ)] は HCV 感染患者にエルバスビル (50 mg) を投与したときの全身曝露量のそれぞれ約8倍及び約14倍に相当する。

2.4.B.4.5.3 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

F₀世代の雌ラットにエルバスビル50、300又は1000 mg/kg/日を経口投与し、F₁世代の発生、発育、行動、生殖成績及び受胎能に対する作用を評価した[資料4.2.3.5.3.2: TT#■■■■-7020][2.6.7.B.14 項]。F₀世代では、エルバスビルに関連した母体変化は、1000 mg/kg/日群での母体の平均体重増加及び摂餌量の一過性の減少のみであった。これらの変化は一過性であることから、毒性学的意義は低いと考えられ、F₀世代の母体毒性に関する NOAEL は1000 mg/kg/日以上であった。F₁世代では、発生、発育、行動、生殖成績又は受胎能に対するエルバスビルに関連した作用は認められず、NOAEL は1000 mg/kg/日以上であった。この用量での血漿中全身曝露量 [AUC_{0-24 hr} = 21.8 µM・hr (ラットの経口投与による胚・胎児発生毒性試験及びトキシコキネティクス試験)] は HCV 感染

患者にエルバスビル（50 mg）を投与したときの全身曝露量の約8倍に相当する。

2.4.B.4.5.4 出生児（幼若動物）での試験

本申請では小児へのエルバスビルの投与は意図していない。しかし、エルバスビルの非臨床試験（概して試験開始時に性成熟前の幼若動物を用いた試験）及び臨床試験からは、年齢に関連した安全性に大きな懸念は認められなかった。さらに、エルバスビルはラットの乳汁中に移行するため、ラットの出生後発生毒性試験において、授乳中の幼若ラットはエルバスビルに間接的に曝露した。したがって、一連の非臨床試験は小児の適応での臨床開発を裏付ける上で適切と考えられる。

2.4.B.4.6 局所忍容性試験

作業時安全性のための試験として、局所刺激性試験（ウシ角膜を用いる混濁度及び透過性試験並びに MatTek EpiDerm™ MTT Viability 試験）を実施した。

ウシ角膜を用いる混濁度及び透過性試験の結果、エルバスビルは無刺激性と分類された[資料4.2.3.6.3: TT# [REDACTED]-7807][2.6.7.B.16 項]。

MatTek EpiDerm™ MTT Viability 試験において、エルバスビルは皮膚無刺激性と分類された[資料4.2.3.6.4: TT# [REDACTED]-7806][2.6.7.B.16 項]。

2.4.B.4.7 その他の毒性試験

2.4.B.4.7.1 抗原性試験

標準的な反復投与毒性試験において、エルバスビルの抗原性を示唆する所見又は変化は認められなかったため、抗原性の評価は行わなかった。

2.4.B.4.7.2 免疫原性試験

ICH S8ガイドライン「医薬品の免疫毒性試験に関するガイドライン」の2.1.1項に概説されている免疫毒性を示唆する所見、すなわち、顕著な血液学的変化（白血球又はリンパ球の変化）、脾臓、胸腺、リンパ節又は骨髄の臓器重量又は組織像の変化、血清免疫グロブリン濃度の変化を示唆する血清グロブリン濃度の変化、感染発生率の増加、腫瘍発生率の増加はいずれもみられなかった。イヌでは空胞化が、リンパ節、胃／小腸（パイエル板）／大腸のリンパ系組織、及び胆嚢／脾臓の孤立リンパ小節において認められ、これは超微細構造的にライソソームのリン脂質蓄積（リン脂質症）に一致していた（ラット又はマウスではみられず）。このようなリン脂質症に関連した変化に伴い、リンパ様細胞の減少はみられなかった。2.2項の「重要性に基づいた評価」のとおり、一つの要因でもそれが重要な所見である場合、また、二つ以上の要因が認められた場合には、追加の免疫毒性試験が必要である。ラット及びイヌを用いたエルバスビルの毒性試験では、免疫毒性の懸念はみられなかったことから、追加の試験を不要とした。

化合物の作業時安全性に関するデータを得るための試験として、マウスの局所リンパ節試験

(LLNA) を実施した。本試験において、エルバスビルは皮膚感作性を示さなかった[資料 4.2.3.7.2.2: TT# [REDACTED]-7805][2.6.7.B.17 項]。

2.4.B.4.7.3 毒性発現の機序に関する試験

本化合物では毒性発現の機序に関する試験は実施しなかった。

2.4.B.4.7.4 依存性

アルビノ及び有色ラットに¹⁴C エルバスビルを経口投与した際の QWBA の結果、エルバスビルの脳内での蓄積は認められなかった[2.4.B.3.3.1 項]。さらに、エルバスビルの薬理作用及び副次的薬理作用からは薬物乱用の可能性は認められず[2.4.B.2.2.1 項]、標準的な反復投与毒性試験においても向精神作用（鎮静又は刺激作用）は認められなかった[2.4.B.4.2 項]。したがって、動物での依存性試験は実施しなかった。

2.4.B.4.7.5 代謝物

ヒト血漿中に代謝物は検出されなかった[2.4.B.3.4.1 項]。したがって、エルバスビルは ICH M3 (R2) ガイダンスでの代謝物の安全性評価に関する要件を満たすことから、個々の代謝物についての試験は実施しなかった。さらに、ヒトでのエルバスビルのすべての代謝物（肝ミクロソームで *in vitro* で同定、又は排泄物中に検出）は、ラット又はイヌでも生成されていた[2.4.B.3.4 項]。

2.4.B.4.7.6 不純物

個々の不純物についての非臨床試験は実施しなかった。すべての不純物は、非臨床毒性試験において評価したバッチに含まれていたことにより安全性が評価されたか[表2.4.B- 1]、原薬の不純物に関する ICH Q3A (R2) ガイドラインにて規定された安全性確認の必要な閾値を超えないものであった。さらに、ICH M7 ガイドラインに従って、不純物の潜在的変異原性について評価した。変異原性不純物及び管理の詳細については[3.2.S.3.2 項（エルバスビル）]を参照のこと。

表 2.4.B-1 安全性の確認が必要なエルバスビルの不純物及びそのヒト摂取量に対するラット摂取量比

不純物	規格上限 (%)	不純物レベル (%) ^a	ラットでの不純物の総1日摂取量 (mg/kg) ^b	ヒトでの不純物の総1日摂取量 (mg/kg) ^c	体重あたりの用量 (mg/kg) の倍数 ^d	ラットでの不純物の総1日摂取量 (mg/m ²) ^e	ヒトでの不純物の総1日摂取量 (mg/m ²) ^f	体表面積あたりの摂取量 (mg/m ²) の比 ^g
不純物C*	■	■	■	■	467	■	■	76
不純物D*	■	■	■	■	300	■	■	49
不純物E*	■	■	■	■	1450	■	■	235

a 不純物C* 及び 不純物D* については、ラットの6ヵ月間毒性試験 (GLP 準拠) (TT# ■-6033) [2.6.6.B.3.6 項]で約4ヵ月間用いられた非臨床試験用ロット番号 ■ に基づく。不純物E* については、ラットの6ヵ月間毒性試験 (GLP 準拠) (TT# ■-6033) [2.6.6.B.3.6 項]で約2ヵ月間用いられた非臨床試験用ロット番号 ■ に基づく。遺伝毒性試験 (GLP 準拠) では、不純物C* (■%)、不純物D* (■%) 及び 不純物E* (■%) を含むロット番号 ■ が用いられた。

b ラットの総1日摂取量はラットの6ヵ月間毒性試験 (GLP 準拠) での NOAEL である1000 mg/kg に基づき算出した (TT# ■-6033) [2.6.6.B.3.6 項]。

