TABLE OF CONTENTS

略語・略号一覧 3
1. 非臨床試験計画概略 6
2. 薬理試験 8
2.1. In vitro 試験 10
2.1.1. In vitro アッセイ 11
2.1.2. 細胞系炎症反応 12
2.1.3. ヒト臍帯静脈内皮細胞での抗血管新生作用 17
2.1.4. アプレミラスト代謝物の薬理活性 18
2.2. In vivo 薬理試験 18
2.3. 副次的薬理試験 22
2.3.1. In vitro 試験 22
2.3.2. In vivo 動物モデル及び補助的試験 23
2.3.3. ラット及びフェレットでの薬物動態及び薬力学作用 23
2.3.4. 大腸炎モデルでの作用 23
2.3.5. 肺炎症及び喘息モデルでの作用 24
2.3.6. 筋萎縮性側索硬化症モデルでの作用 24
2.3.7. 神経因性疼痛の Bennett モデルでの鎮痛作用の評価 24
2.4. 安全性薬理試験 24
2.5. 薬力学的薬物相互作用試験 25
3. 薬物動態試験 27
4. 毒性試験 29
4.1. 単回投与毒性 29
4.2. 反復投与毒性 29
4.2.1. マウス 29
4.2.2. ラット 30
4.2.3. サル 31
4.2.4. 反復投与毒性試験の要約 32
4.3. 遺伝毒性 32
4.4. がん原性 32
4.5. 生殖発生毒性 33
4.5.1. 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 33
4.5.2. 胚・胎児発生に関する試験 34

4.5.3. 出生前及び出生後の発生に関する試験 34
4.5.4. 幼若動物を用いた毒性試験 35
4.6. 局所刺激性 35
4.7. その他の毒性試験 36
4.7.1. 免疫毒性 36
4.7.2. 毒性発現機序に関する試験 37
4.7.2.1. アプレミラストのラットでの毒性予測のためのバイオマーカーの評価 37
4.7.2.2. マウスでの炎症性病変からの回復性評価試験 37
4.7.3. 光毒性 37
4.7.4. 依存性試験 38
4.7.5. 代謝物 38
4.7.6. 原薬及び製剤 38
4.8. 曝露量に基づく安全域 39
5. 総括及び結論 41
6. 参考文献 43

LIST OF TABLES

Table 1 アプレミラストの各種ホスホジエステラーゼに対する阻害作用及び選択性 11
Table 2 定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）法による各種サイトカインの遺伝子発現及びエンザイムイムノアッセイ（ELISA）法によるタンパク質発現の測定結果 12
Table 3 アプレミラストの細胞系での薬理作用 16
Table 4 アプレミラスト及びその代謝物のホスホジエステラーゼタイプ 4 及び腫瘍壊死因子-α 阻害作用 18
Table 5 In vivo でのアプレミラストの抗関節炎及び抗炎症効果 20
Table 6 アプレミラストの単回投与毒性試験での概略の致死量 29
Table 7 マウス、サル及びヒトでのアプレミラスト代謝物 M3 及び M12 の比較 38
Table 8 曝露量比（ヒト曝露量に対する動物の曝露量比） 40

略語・略号一覧

略語・略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
AHR	Airway hyperresponsiveness	気道過敏性
Akt	v-Akt murine thymoma viral oncogene homolog	セリンスレオニンキナーゼ Akt
ALS	Amyotrophic lateral sclerosis	筋萎縮性側索硬化症
ATF-1	Activating transcription factor-1	活性化転写因子-1
AUC	Area under the concentration-time curve	濃度時間曲線下面積
AUC_{24h}	Area under the concentration-time curve from time zero to 24 hours	時間 0 から投与 24 時間後までの濃度時間曲線下面積
BCRP	Breast cancer resistance protein	乳がん耐性タンパク質
bFGF	Basic fibroblast growth factor	塩基性線維芽細胞増殖因子
BID	Twice daily	1 日 2 回
BMM	Bone marrow mononuclear cell	骨髄単核細胞
BMP-6	Bone morphogenic protein - 6	骨形成タンパク質-6
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate	環状アデノシン 1 リン酸
CIA	Collagen - induced arthritis	コラーゲン誘発関節炎
C_{max}	Peak （maximum） plasma concentration of the drug	最高血漿中濃度
CMC	Carboxymethylcellulose	カルボキシメチルセルロース
COX-2	Cyclooxygenase-2	シクロオキシゲナーゼ-2
CRE	Cyclic AMP-responsive element	環状アデノシン 1 リン酸応答配列
CREB	CRE binding protein	環状アデノシン 1 リン酸応答配列結合タンパク質
CRP	C-reactive protein	C-反応性タンパク
CysA	Cyclosporine A	シクロスポリン A
CCI	Chronic constriction injury	慢性絞扼損傷
CYP	Cytochrome P450	チトクローム P450
DC	Dendritic cell	樹状細胞
DMSO	Dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
dP/dt_{max}	Maximum rate of change in left ventricular pressure	左室圧一次微分最大値: 心収縮力の指標
DPBS	Dulbecco’s phosphate buffered saline	Dulbecco リン酸緩衝生理食塩液
$EC_{150（200）}$	Concentration of drug producing 150% (200%) of normal response	150%（200%）有効濃度
EC_{50}	Concentration of drug producing 50% of Emax （maximum effect of a drug produces）	50%有効濃度
ED_{50}	50% effective dose	50%有効用量
ECG	Electrocardiogram	心電図
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	エンザイムイムノアッセイ
ENA-78	Epithelial-derived neutrophil-activating peptide-78	上皮好中球活性化ペプチド-78
ESR	Erythrocyte sedimentation rate	赤血球沈降速度
ETAN	Etanercept	エタネルセプト
fMLP	*N*-formyl methionyl-leucyl-phenylalanine	*N*-ホルミル-メチオニン-ロイシン-フェニルアラニン
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
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor	顆粒球マクロファージコロニー刺激因子
HARBS	High-affinity rolipram binding site	高親和性ロリプラム結合部位
HDF	Human dermal fibroblast	ヒト皮膚線維芽細胞
HEKn	Human epidermal keratinocytes, neonatal	ヒト新生児表皮ケラチノサイト
hERG	Human ether-a-go-go related gene	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子

略語・略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
HIF	Hypoxia inducible factor	低酸素誘導因子
HLA-DR	Human leukocyte antigen-DR	ヒト白血球抗原-DR
HPBMC	Human peripheral blood mononuclear cell	ヒト末梢血単核球細胞
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell	ヒト臍帯静脈内皮細胞
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1	細胞間接着分子-1
IC_{50}	Concentration of drug producing 50% inhibition	50%阻害濃度
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
IKr	Ikr potassium channel current	カリウム電流
IL	Interleukin	インターロイキン
IL-6R	Interleukin-6 receptor	インターロイキン-6 受容体
IFN-α	Interferon-alpha	インターフェロン-α
IFN-γ	Interferon-gamma	インターフェロン-γ
iNOS	Inducible nitric oxide synthase	誘導型一酸化窒素合成酵素
IP	Intraperitoneally	腹腔内投与
IP-10	Interferon-gamma inducible protein-10	インターフェロン-γ 誘導タンパク質-10
LPMC	Lamina propria mononuclear cell	粘膜固有層単核細胞
LTB4	Leukotriene B4	ロイコトリエン B4
LPS	Lipopolysaccharide	リポ多糖
mAb	Monoclonal antibody	モノクローナル抗体
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1	単球遊走因子-1
MEK	Mouse epidermal keratinocytes	マウス表皮ケラチノサイト
MIG	Monokine induced by interferon-gamma	インターフェロン-γ 誘導モノカイン
MIP-1α	Macrophage inflammatory protein-1 alpha	マクロファージ炎症性タンパク質-1 α
MIP-1β	Macrophage inflammatory protein-1 beta	マクロファージ炎症性タンパク質-1 β
MIP-2α	Macrophage inflammatory protein-2 alpha	マクロファージ炎症性タンパク質-2 α
MMP	Matrix metalloproteinase	マトリックスメタロプロテアーゼ
MRP	Multidrug resistance- related protein	多剤耐性関連タンパク質
MRP-14	Myeloid related protein-14	ミエロイド関連タンパク質-14
MTD	Maximum tolerated dose	最大耐量
MTX	Methotrexate	メトトレキサート
NF-κB	Nuclear factor-kappa B	核内因子- κB
NHLF	Normal human lung fibroblasts	正常ヒト肺線維芽細胞
NK	Natural killer	ナチュラルキラー
NOAEL	No-observed-adverse-effect level	無毒性量
OAT	Organic anion transporter	有機アニオントランスポーター
OATP	Organic anion transporting polypeptide	有機アニオントランスポーターポリペプチド
OCT	Organic cation transporter	有機カチオントランスポーター
ODN	Oligodeoxyribonucleotide	オリゴデオキシヌクレオチド
OPG	Osteoprotegerin	オステオプロテゲリン
OVA	Ovalbumin	卵白アルブミン
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1	プラスミノーゲン活性化抑制因子-1
pDC	Plasmacytoid dendritic cells	形質細胞様樹状細胞
PDE	Phosphodiesterase	ホスホジエステラーゼ
PGE2	Prostaglandin E2	プロスタグランジン E2
P-gp	P-glycoprotein	P 糖タンパク
PHA	Phytohemagglutinin	植物性血球凝集素
PKA	Protein kinase A	プロテインキナーゼ A

略語・略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
PO	Orally	経口投与
PRED	Prednisolone	プレドニゾロン
QD	Daily	1 日 1 回
qRT-PCR	Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction	定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
QTc	Corrected QT interval	補正 QT 間隔
QSAR	Quantitative structure-activity relationship	定量的構造的活性相関
RA	Rheumatoid arthritis	関節リウマチ
RANTES	Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted	インターロイキン-8 スーパーファミリーに属するサイトカインの一種
SEB	Staphylococcal enterotoxin B	ブドウ球菌エンテロトキシン B
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3	サイトカインシグナル抑制因子 3
sRANKL	Soluble ligand for receptor activator of nuclear factor kappa B	可溶性核内因子 κB 活性化受容体リガンド
TGF-β1	Transforming growth factor-beta1	トランスフォーミング増殖因子-β1
Th1	T helper cell type 1	1 型ヘルパーT 細胞
Th2	T helper cell type 2	2 型ヘルパーT 細胞
Th17	T helper cell type 17	17 型ヘルパーT 細胞
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid	2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸
TNF-α	Tumor necrosis factor-alpha	腫瘍壊死因子-α
UC	Ulcerative colitis	潰瘍性大腸炎
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1	血管細胞接着分子-1
VEGF	Vascular endothelial growth factor	血管内皮細胞増殖因子

1. 非臨床試験計画概略

アプレミラストは、新規で経口投与可能な低分子の抗炎症作用と免疫調整作用を有する薬剤であり、尋常性乾癬や関節症性乾癬の患部免疫細胞の炎症性サイトカイン産生を促進するホスホジエステラーゼ（PDE）タイプ 4 酵素を特異的に阻害する。アプレミラストは、PDE4 阻害により細胞内環状アデノシン 1 リン酸（cAMP）レベルを上昇させる。これにより腫瘍壊死因子-α（TNF-α）、インターロイキン（IL）-7、IL-23 等の多くの炎症性サイトカインの産生を阻害し、逆に IL-10 のような抗炎症性サイトカインの産生を増加させる。

これらのアプレミラストの薬力学的特性には、ヒト末梢血単核球細胞（HPBMC）及び T 細胞由来のサイトカインの調整（炎症性サイトカイン産生抑制と抗炎症性サイトカイン産生増強）、抗炎症作用、鎮痛作用及び血管新生抑制作用が含まれる。

非臨床薬理試験としては、in vitro 試験でアプレミラストの PDE4 に対する酵素特異性と薬理作用を種々の酵素及び細胞系を用いて評価した。また、アプレミラストの代謝物の薬理作用も併せて評価した。In vivo においては、急性炎症、リウマチ様炎症及び皮膚炎症、さらにマウス異種移植乾癬症等の動物モデルを用いてアプレミラストの抗炎症作用、鎮痛作用等の薬理作用について評価した。

副次的薬理試験としては、サリドマイドの催奇形性に関係するセレブロン（CRBN）への結合性、フェレットを用いた催吐作用、腫瘍細胞増殖抑制作用、潰瘍性大腸炎（UC）、筋萎縮性側索硬化症（ALS）等の動物モデルを用いて評価した。

安全性薬理試験としては、アプレミラストの中枢神経系、呼吸系、心血管系、消化管系に対する作用を評価した。

薬力学的相互作用試験としては、フォルスコリン、プロスタグランジン E2（PGE2）、メトトレキサート（MTX）及びエタネルセプト（ETAN）とアプレミラストとの併用効果を in vitro 及び in vivo での動物モデルにより評価した。

アプレミラストの吸収、分布、代謝及び排泄について、毒性試験に用いた動物を使用して、in vitro 及び in vivo にて評価した。in vitro の試験で、アプレミラストと併用薬との薬物相互作用の可能性も評価した。

アプレミラストの非臨床安全性プログラムとして、マウス及びラットにおける単回投与毒性試験（経口及び静脈内投与）、マウスにおける 6 ヵ月までの反復経口投与毒性試験、サルにおける 12 ヵ月までの反復経口投与毒性試験、遺伝毒性試験コアバッテリー（Ames 試験、in vitro 染色体異常試験及び in vivo 小核試験）、マウス及びラットの 2 年間がん原性試験並びにその用量設定のための 3 ヵ月間投与最大耐量（MTD）評価試験、マウス及びサルにおける生殖発生毒性試験、局所刺激性試験を計画した。ラットにおけるアプレミラスト（*S*-エナンチオマー、CC-10004）及びその *R*-エナンチオマー（CC-10007）の毒性プロファイルを比較する試験も実施した。加えて、マウスの複数組織に観察された炎症性変化の進展及び回復性の時間経過並びに炎症反応のバイオマーカーを評価するため、毒性発現機序に関する試験を実施した。アプレミラストの光毒性は BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞を用いる in vitro 試験で評価した。また、新生児マウスを用いる 13 週間投与毒性試験及びその用量設定試験も実施した。アプレミラスト原薬中に同定された不純物の 1 つ（RC6）は、in silico 評価により遺伝毒性の警告構造を有することから、Ames 試験で変異原性を評価した。

ほとんどの毒性試験でアプレミラストのトキシコキネティクスを評価した。2 つのヒト代謝物（M3［*O*-脱メチル体］及び M12［*O*-脱メチル体のグルクロン酸抱合体］）については、マウス及びサルの長期投与毒性試験でも測定した。

安全性薬理試験及び毒性試験は日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイドラインに準じて行い、全ての主要な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）に準拠して実施した。

曝露量に基づく安全域の要約を 2.4.4.8 項に示す。主要な毒性試験（マウス 6 ヵ月間投与試験、サル 12 ヵ月間投与試験、がん原性試験、生殖発生毒性試験及び新生児を用いた毒性試験）で推定された無毒性量（NOAEL）における定常状態での曝露量を、曝露量比の算出のために使用した（Table 8）。本概括評価に記載したすべての用量及び曝露量ベースでの安全域は、CC-10004-PSOR-005-PK 試験でアプレミラストの 30 mg を 1 日 2 回（BID）の用法・用量で投与した局面型乾癬患者の定常状態における曝露量（遊離薬物及びタンパク結合物）の時間 0 から投与 24 時間後までの濃度時間曲線下面積（AUC_{24h}: 7308 ng･h/mL）に基づき算出した。臨床用量 30 mg における最高血漿中濃度（C_{max}）は 670 ng/mL であった。アプレミラストの薬物動態は、乾癬性関節炎の患者でも評価され（CC-10004-PSA-002 試験）、尋常性乾癬及び乾癬性関節炎の患者で類似した薬物動態学的プロファイルが示された。アプレミラストの 30 mg BID の用法・用量で投与した乾癬性関節炎患者の定常状態での平均 AUC_{24h} は、最終の母集団解析に基づき 7440 ng•h/mL と推定され、この値は局面型乾癬患者で推定された 7308 ng•h/mL にかなり近似していた。本概括評価で示したすべてのトキシコキネティクスデータは、特に記載がなければ、小数点第 1 位で四捨五入し整数にした。反復投与毒性試験では、特段の断りがなければ、雌雄の曝露量の平均値を考察のために使用した。

2. 薬理試験

尋常性乾癬及び関節症性乾癬は慢性炎症性疾患であり、海外では乾癬患者の 10%～30%が関節症性乾癬を発現し、いずれも長期治療が必要とされると報告されている（Gottlieb, 2008、Gladman, 2005、Chandran, 2010）。これらの疾患では、樹状細胞（DC）、単球、マクロファージ、好中球、T 細胞、B 細胞、角化細胞、軟骨細胞、滑膜細胞で複数の炎症性／抗炎症性メディエーターの調節不全が認められている（Lowes, 2007、Fuentes-Duculan, 2010）。従来の薬物治療は重篤な臓器毒性及びや副作用を伴うことがあり、薬物治療を受けている間、モニタリングが必要とされている。また、現在利用可能な生物製剤による治療は専門医による管理を必要とし、これらは多くの炎症性シグナルカスケードの一部である単一の炎症性サイトカインのみを特異的な標的としており、細胞内シグナル伝達経路を標的とはしておらず、むしろ細胞外の受容体又はタンパク質に結合して薬理作用を示す（Menter, 2008、Lowes, 2007）。

PDE4 は cAMP の加水分解に関与しているが（Burnouf, 2002）、アプレミラストは PDE4 を選択的に阻害する新規経口剤である。PDE4 は尋常性乾癬や関節症性乾癬の患部免疫細胞の炎症性サイトカイン産生を促進する。アプレミラストよる PDE4 阻害により細胞内 cAMP 濃度が上昇し、これによりプロテインキナーゼ A（PKA）が活性化され、環状アデノシン 1 リン酸応答配列結合タンパク質／活性化転写因子-1（CREB/ATF-1）のリン酸化と活性化がもたらされる。また、PKA の活性化により核内因子-κB（NF-κB）転写活性のダウンレギュレーションも生じる。その結果、誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）、TNF-α、IL-17 及び IL-23 といった炎症性サイトカインの産生が抑制され、逆に抗炎症性サイトカインである IL-10 の産生増加がもたらされる。アプレミラストは上記のような広範囲の炎症性／抗炎症性サイトカインを変化させることにより（Houslay, 2005、Baumer, 2007、Takahashi, 2002）、皮膚及び関節における炎症症状を改善に導くと考えられる。このようにアプレミラストは、従来の生物学的製剤が単一のサイトカインを標的としているのと異なり、炎症性及び抗炎症性シグナル伝達カスケード上流の免疫バランスを回復させることに着目した薬剤であり（Lowes, 2007）、尋常性乾癬や関節症性乾癬に対する安全性の高い新たな治療薬となり得ると考えられた。

