
2.4 非臨床試験の概括評価

ブリリント[®]錠 60 mg/90 mg

本資料に記載された情報に係る権利はアストラゼネカ株式会社に帰属します。弊社の事前の承諾なく本資料の内容を他に開示することは禁じられています。

目次	頁
目次	2
略語及び専門用語一覧表	4
2.4.1 非臨床試験計画概略	5
2.4.2 薬理試験	6
2.4.2.1 効力を裏付ける試験	6
2.4.2.1.1 <i>In vitro</i> 試験	6
2.4.2.1.2 <i>In vivo</i> 試験	7
2.4.2.1.3 P2Y ₁₂ 受容体結合の可逆性	7
2.4.2.1.4 代謝物の薬理試験	7
2.4.2.2 副次的薬理試験	7
2.4.2.3 安全性薬理試験	8
2.4.2.3.1 呼吸機能に対する作用	8
2.4.3 薬物動態試験	9
2.4.3.1 吸収	9
2.4.3.2 分布	9
2.4.3.2.1 血漿蛋白結合	9
2.4.3.2.2 組織分布	9
2.4.3.3 代謝	9
2.4.3.3.1 <i>In vivo</i> 代謝	9
2.4.3.3.2 チカグレロルの代謝に関与する CYP 酵素の同定	10
2.4.3.3.3 酵素の誘導及び阻害	11
2.4.3.4 排泄	11
2.4.4 毒性試験	12
2.4.4.1 トキシコキネティクス	12
2.4.4.2 急性毒性試験	12
2.4.4.3 反復投与毒性試験	13
2.4.4.3.1 マウス	13
2.4.4.3.2 ラット	13
2.4.4.3.3 マーモセット	14
2.4.4.4 遺伝毒性試験	15
2.4.4.5 がん原性試験	15
2.4.4.5.1 マウス	15
2.4.4.5.2 ラット	15
2.4.4.6 生殖発生毒性試験	16

2.4.4.7	幼若動物を用いた毒性試験.....	16
2.4.4.8	不純物の安全性.....	16
2.4.5	総括及び結論.....	16
2.4.5.1	チカグレロルの薬理作用.....	17
2.4.5.2	呼吸機能に対する作用.....	17
2.4.5.3	一般毒性.....	18
2.4.5.4	遺伝毒性.....	19
2.4.5.5	がん原性.....	19
2.4.5.5.1	肝腫瘍.....	19
2.4.5.5.2	子宮腫瘍.....	20
2.4.5.5.3	がん原性試験のまとめ.....	21
2.4.5.6	生殖発生毒性.....	21
2.4.5.7	結論.....	21
2.4.6	参考文献.....	21

表目次

表 1	<i>In vitro</i> 試験系におけるチカグレロルの血小板凝集阻害作用の IC ₅₀ 値.....	6
表 2	<i>In vitro</i> 試験系におけるチカグレロル及び AR-C124910XX の活性.....	8

図目次

図 1	チカグレロルの <i>in vivo</i> 推定代謝経路.....	10
-----	------------------------------------	----

略語及び専門用語一覧表

本概要で使用する略語及び専門用語を以下に示す。

略語及び専門用語	用語の説明
ACS	Acute coronary syndromes：急性冠症候群
ADP	Adenosine diphosphate：アデノシン二リン酸
ACTH	Adrenocorticotrophic hormone：副腎皮質刺激ホルモン
ALP	Alkaline phosphatase：アルカリホスファターゼ
ALT	Alanine aminotransferase：アラニン・アミノトランスフェラーゼ
ATP	Adenosine triphosphate：アデノシン三リン酸
AZ	AstraZeneca：アストラゼネカ
CHO	Chinese hamster ovary：チャイニーズハムスター卵巣
CYP 450	Cytochrome P450：チトクローム P450
DPSPX	1,3-Dipropyl-8-p-sulfophenylxanthine：1,3-ジプロピル-8-(p-スルホフェニル)キサンチン
ENT	Equilibrative nucleoside transporter：受動拡散型ヌクレオシドトランスポーター
GLP	Good Laboratory Practice：医薬品安全性試験実施基準
HEK293	Human Embryonic Kidney 293 cells：ヒト胎児由来腎臓 293 細胞
hERG	Human ether-a-go-go-related gene：ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
IC ₅₀	50% inhibitory concentration：50%阻害濃度
LC-MS	Liquid-Chromatography and single Mass Spectrometry：液体クロマトグラフィー／質量分析法
LC-MS-MS	Liquid-Chromatography and tandem Mass Spectrometry：液体クロマトグラフィー／タンデム型質量分析法
OAT	Organic Anion Transporter：有機アニオントランスポーター
PCI	Percutaneous coronary intervention：経皮冠動脈インターベンション
Pgp	P-glycoprotein：P-糖蛋白質
t _{1/2}	Half-life：半減期
TTC	Threshold of toxicological concern：毒性学的閾値
URAT	Urate transporter：尿酸トランスポーター

2.4.1 非臨床試験計画概略

チカグレロルに関する包括的な非臨床試験を実施し、本薬の薬理、安全性薬理、薬物動態（吸収、分布、代謝及び排泄）、トキシコキネティクス及び安全性を評価した。

チカグレロルの薬理学的特性を検討するために、ヒト及びラット洗浄血小板、ヒト多血小板血漿、並びに、ヒト、ラット及びマーモセット全血を用いて各種 *in vitro* 試験を実施し、更にイヌの *ex vivo* 及び *in vivo* 試験においてチカグレロルの血小板凝集阻害作用及び血栓形成阻害作用を評価した。一連の酵素及び受容体に対する相互作用も評価し、チカグレロルの P2Y₁₂ 受容体を介した血小板凝集阻害作用以外の潜在的作用を検討した。ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子 (hERG) チャネルを発現させた Chinese hamster ovary (CHO) 細胞、ラット及びイヌを用いた安全性薬理コアバッテリー試験を実施し、消化管系、心血管系、呼吸系、腎機能及び中枢神経系に対するチカグレロルの作用を評価した。

チカグレロルの吸収、分布、代謝及び排泄を検討した一連の試験では、チカグレロルの非臨床薬理試験及び毒性試験に用いた動物種と同じ動物種（マウス、ラット、イヌ及びマーモセット等）を、また基本的に同じ系統を用いた。様々な動物種の体液中におけるチカグレロル及び代謝物 AR-C124910XX、AR-C133913XX を測定するため、逆相液体クロマトグラフィー／質量分析法（LC-MS）による高感度かつ特異的な分析方法を開発した。また同位体標識したチカグレロルを内部標準物質として用いたタンデム型質量分析法（LC-MS-MS）を開発した。それぞれの分析法は一貫した精度及び真度を有しており、その試験特性は GLP 適用のトキシコキネティクス評価を含むすべての適用において、これら分析法は適切な特性を有していた。

ヒトへの長期投与時の安全性を担保するため、所定の非臨床毒性試験によりチカグレロルの毒性を評価した。これらの試験にはマウス、ラット、非妊娠ウサギ及び／又はマーモセットを用いた単回及び／又は反復投与毒性試験が含まれており、一部の試験では回復性についても評価した。チカグレロルの遺伝毒性を Ames 試験、マウスリンフォーマ試験及びラット小核試験で検討した。活性を保持する代謝物 AR-C124910XX については、微生物を用いた復帰突然変異試験及びマウスリンフォーマ試験を実施した。チカグレロルのがん原性についてマウス及びラットを用いた 2 年間がん原性試験で検討した。雌ラットにみられた子宮腫瘍の発現頻度増加のメカニズムを検討するため、*in vivo* 及び *in vitro* の機序考察試験を実施した。

チカグレロルの生殖発生毒性試験として、雌雄のラットを用いた授・受胎能に関する試験（雄の授胎能については 6 カ月間反復投与毒性試験の一部として評価）、ラット及びウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験（ウサギについては胚・胎児発生に関するフォローアップ試験も実施）並びにラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験を実施した。

チカグレロルの不純物について遺伝毒性の評価を行いその安全性を確認するとともに、最終製剤の規格設定の根拠を提供した。チカグレロルの半減期は短く、皮膚及び眼における蓄積性がないことから、光毒性試験は実施しなかった。