c 患者の体重を60 kg と仮定し、エルバスビルの用量を50 mg として算出した。

d 用量倍数はヒトの総1日摂取量 (mg/kg) に対するラットの総1日摂取量 (mg/kg) の比として算出した。

e ラットでの mg/kg から mg/m² への換算係数6に基づく。すなわち、mg/kg×6=ラットでの用量 (mg/m²)。

f 成人での mg/kg から mg/m² への換算係数37に基づく。すなわち、mg/kg×37=成人での用量 (mg/m²)。

g 用量倍数はヒトの総1日摂取量 (mg/m²) に対するラットの総1日摂取量 (mg/m²) の比として算出した。

* 新薬承認情報提供時に置き換え

2.4.B.4.7.7 その他

2.4.B.4.7.7.1 光毒性試験

エルバスビルは波長領域290～700 nm で光吸収を示し[3.2.S.3.1 項 (エルバスビル)]、モル吸光係数は1000 L/mol/cm を上回った。さらに、アルビノ及び有色ラットに¹⁴C エルバスビル 30 mg/kg を経口投与し QWBA 測定した試験で、ぶどう膜の放射能の消失はアルビノラットよりも有色ラットの方が遅くエルバスビルがメラニンに結合する可能性が示唆された[2.4.B.3.3.1 項]。そのため、雄性有色ラットを用いた光毒性試験を実施した[資料4.2.3.7.7.5: TT#■■-9042][2.6.7.B.17 項]。エルバスビル (100及び1000 mg/kg/日) による雄性有色ラットの眼及び皮膚に対する光毒性は認められず、エルバスビルには光毒性の懸念がないことが示された。

2.4.B.4.7.7.2 回復性試験

イヌの反復投与試験でみられたリン脂質症の回復性を評価するために、1000 mg/kg/日の用量でのイヌの1ヵ月間経口投与毒性試験 (及び3ヵ月間休薬期間) を実施した[資料4.2.3.7.7.6: TT#■■-1031][2.6.7.B.17A 項]。

投与期間中にみられたエルバスビルに関連した生前及び病理検査の変化は、糞便の白色化、嘔吐、体重減少 (まれに皮膚緊張の低下及び痩せた外観を伴う) 及びリンパ系組織でのリン脂質症であり、これらは3ヵ月間休薬期間中に回復し、回復性があることが示された。

2.4.B.4.7.7.3 併用投与毒性試験

エルバスビル及びグラゾプレビルをそれぞれ単独投与したときの非臨床安全性試験の結果、毒性の重複あるいはエルバスビル／グラゾプレビル併用投与に関する懸念を生じる要因は特に認められなかった (セクション A: グラゾプレビル参照)。したがって、ICH M3 (R2) ガイダンスの質疑応答集 (R2)、配合剤のための毒性試験・質問9に従い、非臨床エルバスビル／グラゾプレビル併用投与毒性試験の実施は不要と判断された。

しかし、エルバスビル／グラゾプレビルの臨床プログラム開始時には、HCV 治療における DAA 製剤の併用投与を担保するための非臨床安全性試験の実施が要求される規制状況となることも考慮し、エルバスビル／グラゾプレビルを25/0、0/5及び25/5 mg/kg/日の用量で投与するイヌの1ヵ月間経口併用投与毒性試験を実施した[資料4.2.3.7.7.2: TT#■■-6051][2.6.7.B.17B 項]。

本試験でみられた投与に関連した変化は、エルバスビル／グラゾプレビル25/5及び25/0 mg/kg/日群でのリンパ節並びに小腸 (パイエル板) 及び／又は大腸の消化管関連リンパ系組織におけるリンパ系組織の空胞化 (形態学的にリン脂質症に一致) のみであり、これはエルバスビル投与によるものであった。エルバスビルとグラゾプレビルを併用投与した場合に、毒性学的に意味のある差異を示す証拠は認められなかった。また、エルバスビル及びグラゾプレビルの平均全身曝露量及び平均 C_{max} は各用量で同程度であることから、各化合物のトキシコキネティクス・プロファイルにおける相互作用は認められなかった。本試験でみられたリン脂質症の毒性学的意義は低く、エルバスビル／グラゾプレビル併用投与の NOAEL は25/5 mg/kg/日 (HCV 感染患者に併用投与し

たときの全身曝露量の約3/14倍)であった。

エルバスビルとリバビリン及びソホスブビル併用投与の非臨床及び臨床経験からは、HCV 感染患者でのエルバスビルとリバビリン又はソホスブビル併用投与に関する懸念は特に認められていない[資料4.3: 6]、[資料4.3: 7]、[資料4.3: 8]。したがって、ICH M3 (R2)ガイダンスの質疑応答集 (R2)、配合剤のための毒性試験・質問9に従い、エルバスビルとリバビリン又はソホスブビル併用投与の非臨床毒性試験は実施しなかった。

2.4.B.4.7.7.4 その他

ヒト全血を用いた *in vitro* 試験において、エルバスビルの静脈内投与用調製物による赤血球の溶血は認められなかった[資料4.2.3.7.7.7: TT#■■■■-7800][2.6.7.B.17 項]。

2.4.5 統合された考察及び結論

グラゾプレビルは HCV の NS3/4A に可逆的に結合する大環状ペプチド構造の阻害薬であり、エルバスビルは HCV の NS5A に対する低分子阻害薬である。HCV genotype (GT) 1、3及び4の慢性感染患者向けに開発されたグラゾプレビル／エルバスビルは併用投与により高い有効性及び良好な忍容性を有し、使用が簡便（1日1回投与）であり、ペグインターフェロンを使用しない短期投与レジメンが可能である。HCV GT1感染患者に対してはグラゾプレビル及びエルバスビルの12週間の投与レジメンが提案されている。グラゾプレビル／エルバスビルの臨床推奨用量は 100 mg/50 mg である。母集団薬物動態解析による日本人 HCV 感染患者（MK-5172-058試験）の定常状態におけるグラゾプレビル及びエルバスビルの血漿中曝露量の個別推定値に基づく AUC_{0-24hr} の幾何平均値はそれぞれ4.438及び2.775 $\mu\text{M}\cdot\text{hr}$ であり、 C_{max} 値はそれぞれ0.617及び0.177 μM であった[2.7.2.3.1.1 項]、[2.7.2.3.2.1 項]。

グラゾプレビルは強力な HCV NS3/4A プロテアーゼ阻害薬であり、HCV GT 1～6に対する広範囲な活性を有する。グラゾプレビルは、第一世代のプロテアーゼ阻害剤により選択されたほとんどの耐性変異に対する活性を保持し、活性低下は主に A156及び D168置換に限られている。

慢性 HCV 感染チンパンジーにおいて、グラゾプレビル経口投与の活性に関する *in vivo* での概念実証（proof-of-concept）が示された。グラゾプレビル1 mg/kg b.i.d.の7日間投与により、GT1b 及び GT1a 感染チンパンジーの血漿中 HCV RNA 量はそれぞれ4及び3 log 減少した。グラゾプレビルは、GT1a_R155K 変異ウイルスに均一に感染させたチンパンジーにおいて有効であり、ウイルス負荷を約2 log 減少させた。グラゾプレビルは HCV NS3/4A セリンプロテアーゼに対して極めて選択的であり、トリプシン及びキモトリプシン等のヒトセリンプロテアーゼに対する選択性係数は1,000,000を上回った。グラゾプレビルは100を超える受容体、イオンチャネル及び他の蛋白質標的のパネルに対する阻害作用を示さず、非標的活性をもたない。グラゾプレビルは細胞モデル複製系において10 μM の濃度で HIV 及び HBV に対する阻害活性を示さず、HCV に対する高い特異性を保持する。選択性及び特異性が高いことから、グラゾプレビルは呼吸、心血管系及び神経行動学的作用をもたない。