アプレミラストの PDE4 阻害作用については各種 PDE を用いた in vitro の系で試験し、本剤が特異的な PDE4 阻害剤であることを確認した。また、HPBMC、形質細胞様樹状細胞（pDC）、ヒト新生児表皮ケラチノサイト（HEKn）、ヒト粘膜固有層単核細胞（LPMC）、ヒト全血、初代培養マウス表皮ケラチノサイト（MEK）等の細胞を用いたが、これら細胞における代表的な炎症性サイトカインである TNF-α 産生を阻害した。また、アプレミラストは、HPBMC で抗炎症性サイトカインである IL-10 産生を増加させた。さらに、TNF-α、インターフェロン-γ（IFN-γ）、IL-12 及び IL-23A 等の炎症性サイトカイン関連遺伝子の発現も阻害した。pDC では 1 型インターフェロンであるインターフェロン-α（IFN-α）の産生を阻害した。また、アプレミラストは、プレートに接着した抗 CD3 モノクローナル抗体（mAb）刺激初代培養ヒト T 細胞で、ヒト T 細胞由来の主要な 1 型ヘルパーT 細胞（Th1）サイトカイン（顆粒球マクロファージコロニー刺激因子［GM-CSF］、IFN-γ、インターロイキン-8 スーパーファミリーに属するサイトカインの一種（RANTES）、TNF-α 及び 2 型ヘルパーT 細胞（Th2）サイトカイン（IL-5、IL-10、IL-13）の産生を阻害し、同様に 17 型ヘルパーT 細胞（Th17）サイトカインである IL-17 の産生を阻害した。さらに、複数のサイトカイン受容体及びサイトカインの遺伝子発現も阻害した。加えて、アプレミラストは、IL-8 及びロイコトリエン B4（LTB4）の産生、接着分子 CD18 及び CD11b（Mac-1）の発現、並びに IL-8 によって誘発される好中球の遊走を含む様々な免疫応答を阻害した。また、アプレミラストは臨床用量付近の濃度で破骨細胞形成を有意に阻害した。

アプレミラストの代謝物のうち、M7 及び M17 が in vitro で PDE4 活性及び TNF-α 産生に対して強い阻害作用を示した。しかし、代謝物 M7 及び M17 のそれらの薬理作用はアプレミラストよりも弱く、

血漿中アプレミラスト濃度に対する割合も 1%未満と極めて少量であることから、代謝物 M7 及び M17 の薬力学的作用に対する明らかな寄与はほとんどないと考えられた。

効力を裏付ける試験

2.6.2.2 項

In vivo でのアプレミラストの薬効薬理作用については、急性炎症、リウマチ様炎症及び皮膚炎症の動物モデルを用いて評価した。マウスにエンドトキシンであるリポ多糖（LPS）を曝露させた急性炎症モデルでは、アプレミラストの経口投与によって血清中の TNF-α レベルが著しく低下することが確認され、アプレミラストが抗炎症作用を有することが示唆された。抗コラーゲン mAb・LPS 混合により誘発したリウマチ様の炎症モデルであるマウス関節炎モデルでは、アプレミラストはデキサメタゾン経口投与及び ETAN 腹腔内投与（IP）と同様に関節炎の活動性（後肢足蹠浮腫）を有意に抑制した。さらに、ラットカラゲニン誘発性炎症／痛覚過敏モデルで、アプレミラストは足蹠浮腫を有意に軽減するとともに、機械刺激及び熱刺激に対するいずれの疼痛閾値も生物学的に有意に上昇させたことから、疼痛抑制を伴う抗炎症作用を有することが示された。関節リウマチ（RA）患者由来のヒト滑膜細胞では、TNF-α 産生を阻害し、コラーゲン誘発関節炎（CIA）モデル動物で炎症症状の軽減とともに及び組織学的重症度も軽減した。また、コラーゲンで免疫したマウスから得た培養リンパ節細胞では、コラーゲン又は抗 CD3 mAb 刺激による T 細胞増殖並びに TNF-α 及び IFN-γ 産生を阻害した。さらに、ヒト乾癬ナチュラルキラー（NK）細胞により誘発したマウス異種移植乾癬モデルで、アプレミラストは乾癬様病変の重症度及び発現頻度を低下させ、表皮の肥厚及びケラチノサイトの増殖を低減し、移植皮膚片の TNF-α、ヒト白血球抗原-DR（HLA-DR）及び細胞間接着分子-1（ICAM-1）の発現を抑制した。

副次的薬理試験

2.6.2.3 項

サリドマイドが催奇形性を有することは良く知られているが、サリドマイドによる催奇形性は主に E3 ユビキチンリガーゼ基質補助受容体の CRBN を介して起こることが報告されている（Ito, 2010）。アプレミラストはサリドマイドと構造的に一部類似するため、CRBN への結合性を評価した結果、アプレミラストはヒト内因性 CRBN に結合しないことを確認した。したがって、アプレミラストによる催奇形性の可能性は低いと考えられた。PDE4 阻害剤の一般的にみられる薬理作用として催吐作用が報告されているが（Robichaud, 1999）、フェレットを用いた催吐作用試験で、アプレミラスト経口投与はほとんど影響を及ぼさなかった。非ホジキンリンパ腫 B 細胞株に対する増殖抑制作用について評価した結果、非ホジキンリンパ腫（Farage）細胞に対して、アプレミラスト（0～100 µmol/L）は弱い増殖抑制作用を示した。また、2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸（TNBS）誘発マウス大腸炎モデルに対する改善作用を評価したところ、アプレミラストは体重減少を用量依存的に軽減した。肺の炎症モデル及び喘息モデルに対する作用については、これらモデル動物でアプレミラストは肺の炎症を抑制した。各種皮膚ループス細胞モデルでは、IFN-α 及び TNF-α タンパク質産生を有意に阻害し、さらに IFN 誘導性ループス遺伝子の発現も有意に阻害した。このことから、皮膚エリテマトーデスに対してアプレミラストが有効である可能性が示唆された。マウス ALS モデルに対しては、アプレミラスト高用量群では雌雄マウスともに生存日数のわずかな延長（2～4 日）が、低用量群の雌では生存日数が 13.8 日、雄では 8 日延長した。

安全性薬理試験

2.6.2.4 項

アプレミラストの安全性薬理試験は、GLP 適用試験として実施し、中枢神経系、呼吸器系、心血管系及び消化管系に対する作用を評価した。

マウス中枢神経系及び行動への影響について試験した結果、500 mg/kg 経口投与でも行動上の変化又は生理的変化は認められなかった。心血管系及び呼吸器系に対する作用については麻酔ビーグル犬で試験したが、アプレミラストの静脈内投与（0.5 mg/kg）で、心機能パラメータや呼吸機能に関するパラメータにほとんど影響はみられなかった。また、電位固定したヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）を恒常的に発現させたヒト胎児腎細胞（HEK293）における K+イオン電流に対する影響については、50%阻害濃度（IC_{50}）は 184.2 μmol/L と推定され、推定ヒト最大治療用量である 30 mg BID を投与した場合の C_{max} の 127 倍であった。マウスの消化管運動に対する作用については 1000 mg/kg までの経口投与で影響はみられなかった。

以上のように、アプレミラストの安全性薬理試験で、重大な安全性上の問題がないと考えられた。

薬力学的相互作用試験

2.6.2.5 項

ヒト白血球で、PGE2 との併用で相乗的かつ用量依存的な cAMP 濃度の増加が、また、正常ヒト肺線維芽細胞（NHLF）におけるフォルスコリンとの併用では、相乗的かつ用量依存的に TNF-α 刺激性 GM-CSF 産生が阻害された。TNF 刺激ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）では、PGE2 と併用した場合に抗血管新生作用及び抗炎症作用に関与する E-セレクチン及び血管細胞接着分子-1（VCAM-1）が有意に阻害された。マウス抗コラーゲン mAb カクテル・LPS 誘発実験的関節炎モデルでは ETAN との併用で相加的な関節炎抑制効果が認められた。

ヒト抗 CD3 mAb で刺激した T 細胞及びブドウ球菌エンテロトキシン B（SEB）処理 HPBMC を用いて、関節リウマチや乾癬に関与するサイトカインに対する阻害作用をシクロスポリン A（CysA）、ETAN 又は MTX との併用により評価した。その結果、CysA 又は ETAN との併用により各種炎症性サイトカイン産生を相乗的に阻害した。MTX との併用では相加的又は相乗的な阻害作用はみられなかった。関節リウマチ由来滑膜線維芽細胞の IL-1β、IL-6 及び IL-6R 刺激による IL-7 産生について、アプレミラストは ETAN 又は MTX との併用処理によりアプレミラスト単独処理の場合よりも更に強力に IL-7 産生を阻害した。

考察及び結論

以上の結果より、アプレミラストの細胞レベルでのサイトカイン調節作用、in vivo での各種動物モデルでみられた抗炎症作用、異種移植乾癬マウスモデルにおける皮膚症状抑制作用等の試験結果、及び安全性薬理試験の結果から、アプレミラストは尋常性乾癬及び関節症性乾癬患者で、安全性の高い有益な治療薬となることが示唆された。

2.1. In vitro 試験

尋常性乾癬や関節症性乾癬の進行に深くかかわっている PDE4 に関するアプレミラストの特異的な阻害作用、cAMP 産生増大作用、各種サイトカイン産生に及ぼす影響について、PDE4 アッセイ系で評価し、その他のアッセイ系では各種 PDE、細胞表面受容体、各種酵素、キナーゼに対する影響について評価した（2.6.2.2.1.1 項）。

2.1.1. In vitro アッセイ

2.6.4.2.1 項

PDE4 特異的な阻害作用

PDE4 アッセイの結果、アプレミラストはヒト単球性細胞 U937 から単離した PDE4 に対する IC_{50} は 74 nmol/L と強力な阻害活性を示し、その阻害作用は PDE4 に特異的であることが示された（Muller, 1998）。アプレミラストの PDE4 に対する阻害選択性を、10 µmol/L のアプレミラストを用い、PDE1、PDE2、PDE3、PDE5、PDE6、PDE7 及び PDE11 に対する阻害活性と比較して評価した。アプレミラストは PDE4 を他の PDE よりも約 279～40000 倍選択的に阻害した（Table 1）。

さらに、各種遺伝子組換えヒト PDE（PDE1A、PDE1C、PDE2A、PDE3A、PDE3B、PDE4A1A、PDE4B1、PDE4B2、PDE4C1、PDE4D2、PDE5A1、PDE7A、PDE7B、PDE8A1、PDE9A2、PDE10A1、PDE11A4）を用いて、アプレミラストの PDE4 特異性を評価した（室温で 1 時間反応）。アプレミラストによる PDE4 分子種である PDE4A1A、PDE4B1、PDE4B2、PDE4C1、PDE4D2 の平均阻害率は約 95%（範囲: 91%～99%）であった。

一方、アプレミラストは他の PDE に対して有意な阻害活性を示さなかった。また、遺伝子組換えヒト PDE4 分子種である PDE4A1A、PDE4B1、PDE4B2、PDE4C1、PDE4D2、PDE4D3 及び PDE4D7 を用いてアプレミラストの阻害作用を確認したところ、IC_{50} 値は、それぞれ 14、43、27、118、33、28 及び 30 nmol/L であった。

アプレミラストはラット脳由来 PDE4 の高親和性ロリプラム結合部位（HARBS）に結合した。アプレミラストは光学的に純粋な *S*-エナンチオマーであり、その PDE4 阻害作用は、*R*-エナンチオマーである CC-10007（IC_{50} = 611 nmol/L）の 8 倍強力であった。

動物、ヒトの生体内でアプレミラストが *R*-エナンチオマーとの間で光学異性体変換は起きないため（2.6.4.1 項）、アプレミラストの薬理活性には *R*-エナンチオマーに由来するものはないと考えられる。

Table 1　アプレミラストの各種ホスホジエステラーゼに対する阻害作用及び選択性

PDE 阻害	アプレミラスト (*S*-エナンチオマー)	PDE 選択性比	倍数差
PDE4 IC_{50}（U937 細胞由来）（nmol/L）	74（34 ng/mL）	PDE4/PDE4	1
PDE1（10 µmol/L での阻害%）	23%	PDE1/PDE4	> 500
PDE2（10 µmol/L での阻害%）	6%	PDE2/PDE4	> 10000
PDE3（10 µmol/L での阻害%）	20%	PDE3/PDE4	> 1200
PDE5（10 µmol/L での阻害%）	3%	PDE5/PDE4	> 3000
PDE6（10 µmol/L での阻害%）	-6%	PDE6/PDE4	> 40000
PDE7 IC_{50}（nmol/L）	20500（9400 ng/mL）	PDE7 IC_{50}/PDE4 IC_{50}	279
PDE11 IC_{50}（nmol/L）	> 100000（> 46 µg/mL）	PDE11 IC_{50}/PDE4 IC_{50}	> 1400
HARBS 結合 IC_{50}（nmol/L）	23（11 ng/mL）	NA	NA

HARBS =高親和性ロリプラム結合部位、IC_{50} = 50%阻害濃度、NA = 該当データなし、PDE = ホスホジエステラーゼ、PDE4 = ホスホジエステラーゼタイプ 4

Source: 4.2.1.1.1 項

次に 68 種の細胞表面受容体及び PDE1、PDE2、アデニルシクラーゼ、ATPase、MAO をはじめとする 17 種の酵素に対する作用を評価した。アプレミラスト（10 µmol/L）は、PDE4 を 95%阻害し、L 型（ベラパミル）カルシウムチャネル受容体へのアゴニスト結合を 52%増加させたが、再現性はみられず擬陽性であった。また、今回用いた 68 種類の細胞表面受容体のいずれにも有意な結合を示さず、また 17 種類の酵素のいずれに対しても阻害作用を示さなかった。

アプレミラストのキナーゼ阻害特性について、255 種類のキナーゼを用いて試験したが、いずれに対してもアプレミラストの有意な阻害作用はみられなかった。

2.1.2. 細胞系炎症反応

各種ヒト細胞での炎症反応抑制作用

アプレミラスト（10 µmol/L）のヒト細胞系での炎症反応抑制作用について、単球及び T 細胞由来サイトカイン、PGE2 産生、cAMP 上昇、シクロオキシゲナーゼ-2（COX-2）発現、好中球接着、内皮細胞遊走及び抗増殖・抗血管新生作用の観点から評価した（Table 2、2.6.2.2.1.2 項）。Jurkat T 細胞及びヒト単球性白血病細胞（THP-1）にアプレミラスト（0.1、1、10 µmol/L）を単独又はフォルスコリンと併用処理して、PKA 経路及び NF-κB 経路に対するアプレミラストの細胞内作用機序を評価した。その結果、アプレミラストは、PKA-CREB 経路を活性化することにより炎症性／抗炎症性遺伝子の発現を調節して、環状アデノシン 1 リン酸応答配列（CRE）による遺伝子転写の増大及び NF-κB による遺伝子転写の阻害をもたらしたと推察された。遺伝子転写活性阻害活性はアプレミラストの濃度に比例していた。さらに、遺伝子発現に対するアプレミラストの作用を評価するために、HPBMC 及びヒト単球をアプレミラスト処置後に LPS で刺激した。ゲノムワイド遺伝子発現解析の結果、アプレミラストによる遺伝子調節の標的が複数特定され、アプレミラストが多くのケモカイン、ケモカイン受容体及び Th1 サイトカイン遺伝子の抑制作用や、抗炎症性因子サイトカインシグナル抑制因子 3（SOCS3）、ケモカイン上皮好中球活性化ペプチド-78（ENA-78）、並びに成長因子のアンフィレグリン及び骨形成タンパク質-6（BMP-6）をコードする遺伝子を増加する作用があることが確認された。

アプレミラスト（0.00001～10 µmol/L）による、UC のバイオマーカー発現及びサイトカイン産生に対する作用を、LPS 及び抗 CD3 mAb で刺激した HPBMC を用いて評価した。定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）の結果から、アプレミラストは IFN-γ、インターフェロン-γ 誘導タンパク質-10（IP-10）、インターフェロン-γ 誘導モノカイン（MIG）、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）-1 及びミエロイド関連タンパク質-14（MRP-14）の遺伝子発現を阻害したが、マクロファージ炎症性タンパク質-2α（MIP-2α）の遺伝子発現には影響しなかった。また、アプレミラストは、IFN-γ、IP-10、MIG 及び TNF-α のタンパク質発現を阻害したが、MMP-1 産生を 0.1 及び 1 µmol/L で増加させ、10 µmol/L では阻害した（Table 2）。アプレミラストとのインキュベート後 LPS 刺激したヒト単球では、IL-10 遺伝子発現が 1.53 倍増加したが、この変化は統計学的に有意ではなかった。

Table 2 定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）法による各種サイトカインの遺伝子発現及びエンザイムイムノアッセイ（ELISA）法によるタンパク質発現の測定結果

	qRT-PCR 法による遺伝子の発現						
化合物	**IFN-γ**	**IP-10**	**MIG**	**MIP-2α**	**MMP-1**	**MRP-14**	**TNF-α**
アプレミラスト（10 µmol/L）	↓	↓	↓	↔	↓	↓	↓

	ELISA IC_{50}（µmol/L）によるタンパク質の発現				
	IFN-γ	**IP-10**	**MIG**	**MMP-1（EC_{50}）**	**TNF-α**
アプレミラスト	0.013	0.0099	0.028	0.017	0.15

↓=低下、↔= 作用なし、EC_{50} = 50%有効濃度、ELISA =エンザイムイムノアッセイ、IC_{50} = 50%阻害濃度、IFN-γ = インターフェロン-γ、IP-10 = インターフェロン-γ 誘導タンパク質-10、MIG = インターフェロン-γ 誘導モノカイン、MIP-2α = マクロファージ炎症性タンパク質-2α、MMP = マトリックスメタロプロテイナーゼ、MRP-14 = ミエロイド関連タンパク質-14、 qRT-PCR = 定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応、TNF-α = 腫瘍壊死因子-α