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

血小板はアテローム性動脈硬化のプラーク破綻後に発生する血栓形成で中心的役割を果たすため、大部分の急性冠症候群（ACS）の病理学的原因となっている。血管障害により血小板の活性化が起これ、血小板の凝集、顆粒内容物の放出、負荷電リン脂質の発現及び凝固カスケードの活性化が引き起こされる。血小板は、3種のプリン作動性 P2 受容体（アデノシン三リン酸 [ATP] により活性化される P2X₁ イオンチャネル、並びにアデノシン二リン酸（以下、ADP）により活性化される P2Y₁ 及び P2Y₁₂ 受容体 [G 蛋白質共役型受容体]）を血小板表面に発現している。ADP 誘発血小板凝集は、P2Y₁ 受容体の活性化により開始され、P2Y₁₂ 受容体の活性化により相乗的に増強され、維持される。完全な凝集反応には同時活性化が必要とされる。P2Y₁₂ 受容体の活性化により凝集が維持され、他の血小板活性化因子に対する反応も増強される一方で、P2Y₁₂ 受容体の遮断により凝集の可逆性が亢進される。その結果、抗血小板療法は、ACS 患者又は経皮的冠動脈インターベンション（以下、PCI）を適用された患者の初期管理の中心になっており、P2Y₁₂ 受容体拮抗薬開発の魅力的な標的分子と考えられる。

チカグレロルは、強力、選択的、可逆的、直接的かつ経口投与可能な P2Y₁₂ 受容体拮抗薬として開発された。本項では、チカグレロルが ADP 誘発血小板凝集に対して、可逆的で濃度（用量）依存的な阻害作用を示すことを明らかにした。作用の可逆性に加えて、*in vitro* 試験系における抗血小板作用及びイヌを用いた *in vivo* 試験における速やかな作用発現から、チカグレロルはチエノピリジン系薬物（活性代謝物を介して作用を示すプロドラッグであり、血小板の寿命期間に亘り P2Y₁₂ 受容体拮抗作用を示す）とは異なる薬理学的プロファイルを示すことが確認された。

2.4.2.1.1 *In vitro* 試験

チカグレロルは、特異的 P2Y₁₂ 受容体放射性リガンド (¹²⁵I-AR-C98597XX) のヒト洗浄血小板への結合を強力に阻害した (K_i 値 = 2.0 nmol/L)。チカグレロルは、ヒト及びラットの洗浄血小板、ヒト多血小板血漿、マーマセット及びヒトの全血で ADP 誘発血小板凝集を強力に阻害した（表 1）。

抗血小板作用に加えて、チカグレロルはマウス血管平滑筋細胞の P2Y₁₂ 受容体を介した 2Me-S-ADP 誘発血管収縮に対して抑制作用を示した。

表 1 *In vitro* 試験系におけるチカグレロルの血小板凝集阻害作用の IC₅₀ 値

化合物	試験系	IC ₅₀ 値 (nmol/L)
チカグレロル	ヒト洗浄血小板	13
チカグレロル	ラット洗浄血小板	20
チカグレロル	ヒト多血小板血漿	398
AR-C124910XX ^a	ヒト多血小板血漿	126
チカグレロル	マーマセット全血	35
チカグレロル	ヒト全血	58

^a: 活性を保持するチカグレロルの代謝物

2.4.2.1.2 *In vivo* 試験

覚醒雄性ビーグル犬にチカグレロルを単回経口投与後、*ex vivo* で ADP 誘発血小板凝集を測定したところ、チカグレロルは 90%超の阻害作用を示した。麻酔イヌに大腿動脈の内皮傷害と血管狭窄の処置を行い、チカグレロルを 30 分毎に用量漸増的に持続注入したところ、血小板凝集を介した血栓形成に起因する周期的血流減少が消失した。

ビーグル犬の血栓形成及び出血モデルで、チカグレロルの抗血栓作用と出血時間延長作用との乖離は、クロピドグレルに比し大きな乖離を示したものの、統計学的に有意な差は認められなかった。しかし、チカグレロルとクロピドグレルのいずれも、GPIIb/IIIa 拮抗薬である orbofiban 活性代謝物に比し有意に大きな乖離を示した。同モデルで更に検討を実施したところ、チカグレロルの抗血栓作用と出血時間延長作用との乖離は、チエノピリジン系誘導体であるクロピドグレルよりも大きいことが確認された（統計学的解析は実施せず）。

2.4.2.1.3 P2Y₁₂ 受容体結合の可逆性

In vitro 試験において、チカグレロルの P2Y₁₂ 受容体への結合は可逆的であることが示されたが、解離速度は比較的遅いことが示唆された。更に検討した結果、チカグレロルの K_{on} 値は低く、 $0.11 \times 10^{-3} \text{ (nmol/L)}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であり、 K_{off} は $0.87 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ であることが示された。

2.4.2.1.4 代謝物の薬理試験

ヒト循環血中主要代謝物であるヒドロキシエチル側鎖の脱離体 AR-C124910XX は、チカグレロル同様、特異的放射性リガンドのヒト洗浄血小板への結合 (K_i 値 = 2.5 nmol/L) 及びヒト多血小板血漿で ADP 誘発血小板凝集 (IC_{50} 値 = 126 nmol/L、表 1) に対して強力な阻害作用を示した。別試験で、チカグレロル及び AR-C124910XX のヒト、ラット及びマーモセット全血における ADP 誘発血小板凝集阻害作用を検討したところ、いずれの薬物も同程度の活性を示した。一方、尿中主要代謝物である AR-C133913XX は、明らかな活性を示さなかった。

2.4.2.2 副次的薬理試験

各種受容体、酵素及びトランスポーターに対する *in vitro* のスクリーニングにより、チカグレロル及び AR-C124910XX の P2Y₁₂ 受容体に対する選択性を検討した。顕著な活性を示した標的分子を表 2に要約する。

P2Y₁₂ 受容体に対する作用以外で認められた最も強力な作用は、アデノシントランスポーターである受動拡散型ヌクレオシドトランスポーター（以下、ENT1）によるアデノシン取り込みの阻害作用であった (K_i 値 = 41 nmol/L)。ENT1 に対する親和性は、アデノシン取り込み阻害薬であるジピリダモール (K_i 値 = 2.6 nmol/L) に比較して、10 倍以上弱かった。イヌを用いた *in vivo* 試験から、チカグレロルは 4~13 $\mu\text{mol/L}$ の血漿中濃度で、ジピリダモールと同様に、内因性及び外因性のアデノシン誘発冠血流量増加を増強した。イヌの心筋梗塞モデルの成績から、チカグレロル投与により梗塞領域が縮小することが示された。同試験で、クロピドグレルは血小板凝集をほぼ完全に阻害し、チカグレロルに比し有意な出血時間延長作用を示したものの、梗塞領域に対する影響は認められなかった。*In vitro* 試験において、ヒト全血に添加したアデノシンの半減期を、チカグレロルが濃度依存的に延長させたことから、血小板上に発現するアデノシン A_{2A} 受容体を介したアデノシン誘発抗血小板作用を増強する可能性が考えられる。同試験において、ヒト全血に添加したアデノシンの消失時間に対するチカグレロルの最小有効濃度は 1 $\mu\text{mol/L}$ であった。以

上より、*in vitro* 試験で確認されたチカグレロルのアデノシン取り込み阻害作用が、臨床においても発現する可能性が示唆される。

表 2 *In vitro* 試験系におけるチカグレロル及び AR-C124910XX の活性

	K _i 値又は IC ₅₀ 値の平均値 (μmol/L)			
	チカグレロル		AR-C124910XX	
	K _i 値	IC ₅₀ 値	K _i 値	IC ₅₀ 値
アデノシントランスポーター (ENT1)	0.041	0.2		
ドパミントランスポーター	0.2	0.1		
アデノシン A ₃ 受容体	0.2	6.4	0.2	5.6

チカグレロルの P2Y₁₂ 受容体に対する親和性 (K_i 値 = 2.0 nmol/L) から 100 倍以下の選択性 (K_i 値 ≤ 200 nmol/L) を示した標的分子を示す。

2.4.2.3 安全性薬理試験

覚醒成熟雄性ラット及び麻酔成熟雄性ビーグル犬を用いて安全性薬理試験を実施し、中枢神経系、末梢及び自律神経系、心血管系、呼吸系、消化管系、並びに腎機能に対する望ましくない急性の薬理作用を評価した。