エルバスビルはレプリコンアッセイにおいて HCV がコードする NS5A 蛋白質を強力に阻害する。サブゲノムレプリコン細胞株のパネルにおいて、エルバスビルは HCV GT 1～6の NS5A 配列に対して強力な活性を示した。参照配列以外にも、エルバスビルは HCV GT 1～6由来の臨床分離株（前世代の既承認 NS5A 阻害薬が活性をもたないサブタイプを含む）に対する高い活性を保持した。エルバスビルはレプリコンアッセイにおいて耐性細胞の出現を効率的に抑制した。グラゾプレビルとの併用投与では、耐性出現に対する相加作用及び選択圧の亢進が認められた。エルバスビルの活性は他のクラスの HCV DAA からの特徴的な RAV に影響されず、これらの薬剤が無効の患者にとっての治療選択肢となり得る。エルバスビルは HCV NS5A に対する高選択的阻害薬であり、非標的活性はごくわずかであり、選択性係数は野生型 GT1レプリコンに対する活性の100,000倍を上回る。HIV 及び HBV を用いた細胞モデル系においてエルバスビルの特異性が示された。エルバスビルはヒトでの相同分子種をもたないことから、その特異性はさらに高い。エルバスビルはその高い特異性により安全性薬理試験（後述）において心血管系、呼吸系及び神経行

動学的作用を示さない。

十分に最適化された安全性薬理試験において、グラゾプレビル及びエルバスビルの単独投与による心血管系（hERG 電流等）、呼吸系及び神経機能に対する作用を評価した。これらのアッセイにおいて、グラゾプレビル及びエルバスビルともに懸念となる薬理作用は認められなかった。

非臨床安全性評価に用いた動物種（ラット及びイヌ）を用いて、グラゾプレビルの薬物動態を評価した。ラット及びイヌでのグラゾプレビルのクリアランスは中程度であり、血漿半減期は短く、分布容積は中程度であった。ラット及びイヌにグラゾプレビルを経口投与した際の曝露量は、投与量の増加に伴い用量比例性を上回る非線形のパターンを示した。ラット及びイヌでの F は低かったが（12%～13%）、HCV 治療の標的臓器である肝臓でのグラゾプレビルの曝露は良好であった。これには少なくとも部分的に肝臓での能動的な取り込みが関与していると考えられる。ラットにグラゾプレビルを経口投与した際の分布は選択的で、主に消化管及び肝臓に分布した。グラゾプレビルは、ラット及びウサギの胎盤を通過し、授乳ラットの乳汁中にも排泄された。グラゾプレビルの血漿蛋白結合率は高く、動物及びヒトで非結合型分率は約1%～2%であった。グラゾプレビルの血球移行性は低かった。ラット及びイヌにおいて、グラゾプレビルは未変化体及び酸化代謝物として主に胆汁中及び糞中に排泄された。健康被験者にグラゾプレビルの放射性標識体を186～188 mg 投与した際、グラゾプレビルは、未変化体及び酸化代謝物としてほぼ完全に糞中に排泄された。ラット、ウサギ及びイヌの糞尿中代謝物をヒトの代謝物と比較した結果、ヒトで生成したすべての代謝物 [ただし、M11a/b（投与量の約8%）及び M14（投与量の約4%）を除く] は動物でも確認された。重要なことに、ラット、イヌ又はヒトにおいて血漿中から代謝物は検出されなかった。なお、ウサギ血漿中からは極めて微量の代謝物が検出された。グラゾプレビルは、*in vitro* において CYP3A、P-gp、OATP1B1 及び OATP1B3 の基質であり、腸の CYP3A 及び BCRP の弱い阻害薬となる可能性が示された。ヒト肝細胞とインキュベーションした際、グラゾプレビルは CYP3A、CYP1A2 及び CYP2B6 を誘導しなかった。臨床試験では、グラゾプレビルは CYP3A、P-gp、OATP1B1 及び OATP1B3 の基質であり、CYP3A 及び BCRP の弱い阻害薬であることが確認された。

非臨床安全性評価に用いた動物種（ラット及びイヌ）を用いて、エルバスビルの薬物動態を評価した。ラット及びイヌでのエルバスビルのクリアランス及び分布容積は中程度であり、消失半減期はグラゾプレビルよりもわずかに長かった。ラット及びイヌでの F は低く（3%～35%）、これはおそらく吸収が高くないことに加え、肝臓での初回通過効果によるものと考えられる。ラットにおいて、エルバスビルは肝臓を含む大部分の組織に分布したが、脳などの P-gp による輸送経路の影響を受ける臓器への分布はわずかであった。有色ラットの眼球ブドウ膜からの薬物由来放射能の消失は緩徐であり、メラニンに結合する可能性が示唆された。しかし、有色ラットを用いた光毒性試験の結果、エルバスビルの光毒性の懸念は認められなかった。エルバスビルの血漿蛋白結合率は高く、動物及びヒトでの非結合型分率は0.001未満であった。エルバスビルの血球移行性は低かった。エルバスビルはラット及びウサギの胎盤を通過し、授乳ラットの乳汁中に排泄さ

れた。胆管カニューレ処置したラット及びイヌでは、エルバスビルは主に未変化体として胆汁、腸及び腎臓（ラットのみ）に排泄された。胆汁中及び糞中では、2種類の微量な酸化代謝物（m2及び m3）が検出された。ヒトのマスバランス試験では、エルバスビルはそのほとんどが主に未変化体として糞中に排泄され、加えて少量の m2及び m3も認められた。ヒト排泄物中から検出された代謝物は、毒性試験で用いた動物種においても検出されたことから、毒性試験での代謝物の検討が妥当であることが示された。エルバスビルの代謝物は、動物及びヒト血漿中からは検出されなかった。

エルバスビルは、*in vitro*において CYP3A 及び P-gp の基質であり、臨床濃度では主な CYP 分子種を阻害又は誘導せず、エステラーゼ又は UGT1A1 を阻害しなかった。エルバスビルは、*in vitro*において OATP1B1、OATP1B3、P-gp 及び BCRP に対して阻害作用を示した。臨床薬物間相互作用試験のデータから、エルバスビルは CYP3A 及び P-gp の基質であり、P-gp 及び BCRP の弱い阻害薬であるが、OATP1B1 及び OATP1B3 は阻害しないことが確認された。

グラゾプレビル及びエルバスビル単独投与の安全性を評価するために、遺伝毒性試験、ラットで最大6ヵ月間及びイヌで最大9ヵ月間の反復投与毒性試験並びに生殖発生毒性試験（ラット及びウサギ）を実施した。CD1マウス及び／又は rasH2野生型マウスの用量設定試験を実施して、それぞれのマウスを用いて実施する可能性のあった短期又は長期がん原性試験での投与量を検討したが、臨床で予定されるグラゾプレビル／エルバスビルの併用連続投与期間が6ヵ月未満であり、慢性あるいは再発性の病態の治療において間欠的な方法で頻繁に用いられるものではなく、標準的な組合せの遺伝毒性試験でいずれの遺伝毒性も認められず、慢性毒性試験でいずれの増殖性の徴候も認められなかったことから、ICH S1A ガイドランスに従って、がん原性試験は実施しなかった。その他の試験としては、臨床試験（PN003試験）において高用量グラゾプレビルとペグインターフェロン及びリバビリンを併用投与された一部の患者でみられた遅発性のトランスアミナーゼ上昇の機序を検討するために、異なるマウスの系統を用いたグラゾプレビル単独投与の探索的試験が実施された[資料5.3.5.1.2: 5172P003]。これらの試験は、マウスの用量設定試験（マウスは高用量でトランスアミナーゼ上昇を示す唯一の非臨床動物種である）でみられた肝・胆道系の変化についてさらに詳細に検討できるようデザインされた。また、イヌの反復投与毒性試験においてリンパ系組織でみられたエルバスビルに関連したリン脂質症の回復性を検討するために、エルバスビルのイヌでの1ヵ月間経口単独投与毒性試験（及び3ヵ月間休薬期間）を実施した。イヌの1ヵ月間経口併用投与毒性試験ではグラゾプレビル／エルバスビル併用投与の非臨床安全性を評価した。イヌは、グラゾプレビル及びエルバスビルともに標的器官は異なるものの病理組織学的変化が確認された非臨床動物種であった。