Source: 4.2.1.1.8 項

炎症性及び抗炎症性サイトカイン産生に対する作用

HPBMC を用い、LPS（100 ng/mL）刺激による TNF-α、IL-10、IL-12 産生に対するアプレミラストの抑制作用を評価した。また、IL-1（50 ng/mL）刺激による TNF-α 産生に対する抑制作用及び CD4 陽性 Th の抗 CD3 及び抗 CD28 抗体刺激による IL-5 産生に対する抑制作用、SEB 誘発 IL-2 及び IFN-γ 産生に対する抑制作用、さらに *N*-ホルミル-メチオニン-ロイシン-フェニルアラニン（fMLP）誘発 LTB4 産生、CD18 及び CD11b 発現、内皮細胞への接着、ザイモサン誘発 IL-8 産生を含む好中球の様々な反応について評価した。その結果、アプレミラストは、T 細胞活性化、HPBMC（IC_{50} = 0.077 µmol/L）及び全血（IC_{50} = 0.294 µmol/L）での LPS 誘発性の TNF-α 及び IL-12 産生を阻害したが、抗炎症性サイトカインである IL-10 産生は増加させた（Table 3、①）。さらに、アプレミラストはヒト末梢血から単離したヘルパー（CD4+）T 細胞での抗 CD3/CD28 mAb 誘発性 IL-5 産生を阻害した（Table 3、②）。炎症性疾患の過程では、TNF-α 産生は多くの場合、サイトカイン IL-1β によって誘発されるが、アプレミラストは HPBMC での IL-1β 誘発性 TNF-α 産生を阻害した（Table 3、③）。

次に、LPS で刺激した HPBMC を用いアプレミラスト（0.0001～100 µmol/L）の種々のサイトカイン産生に対する抑制作用を評価した。その結果、アプレミラストは TNF-α、IL-12、GM-CSF、マクロファージ炎症性タンパク質-1α（MIP-1α）及び単球遊走因子-1（MCP-1）の産生を阻害し、IL-1β、IL-8 及び RANTES の産生は阻害せず、IL-6 及び IL-10 の産生を増加させた（Table 3、 ④）。

さらに、 健康ヒト全血を用い、アプレミラストによる LPS 刺激後のサイトカイン及びケモカイン産生に対する抑制作用を評価した。その結果、アプレミラストは、TNF-α、IL-12/IL-23 p40、IP-10 及び MCP-1 産生、IL-23 p19、IL-23 産生に対して有意な阻害作用を示した。

PDE 阻害活性の動物による違い

PDE4 阻害剤アプレミラスト、シロミラスト及びロフルミラストは LPS で刺激したマウス及びラット全血での IL-6 産生を用量依存的に 2 倍～5 倍増加させた。しかし、サル及びヒトの全血で、IL-6 に対する作用は認められず、サル血液での IL-6 産生の最大阻害は 50%であった。これらの結果から、げっ歯類は霊長類及びヒトよりも PDE 阻害剤で誘導される炎症反応に対する感受性が高いことが示唆された。

TNF-α 産生に対する作用

pDC は乾癬及び皮膚エリテマトーデスに関与する重要な抗原提示細胞である。Toll 様受容体 9（TLR9）を介してウイルス由来及びアポトーシス細胞由来のオリゴヌクレオチドに反応し、IFN-α 及び TNF-α を産生することで骨髄系 DC、T 細胞、ケラチノサイトを活性化することが知られている。アプレミラストは、HPBMC 及びヒト形質細胞様樹状細胞（hPDC）で、TLR9 アゴニストである CpG-A オリゴデオキシヌクレオチド（ODN）2216 刺激による IFN-α 及び TNF-α 産生を効率的に阻害した（Table 3、⑤）。

細胞増殖に対する作用

NHLF を LPS、TNF-α 又はトランスフォーミング増殖因子-β1（TGF-β1）添加前にアプレミラストで処置し、[^{3}H]-チミジン取込みにより評価した。アプレミラストは、培養 24 時間では NHLF に対する弱い抗増殖性作用を示し、培養 48 時間では抗増殖作用が増強した。IL-1β、TNF-α 又は IFN -γ 刺激ヒト皮膚線維芽細胞（HDF）又は IFN-γ 存在下インキュベートし、さらに[^{3}H]-チミジン取込みを評

価した。アプレミラストは、刺激した HDF に対しては明らかな抗増殖性作用を示さなかった）。抗増殖性作用は二相性であると考えられ、0.1 μmol/L で増殖が 30%増大したが、10 μmol/L ではベースラインまで回復した。

次に、HDF をアプレミラスト処理後、組換えヒト IL-1β、組換えヒト腫瘍壊死因子 α（TNF-α）又は組換えヒト IFN-γ で刺激した。繊維芽細胞増殖に関与しているヒトプラスミノーゲン活性化抑制因子-1（PAI-1）を用いて、エンザイムイムノアッセイ（ELISA）法により評価した。その結果アプレミラストは弱い PAI-1 阻害作用（約 17%の阻害）を示した。また、TNF-α 刺激による GM-CSF の産生を阻害した（Table 3、⑥）。

IL-7 遺伝子発現に対する作用

軟骨細胞及び滑膜細胞から産生された T 細胞調節サイトカイン IL-7 は、炎症性関節疾患（関節炎や骨の損傷等）に関与する。これらの疾患では滑液中 IL-7 の mRNA 発現及びタンパク質レベルの上昇がみられる。アプレミラストは、IL-1、IL-6 及びインターロイキン-6 受容体（IL-6R）で刺激した初代培養正常ヒト軟骨細胞での IL-7 遺伝子発現を用量依存的に有意に阻害した。その阻害作用は、MTX 及び ETAN よりも高かったが、プレドニゾロン（PRED）よりも弱かった。また、アプレミラストは滑膜組織のバイオマーカーである ICAM-1 及び αvβ3 インテグリンの発現に対して弱い抑制作用を示した。同様に、IL-1、IL-6 及び IL-6R で刺激した関節リウマチ滑膜由来の線維芽細胞でも、アプレミラストは IL-7 遺伝子発現を用量依存的に有意に阻害した。

Th1、Th2、Th17 に関連する免疫反応疾患に対する効果

黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）由来のスーパー抗原である SEB は、T 細胞に対する特異的な生理的刺激物質である。アプレミラストは SEB 誘発性 IL-2 及び IFN-γ 産生の強力に阻害し、IC_{50} 値はそれぞれ 134 ng/mL（291 nmol/L）及び 21 ng/mL（46 nmol/L）であった（Table 3、⑦）。

また、アプレミラストの各種サイトカイン免疫調節活性に対する作用を、抗 CD3 mAb 刺激初代培養ヒト T 細胞を用いて評価した 結果、Th1 サイトカイン（GM-CSF、IFN-γ、IL-2、RANTES、TNF-α）と Th2 サイトカイン（IL-5、IL-10、IL-13）両者の産生を阻害し、同様に骨破壊を誘導する破骨細胞誘導性 T 細胞 Th17 が産生するサイトカインである IL-17 の産生を阻害した（Table 3）。アプレミラストのこれら T 細胞由来サイトカインに対する阻害の強さは、IL-5（IC_{50} = 0.03 μmol/L）> IL-17（IC_{50} = 0.09 μmol/L）> IL-10（IC_{50} = 0.19 μmol/L）> IL-13（IC_{50} = 0.28 μmol/L）> TNF-α（IC_{50} = 0.93 μmol/L）> GM-CSF（IC_{50} = 1.0 μmol/L）> IFN-γ（IC_{50} = 1.3 μmol/L）> IL-2（IC_{50} = 2.4 μmol/L）> RANTES（IC_{50} = 4.1 μmol/L）の順であった（Table 3、⑧）。

以上の結果は、アプレミラストが Th1 サイトカイン産生よりも Th2 サイトカイン産生を強く阻害することを示している。健康被験者を対象とした試験で報告（CC-10004-PK-001 試験）されている C_{max}（第 7 日の C_{max} = 420 ng/mL）で、理論的なアプレミラストのサイトカイン阻害の程度も評価した。その結果、アプレミラストは 420 ng/mL の濃度で、Th1 サイトカイン産生を 40%（IL-2、RANTES）～50%（TNF-α）の範囲で、Th2 サイトカイン産生を 65%（IL-13）～100%（IL-5）の範囲でそれぞれ阻害した。アプレミラストが、炎症性 Th1、Th2 又は Th17 免疫応答が全般的な病態生理に関与している乾癬性関節炎のような疾患の治療に対して有効な手段となることが示唆された。

好中球－内皮細胞接着に対する作用

好中球は炎症部位に速やかに動員される骨髄由来白血球である fMLP は細菌由来のペプチドであり、好中球を活性化して、速やかな脱顆粒、遊走、内皮細胞への接着を誘導する。好中球の顆粒内容物には LTB4 が含まれており、これはアラキドン酸代謝の産物であるとともにそれ自体が好中球刺激物質であり、乾癬による炎症に対して重要な役割を演じている。アプレミラストは fMLP で刺激した好中球での LTB4 産生を阻害した（Table 3、⑨）。また、アプレミラストは fMLP による CD18 及び CD11b（Mac-1）の発現を強力に阻害し、さらに、fMLP による好中球の内皮細胞への接着も強力に阻害した（Table 3、⑨）。

出芽酵母由来のザイモサン A は、好中球表面に発現している接着分子である CD11b（Mac-1）に結合して、食作用、細胞の活性化、IL-8 産生の誘導を引き起こすが、アプレミラストはザイモサンによる IL-8 産生を IC_{50} 値 43 ng/mL（94 nmol/L）で阻害した（Table 3、⑩）。

これらの結果から総合すると、アプレミラストは好中球-内皮細胞間の接着を妨害し、その結果、炎症性の傷害に対する細胞反応を抑制し、組織の損傷を軽減すると考えられた。

COX-2 酵素機能に対する作用

PDE4 阻害剤は HPBMC の PGE2 産生を増加させるが、その効果には COX-2 プロモーター内の CRE の活性化が関与していると考えられている。アプレミラストは、LPS 又は植物性血球凝集素（PHA）で刺激した HPBMC 内の COX-2 及び PGE2 産生を 50%～100%増加させた（Table 3、⑪）。

また、HUVEC 又は血小板をそれぞれ血小板又はカルシウムイオノフォア A23187 で刺激した時のプロスタサイクリン及びトロンボキサン産生へのアプレミラストの影響を評価したが、アプレミラストはプロスタサイクリン及びトロンボキサン産生には影響しなかった。

上記の結果から、プロスタサイクリン及びトロンボキサンは血栓形成に関与しているが、アプレミラストは、これらの細胞でのエイコサノイド産生経路を変化させないことが示された。

Table 3　アプレミラストの細胞系での薬理作用

細胞系での作用	**番号**	**IC_{50}（nmol/L）**	**IC_{50}（ng/mL）**
LPS 誘発性 HPBMC TNF-α 産生阻害	①	77	35
LPS 誘発性ヒト全血 TNF-α 産生阻害	①	294	135
LPS 誘発性 HPBMC IL-12 産生阻害	①	140	64
LPS 誘発性 HPBMC IL-10 産生誘導	①	EC_{50} = 2300	EC_{50} = 1100
ヒトヘルパー（CD4+）T 細胞 IL-5 産生阻害	②	890	410
IL-1β 誘発性 HPBMC TNF-α 産生阻害	③	83	38
SEB 誘発性 HPBMC IL-2 産生阻害	⑦	291	134
SEB 誘発性 HPBMC IFN-γ 産生阻害	⑦	46	21
fMLP 誘発性好中球 LTB4 産生阻害	⑨	2.48	1.14
fMLP 誘発性好中球 CD18 発現抑制	⑨	390	179
fMLP 誘発性好中球 CD11b 発現抑制	⑨	74	34
fMLP 誘発性好中球 HUVEC 接着抑制	⑨	150	69
ザイモサン誘発性好中球 IL-8 産生阻害	⑩	94	43
NHLF での TNF-α 刺激 GM-CSF 産生阻害	⑥	120	55
CpG-A ODN 2216（1 μmol/L）誘発性 HPBMC IFN-α 産生阻害	⑤	620	286
CpG-A ODN 2216（10 μmol/L）誘発性 ヒト pDC IFN-α 産生阻害	⑤	480	221
CpG-A ODN 2216（1 μmol/L）誘発性 HPBMC TNF-α 産生阻害	⑤	120	55
CpG-A ODN 2216（10 μmol/L）誘発性 ヒト pDC TNF-α 産生阻害	⑤	270	124
LPS 誘導 HPBMC からのマルチプレックスサイトカイン分析		**IC_{50}（nmol/L）**	**IC_{50}（ng/mL）**
TNF-α 産生阻害	④	110	51
IL-1β 産生阻害	④	> 100000	> 46000
IL-8 産生阻害	④	> 100000	> 46000
IL-12 産生阻害	④	120	55
GM-CSF 産生阻害	④	7800	3600
MIP-1α 産生阻害	④	440	200
MCP-1 産生阻害	④	1300	600
RANTES 産生阻害	④	> 100000	> 46000
IL-6 産生誘導	④	EC_{50} = 11000	EC_{50} = 5100
IL-10 産生誘導	④	EC_{50} = 80	EC_{50} = 37
抗 CD3 mAb 刺激初代ヒト T 細胞からのマルチプレックスサイトカイン分析		**IC_{50}（nmol/L）**	**IC_{50}（ng/mL）**
IL-5 産生阻害	⑧	30	14
IL-17 産生阻害	⑧	90	41
IL-10 産生阻害	⑧	190	88
IL-13 産生阻害	⑧	280	130
TNF-α 産生阻害	⑧	930	430
GM-CSF 産生阻害	⑧	1000	470
酵素及び細胞に対する阻害作用		**IC_{50}（nmol/L）**	**IC_{50}（ng/mL）**
IFN-γ 産生阻害	⑧	1300	580
IL-2 産生阻害	⑧	2400	1100
RANTES 産生阻害	⑧	4100	1900

Table 3　アプレミラストの細胞系での薬理作用（つづき）

cAMP 及び PGE2 増加に対する作用		**EC（nmol/L）**	**EC（ng/mL）**
PGE2 誘発性 HPBMC cAMP 増加	⑪	EC_{50} = 1510	EC_{50} = 695
PGE2 誘発性好中球での cAMP 増加	⑪	EC_{50} = 4570	EC_{50} = 2100
LPS 誘発性 HPBMC での PGE2 増加	⑪	EC_{150} = 85	EC_{150} = 39
PHA 誘発性 HPBMC での PGE2 増加	⑪	EC_{200} = 85	EC_{200} = 39
一酸化窒素及び E-セレクチン産生に対する阻害作用		**10 µmol/L での阻害%**	
IL-1β 誘発性 HUVEC 一酸化窒素産生阻害	⑫	87%	
TNF-α 誘発性 HUVEC E-セレクチン産生阻害	⑫	PGE2/アプレミラスト併用で 25%	

cAMP = 環状アデノシン 1 リン酸、EC_{50} = 50%有効濃度、$EC_{150\ (200)}$ = 150%（200%）有効濃度、fMLP = *N*-ホルミル-メチオニン-ロイシン-フェニルアラニン、GM-CSF = 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、HPBMC = ヒト末梢血単核球細胞、HUVEC = ヒト臍帯静脈内皮細胞、IC_{50} = 50%阻害濃度、IFN-α = インターフェロン-α、IFN-γ = インターフェロン -γ、IL = インターロイキン、LPS = リポ多糖、LTB4 =ロイコトリエン B4、mAb = モノクローナル抗体、MCP-1 = 単球遊走因子-1、MIP-1α = マクロファージ炎症性タンパク質-1α、NHLF = 正常ヒト肺線維芽細胞、ODN = オリゴデオキシヌクレオチド、PGE2 = プロスタグランジン E2、pDC =形質細胞様樹状細胞、PHA = 植物性血球凝集素、RANTES = ランテス（血小板や T 細胞由来の好酸球走化性物質）、SEB = ブドウ球菌エンテロトキシン B、TNF-α = 腫瘍壊死因子-α

Source: 4.2.1.1.1 項、4.2.1.1.10 項、 4.2.1.1.13 項、4.2.1.1.18 項、4.2.1.1.17 項、4.2.1.4.1 項、4.2.1.4.2 項

2.1.3. ヒト臍帯静脈内皮細胞での抗血管新生作用

血管内皮細胞の遊走及び血管透過性亢進に加え、血管平滑筋細胞の遊走も PDE4 阻害剤によって阻止され、PDE4 が乾癬等で生じる血管新生プロセスに関与しているとされる。そこで、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）誘発 HUVEC の増殖及び細胞内シグナル伝達に対するアプレミラストの作用について評価した。アプレミラストは VEGF 誘発性 HUVEC 増殖を濃度依存的に阻害したが（IC_{50} = 6.7 µmol/L）、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）誘発性 HUVEC 増殖には阻害作用を示さなかった。また、アプレミラスト（100 µmol/L）は Ser473 部位のセリンスレオニンキナーゼ Akt（Akt）リン酸化に対して有意な阻害作用を示したが、Thr308 部位の Akt リン酸化に対しては阻害作用を示さなかった。アプレミラストは、ヒト血管新生系アッセイでヒト臍帯血管からの発芽を濃度依存的に阻害（IC_{50} = 0.14 µmol/L）した。以上の結果から、アプレミラストが内皮細胞を介した VEGF シグナル伝達及び血管新生プロセス、並びに内皮細胞の増殖を阻害することが示され、乾癬性関節炎や乾癬で起きている血管新生プロセス（Coates, 2008）に対して何らかの効果がある可能性が示された。

低酸素誘導因子（HIF）は、低酸素作用のメディエーターであり、血管新生、転移、乾癬に関与している。HIF アイソフォームは、乾癬皮膚内で顕著にアップレギュレーションされるが、特に HIF-1α は表皮での血管新生に関与している。一方、腫瘍抑制因子 p53 は、HIF-1α 血管新生経路を抑制する。アプレミラストは、HUVEC の低酸素条件下 HIF-1α タンパク質発現を濃度依存的に阻害し、p53 タンパク質発現を増加させさせた。以上の結果から、アプレミラストは腫瘍抑制因子 p53 タンパク質発現を増加させることが示され、アプレミラストの p53 発現を介した抗血管新生作用が示唆された。同時に IL1β 誘発性 HUVEC による一酸化窒素の産生を 87%阻害した（Table 3、⑫）。