チカグレロルは hERG チャンネルを発現させた CHO 細胞で hERG チャンネルを阻害し、その IC₅₀ 値は 1.72 μmol/L であった。チカグレロルの単回投与は 100 mg/kg までの用量で、麻酔イヌの心血管系（十二指腸内投与）、並びにラットの末梢及び中枢神経系（経口投与）に対して明らかに有害な作用を示さなかった。10 及び 100 mg/kg の用量で、呼吸パラメータ（呼吸数増加、呼気時間短縮）及び腎機能（ナトリウム及び塩素排泄量の増加、尿 pH 上昇）の変化が認められたものの、これらは予定臨床用量に影響を及ぼす程の懸念はないと考えられた。1 及び 10 mg/kg の用量で消化管系に影響を及ぼさなかったものの、高用量 100 mg/kg で腸管輸送を低下させた。

2.4.2.3.1 呼吸機能に対する作用

チカグレロル投与に伴う呼吸困難は、海外臨床試験（DISPERSE 試験及び DISPERSE2 試験）で最初に認められた。呼吸器系への影響はラットの安全性薬理試験で確認された。そのため、呼吸困難の発現率の増加が、心筋組織の傷害部位から産生されたアデノシンによる気管支アデノシン受容体の活性化により発現したと推察し、ラットを用いて更に検討した。しかしながら、ラットにチカグレロルを投与した一連の試験で、前述の呼吸器系への影響と一致した成績は得られなかった。また、ラットを用いた試験において、アデノシン受容体拮抗薬である 1,3-dipropyl-8-p-sulfophenylxanthine（以下、DPSPX）は呼吸刺激作用を示したものの、DPSPX とチカグレロルとの併用投与の作用に一貫性がなく、用量依存性も認められなかった。これらの成績から上述の仮説に関連した明確な結論は得られなかった。

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 吸収

ラットを用いた毒性試験における反復投与後のチカグレロルの曝露量は、用量比を上回って増加した。イヌを用いた毒性試験における反復投与後のチカグレロルの曝露量は、ほぼ用量の増加に比例して増加した。ラット及びマーモセットにおける経口バイオアベイラビリティは、*in vivo* でそれぞれ約 90%及び約 40%であった。ラットではチカグレロルへの曝露量が概して雄より雌のほうが高かったが、ラット以外の動物種で性差は認められなかった。チカグレロル及びその活性を保持する代謝物 AR-C124910XX はいずれも P-糖蛋白質 (Pgp) の基質であり、弱い阻害剤でもある。

2.4.3.2 分布

ラット及びマーモセットにおける定常状態の分布容積は、それぞれ 4.8 及び 3.7 L/kg と算出された。

2.4.3.2.1 血漿蛋白結合

チカグレロルの血漿蛋白結合率は試験に用いたいずれの動物種においても高く、血漿中の非結合型分率は 0.7% (マウス) ～1.0% (イヌ) の範囲にあった。代謝物 AR-C124910XX の非結合型分率は 0.3% (ウサギ) ～2.0% (マウス) の範囲にあった。ヒト血漿中におけるチカグレロル及び代謝物 AR-C124910XX の非結合型分率は、それぞれ 0.6%及び 0.1%であった。全体として、チカグレロル及び代謝物 AR-C124910XX はいずれも高い蛋白結合率を示した。

2.4.3.2.2 組織分布

ラットに放射能標識したチカグレロルを経口投与したとき、放射能は広範に分布し、放射能濃度が最も高かったのは肝臓、腎臓、副腎、下垂体及び甲状腺であった。脳における放射能濃度は非常に低かった。すべての組織において放射能の消失は比較的速やか ($t_{1/2}$: 3～10 時間) で、有色皮膚及び眼球を含むいずれの組織への残留も認められなかった。¹⁴C-チカグレロルを投与したとき、放射能は胎盤に分布したが、胎盤から胎児への明らかな移行は認められなかった。

2.4.3.3 代謝

2.4.3.3.1 *In vivo* 代謝

主要代謝経路は毒性試験に用いた動物種間で定性的に同様であり、臨床試験でみられた代謝経路とも同様であった。ヒドロキシエチル側鎖の脱離により、活性を保持する代謝物 AR-C124910XX が形成され、ジフルオロフェニル-シクロプロピル基の脱離により AR-C133913XX が形成される。検出されたその他の微量代謝物としては、チカグレロル、AR-C124910XX 及び AR-C133913XX の更なる酸化代謝物又はグルクロン酸抱合体、また水酸化や抱合の後にヒドロキシ

エチル側鎖及びジフルオロフェニル-シクロプロピル基の両方が脱離した代謝物が検出された。チカグレロルのカルボン酸も検出された。チカグレロルの *in vivo* 推定代謝経路を図 1に要約する。

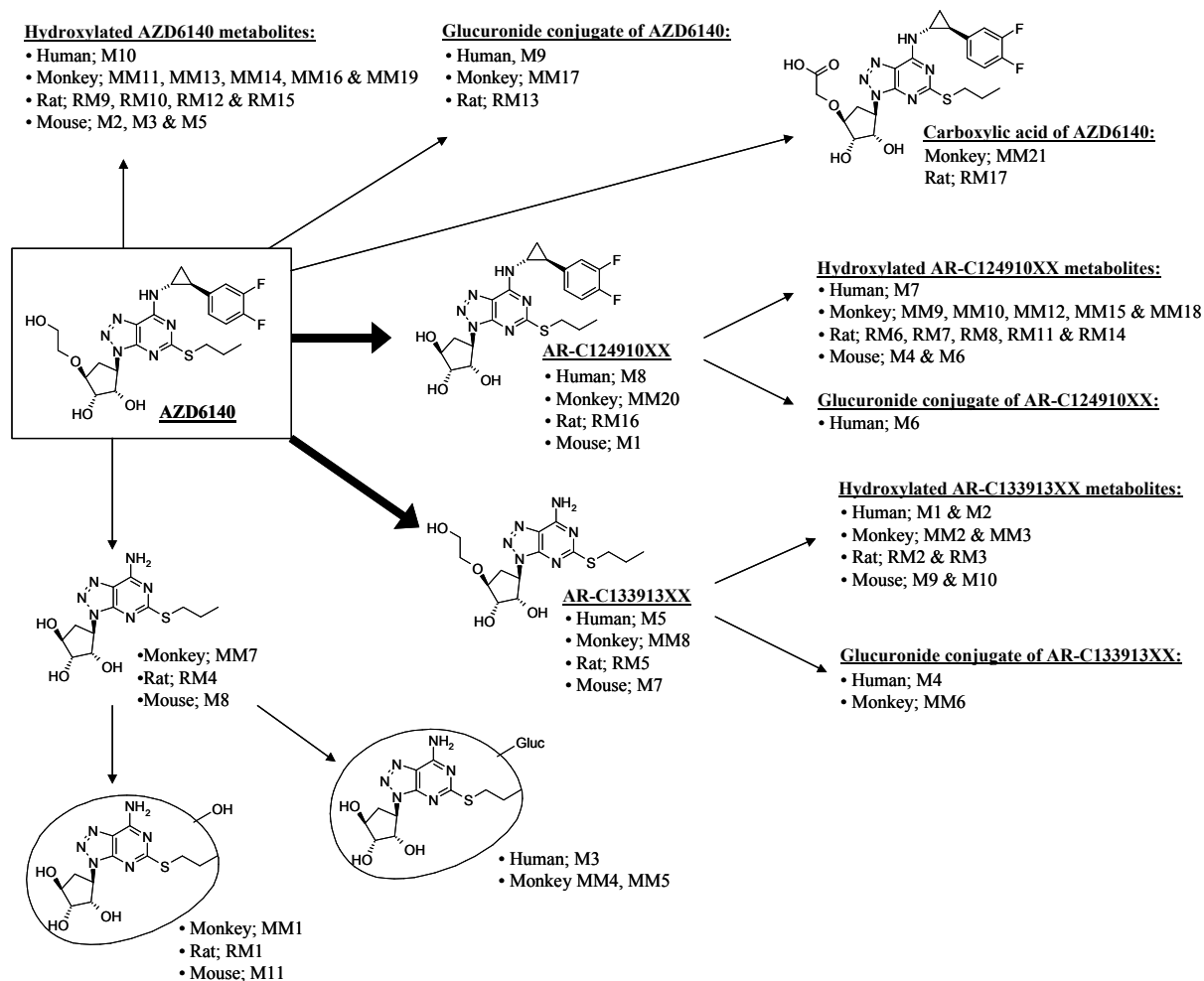


図 1 チカグレロルの *in vivo* 推定代謝経路

2.4.3.3.2 チカグレロルの代謝に關与する CYP 酵素の同定

In vitro の検討において、チカグレロルの代謝に關与する主要なチトクローム P450 (CYP) 酵素は、CYP3A4 及び CYP3A5 であった。CYP3A4 は AR-C124910XX の形成に關与する主要な酵素であり、AR-C124910XX の更なる代謝にも關与した。その他の CYP 酵素はチカグレロルの代謝にそれほど大きくは關与しなかった。