個々の不純物についての非臨床試験は実施しなかった。すべての不純物は、非臨床毒性試験の評価に用いたバッチ中に含まれていたことにより安全性が評価されたか[表2.4.A- 1]、[表2.4.B- 1]、原薬の不純物に関する ICH Q3A (R2)ガイドラインにて規定された安全性確認の必要な閾値を超えないものであった。さらに、ICH M7ガイドラインに従って、不純物の潜在的変異原性について評価した。変異原性不純物及び管理の詳細については[3.2.S.3.2 項（グラゾプレビル及びエルバス

ビル)]を参照のこと。

グラゾプレビルは、ICH ガイドラインに従って実施した、標準的な組合せの *in vitro* 又は *in vivo* 試験 [細菌を用いる復帰突然変異試験 (Ames 試験)、染色体異常試験及びラット骨髄の *in vivo* 小核試験] において遺伝毒性を示さなかった。最高用量は、*in vitro* 遺伝毒性試験では限界濃度又は細胞毒性により制限される濃度とし、*in vivo* 遺伝毒性試験では限界用量又は到達可能な最大曝露が得られる用量とした。

グラゾプレビルの毒性プロファイルは、反復投与試験で評価し、これにはラット及びイヌでの毒性試験、*rasH2*野生型マウス又は CD1マウスでの用量設定試験、ラット、イヌ及び異なる系統のマウスでのメカニズム試験がある。ラットの反復投与毒性試験での最高用量は到達可能な最大曝露が得られる用量とし、イヌの反復投与毒性試験及びマウスの用量設定試験での最高用量は MTD を上回った。ラット及びイヌの反復投与毒性試験並びにマウスの用量設定試験での NOAEL により算出した安全域の要約を[表2.4.A- 2]に示す。

表 2.4.A- 2 グラゾプレビルの全身曝露量に基づいた安全域

	NOAEL (mg/kg/日)	NOAEL での トキシコキネティクス値		臨床用量に対する 安全域 ^a	
		AUC _{0-24 hr} µM•hr	C _{max} µM	AUC _{0-24 hr}	C _{max}
マウス (<i>rasH2</i> 野生型) (1カ月間) ^b	100	164	40.8	37倍	66倍
マウス (CD1(ICR)) (3カ月間) ^c	200	820	56.3	185倍	91倍
ラット (6カ月間) ^d	200 b.i.d.	445	32.8	100倍	53倍
イヌ (9カ月間) ^e	15 ^b	367	34.4	83倍	56倍
^a グラゾプレビル／エルバスビル併用投与時のグラゾプレビルの推奨1日臨床用量 (100 mg) を投与された日本人 HCV 感染患者での1日曝露量 (AUC _{0-24 hr}) 及び C _{max} 値に対する非臨床動物種での1日曝露量 (AUC _{0-24 hr}) 及び C _{max} 値のそれぞれの比に基づき算出した。日本人 HCV 感染患者での AUC _{0-24 hr} 及び C _{max} 値は、MK-5172-058試験での母集団薬物動態解析による定常状態における血漿中曝露量の個別推定値に基づく AUC _{0-24 hr} 及び C _{max} の幾何平均値である。 ^b TT# [REDACTED]-6034試験[2.6.7.A.7A 項] ^c TT# [REDACTED]-6038試験[2.6.7.A.7B 項] ^d TT# [REDACTED]-6014試験[2.6.7.A.7E 項] ^e TT# [REDACTED]-6015試験[2.6.7.A.7G 項]					

ラットでは、最大血漿中全身曝露量が得られる用量 (200 mg/kg b.i.d.) までの用量でのグラゾプレビルの忍容性は良好であった。この用量での全身曝露量 (AUC_{0-24 hr} = 445 µM•hr) は HCV 感染患者にグラゾプレビル (100 mg) を投与したときの全身曝露量の約100倍に相当する。イヌ及びマウス (*rasH2*野生型及び CD1マウス) では、試験した最高用量 (それぞれ300及び500 mg/kg/日) で用量制限毒性 (主に体重減少が先行する病的状態又は死亡) が認められた。イヌに300 mg/kg/日で投与したときの血漿中全身曝露量 (AUC_{0-24 hr} = 2620 µM•hr) は HCV 感染患者にグラゾプレビル (100 mg) を投与したときの全身曝露量の約590倍に相当する。*rasH2*野生型及び CD1マウスに 500 mg/kg/日で投与したときの血漿中全身曝露量 [AUC_{0-24 hr} = 2810 µM•hr (*rasH2*野生型マウス)]

及び1470 $\mu\text{M}\cdot\text{hr}$ (CD1マウス)] は HCV 感染患者にグラゾプレビル (100 mg) を投与したときの全身曝露量のそれぞれ約633倍及び約331倍に相当する。

グラゾプレビルの標的臓器は肝・胆道系 (マウス、ラット及びイヌ)、雄性生殖器 (マウス及びイヌ)、消化管 (マウス、ラット及びイヌ)、腎臓 (マウスのみ) 並びに脾臓／骨髄 (イヌのみ) であった。これらの臓器での変化は、性質 (炎症又は変性／壊死との関連なし) 及び程度から毒性学的意義は低いと考えられ、その高い安全域 (35倍超) からヒトでの曝露量レベルでは外挿性がないものと考えられた。

・ 肝・胆道系

ラットの肝・胆道系の変化は200 mg/kg/日 (HCV 感染患者に投与したときの曝露量の約83倍に相当) 以上でみられた総ビリルビン増加 (ごく軽度) のみであった。程度が小さい (2倍以下) こと、他の肝・胆道系検査値異常 (AST、ALT 又は ALP 上昇) がみられないこと、及び関連する病理組織学的所見がみられないことから、この変化の毒性学的意義は低いと考えられた。したがって、胆道系の変化に関する NOAEL は200 mg/kg b.i.d. (HCV 感染患者に投与したときの曝露量の約100倍に相当) であった。