破骨細胞増殖抑制作用

アプレミラストは乾癬及び関節炎の動物モデルで効果を示し、皮膚及び関節のいずれの炎症過程も抑制する。破骨細胞は、骨髄単核細胞（BMM）由来の多核細胞であり、骨吸収に関与しおり、関節リウマチ又は関節症性乾癬の骨破壊に重要な役割を担っている。BMM 及び正常ヒト骨芽細胞を臨床血漿中濃度のアプレミラスト存在下で 7 日間インキュベートしたところ、アプレミラストは破骨細胞形成を有意に阻害した。また、破骨細胞形成因子である可溶性核内因子 κB 活性化受容体リ

ガンド（sRANKL）の発現の低下及び BMP-6 遺伝子発現の増加をもたらした。アプレミラストは破骨細胞及び骨芽細胞の両培養液中で sRANKL／オステオプロテゲリン（OPG）タンパク質比を低下させ、その作用は骨芽細胞に対してより顕著であった。これらの結果から、アプレミラストは骨芽細胞の sRANKL タンパク質発現の低下に関与する機序を介して破骨細胞の発現を阻害する可能性が示された。

2.1.4. アプレミラスト代謝物の薬理活性

アプレミラストの代謝物（M1/M2、M3、M5、M7、M12、M14、M16、M17）の PDE4 阻害及び TNF-α 産生阻害作用を評価した。評価した代謝物の中で、M7 及び M17（それぞれ CC-10055 及び CC-16401）が in vitro で PDE4 活性及び TNF-α 産生に対して強い阻害作用を示した。しかし、代謝物 M7 及び M17 のそれらの薬理作用はアプレミラストよりも弱く、血漿中アプレミラスト濃度に対する割合も 1%未満と極めて少量であることから、代謝物 M7 及び M17 の薬力学的作用に対する明らかな寄与はほとんどないと考えられた（Table 4）。

Table 4 アプレミラスト及びその代謝物のホスホジエステラーゼタイプ 4 及び腫瘍壊死因子-α 阻害作用

化合物	CC-番号	PDE4 IC_{50} (μmol/L)	TNF-α IC_{50} (μmol/L)
未変化体（アプレミラスト、*S*-エナンチオマー）	CC-10004	0.074	0.077
M1/M2: 開環加水分解体（*S*-エナンチオマー）	CC-15091	120	77
M3: *O*-脱メチル体（ラセミ体）	CC-15604	17	16
M3: *O*-脱メチル体（*S*-エナンチオマー）	CC-16085	8.3	5.6
M5: *O*-脱エチル体（ラセミ体）	CC-10047	44	4.9
M7: *N*-脱アセチル体（*S*-エナンチオマー）	CC-10055	0.16	0.13
M12: *O*-脱メチル体のグルクロン酸抱合体（*S*-エナンチオマー）	ヒト尿由来	5.5	IC_{40} = 10
M12: *O*-脱メチル体のグルクロン酸抱合体（*S*-エナンチオマー）	CC-16166	> 100	> 10 μmol/L（10 μmol/L で 24%）
M14: *N*-脱アセチル、*O*-脱メチル体のグルクロン酸抱合体	CC-16793	> 80 μmol/L	> 10 μmol/L
M16: 水酸化アセトアミドのグルクロン酸抱合体（*S*-エナンチオマー）	CC-16557	6.5	> 10 μmol/L（10 μmol/L で 24%）
M17: 水酸化アセトアミド（*S*-エナンチオマー）	CC-16401	0.094	0.021

$IC_{50\ (40)}$ = 50%（40%）阻害濃度、PDE4 = ホスホジエステラーゼ タイプ 4、TNF-α = 腫瘍壊死因子 α
Source: 4.2.1.1.24 項、4.2.1.1.25 項、4.2.1.1.26 項、4.2.1.1.27 項

2.2. In vivo 薬理試験

2.6.2.2.2 項

急性炎症反応モデルを使用した試験

LPS 誘発性 TNF-α 放出マウスモデル（Corral, 1996）で、アプレミラスト経口投与は血清中の TNF-α レベル上昇を強力に抑制し、抗炎症効果が確認された。

同様に、ラットの LPS 誘発性 TNF-α 放出モデルでも、アプレミラスト経口投与で血漿中の TNF-α 誘導が 80%以上抑制された（50%有効用量［ED_{50}］ = 0.018 μmol/L）。

ラットの空気嚢型炎症モデルで、アプレミラスト（10 mg/kg）の経口投与は、空気嚢での TNF-α レベルを 82%低下させたが、足蹠浮腫に対しては有意な抑制はみられなかった。

ラットカラゲニン誘発性炎症／痛覚過敏モデルでの作用

アプレミラストの抗炎症作用及び抗侵害受容作用についても評価した。本測定系で、アプレミラスト（50 mg/kg、IP）はラット足蹠浮腫を有意に軽減するとともに、投与 3 時間後の機械刺激及び熱刺激に対する疼痛閾値が生物学的に意義のある上昇を示した。このことから、アプレミラストは疼痛抑制を伴う抗炎症効果を有することが示された。

以上のような結果から、アプレミラスト（50 mg/kg、IP）は、痛みを伴う炎症性疾患の治療に有用であることが示唆された。

CIA モデルでの作用

CIA モデルを用いアプレミラストの抗関節炎作用を評価した。アプレミラストの経口投与により、足浮腫の抑制がみられた。また、別の実験では、足蹠関節炎パラメータのスコアの顕著な抑制と、関節炎の重症度低下傾向が確認された。

ヒト患者由来のリウマチ性滑膜細胞を用いた in vitro 試験及び CIA マウスモデルを用いた in vivo 試験では、アプレミラストは、関節リウマチ患者由来のリウマチ性滑膜細胞で TNF-α 産生を阻害し、その IC_{50} は 100 nmol/L であった。in vivo 試験では、アプレミラスト経口投与によって、臨床指標及び組織学的指標の改善が確認された。

CIA マウスモデルを用いて、アプレミラストが Th17 細胞に及ぼす影響を評価した結果、アプレミラストはマウスの鼡径部リンパ節の ex vivo 又はウシ II 型コラーゲン刺激による IL-17 産生に有意な影響を示さなかったが、IFN-γ 及び IL-6 を有意に増加させた。関節でのサイトカインの mRNA 発現には有意な差は認められなかったことから、IL-6 産生の増加がアプレミラストの抗炎症作用を妨げた可能性がある。

マウスの抗コラーゲン mAb カクテル・LPS 誘発実験的関節炎の複合モデルを用い、アプレミラスト経口投与後の抗関節炎効果について評価した。アプレミラスト経の経口投与は、デキサメタゾンと同程度に関節炎の活動性を有意に抑制した。病理組織学的評価では、アプレミラスト投与群では、関節炎を示唆する所見（滑膜過形成、滑膜絨毛形成、フィブリン沈着、滑膜への炎症細胞浸潤、パンヌス形成、軟骨組織破壊）がいずれもほぼ消失した。

マウスの抗コラーゲン mAb カクテル・LPS 誘発実験的関節炎の複合モデルを用いた 2 つの試験では、アプレミラストは 5 及び 25 mg/kg/日の用量で有意な抗関節炎効果（足蹠浮腫の軽減として測定）を示し、その効果は ETAN と同程度であった。しかし、本試験での病理組織学的評価では、アプレミラストの関節炎パラメータの抑制は有意ではなかった。

以下に、in vivo おけるアプレミラストの抗関節炎及び抗炎症効果についてまとめた（Table 5）。

Table 5　In vivo でのアプレミラストの抗関節炎及び抗炎症効果

添付資料番号	投与期間	刺激物質	用量／投与経路	試験の種類動物種／性	主な所見
急性炎症: TNF-α 産生抑制、抗炎症作用、痛覚過敏に対する効果					
4.2.1.1.1	3.5 時間	LPS	0.01～1 mg/kg ／PO	BALB/c マウス／雌	アプレミラストは LPS 誘発性血清中 TNF-α レベル上昇を抑制した（ED_{50} = 0.05 mg/kg）。
4.2.1.1.28	2.5 時間	LPS	0.01～10 mg/kg ／PO	CD ラット／雌	アプレミラストは LPS 誘発性血漿中 TNF-α レベル上昇を抑制した（> 80%、ED_{50} = 0.018 mg/kg）。
4.2.1.1.29	5 時間	カラゲニン	10 mg/kg／PO	CD ラット／雌	アプレミラスト前処理は空気嚢中 TNF-α レベルを 82%低下させた。
4.2.1.1.30	3 日間	カラゲニン	50 mg/kg/日（10 mg/mL／IP）	Sprague- Dawley ラット／雄	アプレミラストは足蹠浮腫を有意に軽減するとともに、投与 3 時間後の機械刺激及び熱刺激に対する疼痛閾値をいずれも生物学的に有意に上昇させた。
4.2.1.1.31	4 時間	カラゲニン	10 mg/kg／PO	CD ラット／雌	アプレミラストはカラゲニン注射による足蹠浮腫に対して作用を示さなかった。
CIA に対する抑制作用					
4.2.1.1.32	14 日間（試験第 21～34 日）	ウシ II 型コラーゲン	1、10 mg/kg/日 ／PO、QD	DBA/1LacJ マウス／雌	CIA モデルで、アプレミラストは 1 mg/kg の用量で足蹠浮腫を 49%抑制し、10 mg/kg の用量では 32%抑制した。
4.2.1.1.33	17 日間	ウシ II 型コラーゲン及び LPS	1、5、25 mg/kg/日／PO、QD	DBA/1LacJ マウス／雌	アプレミラストは足蹠関節炎パラメータのスコアを有意に抑制した（AP707 試験）。AP830 試験では関節炎重症度が低下する傾向が確認された。特記すべき点として、AP830 試験での対照群の関節炎重症度は AP707 試験での対照群よりも低かった。
4.2.1.1.34	10 日間 48 時間	ウシ II 型コラーゲン LPS	5、25 mg/kg/日 ／IP 6.25～100 nmol/L	DBA/1Ola-Hsd マウス 一部 In vitro 滑膜細胞	アプレミラストは両用量で CIA マウス関節炎の臨床的及び組織学的重症度を有効に低下させた。アプレミラストは関節リウマチ患者由来滑膜細胞の TNF-α 産生を阻害した（IC_{50} = 100 nmol/L）。

Table 5　In vivo でのアプレミラストの抗関節炎及び抗炎症効果（つづき）

添付資料番号	投与期間	刺激物質	用量／投与経路	試験の種類動物種／性	主な所見
4.2.1.1.35	41 日間	ウシ II 型コラーゲン及びフロイント完全アジュバント	10 mg/kg/日／PO、QD	DBA/1 マウス	アプレミラストは有意な抗関節炎効果を示さなかったが、アプレミラスト又は ETAN 投与により足蹠スコア及び測定値の一部低下が認められた。アプレミラスト投与により、ウシ II 型コラーゲン存在下で鼡径リンパ節に存在する IL-17 産生細胞の割合（%）は有意に変化しなかったが、14 日目での IFN-γ 及び 14 日目及び 28 日目での IL-6 レベルは有意に上昇した。
4.2.1.1.36	5 日間	コラーゲン mAb 及び LPS	1、5、25 mg/kg/日／PO、QD	BALB/c マウス／雄	アプレミラスト（25 mg/kg、5 日間）はマウスのコラーゲン mAb カクテル・LPS 誘発実験的関節炎の複合モデルで有意な抗関節炎効果を示した。病理組織学的評価では、アプレミラスト投与群で関節炎を示唆する所見は軽微であった。アプレミラストの 25 mg/kg の用量での抗関節炎効果は、デキサメタゾン 1 mg/kg と同程度であった。
4.2.1.1.37	11 日間	コラーゲン mAb 及び LPS	5、25 mg/kg／PO、QD	BALB/c マウス／雄	アプレミラスト（5 及び 25 mg/kg、11 日間）はマウスのコラーゲン mAb カクテル・LPS 誘発実験的関節炎の複合モデルで有意な抗関節炎効果を示した。病理組織学的評価では、アプレミラスト投与群で関節炎を示唆する所見は軽微となったが、これらの変化は統計学的有意ではなかった。アプレミラストの 5 及び 25 mg/kg（経口投与）の用量での抗関節炎効果は、ETAN の 5 mg/kg（IP）の用量での効果（8%～28%抑制、試験第 5～9 日）と同程度であった。

Table 5 In vivo でのアプレミラストの抗関節炎及び抗炎症効果（つづき）

添付資料番号	投与期間	刺激物質	用量／投与経路	試験の種類動物種／性	主な所見
4.2.1.1.38	11 日間	コラーゲン mAb 及び LPS	5 mg/kg／PO、QD	BALB/c マウス／雄	アプレミラストはマウスのコラーゲン mAb カクテル・LPS 誘発実験的関節炎の複合モデルで有意な抗関節炎効果を示した。病理組織学的評価では、対照群で認められた関節炎の程度が軽微から中等度であったために、アプレミラスト投与による抗関節炎効果を確認できなかった。

CIA = コラーゲン誘発関節炎、ED_{50} = 50%有効用量、ETAN = エタネルセプト、IC_{50} = 50%阻害濃度、IFN-γ = インターフェロン-γ、IP = 腹腔内投与、LPS = リポ多糖、mAb = モノクローナル抗体、PO = 経口投与、QD = 1 日 1 回、TNF-α = 腫瘍壊死因子-α

マウス異種移植乾癬モデルでの作用

マウス異種移植乾癬モデルを用いて、アプレミラスト（2.5 mg/kg、 BID、計 5 mg/kg/日）の薬理活性を CysA（2.5 mg/kg、BID）と比較評価した。正常ドナーの皮膚切片を Beige-重症複合免疫不全（SCID）マウスに異種移植し、乾癬患者由来 NK 細胞で処理すると、溶媒対照群に乾癬様所見が発現した。これらの皮膚移植片では乾癬と同様の組織学的所見が認められ、これらに伴って皮膚リンパ球浸潤（一部の部位で集簇巣、他の部位では顆粒層欠如）が認められた。

これらの乾癬様所見は、CysA の投与により、マウス 7 例中 3 例で完全又は部分的な寛解が認められた。同様に、アプレミラストの投与により、マウス 7 例中 4 例で完全又は部分的な寛解が認められた。これらの寛解には、表皮の形態学的正常化、リンパ球浸潤の消失がみられた。表皮の厚さ及びケラチノサイト増殖インデックスは組織学的所見と相関し、アプレミラストは溶媒対照群と比較して有意に表皮の厚さ及びケラチノサイト増殖インデックスを低下させた。これらのアプレミラストの作用は CysA と同程度であった。

CysA との間で治療効果がほぼ同等であることが示されたことから、アプレミラストは乾癬治療に有用な選択肢となると考えられた。

2.3. 副次的薬理試験

2.6.2.3 項

2.3.1. In vitro 試験

ヒトセレブロン（CRBN）への結合能

サリドマイドによる催奇形性は、サリドマイドのアミノグルタルイミド基を介して、たんぱく質の分解に関与するセレブロンと特異的に結合し、その結果、酵素のタンパク質分解活性を阻害することによって生じる。アプレミラストはアミノグルタルイミド基を含んでいないが、サリドマイドと構造的に類似するため、ヒト U266 MM 細胞抽出物中のヒト内因性 CRBN への結合性を定量的 CRBN 免疫ブロット法により評価した。その結果、対照薬であるレナリドミド（3 µmol/L）では著

名な CRBN への結合が認められたが、アプレミラストでは最高濃度の 100 μmol/L でも CRBN に結合しないことが確認された（4.2.1.2.1 項）。

したがって、アプレミラストによる催奇形性の可能性は低いと考えられる。

皮膚ループス細胞モデルでの作用

HPBMC で、TLR9 アゴニスト CpG-A ODN 2216 刺激による IFN-α 産生をアプレミラストは有意に阻害した（$p<0.0001$）。また、アプレミラストは、ケモカイン CXCL9（MIG）、CXCL10（IP-10）や 2',5'-オリゴアデニル酸合成酵素 1（OAS1）、シグナル伝達性転写因子 1（STAT1）及び CXCL11（I-TAC）をコードする IFN 誘導性ループス発現遺伝子を有意に阻害し、5 μmol/L の濃度ではインターフェロン調節因子 7（IRF7）、ミクソウイルス耐性遺伝子 A（MxA）、2',5'-オリゴアデニル酸合成酵素様タンパク質（OASL）、リンパ球抗原 6 複合体ローカス E（LY6E）の発現も有意に阻害した。1 μmol/L の TLR9 アゴニスト CpG-A ODN 2216 で刺激したヒト成人表皮ケラチノサイト（HEKa）hPDC では、アプレミラスト（0.25、0.5 及び 1 μmol/L）は IFN-α 及び TNF-α タンパク質産生を有意に阻害し（IFN-α: 0.25 μmol/L で $p<0.01$、TNF-α: 1.0 μmol/L で $p<0.0001$）、また HEKa 内 MxA タンパク質発現も有意に阻害（0.25 μmol/L で $p<0.01$）した。これらの結果から、アプレミラストが皮膚エリテマトーデスの治療で有効である可能性が示唆された。

腫瘍細胞増殖抑制作用

非ホジキンリンパ腫（Farage）細胞をアプレミラスト（0～100 μmol/L）存在下で 72 時間インキュベートした後に 6 時間の[^{3}H]-チミジン取込みアッセイを行ったところ、弱い増殖抑制作用（100 μmol/L で約 11.7%～55.6%の増殖抑制）が認められた。

2.3.2. In vivo 動物モデル及び補助的試験

以下の試験は、関節炎及びや乾癬以外のモデルで試験して得られた結果である。

2.3.3. ラット及びフェレットでの薬物動態及び薬力学作用

Wistar Han ラットにアプレミラストを投与した時のアプレミラスト濃度の脳／血漿比は 0.1 以下であったことから、アプレミラストは P 糖タンパク質の基質であると推察された。

フェレットでアプレミラストを単回経口投与した後のアプレミラスト濃度の脳／血漿比は 0.06～0.27 の範囲であり、肺／血漿比は 1.4～3.4 の範囲であった。