2.4.3.3.3 酵素の誘導及び阻害

ラットにおいてチカグレロルは肝 CYP 酵素を軽度誘導した。チカグレロルを雌雄のラットに 20、80 又は 300 mg/kg/日の用量で 1 カ月間投与したとき、肝臓における CYP1A2、2B、2C、2E1、2A、3A 及び 4A 活性の上昇が認められた。典型的な CYP 誘導剤による誘導の程度と比較すると、本薬による誘導は生物学的に意義のないものと考えられた。

1 カ月間の探求的試験においてチカグレロルの酵素誘導の可能性が示された。180 mg/kg/日の用量で雌ラットの肝臓において CYP1A1/2 及び CYP4A1 の僅かな増加が認められた。この誘導は投与 1 週間後で認められ、試験終了時にも認められた。この誘導は 3 カ月間の探求的試験でも認められ、180 mg/kg/日の用量で肝臓における CYP1A1/2 の発現量が増加した。

これに対して、ヒト肝細胞ではチカグレロル又は AR-C124910XX による CYP1A1、1A2 及び 3A4 の誘導は認められなかった。CYP2B6 及び CYP2C9 の活性に対しては僅かに影響が認められた。

ヒトミクロソームを用いた *in vitro* 試験では、チカグレロル及び／又はその主要代謝物は CYP2C9 及び CYP2D6 の活性を中等度に阻害し、CYP3A5 も中等度に阻害した。CYP3A4 については評価に用いた基質により異なり、活性化又は中等度の阻害を示した。チカグレロルは CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C19 及び CYP2E1 に対して阻害傾向を示さなかった。

雌ラットから調製した肝ミクロソームを用いた *in vitro* 試験において、チカグレロルはテストステロンの固有クリアランスを阻害し、その IC₅₀ は 12 µmol/L であった。ヒト肝ミクロソームを用いた同様の試験においてもチカグレロルはテストステロンの固有クリアランスを阻害し、その IC₅₀ は 23 µmol/L であった。ラット 6 カ月間反復投与毒性試験の高用量群における血漿中濃度は、肝ミクロソームにおける固有クリアランスを阻害する IC₅₀ 値と同程度かそれ以上の濃度を示した。それに対し、ヒトの申請用量における最高血漿中濃度は、ヒト肝ミクロソームにおけるテストステロンの固有クリアランスを阻害する IC₅₀ 値より著しく低かった。

2.4.3.4 排泄

非臨床試験に用いた動物種における主排泄経路は、放射能標識したチカグレロルの投与経路（経口又は静脈内）を問わず糞中排泄であり、胆汁中排泄によるものと考えられた。胆管カニュールを施したラットにおいて、投与後 24 時間以内に総放射能の 70%超が胆汁中に排泄された。マウス及びラットにおける糞中排泄はそれぞれ 90%及び 80%を超えており、マーモセットでは約 60%であった。これらの動物種における放射能の尿中排泄率は、それぞれ約 2%、5%及び 10%であった。

ヒトを含むすべての動物種において、糞中に排泄された放射能の大部分は概してチカグレロル及び代謝物 AR-C124910XX であった。尿中に排泄された放射能の大部分は AR-C133913XX であったが、例外的にマウスでは未変化体が最も多く認められた。

卵母細胞を用いた *in vitro* 試験で、チカグレロル、AR-C124910XX 及び AR-C133913XX は、有機アニオントランスポーター3 (OAT3) を介した ¹⁴C-尿酸塩の取り込みを阻害した。また *in vitro* 評価系で、AR-C124910XX は有機アニオントランスポーター1 (OAT1) を介した取り込みも阻害した。3 つの化合物のすべてが、尿酸塩トランスポーター1 (URAT1) 遺伝子導入 HEK293 細胞における URAT1 を介した ¹⁴C-尿酸塩の取り込みに対して弱い阻害作用を示した。ヒト腎臓において OAT1 及び OAT3 は尿酸塩分泌を媒介し、URAT1 はヒト腎臓における尿酸塩の再吸収に関与する。ヒト近位尿細管細胞の単層膜を介した二方向性輸送試験において、これら化合物の添加

により正味の尿酸塩分泌は阻害され、基底膜側に添加したときに正味の尿酸塩分泌は有意に阻害された。

放射能標識したチカグレロルを授乳期のラットに投与したところ、乳汁中に母動物の血漿中濃度よりも顕著に高い濃度の総放射能が確認された。乳汁中に認められた放射能の大部分は未変化体のチカグレロルであったが、AR-C124910XX 及び AR-C133913XX もある程度認められた。

2.4.4 毒性試験

チカグレロルのヒト投与での安全性を担保するために、*in vivo* 及び *in vitro* 毒性試験の包括的なプログラムを実施した。マウス、ラット、ウサギ及びマーモセットを用いた単回及び／又は反復投与毒性試験を実施し、一部の反復投与毒性試験では回復性試験群をおいた。試験に用いたすべての動物種においても薬理作用がみられると考えられた。イヌでの活性を保持する代謝物 AR-C124910XX の産生量がヒトと大きく異なることから、非げっ歯類動物種としてイヌは使用しなかった。チカグレロル及び AR-C124910XX 並びに最終製剤中の不純物について遺伝毒性試験を実施した。チカグレロルのがん原性の有無を検討するため、マウス及びラットを用いた 2 年間投与試験を実施した。雌ラットにみられた腫瘍の発現頻度増加の機序を検討するため、一連の *in vivo* 及び *in vitro* 試験を実施した。チカグレロルの生殖発生毒性試験をラット及びウサギを用いて実施した。

2.4.4.1 トキシコキネティクス

試験に用いたいずれの動物種においても、曝露量は用量の増加に伴って増加した。反復投与によるチカグレロルの曝露量の増加は、ラット及びマーモセットでは用量に比例しており、マウス及びウサギでは用量比を下回っていた。明らかな毒性がみられた最高用量における曝露量には、用量比例性からの逸脱が散見された。これは恐らく、これらの高用量でみられた消化管への影響によるものと考えられる。曝露量には明らかな性差はみられなかったが、例外としてラットでは概して雌におけるチカグレロルの曝露量が雄より高く、AR-C124910XX の曝露量が雄より低かった。6 カ月間反復投与毒性試験（試験 456930 (0400PR)）において、この差は高用量でより顕著であった。

ヒトと毒性試験に用いた動物の曝露量の比較（2.6.6.9 項、表 14 参照）は、総曝露量（結合型+非結合型）に基づいて行った。蛋白結合率はいずれの動物種においても高く、最も高いのはヒトである。したがって、総曝露量に基づいて曝露量比を算出することにより、より安全な側に立ったリスク評価となると考えられる。

2.4.4.2 急性毒性試験

チカグレロルの急性毒性は低いと考えられる。マウス及びラットを用いた単回投与毒性試験の結果において、チカグレロルの強制経口投与による忍容性は良好で、いずれの動物種においても、2000 mg/kg（試験に用いた最高用量）までの用量で死亡は認められなかった。主要な所見はラットの最高用量でみられた一過性の体重減少のみであった。

マーモセットを用いた最大耐量試験（GLP 条件下で実施）の結果から非げっ歯類動物種における急性毒性を評価した。この試験では、チカグレロルを 2 匹の動物に 1600 mg/kg までの用量で 2

日間以上の間隔をおいて単回漸増投与した。死亡及び一般状態の変化はみられず、いずれのパラメータにも明らかな変化は観察されなかった。

2.4.4.3 反復投与毒性試験

2.4.4.3.1 マウス

チカグレロルの反復投与毒性を 14 日間用量設定試験及び 3 カ月間用量設定試験で検討した。750 mg/kg/日以上で投与初期に死亡がみられ、体重及び摂餌量の減少も認められた。これらの用量でみられた主要な一般状態の変化は消化管への影響に関連するものであり、剖検では腹部膨満及び胃重量の増加が認められた。これに伴う消化管の組織学的変化はみられなかった。肝臓重量の増加が 250 mg/kg/日以上でみられ、小葉中心性肝細胞肥大が雄では 250 mg/kg/日以上、雌では 750 mg/kg/日で観察された。750 mg/kg/日では ALP 値の増加も認められた。