イヌの肝・胆道系の変化は15 mg/kg/日 (HCV 感染患者に投与したときの曝露量の約83倍に相当) 以上で認められた。300/100 mg/kg/日 (HCV 感染患者に投与したときの曝露量の約518倍に相当) で認められた肝・胆道系の変化は、ビリルビン (主に直接ビリルビン) の増加 (中等度～重度)、血清 ALP 及び尿中ビリルビンの増加 (軽度)、糞便及び一部の組織 (皮膚、眼、歯肉粘膜、白色脂肪組織、大動脈) の黄色化、胆汁量の増加を伴う胆嚢拡張 (300 mg/kg/日群の早期屠殺例で肉眼的に確認、関連した病理組織学的所見は認めず)、肝重量増加 (関連した病理組織学的所見は認めず) であり、病理組織学的検査では肝臓類洞細胞での色素沈着 (ヘモジデリン、ごく軽度～軽度) 並びに大型胆管及び胆嚢内腔における微石症 (ごく軽度、組織変化は認めず) がみられた。15 mg/kg/日での変化はビリルビン増加 (ごく軽度～軽度、雌雄) 並びに大型胆管及び胆嚢内腔における微石症 (ごく軽度、雌1例、組織変化は認めず) のみであった。ビリルビン増加は、程度が小さく (3倍以下)、他の肝・胆道系検査値異常 (AST、ALT 又は ALP 上昇) が認められず、関連した病理組織学的所見も認められないことから、毒性学的意義は低いと考えられた。大型胆管及び胆嚢内腔における微石症も、程度が極めて軽度であること、病理組織学的変化が認められないことから、毒性学的意義は低いと考えられた。さらに、この病理組織学的変化の程度は用量の増加によってもごく軽度のままであった。したがって、肝・胆道系の変化に関する NOAEL は 15 mg/kg/日 (HCV 感染患者に投与したときの全身曝露量の約83倍に相当) であった。また、イヌでの肝・胆道系の変化に関する NOEL (5 mg/kg/日) での血漿中全身曝露量も HCV 感染患者での臨床的曝露量の約16倍と大きかった。

rasH2野生型及び CD1マウスの肝・胆道系の変化は100 mg/kg/日 [HCV 感染患者でのグラゾプレビル曝露量の約37倍 (rasH2野生型マウス) 及び約102倍 (CD1マウス) に相当] 以上で認められた。両系統のマウスで、100 mg/kg/日以上で群でビリルビン (主に直接ビリルビン、100 mg/kg/日群ではごく軽度～軽度、500 mg/kg/日群で最大)、200 mg/kg/日以上で群で AST 及び ALT (最大

で500 mg/kg/日群での中等度)及び200 mg/kg/日以上でALP(ごく軽度)の用量依存的な増加が認められた。これらの血清生化学的変化は投与期間に依存せず、一般的にCD1マウスよりもrasH2野生型マウスで顕著であり、rasH2野生型マウスの12週間探索試験で12週間回復期間中に回復した。剖検時の肝臓の変化は100 mg/kg/日以上で(rasH2野生型マウス)及び200 mg/kg/日以上で(CD1マウス)、胆嚢の変化は200 mg/kg/日以上で(rasH2野生型マウス)及び500 mg/kg/日群(CD1マウス)で認められた。肝臓では、肝重量の増加が100 mg/kg/日以上で(rasH2野生型マウス)及び200 mg/kg/日群(CD1マウス)で、肝細胞サイズの増大(500 mg/kg/日群では肝臓サイズの増大を伴う)及び軽度の門脈周囲部の肝細胞細胞質の淡明化(PAS染色及びTEMにおいて肝細胞のグリコーゲン量の増加を伴う)が200 mg/kg/日以上で(両系統)で認められた。肝臓の炎症又は変性/壊死を示す病理組織学的所見は認められなかった。マウスでみられた肝臓の変化の程度は投与期間中も進行せず、rasH2野生型マウスの12週間探索試験の12週間回復期間中に回復した。胆嚢では、限局性の炎症が200 mg/kg/日以上で(rasH2野生型マウス)及び500 mg/kg/日群(CD1マウス)で認められ、rasH2野生型マウスの500 mg/kg/日群では投与約8週後に上皮過形成にまで進行した。これらの胆嚢での変化は主にCD1マウスよりも rasH2野生型マウスで顕著であり、rasH2野生型マウスの12週間探索的試験の12週間回復期間中に回復した。全体として、肝・胆道系の変化は、rasH2野生型マウスの100 mg/kg/日群でみられた軽微な臨床病理学的変化及び肝重量の増加、並びにCD1マウスの200 mg/kg/日群でみられた軽微な臨床病理学的変化及び肝細胞サイズのわずかな増大(門脈周囲部の肝細胞細胞質の淡明化及び平均肝重量の増加を伴う)であり、これらは有害とは判断されなかった。したがって、肝・胆道系の変化に関するNOAELは、rasH2マウスでは100 mg/kg/日(HCV感染患者にグラゾプレビルを投与したときの全身曝露量の約37倍に相当)、CD1マウスでは200 mg/kg/日(HCV感染患者にグラゾプレビルを投与したときの全身曝露量の約185倍に相当)であった。

肝・胆道系の変化に対するマウス系統の感受性を調べるために、C57BL/6及びBALB/cマウス(rasH2野生型マウスの親系統)を用いた探索的試験を実施した。マウスはトランスアミナーゼ上昇を示した唯一の動物種であり、rasH2野生型マウスは最も感受性の高い系統であった。本試験は、臨床試験(PN003試験)[資料5.3.5.1.2: 5172P003]において高用量グラゾプレビルとペグインターフェロン及びリバビリンを併用投与された患者の一部でみられた遅発性のトランスアミナーゼ上昇について検討するために実施された。検討した用量は200及び500 mg/kg/日であった。肝・胆道系の変化はrasH2野生型及びCD1マウスで既に実施した試験でみられたものとおおむね類似しており、両系統の両用量でも同様であったが、限局性の肝臓の壊死がBALB/cマウスの200及び500 mg/kg/日群でのみ認められた。その原因は不明であるが、BALB/cマウスでの肝臓中又は肝臓-胆嚢中グラゾプレビル濃度がrasH2野生型マウスよりも高いことはなく、原因とは考えられなかった。さらに、BALB/cマウスではAST上昇はのいずれの用量においても認められず、ALT上昇は500 mg/kg/日群の雄でのみ認められたことから、雌雄BALB/cマウスの200 mg/kg/日以上でみられた限局性の肝臓の壊死とAST又はALT上昇に関連は認められなかった。

主にイヌ及びマウスで認められた肝・胆道系の毒性の機序は不明である。ただし、毒性発現の機序に関する試験でみられたグラゾプレビルに関連した血清中胆汁酸の変化と肝臓の変化(トラ

ンスアミナーゼ上昇) に関係がある可能性は低いと考えられる。その理由は、血清胆汁酸の増加を示したイヌでは肝臓の炎症・壊死及びトランスアミナーゼ上昇は認められず、限局性の肝臓の壊死を示した雌 BALB/c マウスでは血清中胆汁酸の増加は認められなかったからである。一方、毒性発現の機序に関する試験でみられたグラゾプレビルに関連した血清中胆汁酸の変化と非臨床試験でみられた胆管毒性の関係の可能性は除外できない。血清胆汁酸の変化を示した動物種(マウス及びイヌ)では胆嚢又は胆管の病理組織学的変化及び血清中直接/間接ビリルビンの顕著な増加が認められた。さらに、グラゾプレビルの主要排泄経路は胆汁排泄であることから[2.4.A.3.5項]、胆汁中の高濃度のグラゾプレビルが胆管の病理組織学的所見(イヌでの胆管及び胆嚢中の微石症、マウスでの胆嚢の炎症/過形成)に寄与している可能性は除外できない。

全体として、イヌ及びマウスでみられた肝・胆道系の毒性は、NOAEL での高い安全域(イヌで約83倍及びマウスで約37倍)を考慮すると、グラゾプレビルの臨床用量(100 mg)でのヒトでのリスクには影響しないと考えられた。

• 雄性生殖器

ラットでは、到達可能な最大曝露量が得られる用量(200 mg/kg b.i.d.、HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときの全身曝露量の約100倍に相当)まで最大6ヵ月間投与しても、雄性生殖器に変化は認められなかった。