PDE4 阻害剤の既知の薬理作用は催吐作用であるが、本剤はフェレットで 10 mg/kg の経口投与で嘔吐を示さなかった。

フェレットで催吐作用がみられなかったのは、アプレミラストの血液脳関門透過性が低いことによるものと推察された。また、アプレミラストはフェレットで肺炎症を抑制したが、これは、肺組織中アプレミラスト濃度がより高かったことに起因すると考えられた。

2.3.4. 大腸炎モデルでの作用

アプレミラストは、炎症性腸疾患のモデルである TNBS 誘発大腸炎マウスモデルで、体重減少、下痢及び遠位大腸の粘膜損傷の重症度を用量依存的に軽減した。アプレミラスト投与により腸管粘膜陰窩の形態に修復がみられ、特に腸管粘膜陰窩の幅が増加した。

2.3.5. 肺炎症及び喘息モデルでの作用

アプレミラストは、ラット肺好中球増加モデルで経口及び気管内投与後に肺炎症を抑制した。アプレミラストは、無麻酔フェレットモデルでも経口投与により肺炎症を抑制した（ED_{50} = 0.8 mg/kg）。この試験でのアプレミラストの治療係数は 12（嘔吐閾値用量 10 mg/kg／好中球増加に対する ED_{50} 値 0.8 mg/kg）と推定された。

アプレミラストは、マウス慢性喘息モデルで卵白アルブミン（OVA）による最終惹起後の気道過敏性（AHR）を有意に抑制した。また、気管支肺胞洗浄（BAL）中の白血球数を有意に減少させ、リンパ球、マクロファージ及び好酸球数を減少させた。

アプレミラストの ex vivo で気管平滑筋弛緩能を評価した。アプレミラストはこの試験で自発張力下のモルモット気管を弛緩させ、その 50%有効濃度（EC_{50} 値）は 310 nmol/L であった。

2.3.6. 筋萎縮性側索硬化症モデルでの作用

ヒトスーパーオキシドジスムターゼ（hSOD1）の変異遺伝子を発現する ALS モデルマウスに、アプレミラストを混餌投与した。アプレミラスト高用量群では、雌雄マウスともに臨床症状発現の有意な遅延（4～6、p<0.05）がみられ、生存日数はわずかに延長（2～4 日、p=0.82）した。低用量群では、雌雄の臨床症状発現に変化はなく、生存日数では、雌で 13.8 日（p=0.20）、雄で 8.0 日（p = 0.39）延長した。また、生存日数と血漿中アプレミラスト濃度にはわずかな相関がみられた（r = 0.26）。

2.3.7. 神経因性疼痛の Bennett モデルでの鎮痛作用の評価

Sprague-Dawley ラットに慢性絞扼損傷（CCI）を施し自発痛を惹起した。アプレミラスト（3 mg/kg、BID）を経口投与し、機械的アロディニア及び体重負荷の検査によって、術後第 12 及び 15 日にラットの疼痛感受性を評価した。その結果、アプレミラストは疼痛緩和を示さなかった。検査したいずれの時点でも、体重負荷の指標にも群間差はみられなかった。

2.4. 安全性薬理試験

2.6.2.4 項

中枢神経系

雄マウスにアプレミラスト（500、1000、2000 mg/kg）を単回経口投与した。アプレミラストの 500 mg/kg（平均 AUC_{24h} = 112,640 ng·h/mL: 臨床濃度時間曲線下面積（AUC）の 15.4 倍、平均 C_{max} = 8650 ng/mL: 臨床 C_{max} の 12.9 倍）では、一般症状又は行動様式（Irwin の変法）に影響を及ぼさなかった。1000 mg/kg 投与群では、流涙や眼瞼下垂が認められたものの、その程度は軽度であり、症状の継続時間も短期間であった。

呼吸器系

麻酔下イヌで、アプレミラスト（0.5、1、5 mg/kg）を単回静脈内投与（C_{max} = 5074 ng/mL、臨床 Cmax の 7.6 倍）した。いずれの用量でも呼吸機能には影響を及ぼさなかった。

心血管系

上記の麻酔下イヌで、アプレミラストの 0.5 mg/kg では心機能に明らかな影響は認められなかった。高用量群（1 及び 5 mg/kg）では用量に相関した心拍数及び左室圧一次微分最大値: 心収縮力の指標（dP/dt_{max}）の中等度増加が認められた。また、これらの群では心電図（ECG）で、心拍間隔（RR 間隔）及び QT 間隔の短縮が認められたが、心拍補正 QT 間隔（QTc）に関しては影響は認められなかった。 NOAEL は 0.5 mg/kg（平均 C_{max} = 662 ng/mL、臨床 C_{max} の 1 倍）であった。補正 QT 間隔（QTc）に関しては最高用量の 5.0 mg/kg（平均 C_{max} = 5074 ng/mL、臨床 C_{max} の 7.6 倍）まで投与に関連した影響は認められなかった。

In vitro 試験で、hERG カリウム電流（IKr）の有意な阻害は認められなかった。hERG 電流に対するアプレミラストの阻害の IC_{50} は 184.2 µmol/L（Hill 係数 = 1.1）と推定され、この結果はヒトでの C_{max} の 127 倍を超えるマージンがあることを示している。

サルの 12 ヵ月までの反復投与毒性試験でも ECG パラメータ又は心拍数に投与に関連した異常はみられなかった。最も長期の 12 ヵ月試験の最高用量は 600 mg/kg/日（平均 AUC_{24h} = 34,772 ng•h/mL［臨床 AUC の 4.8 倍］、平均 C_{max} = 3450 ng/mL［臨床 C_{max} の 5.1 倍］）であった。さらにアプレミラストはヒト QT/QTc 試験で 5 mg BID までの用量で評価され、QT/QTc 間隔又は心拍数、バイタルサイン、臨床検査パラメータに投与に関連した影響のないことが確認された。

胃腸管系

雄マウスにアプレミラスト（0、10、100 又は 1000 mg/kg）を単回経口投与した。次いで炭粉懸濁液を投与し消化管運動に対するアプレミラストの影響を評価した。その結果、いずれの投与群でも炭末懸濁液の輸送に変動は認められなかった。本試験での NOEL は 1000 mg/kg と考えられた。

雄マウスにアプレミラスト 1000 mg/kg を投与した場合の平均 AUC_{24h} は 117,290 ng•h/mL、平均 C_{max} は 9184 ng/mL であり、アプレミラストを 30 mg（BID）の用量で局面型乾癬患者に投与した場合（CC-10004-PSOR-005-PK 試験）のヒト臨床 AUC 及び C_{max} のそれぞれ 16.0 倍及び 13.7 倍であった。

2.5. 薬力学的薬物相互作用試験

2.6.2.5 項

In vitro 試験

PGE2 は単球、T 細胞や他の白血球表面のプロスタノイド受容体に結合して細胞内の cAMP 濃度を増加させ、細胞応答を阻害する。PGE2 とアプレミラストを併用処理すると、HPBMC 及び好中球内の cAMP 濃度が用量依存的かつ相乗的に増加したことから、アプレミラストが PGE2 を介した細胞内 cAMP 濃度上昇を増強することが示された。さらに、cAMP を産生するアデニル酸シクラーゼの活性化剤であるフォルスコリンとアプレミラストを併用処理すると、NHLF での TNF-α 刺激性 GM-CSF 産生を用量依存的かつ相乗的に阻害することから、アプレミラストは異常組織のリモデリングに伴う肺線維芽細胞の動員及び GM-CSF 活性を調節することが示唆された。

E-セレクチンは、細胞接着分子であるとともに重要な血管新生メディエーターであり、血管増殖性疾患患者や炎症性疾患患者で上昇する。HUVEC で TNF-α で誘発される E-セレクチン及び他の接着分子の発現に対する作用をアプレミラストの単独及び PGE2 との併用により評価する試験を実施したところ、アプレミラストと PGE2 を併用した場合に、TNF-α で誘発される E-セレクチン及び VCAM-1 の発現が有意に阻害された。これらの結果から、E-セレクチン及び VCAM-1 阻害が、

PGE2 存在下でのアプレミラストの抗血管新生薬及び抗炎症薬としての作用機序であると推察される。

SEB 処理 HPBMC を用いて、関節リウマチ及び乾癬と関連するサイトカインの産生に対するアプレミラスト（0.4～1600 ng/mL）の作用を CysA、ETAN 又は MTX との併用により評価した。アプレミラストは CysA との併用により IL-10、IP-10、MIP-1α、マクロファージ炎症性タンパク質-1β（MIP-1β）及び TNF-α 産生を相乗的に阻害した。また、ETAN との併用により IL-1、IP-10 及び MIP-1α 産生を相乗的に阻害した。一方、MIP.1β 及び TNF-α 産生の阻害は相加的ではなかった。さらに、アプレミラストと MTX との併用も、これら 5 種類のサイトカイン産生阻害は相加的ではなかった。

アプレミラストは IL-1、IL-6 及び IL-6R で刺激した初代正常ヒト軟骨細胞及び関節リウマチ由来滑膜線維芽細胞での IL-7 遺伝子発現に及ぼす影響を評価した。その結果、アプレミラストは単独で IL-7 遺伝子発現を用量依存的に有意に阻害した。関節リウマチ由来滑膜線維芽細胞では、アプレミラストは ETAN 又は MTX との併用処理により IL-7 発現をアプレミラスト単独処理の場合より強力で有意な阻害作用を示した。

In vivo 試験

マウスの抗コラーゲン mAb カクテル・LPS 誘発実験的関節炎の複合モデルで、アプレミラストと ETAN の併用により相加的かつ溶媒対照と比較して有意に足蹠浮腫が軽減され、相加的な抗関節炎効果が認められた。しかし、病理組織学的評価では、アプレミラストによる関節炎パラメータの抑制は有意ではなかった。病理組織学的評価の結果に一貫性がみられなかったのは、対照群で認められた関節炎の程度が軽微から中等度であったことに起因すると推察される。

マウス CIA モデルで、インドメタシン又は MTX と併用したときのアプレミラストの作用を評価したが、全体的にアプレミラストの単独投与により足蹠スコア及び測定値が一部低下したものの、抗関節炎効果はみられなかった。また、相互作用もみられなかった。

マウス異種移植乾癬モデルでは、アプレミラストと MTX との併用について試験した。MTX 1 mg/kg 単独では明らかな効果はみられなかったが、アプレミラスト（BID、計 5 mg/kg/day）との併用では、マウス 5 例中 2 例で中等度の治療効果がみられた。一方、MTX の 2 及び 3 mg/kg の用量では、大半のマウスで乾癬様所見が完全に消失した。毒性所見に関しては、MTX 2 mg/kg 投与群及び MTX 1 mg/kg/アプレミラスト併用投与群では毒性変化は認められなかったのに対し、MTX 3 mg/kg の用量ではすべての投与マウスで毒性変化と死亡がみられた。

これらの試験結果からは、乾癬治療でのアプレミラストと MTX あるいはインドメタシンとの併用は、意味のある治療法とは言い難いと考えられた。

3. 薬物動態試験

アプレミラストの吸収、分布、代謝及び排泄について、毒性試験に用いた動物を使用して in vitro 及び in vivo にて評価した。In vitro の試験で、アプレミラストと併用薬との薬物相互作用の可能性も評価した。

吸収及び体内動態試験並びにトキシコキネティクス試験に際して、アプレミラスト（アキラル又はキラルクロマトグラフィー）及びその代謝物である *O*-脱メチル体及び *O*-脱メチル体のグルクロン酸抱合体の生物学的分析法を開発した。

アプレミラスト及びその代謝物に関するすべての分析法で、直線性、特異性、回収率、精度及び正確性、再現性、安定性、希釈倍率の評価について、バリデーションを実施し、良好な結果を得た。

動物で、アプレミラストの全身クリアランス（又は経口クリアランス）に大きな種差があり、マウス及び雄ラットでは肝血流量の 5 分の 1 未満の低クリアランスで、雌ラット及び雌ウサギでは肝血流量の 50%を超える高クリアランスであった。マウス、ラット、雌ウサギでは、分布容積は中程度で、体内水分量の約 2～3 倍であり、この結果は、アプレミラストが血管外組織への分布が良好であることを示している。アプレミラストの動物での消失半減期は 1～3 時間であった。アプレミラスト由来の放射能の経口吸収性は高く、マウスとサルでは 70%を超えていた。アプレミラストの経口投与時のバイオアベイラビリティには種差があり（マウスが 27%、雄ラットで 12%、雌ラットで 65%、ウサギは 1%未満）、初回通過代謝に種差があることを示唆している。ラットで、アプレミラストの体内動態に著しい性差が認められたが、マウスとサルでは認められなかった。広い投与量範囲で経口投与したとき、アプレミラストの曝露量は投与量とともに増加したものの、用量比ほどの増加は認められず、アプレミラストの吸収は溶解度律速であると示唆された。試験全体を通じて、すべての用量で、マウスとサルに反復投与後の血漿中濃度に一定の蓄積傾向は認められなかった。毒性試験の評価で用いた 4 種の動物で、アプレミラストの光学異性体変換は認められなかった。

アルビノマウスで、[^{14}C]-アプレミラスト由来の放射能は、速やかに組織に分布したが、その濃度は低く、投与後 1 週間までに定量限界未満となった。最高放射能濃度は、肝及び腎臓等の代謝又は排泄に関連した主要な臓器及び膵臓に認められた。アルビノマウスでの放射能の組織分布パターンは雌雄とも同様であった。雄の有色ラットで、ブドウ膜、有色皮膚のようなメラニン含有組織と放射能濃度の間に有意な関係は認められなかった。血液脳関門の通過は極めて低かった。ラットとサルで、血液／血漿中放射能濃度比は 0.60～0.77 の間であり、アプレミラストとその代謝物はあまり血球には移行しないと示唆される。アプレミラストの平均血漿タンパク結合率は、マウス 88.6%、ラット 90.6%、ウサギ 80.9%、サル 84.3%、ヒト 68.3%であり、この濃度範囲では血漿タンパク結合は濃度非依存性であることが明らかとなった。アプレミラストの胎盤通過性をマウス及びサルで評価した結果、平均胎児／母動物血漿中濃度比は 0.3～1.07 であり、両動物種でアプレミラストが胎盤を通過することが示された。

アプレミラストは in vitro 及び in vivo で広く代謝される。すべての動物種で少なくとも一部のアプレミラストのイミド結合は非酵素的な加水分解を受ける。*N*-アセチルアミド結合もヒトを含む複数の動物種で加水分解を受けるが、量的には少ない。アプレミラストは、主として *O*-脱アルキル化による酸化的代謝を広く受けるとともに、量としては少ないが水酸化も受ける。イミド結合の加水分解及び脱アルキル化により生成するアプレミラストの代謝物のホスホジエステラーゼタイプ 4（PDE4）酵素及び腫瘍壊死因子-α（TNF-α）産生に対する阻害活性は、アプレミラストに比較して顕著に低く、これら代謝物は、アプレミラストの薬理活性には寄与しないと考えられた。ヒトを含むすべての動物種で主要な酸化代謝経路は、代謝物 M3 への *O*-脱メチル化反応であり、M3 は続いてグルクロン酸による抱合を受け主代謝物 M12 に代謝される。ヒトでは代謝物 M12 は主要な血漿中代謝物であり、血漿中放射能 AUC の 39%を占め、その排泄率は投与放射能の 34%であった。

M12 は毒性試験に用いられた動物種でも主要な血漿中代謝物であった。以上の結果より、ヒトで認められた代謝物はすべて、毒性試験に用いた 1 種ないし複数の動物種で生成が確認され、ヒト特異的な代謝物は認められなかった。

動物では、[^{14}C]-アプレミラスト由来の放射能は主として胆汁を介して糞中排泄され、静脈内投与時では投与放射能量の 56%～71%が糞中に認められた。尿への排泄は、静脈内投与放射能量の 8%～18%と少なかった。[^{14}C]-アプレミラストを経口投与後の動物でも、吸収された放射能の主排泄経路は胆汁を介した糞中排泄が主であった。[^{14}C]-アプレミラスト由来の放射能は主に代謝物として排泄され、未変化体の排泄は極めて少なかった。

授乳中のマウスにアプレミラストを経口投与したとき、乳汁／血漿中濃度比は 1.46～1.62 であり、マウスでアプレミラストの乳汁への排泄が認められた。

アプレミラストの酸化的代謝は主としてチトクローム P450（CYP）3A4 によるものであり、CYP1A2 及び CYP2A6 等の他の CYP 分子種の寄与はわずかであった。In vivo での結果とともに、これらのデータは、生体でのアプレミラストのクリアランスには、非酵素的加水分解に加えて、複数の酵素により触媒される多くの代謝経路（CYP 非依存性 *N*-脱アセチル化、酸化的代謝とそれに続くグルクロン酸抱合）が介在し、未変化体としての排泄はわずかであることを示している。アプレミラストを強い CYP 阻害剤と併用した場合でも、臨床上問題となる薬物相互作用は生じないと考えられた。

In vitro 試験では、アプレミラストの臨床血漿中濃度で CYP の誘導及び阻害は認められなかった。したがって、CYP の基質となる薬物とアプレミラストを併用しても、CYP の阻害や誘導により CYP の基質薬物と臨床上問題となる薬物相互作用は生じないものと考えられた。

アプレミラストは P 糖タンパク（P-gp）の基質であるが、消化管からの吸収は抑制されない。アプレミラストは、P-gp、乳がん耐性タンパク質（BCRP）、多剤耐性関連タンパク質（MRP）1、MRP2、MRP3、MRP4、有機アニオントランスポーターポリペプチド（OATP）1B1、OATP1B3、有機アニオントランスポーター（OAT）1、OAT3、有機カチオントランスポーター（OCT）2 に対する阻害作用はほとんどなく、アプレミラストをこれらのトランスポーターの基質薬物と併用しても臨床用量で薬物相互作用が生じる可能性はないと考えられた。さらに、in vitro でアプレミラストは BCRP、OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3 及び OCT2 に対する基質とはならず、アプレミラストをこれらトランスポーターの阻害薬と併用しても薬物相互作用は生じないと考えられた。

4. 毒性試験

4.1. 単回投与毒性

2.6.6.2 項

マウス及びラットでの単回投与毒性試験は、経口投与及び静脈内投与で実施された。また、非げっ歯類での急性毒性評価として、サルの 14 日間経口投与 MTD 評価試験での適切なデータを使用した。各試験成績の要約を Table 6 に示した。