750 mg/kg/日以上で投与した用量では、網状赤血球数増加等の臨床検査値の変化を伴う脾臓重量増加及び脾造血増加がみられたことから潜在性の出血が示唆された。雌雄でみられた腎尿細管好塩基性変化に伴い、生存期間中に摂水量の増加が認められた。雄でみられた副腎重量増加に伴って副腎皮質細胞肥大が認められた。一部の雌では卵巣重量減少がみられ、これに伴って間質細胞肥大及び黄体の欠如が認められた。250 mg/kg/日以上で一部の雄にみられた精細管上皮変性（軽微から中等度）を反映する器官重量の変化はみられなかった。250 mg/kg/日（ヒトにおける治療時の曝露量と比較して 13 倍の安全域）以下の用量における忍容性は概して良好で、対照群と同程度の所見がみられたが、3 カ月間反復投与毒性試験では網状赤血球数及び赤血球パラメータに変化がみられたため、無毒性量を確認できなかった。

2.4.4.3.2 ラット

チカグレロルの反復投与毒性を漸増投与用量設定／5 日間反復経口投与毒性試験並びに 1、3 及び 6 カ月間反復経口投与毒性試験で検討した。1 カ月間反復投与毒性試験においては、300 mg/kg/日で投与関連の死亡（切迫屠殺）が認められた。いずれの試験においても、60 mg/kg/日以上で投与した用量で、一般状態の変化、摂餌量減少、体重減少及び体重増加量減少がみられた。主要標的器官は消化管であり、胃重量増加及びこれに伴う病理組織学的な刺激性変化として、びらん、扁平上皮過形成、浮腫及び炎症が、60 mg/kg/日以上で投与した用量で観察された（ヒトにおける治療時の曝露量と比較して 4～9 倍の安全域）。これらの変化は休薬により回復した。

60 mg/kg/日では肝臓重量の増加がみられたものの一貫性がなかった。しかし、より高い用量では一貫性のある肝臓重量の増加が認められ、これに伴って ALP 及び ALT の軽度の増加並びにコレステロール及びトリグリセリドの増加がみられた。ビリルビンの増加が 300 mg/kg/日で認められた。これに伴う組織学的変化は、60 mg/kg/日を上回る用量での小葉中心性肝細胞肥大以外には観察されなかった。これらの所見は、チカグレロルの高用量に反応して、恐らく酵素誘導を伴う肝機能の適応性の変化が起こっていたことを示唆すると考えられる。このことは、細胞・組織の変性を示唆する所見がみられず、休薬によりすべての変化に回復がみられたことによっても裏打ちされる。

60 mg/kg/日では副腎重量の増加がみられたものの一貫性のある変化ではなかった。しかし、より高い用量ではこれが一貫性のある変化として観察された。病理組織学的検査では 80 mg/kg/日以上で空胞化又は炎症性細胞巣がみられ、300 mg/kg/日では皮質細胞肥大が認められた。これらの

変化は休薬により回復した。これらの所見はチカグレロルの高用量に伴うストレスに関連する可能性があるが、チカグレロルは *in vitro* で培養副腎細胞におけるコルチコステロン合成を阻害することが確認されていることから、副腎におけるステロイド合成阻害の結果である可能性もある。この所見はこれらの用量でみられた摂水量及び尿量の増加と一致しており、アルドステロン濃度が変化した可能性が示唆される。

300 mg/kg/日の用量での 1 カ月間の投与により肺胞マクロファージ集簇がみられ、より長期間の投与では 60 mg/kg/日以上用量でも同様所見が認められた。この所見は 1 カ月未満の試験では観察されなかった。この所見の重症度には投与期間に伴う増加はみられず、休薬によって回復が認められた。

血液学的パラメータの変化として、ヘモグロビン、赤血球数及び／又はヘマトクリットの減少並びに網状赤血球数及び血小板数の増加が認められた。剖検では明らかな出血はみられなかったが、胃の刺激性変化を伴う出血及び腸間膜リンパ節の赤血球貪食の所見がみられたことから潜在的出血が示唆された。これは薬理作用である血小板凝集阻害作用に一致するものである。

2.4.4.3.3 マーモセット

チカグレロルの反復投与毒性を漸増投与／5 日間反復投与用量設定試験並びに 1、3 及び 12 カ月間反復経口投与毒性試験で検討した。マーモセットにおける主要な所見は消化管に対する影響に関連するものであり、その多くはこの動物種のハンドリング（動物取り扱い手技等）に関連していた。生存動物では、これらの変化は休薬により回復した。消化管の変化による二次的な変化を除いては、投与関連の変化はほとんど認められなかった。1600 mg/kg までの用量での単回漸増投与による忍容性は良好で、1600 mg/kg/日の用量での 5 日間連日投与による投与関連の変化は認められなかった。死亡（発見時死亡又は切迫屠殺）は、1 カ月間反復投与毒性試験では 2000 mg/kg/日の用量で 18 及び 22 日目にみられたが、3 カ月間反復投与毒性試験では、より低い用量（500 mg/kg/日）で、より早い時期（最初の 1 週間）に認められた。いずれも一般状態観察では、死亡に先立って活動性低下、食欲不振、下痢及び急速な体重減少が認められた。1 カ月間反復投与毒性試験と 3 カ月間反復投与毒性試験における死亡を含む毒性変化の発現パターンにみられた不一致の理由を検討するために実施した 2 つの考察試験の結果、対照群とチカグレロル投薬群のいずれにおいても消化管病変がみられること、溶媒の粘度や投与容量によっても消化管病変の程度に差がみられること、従って、消化管病変は必ずしもチカグレロルの投与に直接関係するものではなく、ハンドリング及び溶媒の投与量や物理的性状によっても左右されることが示された。ハンドリングを改善してもなお、12 カ月間反復投与試験では、すべての投与群で体重減少及びこれに続く消化管の変化を伴う死亡がみられたが、その多くは高用量群であった。死亡に至った動物ではヘモグロビン、赤血球数及びヘマトクリットの減少が認められた。マーモセットはハンドリングや拘束によるストレスによって容易に消化管障害を発症することが知られており、チカグレロルの反復投与毒性試験で観察された所見はこの特徴と一致するものであるが、その発現頻度及び重症度はチカグレロルの投与により増加した。すなわち、マーモセットで頻繁に観察される消化管障害がチカグレロルの投与により増悪したと考えられ、少なくとも部分的にはその薬理作用である血小板凝集阻害作用に関連していると考えられる。

2.4.4.4 遺伝毒性試験

チカグレロル及び活性を保持する代謝物 AR-C124910XX は *in vitro* の Ames 試験及びマウスリンフォーマ試験で遺伝毒性を示さず、チカグレロルは *in vivo* のラット小核試験で遺伝毒性を示さなかった。

2.4.4.5 がん原性試験

チカグレロルの強制経口投与によるがん原性試験を、マウスを用いて 50、100 及び 250 mg/kg/日の用量で、また、ラットを用いて雄では 20、60 及び 120 mg/kg/日、雌では 20、60 及び 180 mg/kg/日の用量で実施した。ラットでは、反復投与試験の投与期間が長くなるにつれて忍容性に若干の性差がみられたことから、雌雄で異なる最高用量を設定した。

2.4.4.5.1 マウス

マウスでは、最高用量 250 mg/kg/日までの用量でがん原性を示唆するような変化は認められなかったことから、チカグレロルはマウスにおいてがん原性を示さないと結論された。

2.4.4.5.2 ラット

雄ラットではがん原性を示唆するような変化は認められなかった。雌ラットでは、高用量において、子宮腫瘍（腺癌）の発現頻度増加、肝腺腫の発現頻度増加、乳腺線維腺腫の発現頻度減少並びに下垂体の腺腫及び過形成の発現頻度減少といった腫瘍発現パターンの変化が認められた。