イヌでは、9ヵ月間毒性試験の15 mg/kg/日(HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときの全身曝露量の約83倍に相当)以上の群及び1ヵ月間毒性試験の600 mg/kg/日群(HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときの全身曝露量の約660倍に相当)において雄性生殖器の病理組織学的変化が認められた。精細管の変性(程度は用量依存的)は、より影響を受けた動物での精巣重量の減少及び精巣上体管(それ自体は変化なし)内腔での精子数の減少(300/100 mg/kg/日以上)を伴っていた。15 mg/kg/日群では、精巣の変化が認められた動物は1例(ごく軽度)のみであり、生殖細胞の減少は精原細胞後の成熟した細胞タイプのみ限定され、セルトリ細胞及びライディッヒ細胞に顕著な変化は認められなかった。さらに、精巣上体での病理組織学的変化は認められず、光学顕微鏡検査において精巣上体の精子数への作用も認められなかった。したがって、程度がごく軽度であり、可逆的であることから[資料4.3: 1]、15 mg/kg/日群でみられた精巣の変化の毒性学的意義は低いと考えられた。雄性生殖器の変化に関する NOAEL は15 mg/kg/日(HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときの全身曝露量の約83倍に相当)であった。さらに、イヌでの精巣の変化に関する NOEL (5 mg/kg/日)での血漿中全身曝露量は HCV 感染患者に投与したときの臨床曝露量の約16倍に相当する。

rasH2マウスを用いた12週間探索試験(及び12週間無処置回復期間)において、グラゾプレビル500 mg/kg/日(HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときの全身曝露量の約633倍に相当)の投与12週後に精巣重量の減少が認められたが、200 mg/kg/日(HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときの全身曝露量の約75倍に相当)では認められなかった。この精巣重量の減少は投与12週時に剖検したマウスでのみ認められ、投与8週時以前に剖検したマウスではみられなかった。12週間の無処置回復期間終了時には精巣重量の減少は認められず、この変化に回復性があること

が示された。この試験の目的は、以前に実施した、同一のマウス系統の短期試験でみられた肝・胆道系の変化を検討することであったため、rasH2野生型マウスでの投与12週以降の雄性生殖器の病理組織学的検査は行わなかった。しかし、最大500 mg/kg/日のグラゾプレビル（HCV 感染患者に投与したときの全身曝露量の約633倍に相当）を1ヵ月間投与された rasH2野生型マウス又は最大500 mg/kg/日のグラゾプレビル（HCV 感染患者に投与したときの全身曝露量の約331倍に相当）を3ヵ月間投与された CD1マウスの雄生殖器において重量又は病理組織学的な変化は認められなかった。

雄性生殖器に対する毒性の原因は不明であるが、グラゾプレビルの高い安全域（イヌで約83倍及び rasH2野生型マウスで約75倍）を考慮すると、臨床推奨用量（100 mg）における外挿性はないと考えられる。第一世代の HCV NS3/4A プロテアーゼ阻害薬であるテラプレビル（Incivek™）[資料4.3: 5]又は同じくボセプレビル（Victrelis™）[資料4.3: 2]を投与されたラットで変性性の精巣毒性が認められ、確立された NOAEL はテラプレビル又はボセプレビルの臨床推奨用量（それぞれ750及び800 mg の1日3回投与）での曝露量の1倍未満であった。しかしながら、安全域が狭いにもかかわらず、臨床モニタリングでは、ヒト患者での精巣毒性はいずれの化合物においても確認されていない。

• 消化管

非臨床動物種での消化管の変化は高用量のみでみられ、グラゾプレビルの局所作用によるものと考えられた。ラットの分布試験では消化管に高濃度のグラゾプレビルが認められた[2.4.A.3.3.1項]。これは、グラゾプレビルの経口バイオアベイラビリティが低いこと（未吸収化合物）あるいは腸又は胆汁中に排泄（グラゾプレビルの主要排泄経路）されることによるものと考えられた[2.4.A.3.5項]。したがって、安全域は推奨用量（体重60 kg 換算）に対する用量の倍数として表記した。

ラットでは、200 mg/kg b.i.d.群（臨床推奨用量の240倍、ヒト体重を60 kg として100 mg を mg/kg に換算）の雄の腺胃粘膜での限局性の出血が認められた。グラゾプレビル200 mg/kg b.i.d.投与時の全身曝露量は雌雄で同程度であり、200 mg/kg/日（1日1回）投与時の全身曝露量とも同程度であることから、この限局性の出血は、グラゾプレビル（200 mg/kg b.i.d.）への胃粘膜の長期にわたる直接的な接触によるものと考えられた。ここでみられた性差は、体重の大きい雄では、雌よりも200 mg/kg b.i.d.の投与容量が大きかったためと考えられた。200 mg/kg/日（臨床用量の120倍、ヒト体重を60 kg として100 mg を mg/kg に換算）までの用量で消化管の変化は認められなかった。

イヌでは、300 mg/kg/日（臨床推奨用量の180倍、ヒト体重を60 kg として100 mg を mg/kg に換算）の1例で、被験物質の局所作用によると考えられる十二指腸の限局性炎症がみられた。100 mg/kg/日（臨床推奨用量の60倍、ヒト体重を60 kg として100 mg を mg/kg に換算）でみられた消化管の所見は嘔吐及び無形便／液状便のみであった。

マウスでは、rasH2野生型、C57BL/6及び BALB/c マウスを用いた1ヵ月間投与試験及び rasH2野生型マウスを用いた12週間回復期間を設けた12週間投与試験において、消化管の変化が認められた。絨毛の萎縮（500 mg/kg/日群）及び上皮の空胞化 [200 mg/kg/日（臨床用量の120倍、ヒト体

重を60 kgとして100 mgを mg/kgに換算)以上の群]が認められたが、そのほとんどが十二指腸に局限していた。これらの上皮性の変化は空腸で認められることはまれであったことから、被験物質の局所作用によるものと考えられた。小腸の他の部位(回腸)又は大腸(盲腸、結腸)での変化は認められなかった。これらの下流組織での細胞間薬物濃度は血流により同程度であると想定されるが、胆汁流入(胆汁中排泄はグラゾプレビルの主要排泄経路)部位から遠位であるために管腔内濃度は低くなると考えられ、このことから被験物質の局所刺激性が裏付けられると考えられた。rasH2野生型マウスを用いた12週間回復期間を設けた12週間探索試験では、概して投与期間を通じて腸の変化がみられたが、その発現頻度及び程度に意味のある変動は認められず、12週間無処置回復期間中に回復した。1ヵ月間経口投与用量設定試験では、100 mg/kg/日(臨床推奨用量の60倍、ヒト体重を60 kgとして100 mgを mg/kgに換算)までの用量で消化管の変化は認められなかった。

結論として、ラット、イヌ及びマウスでみられた胃腸の変化は、被験物質の局所刺激性によるものと考えられ、高い安全域(ラット:臨床用量の120倍、イヌ:60倍、マウス:60倍、ヒト体重を60 kgとして100 mgを mg/kgに換算)を考慮すると、ヒトへの外挿性はないと考えられる。

- 腎臓

腎臓の変化は rasH2野生型マウス及び CD1マウスの試験でのみ認められた。腎尿細管上皮の変性が500 mg/kg/日(試験した最高用量であり MTD を超えていた、rasH2野生型マウス及び CD1マウスでの曝露はそれぞれ、HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときの曝露量の約633倍及び約331倍に相当)で認められた。腎臓の変化に関する NOEL は200 mg/kg/日(rasH2野生型マウス及び CD1マウスでの曝露は、それぞれ HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときの曝露量の約75倍及び約185倍に相当)であった。

- 脾臓／骨髄

イヌの9ヵ月間投与毒性試験でみられた脾臓／骨髄の変化は、300/100 mg/kg/日(HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときの全身曝露量の約518倍に相当)以上の群での脾臓での色素沈着(ヘモジデリン)の増加、髄外造血の増加、赤血球又は骨髄細胞系列の過形成のみであった。脾臓／骨髄の変化に関する NOEL は15 mg/kg/日(HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときの全身曝露量の約83倍に相当)であった。