Table 6　アプレミラストの単回投与毒性試験での概略の致死量

動物種	投与経路	概略の致死量（mg/kg）	試験番号
マウス（雌雄）	経口	>2000	1398/278
ラット（雄）	経口	2000	1398/276
ラット（雌）	経口	300～700	1398/276
サル（雌雄）	経口	>1000	1398/283
マウス（雄）	静脈内	120	1398/279
マウス（雌）	静脈内	120～200	1398/279
ラット（雌雄）	静脈内	60<LD<75	1398/277

LD = 致死量

4.2. 反復投与毒性

2.6.6.3 項

Crl:CD-1（ICR）マウス及びカニクイザルは、これらの動物種でのアプレミラストの代謝がヒトでの代謝パターンと比較可能なことから、毒性試験に使用する動物種として選択した。マウスでのアプレミラストの代謝はヒトと類似しており、薬物代謝及び薬物動態試験の成績に基づき、マウスはラットよりも適切な動物種として選択した。雌ラットではヒト肝ミクロソームで産生される主要な代謝物（M3、*O*-脱メチル体）が生成されず、ヒト肝ミクロソームで検出された別の代謝物（M7、*N*-脱アセチル体）は、ラット及びサルでは認められなかった。さらに、雌ラットの曝露量は雄ラットよりも約 10～25 倍高く、ラットの曝露量に明らかな性差が認められた。ラットで認められた曝露量の性差は代謝量の違いによるものと考えられた。

そこで、マウスでの 6 ヵ月間までの反復投与毒性試験、及びサルでの 12 ヵ月間までの反復投与毒性試験を実施した。加えて、がん原性試験での用量設定のために、マウス及びラットでの 3 ヵ月間投与 MTD 評価試験を実施した。

4.2.1. マウス

2.6.6.3.1 項

アプレミラストのマウスでの 4 週間投与毒性試験として 3 試験を実施した。3 試験の用量は、それぞれ 250、600 及び 1500 mg/kg/日、5、25、75 及び 150 mg/kg/日、1、2 及び 4 mg/kg/日とした。アプレミラストの 600 mg/kg 以上の用量で死亡が認められた。5～1500 mg/kg で投与した結果、好中球数又はグロブリンの上昇、アルブミンの低下、又は動脈炎及び血管周囲炎などが認められた。動脈炎又は血管周囲炎は、雄では 5 mg/kg/日以上、雌では 150 mg/kg/日以上で心臓、肺、胸腺又は腎臓に観察された。血液学的検査及び血液生化学的検査値の変化はこれらの組織での血管系の重度な好中球性炎症と関連していた。このほか 250 mg/kg/日以上で肝臓、骨髄及びリンパ節での造血亢進、及び関節の滑膜肥厚及び滑膜炎が観察された。75 mg/kg/日以上で胃粘膜の角化亢進が認められた。

4 mg/kg/日以下では、毒性パラメータに本薬投与に関連する変化はみられなかった。したがって、4週間投与毒性試験での NOAEL は 4 mg/kg/日（ヒト曝露量の 0.5 倍）以上と考えられた。

13 週間投与毒性試験では、アプレミラストを投与量 2、4、8 及び 16 mg/kg/日で投与した結果、本薬投与に関連した病理組織学的所見として、16 mg/kg/日群の小数例で大動脈起始部及び胸腺の軽微な動脈炎並びに肺の血管周囲の軽微な炎症性細胞浸潤のみが観察された。したがって、13 週間投与試験での NOAEL は 8 mg/kg/日（ヒト曝露量の 1.3 倍）であると考えられた。

アプレミラストの MTD を推定するために計画されたマウスの 3 ヵ月間投与毒性試験（100、300 及び 1000 mg/kg/日）では、1000 mg/kg/日までの群で良好な忍容性が認められた。本薬投与に関連した変化として、300 mg/kg/日以上の群の雌雄で、好中球数増加又はハプトグロビン値の高値が認められた。300 mg/kg/日以上の群の少数例で、心臓（心筋の変性又は壊死、線維化及び鉱質沈着、慢性炎症、血管の線維化及び鉱質沈着）及び肺（血管周囲又は細気管支周囲の炎症、血管の変性及び出血）が認められ、1000 mg/kg/日群の雄の少数例で胸腺、脾臓又は腸間膜リンパ節のリンパ球枯渇並びに腸間膜リンパ節及び膵臓の血管周囲の炎症が認められた。本試験での NOAEL は 100 mg/kg/日（ヒト曝露量の 3.4 倍）、MTD は 1000 mg/kg/日（ヒト曝露量の 11.5 倍）であると考えられた。

6 ヵ月間投与毒性試験（10、100 及び 1000 mg/kg/日）では、100 mg/kg/日以上の群でアプレミラスト投与に関連した死亡が認められた。死亡又は早期の安楽死に供された 100 mg/kg/日群の 1 例及び 1000 mg/kg/日群の 3 例では、本薬投与に関連すると考えられる血管及び血管周囲の炎症又は壊死が認められ、この結果として出血巣（骨格筋、腹壁、腸間膜、乳腺又は隣接した筋組織）若しくは肝梗塞が認められた。血液生化学的検査では、100 又は 1000 mg/kg/日群に総タンパク及びグロブリンの上昇、並びにハプトグロビン値の高値が認められた。1000 mg/kg/日群の雌で心臓重量の増加がみられ、この変動に関連して、病理組織学的検査で心臓に炎症又は鉱質沈着が認められた。本薬投与に関連すると考えられる主な病理組織学的所見として、心臓（大動脈起始部及び心臓の動脈）、腸間膜及び膵臓での血管並びに血管周囲の炎症が 100 mg/kg/日以上の群の小数例で散見された。また、これらの群では上記の心臓の炎症性変化に関連して、血管の鉱質沈着や軟骨化生（大動脈起始部）も少数例に認められた。さらに、発現率は低いものの肝臓での血管及び血管周囲の炎症や胆管周囲の線維化が 100 mg/kg/日群の雄で、胆嚢の炎症や壊死が 1000 mg/kg/日群の雌でそれぞれ認められ、これらも本薬投与に関連する変化と考えられた。したがって、6 ヵ月間投与毒性試験での NOAEL は 10 mg/kg/日（ヒト曝露量の 0.8 倍）であると考えられた。

4.2.2. ラット

2.6.6.3.2 項

ラットでの MTD の推定及びがん原性試験の用量設定のために計画された 3 ヵ月間投与毒性試験（雄では 30、100、300 及び 1000 mg/kg/日、雌では 0.3、3、10 及び 30 mg/kg/日）では、30 mg/kg/日以上の群の雄及び 10 mg/kg/日以上の群の雌で、アプレミラスト投与に関連する死亡が認められた。明らかな毒性徴候が認められたため、雄の 100 mg/kg/日群で試験 48 日、300 mg/kg/日群で試験 11 日、1000 mg/kg/日群で試験 9 日に、雌の 10 mg/kg/日群で試験 26 日、30 mg/kg/日群で試験 9 日に、それぞれ投与を中止した。雄の 1000 mg/kg/日群及び雌の 30 mg/kg/日群の生存例には、それぞれ 82 又は 83 日間の休薬期間を設けた。

アプレミラスト投与群で複数の組織に急性炎症及びリンパ球枯渇が認められた。急性炎症は、好中球増加、ハプトグロビン値の高値及びアルブミンの低下と関連していた。本薬投与に関連する所見は、82 又は 83 日間の休薬期間終了時で、30 mg/kg/日群の雌でリンパ節、脾臓及び胸腺に軽微から軽度のリンパ球枯渇がみられたことを除いて回復した。したがって、ラットの MTD は、雄では 30 mg/kg/日（ヒト曝露量の 0.2 倍）、雌では 3 mg/kg/日（ヒト曝露量の 1.0 倍）であると考えられた。

4.2.3. サル

2.6.6.3.3 項

サルの 2 週間投与毒性試験では、アプレミラストを 750 mg/kg/日で経口投与した結果、嘔吐、体重減少、リンパ系組織（胸腺、脾臓及びリンパ節）の萎縮が観察されたが、概して忍容性は良好であった。リンパ系組織でのこのような変化はストレスによる生理的影響と一致していると考えられた。骨髄での造血亢進も認められたが、病理組織学的検査でアプレミラスト投与と関連する限局性又は全身性の炎症はみられなかった。したがって、MTD は 750 mg/kg/日であると考えられた。

2 週間投与予備試験（1%カルボキシメチルセルロース［CMC］投与液で 50 及び 250 mg/kg BID、又は 200 及び 1000 mg/kg の 1 日 1 回投与［QD］、0.25 w/v%Tween 80 添加の 1 w/v%CMC 投与液で 200 mg/kg QD）は、アプレミラストの最適な投与スケジュール及び投与液処方を評価するとともに、胚・胎児発生に関する試験での用量設定のために実施した。投与 1 週には主に嘔吐が観察された。本薬投与に関連する病理組織学的所見は心筋組織を採取した 3 例中 1000 mg/kg/日群の 2 例のみにみられ、主に好酸球性炎症細胞浸潤による中等度の多巣性心筋炎が認められ、それらに付随して出血巣及び心筋変性が観察された。この発現時期、分布及び好酸球性炎症細胞浸潤から、過敏症心筋炎であることが示唆された。長期間（最長 12 ヵ月間）投与した他のサルの試験では同様の所見はみられなかった。したがって、この 2 週間投与試験での NOAEL は 250 mg/kg BID（500 mg/kg/日［ヒト曝露量の 12.8 倍］）であった。

28 日間投与毒性試験（50、180 及び 650 mg/kg/日）では、180 mg/kg/日以上の群で、投与後 3 時間以内に散発的に嘔吐が認められた。雌雄で、対照群と比較して約 2～4 倍に相当する好中球数の増加が認められ、650 mg/kg/日群の雄で肝臓重量の増加（25%）がみられたが、対応する病理組織学的所見を伴わなかった。650 mg/kg/日群の雌 2 例及び 180 mg/kg/日群の雄 1 例で軽微かつ限局性の動脈炎が認められた。この所見が限局性かつ軽微であること及び実験動物サルでは同様の変化が自然発生的に認められることから、この変化は自然発生性所見である可能性が高いと考えられた。当該試験の後に実施した 12 ヵ月間投与毒性試験では同様の投与量及び全身曝露量であったが、同様の所見はみられていない。したがって、当該試験での NOAEL は 650 mg/kg/日（ヒト曝露量の 9.4 倍）であると考えられた。

13 週間投与毒性試験（25、85 及び 300 mg/kg/日）では、25 mg/kg/日以上の群で流涎が認められ、300 mg/kg/日群で嘔吐又は空吐が散発的に観察された。肝細胞空胞化の増加が認められたが、用量依存性はなく、細胞質内グリコーゲン貯留に関連していた。肝細胞のグリコーゲン貯留は実験動物サルに共通して認められる自然発生性所見であり、この試験の対照群でも認められている。したがって、対照群をわずかに超える増加は毒性学的意義のない所見と考えられた。この 13 週間投与毒性試験での NOAEL は 300 mg/kg/日（ヒト曝露量の 3.8 倍）であった。

12 ヵ月間投与毒性試験（60、180 及び 600 mg/kg/日）では、投与期間中にアプレミラスト投与に関連すると考えられる途中死亡はみられず、600 mg/kg/日まで忍容性が良好であった。病理学的検査及び病理組織学的検査でも、アプレミラスト投与に関連すると考えられる影響はみられなかった。600 mg/kg/日群で試験 13 及び 39 週に好中球数の増加が認められたが、試験 51 週までに回復した。180 及び 600 mg/kg/日群で試験 51 週にフィブリノーゲン（雌雄）、C-反応性タンパク（CRP）（雄のみ）及びハプトグロビン値（雌雄）の増加が認められた。60 mg/kg/日以上の群の雄で試験 13 週に成熟 T 細胞及び NK 細胞の減少が認められたが、試験 51 週時点では部分的に回復していた。これらの変化は毒性と考えられなかったことから、当該試験での NOAEL は 600 mg/kg/日（ヒト曝露量の 4.8 倍）であった。

4.2.4. 反復投与毒性試験の要約

マウスの 6 ヵ月間投与毒性試験及びサルの 12 ヵ月間投与毒性試験（げっ歯類及び非げっ歯類での最も長期間の反復投与毒性試験）での NOAEL はそれぞれ 10 及び 600 mg/kg/日であり、血漿中 AUC はそれぞれ 5728 及び 34,772 ng•h/mL（ヒト曝露量のそれぞれ 0.8 倍及び 4.8 倍）であった（Table 8）。アプレミラストを反復投与すると、マウス及びサルでの一般状態観察所見が用量相関的に認められ、死亡（マウス）、体重及び摂餌量の増加（マウス）、並びに嘔吐（サル）が観察された。可逆的かつ用量相関的な炎症反応として、好中球数増加、リンパ球数減少及び血清タンパクの変動（アルブミン低下、グロブリン上昇、並びにハプトグロビン値、CRP 又はフィブリノーゲンの上昇）が特にマウスに観察された。これらの炎症反応は、マウスの様々な器官及び組織で動脈炎及び血管周囲炎を伴っていたが、サルでは、マウスよりも高い全身曝露量であってもこれらの変化は認められなかった。本薬のその他の標的器官での変化として、肝毒性とみなされない小葉中心性肝細胞肥大（マウス）及びリンパ系組織の可変的なリンパ球枯渇（マウス）が観察された。炎症反応及びリンパ球枯渇は、本薬投与継続中でもかなりの回復性が認められた。マウスへの反復投与後の回復性評価試験では、投与 3 日又は 14 日後に胸腺、腸間膜リンパ節及び肝臓で観察された組織学的変化は、31 日ないし 76 日間の休薬期間後、又は 90 日間の持続投与中でも完全な回復又は回復傾向が認められた（2.4.4.7.2.2 項）。臨床試験では、血管炎はアプレミラスト投与との関連はみられなかった。加えて、第 2 相臨床試験での臨床検査及び末梢血の炎症性バイオマーカー（白血球数又は好中球数、赤血球沈降速度［ESR］、アルブミン、フィブリノーゲン又は CRP）に顕著な変化はみられなかった。

4.3. 遺伝毒性

2.6.6.4 項

アプレミラストは遺伝毒性を示さなかった。本薬は細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames 試験）及びヒト末梢血リンパ球を用いる染色体異常試験では代謝活性化系の有無に関わらず遺伝毒性を示さず、マウス小核試験では最高 2000 mg/kg までの用量で染色体異常を誘発しなかった。アプレミラストに不純物 RC6 を 5 w/w%混入させた不純物混入物は、細菌を用いる復帰突然変異試験で遺伝毒性を示さないと考えられた。

4.4. がん原性

2.6.6.5 項

アプレミラストはがん原性を示さなかった。がん原性試験では、マウス及びラットにも本薬投与に関連した腫瘍の発生頻度の上昇は認められなかった。マウスのがん原性試験では、100 mg/kg/日群の雄は 103 週間、同群の雌は 99 週間の投与、300/200 mg/kg/日群（73 週に用量減量）の雄は 98 週間、同群の雌は 96 週間の投与、1000 mg/kg/日群の雄は 73 週間、1000/500 mg/kg/日群（73 週に用量減量）の雌は 102 週間の連日経口投与後、103/102 週の病理学的検査により、がん原性を示唆するエビデンスは認められなかった。ラットのがん原性試験では、雄については 3 mg/kg/日群が 91 週間、10/6 mg/kg/日群（66 週に用量減量）が 89 週間、20 mg/kg/日群が 66 週間の連日経口投与後、95～100 週の病理学的検査により、がん原性を示唆するエビデンスは認められなかった。同様に、雌ラットについては 0.3、1 及び 3 mg/kg/日群でそれぞれ試験 103、101 及び 94 週まで連日経口投与した後、試験 104 週の病理学的検査により、がん原性を示唆するエビデンスは認められなかった。

4.5. 生殖発生毒性

2.6.6.6 項

胚・胎児発生に関する試験で使用する動物種として、げっ歯類はマウスを用いた。非げっ歯類は、ウサギに経口投与したときに測定可能なアプレミラストの曝露がみられなかったため、サルを用いた。また、受胎能及び初期胚発生に関する試験、出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験では、これらを評価する動物種としてマウスを使用した。

4.5.1. 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

2.6.6.6.1 項

受胎能及び着床までの初期胚発生に関する最初の試験では、アプレミラストを 100、300 及び 1000 mg/kg/日で雌雄マウスに 1 日 1 回、経口投与した。雄への投与は交配の 28 日前から開始し、交配期間を含め病理学的検査前日まで継続した。雌への投与は交配の 15 日前から開始し、交配期間を含め妊娠 7 日まで継続した。100 mg/kg/日以上の群の雌雄で体重増加量の増加が認められた。100 mg/kg/日以上の群で精巣の重量増加、300 及び 1000 mg/kg/日群で精嚢の重量減少、1000 mg/kg/日群で前立腺の重量減少が認められた。1000 mg/kg/日群の雄で心臓の重量増加が認められた。雄では、いずれの投与群でも精子検査パラメータに影響がみられなかったが、授胎率の低下が観察された。300 mg/kg/日以上の群の雌で交尾成立までに要する日数の有意な延長が認められた。100 mg/kg/日以上の群で雌の受胎率の低下が認められた。妊娠子宮内観察では、100 mg/kg/日以上の群で着床後胚損失率の有意な増加、並びに 1000 mg/kg/日群で胎児の生存率の有意な減少が認められた。

雌雄マウスの受胎能に関する NOAEL を評価するとともに、受胎能について、本薬投与と関連する影響が雌雄いずれに起因しているかを確認するため、再試験として、雌雄別々にアプレミラストを投与する試験をそれぞれ実施した。なお、雌のみにアプレミラストを投与した試験は、受胎能－胚・胎児発生毒性併合試験とした。

雄授胎能試験では、アプレミラストを 1、10、25 及び 50 mg/kg/日で、雄マウス（25 例／群）に交配の 70 日前から開始し、雄の親動物が関与する生殖過程への影響を評価するため、病理学的検査前日まで 1 日 1 回、経口投与した。25 mg/kg/日以上の群で、精巣の重量増加が認められたが、50 mg/kg/日までの群で精巣に病理組織学的変化はみられなかった。また、精子検査パラメータ、並びに処置群の雄を無処置群の雌に交配させた際の授胎能パラメータに影響はみられなかった。したがって、当該試験での雄の授胎能に対する NOAEL は 50 mg/kg/日（ヒト曝露量の 2.9 倍）を超えると考えられた。