高用量（180 mg/kg/日）雌において、子宮腫瘍（腺癌）の発現頻度増加、乳腺腺腫の発現頻度減少及び肝腺腫の軽度の増加といった腫瘍発現パターン変化が認められた。高用量群雌の死亡例では、統計学的に有意な下垂体腺腫（前葉）の減少がみられた。さらに、高用量群雌の全例（死亡例及び生存例）で、下垂体の腺腫と過形成を合わせた発現頻度の低下が認められた。また、高用量群の雌では卵巣における性索間質の各種腫瘍の合計の発現頻度に増加がみられたが、個々の腫瘍には統計学的に有意な増加は認められなかった。

これらの所見並びに子宮重量増加の欠如及び卵巣間質細胞空胞化・嚢胞の増加といった所見を総覧すると、高用量のチカグレロルを投与した雌において内分泌系ホメオスタシスに混乱が生じていることが示唆された。そして、この状態が長期に及ぶことによって子宮腫瘍の発現頻度が増加したという仮説が導かれた。そこで、雌ラットに高用量のチカグレロルを投与したときに起こりうる様々な内分泌系変化を検討する目的で、いくつかの機序探索試験が実施された。これらの探索試験の結果、ひとつの極めて重要な所見として、子宮腫瘍の増加がみられたのと同じ用量でチカグレロルを投与すると、プロラクチン分泌がほぼ完全に抑制されることが判明した。

肝細胞腺腫の発現頻度は、試験実施施設における 5 年間背景値をわずかに上回って増加し、傾向検定（Peto 解析）の結果、腺腫と癌を合わせると陽性の判定が示された。

チカグレロルの一般毒性試験では、肝臓の変化として、肝臓重量増加、肝酵素誘導、ALT の軽度の増加（1 及び 3 カ月間反復投与毒性試験の雌では 180 mg/kg/日以上、6 カ月間反復投与毒性試験の雌雄では 60 mg/kg/日以上）、ALP の軽度の増加（180 mg/kg/日以上）及び小葉中心性肝細胞肥大が認められているが、ALT 及び ALP の増加を説明できる肝細胞障害の組織学的変化像は認められなかった。従ってこれらの変化は、本薬の肝臓への負荷に対する適応的な酵素誘導反応の結果であると考えられる。げっ歯類の肝臓では、これに伴ってしばしば腺腫及び癌の増加

が認められることが知られている。ラットがん原性試験における肝腫瘍の増加は、軽度の酵素誘導反応を反映したものと考えられる。

2.4.4.6 生殖発生毒性試験

チカグレロルの生殖発生毒性は、200 mg/kg/日までの用量で実施した雌ラットの受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、6 カ月間反復投与毒性試験の一部として 180 mg/kg/日までの用量で実施した雄ラットの授胎能に関する試験、ラットで 300 mg/kg/日、ウサギで 63 mg/kg/日までの用量で実施した胚・胎児発生に関する試験並びに 180 mg/kg/日までの用量で実施したラットの出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験によって評価した。

これらの生殖発生毒性試験では、母動物で忍容性が示される曝露量では、母動物及び出生児に対する生殖発生毒性の徴候はみられなかった。

2.4.4.7 幼若動物を用いた毒性試験

日本における今回の申請には小児適応は含まれていないが、将来、チカグレロルを小児患者集団に使用する可能性があることを考慮し、幼若ラットを用いた毒性試験を実施した。新生児ラットに生後 7 日より 19 日間投与した試験では、高用量群で過剰な高曝露により死亡例がみられたが、それ以外の毒性所見は軽度であった。別の試験では、投与初日の時点で 25 日齢の離乳ラットに、チカグレロルを 5 週間投与したときの影響を検討した。高用量群の 1 匹が試験中に死亡した。肺の病理学的検査で投与液の誤嚥が示唆されたが、チカグレロルが死亡に直接関与した可能性も除外できない。チカグレロルのその他の影響は軽度で、完全な回復が認められた。幼若動物を用いたこれらの試験において、成熟ラットでみられなかった新たな毒性所見は認められなかった。

2.4.4.8 不純物の安全性

主要な開始物質、中間体及び不純物の遺伝毒性試験において、唯一の遺伝毒性不純物である **チカグレロル** が認められたが、この不純物については欧米のガイドラインで定められている遺伝毒性不純物に関する TTC (threshold of toxicological concern = 毒性学的閾値：チカグレロルの臨床用量 90 mg 1 日 2 回投与の場合は原薬において **チカグレロル** と算定される) を下回るようにコントロールされている。

2.4.5 総括及び結論

チカグレロルの非臨床試験成績は、PCI が適用される ACS (不安定狭心症、非 ST 上昇心筋梗塞、ST 上昇心筋梗塞) 患者及び陳旧性心筋梗塞患者におけるアテローム血栓性イベントの抑制のための使用を支持するとともに、長期使用時の安全性を担保するものであった。

2.4.5.1 チカグレロルの薬理作用

チカグレロルに関する種々の *in vitro* 及び *in vivo* の非臨床試験成績から、チカグレロルは強力、選択的、可逆的、直接的かつ経口投与可能な P2Y₁₂ 受容体拮抗薬であることが示され、その作用機序は PCI が適用される ACS 患者及び陳旧性心筋梗塞患者におけるアテローム血栓性イベントの抑制に有効であることが裏付けられた。チカグレロルの主な作用機序は血小板上 P2Y₁₂ 受容体に対する拮抗作用であり、その作用により血小板凝集を阻害することが非臨床薬理試験で裏付けられた。また、ENT1 に対する阻害作用は、循環血中のアデノシンの半減期を延長させ、内因性のアデノシンの作用を増強させる可能性が推察される。

チカグレロルは、ヒト洗浄血小板への放射性リガンドの結合を強力に阻害し、ヒト及びラットの洗浄血小板、ヒト多血小板血漿、並びにラット、マーモセット及びヒト全血における ADP 誘発血小板凝集に対して強力な阻害作用を示した。覚醒雄性ビーグル犬にチカグレロルを投与したところ、チカグレロルは *ex vivo* で測定した ADP 誘発血小板凝集に対し阻害作用を示し、大腿動脈の内皮傷害及び血管狭窄の処置を施した麻酔イヌでは、血小板凝集による血栓形成を抑制した。チカグレロルの抗血小板作用は可逆的である一方で、チエノピリジン系抗血小板薬はプロドラッグであり、代謝活性化により生成される活性体が P2Y₁₂ 受容体に共有結合するため、その血小板凝集の阻害が血小板の寿命期間に亘り持続する点で異なっている。抗血小板作用に加えて、チカグレロルは P2Y₁₂ 受容体を介したマウス血管平滑筋細胞の血管収縮を抑制した。

P2Y₁₂ 受容体に対する作用以外で認められた最も強力な作用は、アデノシントランスポーターである ENT1 によるアデノシン取り込みの阻害作用であった (K_i 値 = 41 nmol/L)。ENT1 に対する親和性は、アデノシン取り込み阻害薬であるジピリダモール (K_i 値 = 2.6 nmol/L) に比較して、10 倍以上弱かった。イヌを用いた *in vivo* 試験から、チカグレロルは 4~13 μ mol/L の血漿中濃度で、ジピリダモールと同様に、内因性及び外因性のアデノシン誘発冠血流量増加を増強した。イヌの心筋梗塞モデルの成績から、チカグレロル投与により梗塞領域が縮小することが示された。同試験で、クロピドグレルはチカグレロルと同様に血小板凝集をほぼ完全に阻害したものの、梗塞領域に対する影響を示さなかったことから、チカグレロルによる梗塞領域減少作用は P2Y₁₂ 受容体を介するものではないことが示唆された。*In vitro* 試験において、ヒト全血に添加したアデノシンの半減期を、チカグレロルが濃度依存的に延長させたことから、血小板上に発現するアデノシン A_{2A} 受容体を介したアデノシン誘発抗血小板作用を増強する可能性が考えられる。同試験において、ヒト全血に添加したアデノシンの消失時間を延長するチカグレロルの最小有効濃度は 1 μ mol/L であった。以上より、*in vitro* 試験で確認されたチカグレロルのアデノシン取り込み阻害作用が、臨床においても発現する可能性が示唆された。