生殖毒性試験では、ラットで到達可能な最大曝露量が得られる200 mg/kg b.i.d.(HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときの全身曝露量の約48倍に相当、ラットの1ヵ月間投与毒性試験での投与4週目のトキシコキネティクスの結果に基づく)まで投与しても、雌雄ラットにおいて受胎能パラメータの変化は認められなかった。器官形成期の妊娠ラットに、到達可能な最大曝露量が得られる200 mg/kg b.i.d.(HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときの全身曝露量の約49倍に相当)まで投与しても、また、妊娠ウサギに母動物最大耐量である100 mg/kg/日(HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときの全身曝露量の約17倍に相当)まで投与しても、催奇形性は

認められなかった。器官形成期及び授乳期のラットに到達可能な最大曝露量が得られる100 mg/kg/日（HCV 感染患者にグラゾプレビルを投与したときの全身曝露量の約35倍に相当）まで投与しても F₁世代に影響は認められなかった。

全体として、グラゾプレビルの毒性プロファイルはラット、イヌ及びマウスにおいて十分に特徴付けられ、各動物種での標的器官が特定されている。これらの非臨床動物種において確認された毒性は、高い安全域（35倍超）を有することから、HCV 感染患者にグラゾプレビル（100 mg）を投与したときの曝露量レベルでは外挿性はないものと考えられた。

エルバスビルは、ICH ガイドラインに従って実施した、標準的な組合せの *in vitro* 又は *in vivo* 試験〔細菌を用いる復帰変異試験（Ames 試験）、染色体異常試験及びラット骨髄の *in vivo* 小核試験〕において遺伝毒性を示さなかった。最高用量は、*in vitro* 遺伝毒性試験では限界濃度又は最大溶解量とし、*in vivo* 遺伝毒性試験では限界用量よりも高い用量（1000 mg/kg b.i.d.、1日総投与量2000 mg/kg/日）とした。

エルバスビルの毒性プロファイルは、反復投与試験（ラット、イヌ）及び用量設定試験（rasH2 野生型マウス）で評価した。非臨床試験におけるエルバスビルの経口投与調製物について、ポリソルベート80／ビタミンE TPGS を含有する調製物や HPMCAS-LF／HPMCP を含有する非晶質分散体調製物などの調製物について検討した結果、ポリソルベート80を担体としてエルバスビルを経口投与したときに最高の全身曝露量が得られた。したがって、毒性試験では、5又は10%（w/w）ポリソルベート80水溶液をエルバスビルの媒体とした投与液を用いた。反復投与毒性試験の高用量の設定は、ICH M3（R2）ガイダンスに従って、限界用量とされる1000 mg/kg/日をほとんどの場合に採用した。ラット及びイヌにおいて、1000 mg/kg/日までのエルバスビルの忍容性は全般的に良好であった。投薬に関連した病理組織学的変化は、イヌのリンパ組織で認めたとく軽度～軽度のリン脂質症（毒性学的意義は低く回復性あり）のみであった。ラット及びイヌの慢性投与試験で得られた NOAEL に基づく安全域の要約を[表2.4.B- 2]に示す。

表 2.4.B-2 エルバスビルの全身曝露量に基づいた安全域

	NOAEL (mg/kg/日)	NOAEL での トキシコキネティクス値		臨床用量に対する 安全域 ^a	
		AUC _{0-24 hr} μM・hr	C _{max} μM	AUC _{0-24 hr}	C _{max}
マウス (rasH2野生型) (1カ月) ^b	1000	151	9.17	54倍	52倍
ラット (6カ月間) ^c	1000	21.9	1.54	8倍	9倍
イヌ (9カ月間) ^d	1000	16.6	1.31	6倍	7倍
^a エルバスビル／グラゾプレビル併用投与時のエルバスビルの推奨1日臨床用量 (50 mg) を投与された日本人 HCV 感染患者での1日曝露量 (AUC _{0-24 hr}) 及び C _{max} 値に対する非臨床動物種での1日曝露量 (AUC _{0-24 hr}) 及び C _{max} 値のそれぞれの比に基づき算出した。日本人 HCV 感染患者での AUC _{0-24 hr} 及び C _{max} 値は、MK-5172-058試験での母集団薬物動態解析による定常状態における血漿中曝露量の個別推定値に基づく AUC _{0-24 hr} 及び C _{max} の幾何平均値である。 ^b TT#-6047試験[2.6.7.B.6 項] ^c TT#-6033試験[2.6.7.B.7D 項] ^d TT#-6030試験[2.6.7.B.7G 項]					

マウスでは、実施する可能性のあった rasH2トランスジェニックマウスの短期がん原性試験での用量を検討するため、rasH2野生型マウスの1カ月間経口投与用量設定試験を実施した。最高用量である1000 mg/kg/日 (HCV 感染患者にエルバスビルを投与したときの約54倍の全身曝露量に相当) まで、投薬に関連した変化はみられなかった。

ラットの14日間投与毒性試験での最高用量は1000 mg/kg b.i.d.とし、3及び6カ月間投与毒性試験での最高用量は1000 mg/kg/日とした。未吸収の被験物質が糞便中に排泄されたことを示唆する糞便の白色化が1000 mg/kg b.i.d.群でみられたことから、エルバスビルの経口バイオアベイラビリティには上限があると考えられ、1000 mg/kg b.i.d.群と1000 mg/kg/日群の曝露量がほぼ同等であった。ラット試験では30 mg/kg/日から1000 mg/kg/日までの用量を検討した。糞便の白色化 (1000 mg/kg b.i.d.群) 以外の被験物質に関連した変化は、好中球及びコレステロールの増加 (ごく軽度～軽度、1000 mg/kg b.i.d.群)、概して摂餌量の減少を伴う体重増加の減少 (軽度、300 mg/kg/日以上)、流涎及び尿比重減少を伴う尿量増加 (30 mg/kg/日以上) の群) であった。これらの変化はごく軽度～軽度であり、すべての試験において一貫して被験物質との関連があるとは判断されず、動物の一般状態に大きく影響するものではなく、関連した病理組織学的所見を伴わなかった。したがって、これらの変化の毒性学的意義は低く、ラットでの NOAEL は1000 mg/kg/日以上であった。この用量での血漿中全身曝露量 (AUC_{0-24 hr} = 21.9 μM・hr) は、HCV 感染患者にエルバスビル (50 mg) を投与したときの全身曝露量の約8倍に相当する。

イヌの被験物質に関連した生前変化は、糞便の色調の変化 (白色／薄茶色、吸収されずに糞便中に排泄された被験物質に起因すると考えられた)、散發性の嘔吐、散發的な摂餌量の減少に伴う一過性の体重減少 (1000 mg/kg/日群、まれに皮膚緊張低下及び痩せた外観等の続発性の徴候を伴った) のみであった。イヌの1カ月間毒性試験 (及び3カ月間休薬期間) において、これらの高頻度でみられた生前変化は一般的に動物の健康状態に影響を及ぼさず、病理組織学的所見を伴わず、

投与終了後速やかに回復した。したがって、これらの毒性学的意義は低いと考えられた。1ヵ月間以上の試験での被験物質に関連した病理学的変化は、胃、小腸（パイエル板）及び大腸の消化管関連リンパ系組織、リンパ節及び胆嚢の孤立リンパ小節（25 mg/kg/日以上群）並びに脾臓（1000 mg/kg/日群のみ）でみられたリン脂質症（ごく軽度～軽度）のみであった。リンパ系組織にリン脂質症と関連した変化（特にリンパ様細胞の減少又は炎症／壊死）はみられず、さらに血液学的変化（白血球・リンパ球数減少、循環血中の異常血液細胞）も認められなかった。変化の程度はごく軽度～軽度であり、1ヵ月間試験と9ヵ月間試験の間で頻度及び程度の差は認められなかった。