反復投与毒性試験でも同様に、精巣の重量増加が特記すべき病理組織学的変化を伴わずに認められた。これらの受胎能試験並びに 3 及び 6 ヵ月間反復投与毒性試験で認められた精巣及び精巣上体の所見について、病理専門家が評価した。その結果、アプレミラスト投与に起因する精巣及び精巣上体の病理組織学的所見（精細管の拡張、間質性水腫、炎症又は間質細胞肥大）はみられなかった。精巣の重量増加の原因は不明であるが、病理所見や機能への影響がないことから、この所見は毒性変化とみなされなかった。

受胎能－胚・胎児発生毒性併合試験では、受胎能及び胚・胎児発生への影響を評価するため、アプレミラストを 10、20、40 及び 80 mg/kg/日で、雌マウスに交配の 15 日前から、無処置雄との交配期間を含めて妊娠 15 日まで 1 日 1 回、経口投与した。20 mg/kg/日以上の群で認められた性周期及び交尾成立までに要する日数の延長から、雌の受胎能に対する NOAEL は 10 mg/kg/日であった。これらの変化が認められたにもかかわらず、最高用量 80 mg/kg/日（ヒト曝露量の 4.0 倍）まで、雌の生殖機能（交尾率及び受胎率）に影響はみられなかった。

4.5.2. 胚・胎児発生に関する試験

2.6.6.6.2 項

アプレミラストを 250、500 及び 750 mg/kg/日で交尾を確認した雌マウスに妊娠 6 日から 15 日に 1 日 1 回、経口投与した結果、妊娠動物での毒性として、250 mg/kg/日以上の群で体重増加量、妊娠子宮重量及び摂餌量の減少が認められた。250 mg/kg/日以上の群で同腹児数及び胎児体重の減少が認められ、500 mg/kg/日以上の群で胎盤重量の減少が認められた。250 mg/kg/日以上の群では着床後胚損失率の増加が観察された。250 mg/kg/日以上の群で頭蓋骨及び胸骨の不完全骨化の頻度の増加が認められ、これらの軽微な変異は胎児体重の減少に関連した発育遅延を反映していると考えられた。これらの所見より、当該試験での母動物の一般毒性及び胚・胎児発生に関する NOAEL は 250 mg/kg/日未満と考えられた。最高用量 750 mg/kg/日まで明らかな催奇形性はみられなかった。

マウスの胚・胎児発生に関する NOAEL を推定するために、雌マウスの受胎能－胚・胎児発生毒性併合試験を再試験として実施した。

雌マウスの受胎能－胚・胎児発生毒性併合試験では、アプレミラストを 10、20、40 及び 80 mg/kg/日で、雌マウスに交配の 15 日前から、無処置雄との交配期間を含め妊娠 15 日まで 1 日 1 回経口投与した。その結果、20 mg/kg/日以上の群で心臓の絶対重量又は相対重量の増加が認められた。20 mg/kg/日以上の群で着床後胚損失率の増加及び骨化した足根骨数の減少が認められた。40 mg/kg/日以上の群で胎児体重の減少及び上後頭骨の不完全骨化の頻度の増加が認められた。したがって、当該試験での母動物の一般毒性及び胚・胎児発生に関する NOAEL は 10 mg/kg/日（ヒト曝露量の 1.3 倍）であった。最高用量の 80 mg/kg/日（ヒト曝露量の 4.0 倍）までアプレミラスト投与に関連した胎児の奇形は認められなかった。

非妊娠及び妊娠 New Zealand White ウサギでの用量設定試験及び胚・胎児発生に関する試験では、アプレミラストを 250、500 及び 1000 mg/kg/日で 1 日 1 回経口投与した。その結果、ウサギに測定可能なアプレミラストの曝露がみられなかったことから、胚・胎児発生に関する試験に用いる非げっ歯類の動物種としてサルを選択した。そこで、アプレミラストを 20、50、200 及び 1000 mg/kg/日で妊娠ザルに妊娠 20 日から 50 日に 1 日 1 回経口投与した結果、50 mg/kg/日以上の群で出生前死亡率（流産）の用量依存的な増加が認められたが、20 mg/kg/日群ではみられなかった。最高用量 1000 mg/kg/日（ヒト曝露量の 8.5 倍）まで本薬投与に関連する胚・胎児発生への影響はみられなかった。対照群と比較して、流産した処置群の母動物の数例で本薬投与に関連する体重減少が認められた。したがって、当該試験での母動物の一般毒性及び胚・胎児発生に対する NOAEL は 20 mg/kg/日（ヒト曝露量の 1.4 倍）であった。妊娠 100 日の投与後 5 時間に測定したところ、胎児はアプレミラストに曝露されており（母動物の血中濃度の 30%～40%）、アプレミラストは血液胎盤関門を通過することが示された。

アプレミラスト以外の PDE4 阻害薬でも胚・胎児死亡に関する影響は報告されている（例: ロフルミラスト［Daliresp® 米国処方情報］、Daxas™ 製品研究論文、Daxas®欧州公式評価報告書 – 製品情報）。マウスの胚・胎児発生に関する試験で胚・胎児死亡が高頻度に認められたにも関わらず、アプレミラストを投与した母動物の十分な胎児数が発生への影響のために評価された（2.6.6.10.2.2 項）。

4.5.3. 出生前及び出生後の発生に関する試験

2.6.6.6.3 項

出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する強制経口投与試験では、アプレミラストを 10、80 及び 300 mg/kg/日で妊娠雌マウスに妊娠 6 日から授乳 20 日まで 1 日 1 回経口投与した。80 mg/kg/日以上の群で、分娩に付随する母動物の一般状態観察所見（各群 1 例）、出生前及び出生後死亡の増加及び授乳 7 日まで生存児の体重減少が認められた。妊娠期間、妊娠期間終了時の妊娠動物数、分娩した動物数及び出生後 7 日以降の児の発育にアプレミラスト投与に関連する影響はみられな

かった。出生後 1 週に認められた児の死亡及び発生への影響は、アプレミラスト投与に関連する児の毒性（出生児の体重減少及び生存率低下）又は母動物の哺育行動の欠如と関係している可能性がある。出生児の発育への全ての影響は出生後 1 週に観察され、残りの離乳前後の期間での発育（児の性成熟、行動、交配、受胎能及び子宮内観察項目など）にアプレミラスト投与に関連する影響はみられなかった。したがって、母動物及び F_1 世代に対する NOAEL は 10 mg/kg/日（ヒト曝露量の 1.3 倍）であった。

ロフルミラストでも死産の増加及び出生児の生存率低下が報告されている（Daliresp®米国処方情報）。ロフルミラストはさらにマウスに分娩を妨げるような子宮収縮抑制作用を有するが（ロフルミラストの米国食品医薬品局［FDA］による薬理／毒性レビュー及び評価、ロフルミラストの欧州医薬品委員会による評価報告書）、アプレミラストにはこのような子宮収縮抑制作用は認められていない。

4.5.4. 幼若動物を用いた毒性試験

2.6.6.6.4 項

幼若動物を用いた用量設定試験では、アプレミラストを 10、100 及び 1000 mg/kg/日で雌雄の幼若マウス（雌雄各 8 例／群）に 1 日 1 回、出生後 7 日から 20 日に経口投与した。100 mg/kg/日以上の群で全例又は大部分が出生後 9～12 日に死亡したことから、明らかな用量制限毒性が認められた。10 mg/kg/日群では、雄 2 例が出生後 9 及び 10 日に死亡し、最初の 2 回の投与後（出生後 7～8 日、出生後 8～9 日）に体重増加量の減少が認められたが、出生後 10 日以降は概して対照群と同様であり、全投与期間を通じて忍容性が認められた。病理学的検査時には、アプレミラスト投与に関連すると考えられる肉眼所見はみられなかった。新生児マウスでのアプレミラストの MTD は 10 mg/kg/日であると考えられた。

幼若マウスを用いる 13 週間経口投与毒性試験では、アプレミラストを 1、4 及び 10 mg/kg/日で雌雄の幼若マウス（雌雄各 30 例／群）に 1 日 1 回、出生後 7 日から 97 日に強制経口投与した。雄では 1、4 及び 10 mg/kg/日、雌では 1 及び 4 mg/kg/日の 91 日間連日投与で忍容性が認められた。自発運動量、機能観察総合評価法所見、Morris 水迷路学習成績、交尾、受胎能及び妊娠子宮内観察パラメータ、大腿骨長、臓器重量、病理学的検査肉眼所見及び病理組織学的所見に本薬投与に関連する影響はみられなかった。10 mg/kg/日群の雌で、一般状態観察所見（自発運動抑制又は冷感）に関連した死亡例数の増加が投与 Week 1 に認められたことから、雌の NOAEL は 4 mg/kg/日（出生後 7 日及び 21 日時点の時間 0 から血漿中濃度測定可能最終時点（t）までの濃度時間曲線下面積（AUC_t）はそれぞれ 7470 ng•h/mL 及び 2990 ng•h/mL）であった。雄ではいずれの用量でも毒性は認められなかったことから、NOAEL は 10 mg/kg/日（出生後 7 日及び 21 日時点の AUC_t は雄で 13,600 ng•h/mL、雌で 5270 ng•h/mL）と考えられた。

4.6. 局所刺激性

2.6.6.6.7 項

濃度 0.3 mg/mL のアプレミラスト投与液を 0.5 mL の液量で New Zealand White 雌ウサギに皮膚適用した結果、皮膚刺激性又は腐食性変化は認められなかった。したがって、アプレミラストは皮膚適用による刺激性物質ではないと判定された。

濃度 3 mg/mL のアプレミラスト投与液を Crl:HA（Albino Hartley）雌雄モルモットの局所に閉塞パッチ適用した場合の皮膚感作性（アレルギー性接触皮膚炎）について評価した。その結果、再惹起 48 時間後にアプレミラスト投与群の 20 例中 1 例で刺激性変化が観察され、5%の感作性を示した。したがって、アプレミラストは弱い感作性物質であることが、示唆された。

4.7. その他の毒性試験

4.7.1. 免疫毒性

2.6.6.10.3 項

アプレミラストの特定の免疫毒性試験は実施しなかった。

マウス、ラット及びサルでの単回及び反復投与毒性試験より、アプレミラストの免疫系への影響は、げっ歯類の血管炎に関連した炎症性変化に主に限定された。前述のとおり、げっ歯類に観察された炎症誘発作用が PDE4 阻害薬のクラス作用であることは知られており、ヒトとの関連は低いと考えられた（Dietsh, 2006、Zhang, 2008）。げっ歯類での所見は、腸間膜、心臓、消化管及び肺の複数組織での血管炎及び血管周囲炎に関する病理組織学的変化であった。これらに関連する臨床病理学的変化として、リンパ球数の増加又は減少を伴う好中球数増加、グロブリン、ハプトグロビン値若しくは CRP の上昇、並びにアルブミン低下のような急性期タンパク質の変化が認められた。特に、炎症性バイオマーカーの変化は投与継続による時間経過と共に減弱する傾向であり、例えば、長期投与毒性試験の終了時にみられた変化は、当該試験の早期又は短期間投与毒性試験で観察された変化よりも顕著ではなかった。

これに対し、サルの毒性試験ではアプレミラスト投与に関連した組織の炎症について明確な病理組織学的所見は観察されず、炎症に関する明らかな臨床病理学的変化もみられなかった。サルの 12 ヵ月間投与毒性試験を含む反復投与毒性試験で好中球数増加及びリンパ球数減少が取り上げられたが、これらの変化は無視できる程度又は投与前値の範囲内であった。いずれの試験でもアプレミラストを投与したサルの血液中に、炎症性マーカーの毒性学的意義のある変化は認められなかった。

げっ歯類に特異的な炎症誘発作用は別として、標準的な毒性試験ではアプレミラストの免疫毒性を示唆するエビデンスはほとんどみられなかった。アプレミラストを投与したげっ歯類に、末梢血リンパ球数の軽度な減少、並びにリンパ系組織の萎縮／リンパ節、脾臓若しくは胸腺のリンパ球枯渇が観察されたが、これらの所見は、本薬のリンパ系組織に対する直接的な毒性と考えるよりも、炎症性病変に関連しており、炎症及びストレスに対するリンパ球の正常な生理的反応と一致していた。サルでは、リンパ球系パラメータの変化の出現頻度及び程度がかなり低く、本薬投与に関連した明確な炎症性病変は観察されなかった。2 週間投与した用量 750 mg/kg/日でのみリンパ系組織の萎縮が認められた。しかし、最高 600 mg/kg/日まで投与した 12 ヵ月間までの毒性試験では、リンパ系器官の重量又は組織学的検査のいずれにも変化はみられなかった。サルの 12 ヵ月間投与試験で、末梢血リンパ球数の減少がみられたが、この変化は軽微であり、リンパ系組織の萎縮に関連しないため、毒性学的意義があると考えられなかった。本試験ではイムノフェノタイピングを実施しており、アプレミラスト投与に関連する明確な変化は認められなかった。雄では試験 13 週に、T 細胞及び NK 細胞に対して統計学的に有意な変化がみられたが、試験 51 週には、この変化は有意ではなく、また雌動物には同様な変化がみられなかった。したがって、これらのわずかな変化に対するアプレミラストの影響は評価できなかった。

さらに、実施済のいずれの毒性試験でも日和見感染や腫瘍の発生頻度上昇はみられなかった。臨床試験では、血管炎はアプレミラスト投与に関連しないとされている（2.5.5 項）。第 2 相臨床試験では臨床検査及び末梢血の炎症性マーカーで特記すべき変化はみられなかった。以上の試験成績をまとめると、アプレミラストの免疫毒性に関わる懸念はほとんどないと考えられる。げっ歯類では明らかな炎症誘発作用がみられたが、in vitro 試験、サルの非臨床試験及び臨床試験で明らかにされたように、これらの変化は、ヒトに同様な影響を及ぼす変化ではないと考えられる。非臨床試験で観察されたリンパ系細胞への影響は軽度かつ一過性であり、炎症性変化に関連しており、明らかな免疫抑制を示すものではないと判断した。

4.7.2. 毒性発現機序に関する試験

2.6.6.8.3 項

4.7.2.1. アプレミラストのラットでの毒性予測のためのバイオマーカーの評価

当該試験は、ラットに誘発されたアプレミラストの毒性発現及び回復性を把握できるような経時的なバイオマーカープロファイルを明らかにするために実施した。アプレミラストを 6 又は 10 mg/kg/日で雌ラットに 7 日間 1 日 1 回経口投与し、1、7 又は 11 日間の休薬期間を設けた。

ラットにアプレミラストを投与した結果、炎症過程を示唆する変化が観察されることが示された。病理組織学的検査では、主な標的器官は腸間膜、胸腺及び小腸であり、これらの組織に慢性又は活動性の炎症性変化が観察された。組織学的に、炎症は時間経過と共に回復し、小腸絨毛の萎縮を除き、これらの組織は休薬期間終了時にはほぼ正常にまで回復した。急性期タンパク質、フィブリノーゲン、CRP、アルブミン、リパーゼ及び好中球数増加のようないくつかの血漿中バイオマーカーは初期の炎症過程と関連しており、炎症症状誘発のモニタリングツールとして使用できると考えられた。

4.7.2.2. マウスでの炎症性病変からの回復性評価試験

マウスの複数組織での炎症性病変の進行及び回復性の時間経過を評価するため、アプレミラストを 300 及び 1000 mg/kg/日で雌マウスに 3 又は 14 日間連日経口投与、また投与量 1000 mg/kg/日で 45 又は 90 日間連日経口投与した。300 及び 1000 mg/kg/日の 14 日間投与群では、本薬投与による影響の回復性を評価するため、31 又は 76 日間の休薬期間を設けた。

アプレミラスト投与に関連した一般状態の変化及び血液学的パラメータへの影響はみられなかった。病理組織学的検査では、300 又は 1000 mg/kg/日投与後 3 又は 14 日に胸腺、腸間膜リンパ節及び肝臓に病変が認められ、これらの病変は、31 又は 76 日間の休薬期間終了後、若しくは 90 日間の反復投与期間終了時には認められず、完全な回復が認められた。試験期間中にハプトグロビン及び CRP のわずかな上昇が認められた。しかし、この上昇の程度は全投与群で非常に低く、毒性学的意義は認められなかった。

4.7.3. 光毒性

2.6.6.8.7.1 項

アプレミラスト（Batch[redacted]）を紫外線と共に曝露させた BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞の生存率を、紫外線照射させずにアプレミラストに曝露させた線維芽細胞の生存率と比較し、細胞生存率の相対的減少を指標として、光毒性を評価した。1%ジメチルスルホキシド（DMSO）／Dulbecco リン酸緩衝生理食塩液（DPBS）中のアプレミラストの溶解度（101.8 mg/mL）限界まで評価した結果、本アッセイで細胞毒性及び光毒性は認められなかった。

アプレミラストの UV 吸収スペクトルをみると、波長 230 nm で極大吸収、波長 344 nm で小さな吸収ピークが認められた。波長 344 nm のモル吸光係数は 32,815 L/mol/cm であった。[^{14}C]-アプレミラストの 500 mg/kg を CD-1（アルビノ）マウス及び B6C3F1/Crl BR（有色）マウスに単回投与後の組織分布試験では、全ての測定時点で皮膚の放射能レベルは血液中レベルと同程度であり、定量下限（アルビノマウスでは 0.71 µg 当量/g、有色マウスでは 0.81 µg 当量/g）未満であった。これらの試験成績より、アプレミラスト及びその代謝物は皮膚に選択的に分布せず、メラニン含有組織に貯留しないことが示された。また、本薬の毒性試験に用いられたアルビノ（マウス）及び有色（サル）の両動物種には、皮膚及び眼組織に病理組織学的変化は観察されなかった。加えて、実施済の臨床試験では皮膚の有害事象は何ら報告されていない。これらの試験成績に基づき、アプレミラストは光毒性を発現する可能性は低いと考えられた。