2.4.5.2 呼吸機能に対する作用

ラットの安全性薬理試験で認められた呼吸パラメータへの影響は、追試験で再現性は認められなかったものの、臨床試験で報告された呼吸困難に関連する可能性がある。非臨床試験成績から、チカグレロルは、それ自体はアデノシン受容体に対する活性は低いものの、ヒト赤血球へのアデノシン取り込みを阻害し、さらにアデノシンを介する反応を増強した。アデノシンは、ヒトへの静脈内投与により、アデノシン受容体の活性化を介して呼吸困難を引き起こし、ラットへの静脈内投与により呼吸機能パラメータを変化させる。これらの所見から、急性冠症候群患者の一部で報告された呼吸困難が、心筋組織の傷害部位から産生されたアデノシンによる肺アデノシン受容体の活性化により発現したと推察される。また、チカグレロル投与により、肺に到達するアデノシンが増加する可能性も考えられる。ラット肺で肺胞腺腫（泡沫肺胞マクロファージ）の発現率

が増加したが、この所見は 1 カ月以上高用量を投与したラットにおいてのみ認められた。一方、ラットにおける呼吸系への影響や臨床試験で報告された呼吸困難は単回又は数回の投与後に発現したことから、ラット肺胞腺腫の所見は呼吸困難の発現とは関連がないと考えられる。また、上述の肺胞腺腫発現率の増加は、高用量反復投与後に認められたこと、重症度は軽微から中等度であること、投与期間に依存して重症度が増大しなかったこと、可逆的であったこと、他の動物種では認められなかったことから、ヒトにおける安全性に懸念を示すものとは考えられない。

2.4.5.3 一般毒性

トキシコキネティクスデータから、毒性試験で使用した動物における曝露量は、チカグレロルの毒性プロファイルを評価するために十分高いものであることが示された。非臨床動物種における活性を保持する代謝物 AR-C124910XX への曝露量も十分高く、未変化体と同様に臨床での安全性に関して十分な検討を行うことができた。ヒト固有の代謝物は同定されていない。

いずれの動物種においても主な毒性標的器官は消化管であったが、作用の部位及び障害の形は動物種間で異なっていた。消化管の変化は、重度で死亡に至った場合を除いては可逆的であった。マウスで腹部膨満が観察されたが、これに伴う組織学的変化は認められなかった。ラットでは胃重量増加がみられ、粘膜びらん、扁平上皮過形成、浮腫及び炎症といった変化が、多くは上部消化管に観察された。マーモセットでは、この動物種でストレス等により高頻度に見られる腸炎に一致する小腸及び／又は大腸の変化がみられたが、一貫性を欠いていた。これらの所見は大部分の試験において投薬群及び対照群双方の動物にみられたが、チカグレロルの用量及び投与期間の長期化に伴って発現頻度及び重症度が増加した。このことから、マーモセットにおいてハンドリングや拘束のストレスによってしばしばみられることが知られている腸炎が、チカグレロルの投与により増悪したと考えられる。消化管の変化が局所的な刺激性の変化であるか又は全身薬理作用の血小板凝集阻害作用による出血増加に起因するものかは不明であるが、出血性壊死はマーモセットのみにみられ、げっ歯類では観察されなかった。他には毒性標的器官はみられず、消化管の変化を除いてマーモセットにおける安全域は大きかった。

げっ歯類では肝臓における変化がみられたが、マーモセットでは認められなかった。マウス及びラットにおいて、ALP 及び／又は ALT の増加、肝臓重量増加並びに小葉中心性肝細胞肥大が観察された。これらの所見はげっ歯類における軽度の酵素誘導に符合するものであり、ラットでは CYP 蛋白質及び活性 (CYP4A 及び CYP1A1) のわずかな増加が認められた。ラットのがん原性試験で肝腺腫の軽度の増加 (180 mg/kg/日群の雌 4/50 匹) がみられ、雌の高用量群では腺癌も 1 例認められた。これらの所見に関連する可能性がある変化として、ラットの 1 カ月間以上の反復投与毒性試験で肝臓重量の増加 (20～25%) が一貫してみられ、CYP1A1 及び 4A のわずかな誘導を伴っていたが、組織学的変化は肥大以外には認められなかった。これらの変化は、肝臓に対する本薬の負荷に対して適応的な酵素誘導反応が生じた結果であると考えられる。

潜在性出血を示唆する変化が試験に用いたすべての動物種において高用量でみられた。これらには、脾臓重量及び脾臓の造血の増加、ヘモグロビン、赤血球数及び／又はヘマトクリットの減少並びに網状赤血球数及び血小板数の増加といった臨床検査値の変化が含まれる。剖検では明らかな出血はみられなかったが、胃のびらんに伴う出血及び腸間膜リンパ節の赤血球貪食の所見が認められたことから潜在性出血が示唆される。これらの所見は、チカグレロルの薬理作用である血小板凝集阻害作用に符合する。

死亡例がみられるほど高い用量のチカグレロルを投与したげっ歯類で観察された副腎の変化は、ストレスに起因した変化である可能性もあるが、*in vitro* でみられたチカグレロルのステロイドホ

ルモン（コルチコステロン）合成阻害作用に関連している可能性もある。マウス及びラットにおいて、チカグレロルによる可逆的な副腎重量増加がみられ、副腎皮質（網状層、束状層）の空胞化又は巣状肥大を伴う場合もあった。これらの所見は、げっ歯類副腎におけるステロイドホルモン前駆体合成のホメオスタシス回復のためのフィードバック反応であることを示唆するものである。なぜなら、*in vitro* 試験において内因性 ACTH の作用が阻害作用に打ち勝つ場合があることが示されたからである。下垂体重量には影響が認められなかった。アルドステロン合成はコルチコステロンからみて下流にあり、このこともげっ歯類にみられた摂水量増加と一致している。霊長類では同様の毒性変化は観察されておらず、また、臨床試験においても副腎機能の低下又は亢進を示唆する変化は認められていない。

2.4.5.4 遺伝毒性

チカグレロル及び活性を保持する代謝物 AR-C124910XX は *in vitro* の Ames 試験及びマウスリンフォーマ試験で遺伝毒性を示さず、チカグレロルは *in vivo* ラット小核試験で遺伝毒性を示さなかった。

2.4.5.5 がん原性

チカグレロルはマウス及び雄ラットではがん原性を示唆する変化を示さなかった。雌ラットにおいて、高用量で子宮腫瘍の発現頻度増加、肝腺腫の発現頻度増加、乳腺線維腺腫の発現頻度減少並びに下垂体の腺腫及び過形成の発現頻度減少といった腫瘍発現パターンの変化（2.6.6.5.2 項参照）を誘発した。中用量以下では変化がみられず、約 7 倍の安全域が得られた。

2.4.5.5.1 肝腫瘍

高用量群の雌では、肝腫瘍の発現頻度の軽度増加が認められた。これは酵素誘導、小葉中心性肝細胞肥大及び肝臓重量の増加に関連すると考えられる。ラットでは、チカグレロルによる肝 CYP 酵素誘導が認められた。チカグレロルを雌雄のラットに 20、80 又は 300 mg/kg/日の用量で 1 カ月間投与したところ、肝臓の CYP1A2 及び 4A 蛋白質の増加がみられた。この試験で得られた肝臓の試料について更に解析した結果、肝臓の CYP1A2、2B、2C、2E1、2A、3A 及び 4A に関連する活性の増加が観察された。この酵素誘導による未変化体及び／又は代謝物への全身曝露量の変化は認められなかった。

チカグレロルの酵素誘導能を 1 カ月間の探求的試験で確認したところ、雌ラットにおいて、180 mg/kg/日の用量で CYP1A1/2 及び CYP4A1 値の増加が認められた。この誘導作用は投与後 1 週間及び試験終了時に観察された。この誘導能について更に 3 カ月間の探求的試験で検討したところ、180 mg/kg/日の用量で肝臓の CYP1A1/2 の発現増加がみられ、これに伴って子宮の CYP1A1/2（蛋白質及び mRNA）の発現増加も認められた。肝臓又は子宮における CYP1B1 値（mRNA）の増加は検出されなかった。ラットがん原性試験における肝腫瘍の増加は、軽度の酵素誘導反応を軽度に反映したものである。肝腺腫は発現頻度が低く、高用量群の雌のみにみられ、適応性の肝酵素誘導反応による二次的な変化と考えられることから、ヒトにおいて問題となるものではないと考えられた。