イヌの毒性試験においてリンパ系組織でみられたリン脂質症については、程度が軽度であり、リンパ系組織での毒性（リンパ様細胞の減少、炎症又は壊死）又は血液学的検査異常（白血球・リンパ球数減少、循環血中の異常血液細胞）が認められないことから、有害ではなく、毒性学的意義は低いと考えられた。重要なことに、短期試験でみられたリンパ系組織内の空胞化の程度は長期試験においてもその程度に増強はみられず、長期曝露に伴う毒性学的影響は認められず（リン脂質症の所見以外の機能的又は組織病理学的変化は認めず）、1ヵ月間毒性試験の3ヵ月間休薬期間中に回復性が認められた。したがって、イヌでのNOAELは1000 mg/kg/日以上であった。この用量での血漿中全身曝露量はHCV感染患者にエルバスビルを投与したときの全身曝露量の約6倍に相当する。

多くの既承認薬で実験動物において、またいくつかの薬ではヒトにおいて、リン脂質症が観察されている。In vivo 又は ex vivo 動物試験でリン脂質症と毒性を関連づける証拠はほとんどなく、ヒトのリン脂質症と臨床毒性を関連付ける証拠もない[資料4.3: 3]。たとえば、季節性及び通年性アレルギー性鼻炎の症状緩和の目的で使用される長時間作用型 H1-抗ヒスタミン薬であるロラタジン（ClaritinTM）はラット及びサルにおいて可逆的なリン脂質症を生じた。しかし、ヒトにロラタジン40 mg/kg/日を3ヵ月間投与した試験においてリン脂質症について証拠はない[資料4.3: 4]。

イヌの毒性試験でみられたライソソームでのリン脂質の蓄積の原因は不明である。エルバスビルはリン脂質症を誘発することが知られている、陽イオン両親媒性の薬物に共通の物理化学的性質をもつ。エルバスビルは親水基及び疎水基を含み、酸性下では正に荷電する[3.2.S.1.2 項（エルバスビル）]。標的器官は消化管関連リンパ系組織及びリンパ節、並びに胆嚢の孤立リンパ小節であり、エルバスビルの経口アベイラビリティが低く（未吸収の被験物質がみられた）、エルバスビルの主要排泄経路が腸又は胆汁排泄であることから、これらの器官では被験物質の濃度が高いことが判明している[2.4.B.3.5 項]。これらのエルバスビルの局所的な高濃度がこれらの器官での変化に寄与した可能性はある。したがって、この局所変化に関する安全性係数を臨床用量（ヒト体重を60 kgと仮定して mg/kg に換算）に対する用量の倍数として算出した。イヌに最大9ヵ月間投与しても、5 mg/kg/日以下ではこれらの器官にリン脂質症はみられなかった。本用量は、臨床用量（50 mg すなわち0.8 mg/kg）の6倍に相当する。さらに、脾臓では軽度のリン脂質症が最高用量（1000 mg/kg/日）でのみ認められた。脾臓のリン脂質症に関するNOELは25 mg/kg/日であり、そのときの全身曝露は、HCV感染患者にエルバスビル（50 mg）を投与したときの全身曝露量の約2倍に相当する。

ラットの生殖毒性試験の1000 mg/kg/日群では、精巣上体尾部1gあたりの精子数の減少（ごく軽度、対照群より14%減少）が認められた。しかし、生殖成績、受胎能、胚／胎児生存率、平均精巣重量及び精子の運動性などのいずれの生殖パラメータにも投与に関連した影響はみられず、ラット及びイヌの反復投与毒性試験において精巣の病理組織学的な変化もみられなかったことから、この精子数の減少の毒性学的意義は低いと考えられた。雌雄の受胎能パラメータに関するNOAELは1000 mg/kg/日以上であった。この用量での血漿中全身曝露量はHCV感染患者でのエルバスビルの全身曝露量の約6倍に相当する（ラットの3ヵ月間毒性試験での投与13週目のトキシコキネティクス結果に基づく）。器官形成期の妊娠ラット又は妊娠ウサギにエルバスビルを限界量の1000 mg/kg/日（HCV感染患者にエルバスビルを投与したときの全身曝露量のそれぞれ約8倍及び約14倍に相当）まで投与しても催奇形性は認められなかった。器官形成期及び授乳期の妊娠ラットにエルバスビルを限界量の1000 mg/kg/日（HCV感染患者エルバスビルを投与したときの全身曝露量の約8倍に相当、ラットの胚・胎児発生試験でのトキシコキネティクス結果に基づく）まで投与してもF₁世代に対する影響は認められなかった。母動物の変化は、1000 mg/kg/日群での体重増加及び摂餌量の減少がラットでのみ認められた。これらの変化は軽度であり、すべての生殖毒性試験で一貫して認められた訳ではなかった。したがって、ラット及びウサギでの母動物のNOAELは1000 mg/kg/日以上であり、ウサギではNOAELはNOELでもあった。

全体として、ラット及びイヌの試験（それぞれ最大6及び9ヵ月間）におけるエルバスビルの忍容性は良好であった。顕著な組織形態学的変化はイヌのリンパ系組織でみられた有害ではなく回復性のあるリン脂質症（ごく軽度～軽度）のみであり、これらの組織で他の影響はなく、血液学的パラメータでの変化も認められなかった。ラット又はマウスの反復投与毒性試験において、イヌと同程度以上の曝露量が見込める投与量を投与しても、リン脂質症はみられなかった。

グラゾプレビル及びエルバスビルをそれぞれ単独投与した非臨床安全性試験の結果から、重複する毒性あるいはグラゾプレビル／エルバスビル併用に関して懸念を生じる要因は特に認められなかった。イヌの1ヵ月間グラゾプレビル／エルバスビル併用投与毒性試験において、グラゾプレビル及びエルバスビル5/25 mg/kg/日（HCV感染患者にグラゾプレビル／エルバスビルを投与したときの全身曝露量の約14/3倍に相当）の併用投与による相加的・相乗的な毒性の増強又はトキシコキネティクスの相互作用は認められなかった。

結論として、以上の非臨床プロファイルから、慢性HCV感染に対する治療法としてグラゾプレビル（100 mg）及びエルバスビル（50 mg）併用療法の安全性を裏付けるものであった。

2.4.6 参考文献

- [資料4.3: 1] Creasy DM. Pathogenesis of male reproductive toxicity. Toxicol Pathol. 2001; 29: 64-76.
- [資料4.3: 2] USA VICTRELIS™(boceprevir) capsules: 2011.
- [資料4.3: 3] Reasor MJ, Hastings KL, Ulrich RG. Drug-induced phospholipidosis: issues and future directions. Expert Opin Drug Saf. 2006; 5: 567-83.
- [資料4.3: 4] UK Product Summary: Loratadine 10 mg Tablets
- [資料4.3: 5] US Prescribing Information: INCIVEK (telaprevir) Film Coated Tablets, for oral use: 2011 - Revised 06/12.
- [資料4.3: 6] Rebetol™: Highlights of prescribing information - Revised 12/2014.
- [資料4.3: 7] Sovaldi™ EMEA procedure No. EMEA/H/C/002798/0000: Assessment report - 21 November 2013
- [資料4.3: 8] Sovaldi™ FDA application number: 204671Orig1s000: Cross discipline team leader review - 2013