4.7.4. 依存性試験

アプレミラストの依存性試験は実施しなかった。

4.7.5. 代謝物

2.6.6.8.5 項

アプレミラストは生体内で、開環加水分解体 M1 及び M2、*O*-脱メチル体 M3（ラセミ体 CC-15604 及び *S*-エナンチオマーCC-16085）、*O*-脱エチル体 M5、*N*-脱アセチル体 M7、*O*-脱メチル体のグルクロン酸抱合体 M12、*N*-脱アセチル-*O*-脱メチル体のグルクロン酸抱合体 M14、水酸化アセトアミドのグルクロン酸抱合体 M16 及び水酸化アセトアミド M17 のように、いくつかの代謝物に代謝される。ヒト尿から単離した M12 及び合成した代謝物（M1/M2、M3、M5、M7、M14、M16、M17）の PDE4 活性及び TNF-α 産生に対する作用を評価し、未変化体と比較した。評価した代謝物の中で、M7 及び M17（それぞれ CC-10055 及び CC-16401）が、in vitro で PDE4 活性及び TNF-α 産生に対して強い阻害作用を示した。しかし、代謝物 M7 及び M17 のそれらの薬理作用はアプレミラストよりも弱く、血漿中アプレミラスト濃度に対する割合も 1%未満と極めて少量であることから、代謝物 M7 及び M17 の薬力学的作用に対する明らかな寄与はほとんどないと考えられた。

O-脱メチル反応はヒトでの主代謝経路であることから、マウス及びサルの長期投与試験で M3 及び M12 を測定し、それらの動物のヒトに対する曝露量比を Table 7 にまとめた。

Table 7　マウス、サル及びヒトでのアプレミラスト代謝物 M3 及び M12 の比較

	代謝物 M3（雄／雌）		代謝物 M12（雄／雌）	
	AUC[d]	ヒトに対する AUC 比	AUC[d]	ヒトに対する AUC 比
ヒト[a]	痕跡	NA	3930d	NA
マウス 6 ヵ月間投与試験[b]	5.29/15.2	NC	1459/1856	0.37/0.47
サル 12 ヵ月間投与試験[c]	2768/1065	NC	90035/63662	23/16

ADME = 吸収、分布、代謝、排泄、AUC =濃度時間曲線下面積、AUC_{24h} = 時間 0 から投与 24 時間後までの濃度時間曲線下面積、NA = 該当データなし、NC =算出せず

[a] M3 のヒト曝露データは ADME 試験（CC-10004-PK-002 試験）で 20 mg をヒトに単回投与した場合のデータであり、M12 のヒト曝露データは臨床試験（CC-10004-PK-008 試験）で 30 mg BID を投与した場合の 5 日のデータである。

[b] マウスの曝露データはマウス 6 ヵ月間投与試験で得られたものであり、雄／雌で表示した（4.2.3.2.7 項）。

[c] サルの曝露データはサル 12 ヵ月間投与試験で得られたものであり、雄／雌で表示した（4.2.3.2.13 項）。

[d] 全データは AUC_{24h}（ng•h/mL）の値として示した。

4.7.6. 原薬及び製剤

2.6.6.8.6.1 項

アプレミラストの不純物及び分解生成物の規格を 3.2.S.4.1 項及び 3.2.P.5.1 項に一覧表にした。毒性試験に使用したバッチ及び不純物含量を 2.6.7.4 項に示した。アプレミラストの原薬及び製剤で唯一規格設定された不純物は RC6 及び RC8 である。RC6 はヒト及び動物でも微量代謝物であり、マウスの 6 ヵ月間投与毒性試験、サルの 12 ヵ月間投与毒性試験、並びにマウス及びラットのがん原性試験のようないくつかの主要な毒性試験で使用したバッチに検出された。

定量的構造的活性相関（QSAR）遺伝毒性予測ツールを用いた in silico 評価により、RC8 には遺伝毒性のアラーム構造がなかったが、RC6 は変異原性のアラート構造を有することが示された。したがって、RC6 の変異原性を細菌を用いる復帰突然変異試験で評価した結果、RC6 は変異原性陰性で

あることが示された。ICH Q3A ガイダンス（2002）に基づき、これらの不純物含量は安全性確認の必要な閾値である 0.15%以下に規格設定されている。

アプレミラスト錠剤に使用している各添加物の安全性は、現在、多くの市販経口製剤でこれまでに明確にされている。また、アプレミラスト錠剤に使用している全ての添加物は国内での使用前例がある。本製剤及び組成に関する詳細は 3.2.P.1 項に記載している。

4.8. 曝露量に基づく安全域

2.6.6.9 項

主要な毒性試験（マウス 6 ヵ月間投与試験、サル 12 ヵ月間投与試験、がん原性試験及び生殖発生毒性試験）で推定された NOAEL での定常状態での曝露量は、ヒト曝露量に対する比率を算出するために使用した。曝露量比は、臨床試験（CC-10004-PSOR-005-PK 試験）で局面型乾癬患者にアプレミラストを 30 mg BID の用量で（1 日当たり 60 mg）投与した場合の定常状態での総薬物（遊離体及びタンパク結合体）濃度の AUC_{24h}（7308 ng•h/mL）に基づき算出した（Table 8）。

Table 8　曝露量比（ヒト曝露量に対する動物の曝露量比）

評価項目	動物種／性	NOAEL (mg/kg)	AUC_{24h}[a] (ng•h/mL)	曝露量比[b]
一般毒性[c]	マウス／雄	10	5614	0.8 x
	マウス／雌	10	5842	0.8 x
	マウス／雌雄	10	5728	0.8 x
	サル／雄	600	42608	5.8 x
	サル／雌	600	26936	3.7 x
	サル／雌雄	600	34772	4.8 x
生殖機能（受胎能及び交配）	マウス／雄	>50	21040	2.9 x
	マウス／雌	10	7407	1.0 x
妊娠動物への影響	マウス	10	9450	1.3 x
	サル	20	10100	1.4 x
胚・胎児発生毒性	マウス	10	9450[d]	1.3 x
	サル	20	10100	1.4 x
出生前及び出生後の発生毒性	マウス	10	9450[d]	1.3 x
発がん性[e]	マウス／雄	1000	52856	7.2 x
	マウス／雌	1000/500[f]	75049	10.3 x
	ラット／雄	20	608	0.08 x
	ラット／雌	3	7721	1.1 x
幼若動物の毒性[g]	マウス／雄	10	13600 (出生後 7 日) 5270 (出生後 21 日)	NA
	マウス／雌	4	7470 (出生後 7 日) 2990 (出生後 21 日)	NA
--	ヒト（局面型乾癬患者）	30 mg、BID[h]	7308[h]	NA

AUC_{24h} = 時間 0 から投与 24 時間後までの濃度時間曲線下面積、NA = 該当データなし、NOAEL = 無毒性量

[a] 試験内で複数のトキシコキネティクス測定値を算出した場合、最終に採取した試料の測定値を上記表に載せた。

[b] 曝露量比: 動物の血漿中平均 AUC_{24h}／局面型乾癬患者の平均 AUC_{24h}

[c] 一般毒性試験については、マウス 6 ヵ月間投与毒性試験及びサル 12 ヵ月間投与毒性試験での NOAEL を用いた（4.2.3.2.7 項、4.2.3.2.13 項）。

[d] 該当試験では曝露量を測定しなかったため、雌マウスの受胎能－胚・胎児発生毒性併合試験での曝露量から外挿したデータ（4.2.3.5.1.3 項）。

[e] がん原性試験では最高用量でもがん原性がみられなかったため、便宜上、NOAEL の項には最高用量を記載した。

[f] がん原性試験の Week 73 に用量を 500 mg/kg に減量したため、175 日での減量前の曝露量とした。

[g] 小児患者の曝露量が得られなかったため、マウスを用いた毒性試験に関する曝露量を算出しなかった。

[h] 第 2 相臨床試験（CC-10004-PSOR-005-PK 試験）でアプレミラストの最高用量 30 mg BID の総曝露量平均値（定常状態での AUC_{24h}、母集団解析）

5. 総括及び結論

アプレミラストは、単一のメディエーターを標的とするものではなく、炎症性／抗炎症性シグナルのカスケード上流のバランスを回復することに重点を置いた新規治療薬である。アプレミラストはPDE4を阻害して細胞内cAMP濃度を上昇させることで、PKAを活性化し、転写因子ファミリーCREB/ATF-1のリン酸化・活性化をもたらす。また、PKAの活性化によりNF-κB転写活性を抑制する。その結果として、iNOS、TNF-α、IL-7及びIL-23の発現低下などの広範囲の炎症性／抗炎症性メディエーターの変化が生じ（Houslay, 2005、Baumer, 2007、Takahashi, 2002）、乾癬及び乾癬性関節炎で皮膚及び関節での炎症の病態生理が改善されると考えられる。このように、アプレミラストは、薬理学的プロファイルから乾癬及び乾癬性関節炎で治療効果を発揮することが期待された。

安全性薬理試験では、マウスの中枢神経系、行動機能及び消化管運動で、アプレミラストに起因する重大な安全性上の問題がないことが確認された。また、イヌの心血管機能及び呼吸機能でも重大な安全性上の問題はなかった。

非臨床薬物動態試験を実施し、アプレミラストの吸収、分布、代謝、排泄の特性を明らかにした。その結果、マウス、ラット、ウサギ及びサルでみられた薬物動態プロファイルはヒトと類似していた。ヒトで認められた代謝物は、1種以上の動物でも認められ、ヒト特有の代謝物はなかった。In vitro代謝試験で、アプレミラストは非酵素的な加水分解及びCYP3A4による酸化的代謝（*O*-脱メチル化）を受けた。アプレミラストは臨床用量で、臨床的に問題となるようなCYPの阻害及び誘導を起こさないと考えられた。アプレミラストはP-gpの基質であるが、ヒトで良好なバイオアベイラビリティ（>70%）を示した。アプレミラストは、他のトランスポーター（BCRP、OAT1、OAT3、OCT2、OATP1B1及びOATP1B3）の基質とはならなかった。さらに、アプレミラストは臨床用量では臨床上問題となるようなトランスポーター（P-gp、BCRP、MRP1、MRP2、MRP3、MRP4、OAT1、OAT3、OCT2、OATP1B1及びOATP1B3）の阻害を起こさないと示唆された。

アプレミラストの急性毒性は弱かった。アプレミラストの患者に必要な投与期間は、反復投与毒性試験での投与期間により担保された。げっ歯類及び非げっ歯類の最も長期間の反復投与毒性試験であるマウスの6ヵ月間投与毒性試験及びサルの12ヵ月間投与毒性試験でのNOAELは、それぞれ10及び600 mg/kg/日であった。NOAELでの血漿中曝露量は、マウスで5728 ng•h/mL（ヒト曝露量の0.8倍）、サルで34,772 ng•h/mL（ヒト曝露量の4.8倍）であった。

マウスの反復投与毒性試験でのNOAELでの曝露量比が低いこと、アプレミラストはげっ歯類に炎症を誘発する可能性があることから、一連の評価試験を実施した。In vitro試験の結果、アプレミラスト、シロミラスト、ロフルミラストなどのPDE4阻害薬はげっ歯類では炎症誘発作用を示したが、サルやヒトではそのような作用を示さないことが明確にされた。In vitro試験でのこれらの成績より、げっ歯類はPDE4阻害薬誘発性炎症反応に対する感受性がヒトやサルよりも高いこと、サルでは明確な炎症性変化が誘発されないこと、またヒトの臨床試験で安全性プロファイルが明らかにされたことについて、発現機構の面から支持されることが示された。

臨床試験ではアプレミラスト投与との関連疑われる血管炎はみられていない。加えて、第2相臨床試験での臨床検査及び末梢血の炎症性バイオマーカー（白血球数又は好中球数、ESR、アルブミン、フィブリノーゲン若しくはCRP）に顕著な変化はみられなかった。

アプレミラストは遺伝毒性及び発がん性を示さなかった。マウス及びラットでのがん原性試験では、アプレミラスト投与に関連する腫瘍の発生頻度上昇は認められなかった。

アプレミラストの生殖発生に及ぼす影響は、マウス及びサルでの一連の動物試験でよく特徴づけられた。雄授胎能に対するNOAELは50 mg/kg/日（ヒト曝露量の2.9倍）超であり、雌受胎能に対するNOAELは10 mg/kg/日（ヒト曝露量の1.0倍）であった。胚・胎児発生に関する試験では、母動

物の一般毒性及び胚・胎児発生に関する NOAEL は、マウスで 10 mg/kg/日（ヒト曝露量の 1.3 倍）、サルで 20 mg/kg/日（ヒト曝露量の 1.4 倍）であった。マウスでは最高 750 mg/kg/日まで、サルでは最高 1000 mg/kg/日までの用量でも催奇形性を示す所見はみられなかった。アプレミラストの胚・胎児発生に関する試験で観察された所見は他の PDE4 阻害薬で報告された所見と同様であり、サリドマイド及び免疫調整薬で報告された異常所見と異なっていたことが明確にされた。出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験では、母動物の一般毒性及び F_1 世代に対する NOAEL は 10 mg/kg/日（ヒト曝露量の 1.3 倍）であった。

アプレミラストはウサギの皮膚刺激性試験で刺激性物質でなく、モルモットの皮膚感作性試験で弱い感作性物質であることが示された。しかし、皮膚適用はアプレミラストの臨床投与経路でない。アプレミラストは BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞を用いる in vitro 試験で光毒性を示さなかった。げっ歯類に特異的な炎症誘発作用は別として、標準的な毒性試験ではアプレミラストの免疫毒性を示唆するエビデンスはほとんどみられなかった。アプレミラストを幼若マウスに生後 7 日から 13 週間投与した結果、雄では 10 mg/kg/日まで、雌では 4 mg/kg/日まで忍容性は良好であった。

このように、アプレミラストの非臨床安全性は一連の安全性評価で十分に特徴づけられた。安全性薬理及び毒性の要約で記載した安全性薬理試験及び毒性試験は、乾癬及び乾癬性関節炎の患者にアプレミラストを投与するための十分な有効性及び安全性が担保されているものと結論される。

6. 参考文献

Baumer W, Hoppmann J, Rundfeldt C, Kietzmann M. Highly selective phosphodiesterase 4 inhibitors for the treatment of allergic skin diseases and psoriasis. Inflamm Allergy Drug Targets 2007 Mar;6(1):17-26.

Burnouf C, Pruniaux M-P. Recent advances in PDE4 inhibitors as immunoregulators and anti-inflammatory drugs. Curr Pharm Des 2002;8(14):1255-96.

Chandran V, Raychaudhuri SP. Geoepidemiology and environmental factors of psoriasis and psoriatic arthritis. J Autoimmun 2010 May;34(3):J314-21.

Coates LC, Anderson RR, Fitzgerald O, Gottlieb AB, Kelly SG, Lubrano E, et al. Clues to the pathogenesis of psoriasis and psoriatic arthritis from imaging: a literature review. J Rheumatol 2008 Jul;35(7):1438-42.

Corral LG, Muller GW, Moreira AL, Chen Y, Wu M, Stirling D, et al. Selection of novel analogs of thalidomide with enhanced tumor necrosis factor alpha inhibitory activity. Mol Med 1996 Jul;2(4):506-15.

Dietsch GN, Dipalma CR, Eyre RJ, Pham TQ, Poole KM, Pefaur NB, et al. Characterization of the inflammatory response to a highly selective PDE4 inhibitor in the rat and the identification of biomarkers that correlate with toxicity. Toxicol Pathol 2006;34(1):39-51.

Fuentes-Duculan J, Suarez-Farinas M, Zaba LC, Nograles KE, Pierson KC, Mitsui H, et al. A subpopulation of CD163-positive macrophages is classically activated in psoriasis. J Invest Dermatol 2010 Oct;130(10):2412-22.

Gladman DD, Antoni C, Mease P, Clegg DO, Nash P. Psoriatic arthritis: epidemiology, clinical features, course, and outcome. Ann Rheum Dis 2005 Mar;64 Suppl 2:ii14-7.

Gottlieb AB, Strober B, Krueger JG, Rohane P, Zeldis JB, Hu CC, et al. An open-label, single-arm pilot study in patients with severe plaque-type psoriasis treated with an oral anti-inflammatory agent, Apremilast. Curr Med Res Opin 2008 May;24(5):1529-38.

Houslay MD, Schafer P, Zhang KY. Keynote review: phosphodiesterase-4 as a therapeutic target. Drug Discov Today 2005 Nov 15;10(22):1503-19.

Ito T, Ando H, Suzuki T, Ogura T, Hotta K, Imamura Y, et al. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. Science 2010 Mar 12;327(5971):1345-50.

Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG. Pathogenesis and therapy of psoriasis. Nature 2007 Feb 22;445 (7130):866-73.

Menter A, Gottlieb A, Feldman SR, Van Voorhees AS, Leonardi CL, Gordon KB, et al. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: Section 1. Overview of psoriasis and guidelines of care for the treatment of psoriasis with biologics. J Am Acad Dermatol 2008 May;58(5):826-50.

Menter A, Korman NJ, Elmets CA, Feldman SR, Gelfand JM, Gordon KB, et al. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: Section 4. Guidelines of care for the management and treatment of psoriasis with traditional systemic agents. J Am Acad Dermatol 2009 Sep;61(3):451-85.

Muller GW, Shire MG, Wong LM, Corral LG, Patterson RT, Chen Y, et al. Thalidomide analogs and PDE4 inhibition. Bioorg Med Chem Lett 1998 Oct 6;8(19):2669-74.

Robichaud A, Tattersall FD, Choudhury I, Rodger IW. Emesis induced by inhibitors of type IV cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE IV) in the ferret. Neuropharmacology 1999 Feb;38(2):289-97.

Schafer PH, Parton A, Gandhi AK, Capone L, Adams M, Wu L, et al. Apremilast, a cAMP phosphodiesterase-4 inhibitor, demonstrates anti-inflammatory activity in vitro and in a model of psoriasis. Br J Pharmacol 2010 Feb;159(4):842-55.

Takahashi N, Tetsuka T, Uranishi H, Okamoto T. Inhibition of the NF-kappaB transcriptional activity by protein kinase A. Eur J Biochem 2002 Sep;269(18):4559-65.

Zhang J, Snyder RD, Herman EH, Knapton A, Honchel R, Miller T, et al. Histopathology of vascular injury in Sprague-Dawley rats treated with phosphodiesterase IV inhibitor SCH 351591 or SCH 534385. Toxicol Pathol 2008 Oct;36(6):827-39.