2.4.5.5.2 子宮腫瘍

反復投与毒性試験及びがん原性試験において、副腎皮質及び卵巢間質細胞の肥大及び空胞化、卵巢嚢胞の増加、性周期の変化並びに腫瘍発現パターンの変化といった所見が認められたことから、高用量群の雌ラットで持続的な内分泌不均衡が生じたとの仮説が得られた。この仮説を検証するために実施したメカニズム検討試験により、高用量のチカグレロルが内分泌系におけるいくつかの変化を同時に誘発することが示された。これらのメカニズム検討試験ではテストステロン及びテストステロンクリアランスへの影響（2.4.5.5.3項参照）が示されたが、エストロゲンへの直接作用又はアロマターゼ活性への影響は認められなかった。また、後述するプロラクチン放出に対する影響を調べた試験の結果から、チカグレロルが下垂体からのプロラクチン放出に対して抑制作用を示すことが確認された。これにより、雌ラットにおける子宮腫瘍の増加及び関連する腫瘍パターンの変化が明解に説明できる。

経時変化を検討する試験において、発情前期におけるテストステロンの増加が認められた。この所見は *in vitro* でみられたテストステロンクリアランスに対する阻害作用に関連している可能性がある。雌ラットの肝ミクロソームを用いた *in vitro* 試験により、テストステロンの固有クリアランスはチカグレロルにより阻害されることが示され、その IC_{50} は $12 \mu\text{mol/L}$ であった。ヒト肝ミクロソームを用いた同様の試験では、チカグレロルによりテストステロンの固有クリアランスが阻害され、その IC_{50} は $23 \mu\text{mol/L}$ であった。ラット 6 カ月間反復投与毒性試験の高用量群における血漿中濃度は、肝ミクロソームの固有クリアランスに対する阻害作用の IC_{50} を大幅に超えていた。対照的に、ヒトの治療用量における最高血漿中濃度は、ヒト肝ミクロソームにおけるテストステロンの固有クリアランスに対する阻害作用の IC_{50} よりはるかに低かった。このことから、この作用は毒性試験及びがん原性試験で使用した高用量のみでみられるものと考えられる。文献によると、子宮にはアンドロゲン受容体が発現しており（Pelletier 2000、Pelletier et al 2000）、テストステロンは卵巢摘出ラットの子宮内膜及び間質のいずれにおいても刺激性を示す可能性がある（Nantermet et al 2005）。機序探索のための 3 カ月間反復投与試験（試験 1800KR）では、高用量の 180 mg/kg/日 においても卵巢非摘出ラットで刺激作用は示されなかった。子宮においてアンドロゲン駆動による組織増殖を示唆する変化がみられるか否か、またチカグレロル関連の内分泌不均衡の発現に伴って子宮の前腫瘍性変化が検出されるか否かを検討する試験を並行して実施した。この試験は期間が短かったこと、また指標として用いた子宮の遺伝子発現変化がマーカーとしての感度が十分でなかったことなどから、子宮における組織増殖促進作用の確実なエビデンスを示すことができなかった。

子宮癌の発現頻度増加に伴って、乳腺線維腺腫の減少並びに下垂体腺腫及び過形成の発現数の減少が認められた。このような腫瘍パターンの変動は、ラットにおいて食餌制限を行った際にみられる変化及び高プロラクチン血症治療薬 bromocriptine でみられる変化と一致するものであり、プロラクチンの低下によってこれらの変化が誘発されることが広く知られている（Roe et al 1995; Griffith 1977; Keenan et al 1994; Keenan et al 1995a; Keenan et al 1995b）。また、食餌制限条件下における子宮腫瘍発現頻度と体重との間には逆の相関関係があることも報告されている（Roe et al 1995）。チカグレロルのラット 2 年間がん原性試験における顕著な体重増加量の減少（33%）は、高用量群の雌のみに認められた。ラット下垂体における過形成及び腺腫の多くはプロラクチン産生細胞に由来し、ラットがん原性試験でみられた下垂体の腺腫及び過形成並びに乳腺線維腺腫の発現頻度低下はプロラクチン駆動の低下に一致するものである。この腫瘍パターンの原因がプロラクチン駆動の低下であるという見解を裏付ける重要なエビデンスとして、この腫瘍発現パターン変化を生じたのと同じ用量（ 180 mg/kg/日 ）のチカグレロルで、雌ラットにおけるプロラクチン放出がほぼ完全に抑制された。このプロラクチン分泌抑制は、副次的な薬理作用によるドパミ

ントランスポーターの阻害によるものと考えられる。この作用によりドパミンが増加し、それが下垂体からのプロラクチン放出を抑制すると考えられる。プロラクチンはラットにおいて卵巣でのステロイド産生に直接作用（黄体刺激作用）を有するが、この作用は霊長類では認められない。したがって、ラットにおいてプロラクチンが低下すると、性周期における拮抗されないエストロゲン相が相対的に増加する。長期的には、これが子宮腫瘍の発生に寄与すると考えられる。ヒトを含む霊長類においては黄体刺激は黄体刺激ホルモンによってなされ、プロラクチンによる黄体刺激作用は認められないため、このメカニズムはヒトにおいては重要でないと考えられる。したがって、ラットがん原性試験でみられた子宮腫瘍の所見はヒトには関連性のないものとみなされる。

2.4.5.5.3 がん原性試験のまとめ

一連の試験結果及び考察試験から得られたデータにより、子宮癌の発現頻度の増加は、高用量群の雌のみでみられた持続的な内分泌不均衡により生じたとする仮説が裏付けられた。これらの変化に関連があると考えられるメカニズムのいくつかは（最も重要なのはチカグレロルのプロラクチン放出抑制作用）、高用量群の雌ラットにおいてのみみられるものであり、ヒトの治療用量では問題となるものではない。肝腫瘍の増加は観察された酵素誘導に関連するものと考えられる。チカグレロルには変異原性はみられず、がん原性試験の無影響量である中用量における安全域は約 7 倍である。マウス又は雄ラットではがん原性は認められなかった。これらのデータを総合すると、チカグレロルはヒトにおける発がんのリスクを示さないと結論される。

2.4.5.6 生殖発生毒性

生殖発生毒性試験の結果により、忍容性のみられる曝露量では胎児、出生児又は成熟動物に対する生殖発生毒性リスクはないことが示唆された。これに基づく、チカグレロルは治療時の曝露量において生殖に影響を及ぼさないと考えられる。

2.4.5.7 結論

In vitro 及び *in vivo* において包括的な非臨床試験を実施し、臨床使用の裏付けとしてチカグレロルの非臨床におけるプロファイルを評価した。以上のチカグレロルに関して得られた試験結果から、チカグレロルは安全な抗血小板薬として使用できることが裏付けられた。

2.4.6 参考文献

Griffith 1977

Griffith RW, Bromocriptine and uterine neoplasia, British Medical Journal 1977;2:1605.

Keenan et al 1994

Keenan KP, Smith PF, Hertzog P, Soper K, Ballam GC, and Clark RL. The Effects of Overfeeding and Dietary Restriction on Sprague-Dawley Rat Survival and Early Pathology Biomarkers of Aging, Toxicologic Pathology 1994;22(3):300-315.

Keenan et al 1995a

Keenan KP, Soper KA, Smith PF, Ballam GC and Clark RL. Diet, Overfeeding, and Moderate Dietary Restriction in Control Sprague-Dawley Rats: I. Effects on Spontaneous Neoplasms, Toxicologic Pathology 1995;23:269-286.

Keenan et al 1995b

Keenan KP, Soper KA, Hertzog PR, Gumprecht LA, Smith PF, Mattson BA, Ballam GC, Clark RL. Diet, Overfeeding, and Moderate Dietary Restriction in Control Sprague-Dawley Rats: II. Effects on Age-Related Proliferative and Degenerative Lesions, Toxicologic Pathology 1995b;23:287-302.

Nantermet et al 2005

Nantermet PV, Masarchia P, Gentile MA *et al*: Androgenic induction of growth and differentiation in the rodent uterus involves the modulation of estrogen-regulated genetic pathways. Endocrinology 2005;146:(2): 564-578.

Pelletier 2000

Pelletier G: Localization of androgen and estrogen receptors in rat and primate tissues. Histol. Histopathol 2000;15(4):1261-1270.

Pelletier et al 2000

Pelletier G, Labrie C, Labrie F: Localization of oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and androgen receptors in the rat reproductive organs. J. Endocrinol 2000;165(2):359-370.

Roe et al 1995

Roe FJ, Lee PN, Conybeare G, Kelly D, Matter B, Prentice D and Tobin G. The Biosure Study: Influence of Composition of Diet and Food Consumption on Longevity, Degenerative Diseases and Neoplasia in Wistar Rats Studied for up to 30 Months Post Weaning, Fd Chem Toxic 1995;33;S1:1S-100S