2.6.1 緒言

肝中心静脈閉塞症（VOD）は肝類洞閉塞症候群としても知られる造血幹細胞移植後の合併症の1つであり、移植後3週間以内に発症することが多い[1,2]。患者背景や移植方法などの違いから発症率は様々であるが、多臓器不全を伴うなど重症化した場合の死亡率は80%以上であり、予後不良の疾患である[3,4]。肝類洞内皮細胞は一般の毛細血管内皮細胞と異なり基底膜を持たないため、種々の傷害により容易に剥離する。また、肝中心静脈周囲のゾーン3と呼ばれる領域は薬物を解毒するグルタチオンの量が少ないため、この近傍にある類洞内皮細胞は、骨髄移植前処置として用いられる大量の抗がん剤や全身放射線照射により比較的容易に傷害を受けやすい[2]。通常、血管内皮細胞は抗血栓性に働いており、血管内での血栓形成を阻害するが、血管内皮細胞が傷害された状態では血栓形成が進みやすくなることや、傷害を受けた血管内皮細胞が剥離・脱落して肝類洞が狭小化することなどが絡み合い、血流停滞と類洞閉塞を生じることなどにより VOD を発症する[1,5,6]。

デフィブロチドナトリウムは、ブタ腸粘膜から単離した[redacted]を出発物質として調製した[redacted]分子量13000～20000の一本鎖のポリデオキシリボヌクレオチドのナトリウム塩である。一本鎖DNAは塩基配列に関係なくタンパク質と相互作用する性質を有することから、本薬も同様の性質を有すると考えられる。本薬の作用機序は明確ではないものの、凝固・線溶系の両方の種々因子に影響を及ぼすことで血管内皮細胞に対して保護的に働くと推察されている[7]。医療現場においても VOD 患者への治療効果が注目され、Jazz Pharmaceuticals 社（Gentium 社）は本薬を VOD 治療薬として開発し、2013年に欧州で、2016年に米国で承認を得た。国内では、健康成人に対する第 I 相臨床試験及び VOD 患者に対する第 II 相臨床試験が医師主導治験として実施され、海外臨床試験と同程度の有効性及び安全性が示されたことから、造血幹細胞移植後の肝類洞閉塞症候群（肝中心静脈閉塞症）の治療薬として申請することとした。

医薬品製造販売承認申請書添付資料の作成にあたり、Gentium 社（開発初期の頃は Crinos 社）が実施又は委託したデフィブロチドナトリウムの薬理試験、薬物動態試験及び毒性試験の試験成績を収集した。さらに、日本新薬株式会社にて新たに *in vivo* 薬理試験を実施し、評価資料とした。

2.6.1.1 参考文献一覧

1. 菊田敦, 藥師神公和, 造血細胞移植後における肝中心静脈閉塞症（SOS/VOD）の診断と治療. 日本造血細胞移植学会雑誌. 2016;5:124-37. ＜資料番号 5.4-1＞

2. 池添隆之, 菊田敦, 藥師神公和. 造血細胞移植ガイドライン SOS/TA-TMA. In: 平成28学会年度日本造血細胞移植学会ガイドライン委員会, editors. 日本造血細胞移植学会; 2017年9月. p. 1-11. ＜資料番号 5.4-2＞

3. Carreras E, Bertz H, Arcese W, Vernant JP, Tomás JF, Hagglund H, et al. Incidence and outcome of hepatic veno-occlusive disease after blood or marrow transplantation: a prospective cohort study of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. European Group for Blood and Marrow Transplantation Chronic Leukemia Working Party. Blood. 1998;92:3599-604. ＜資料番号 4.3-15＞

4. Coppell JA, Richardson PG, Soiffer R, Martin PL, Kernan NA, Chen A, et al. Hepatic veno-occlusive disease following stem cell transplantation: incidence, clinical course, and outcome. Biol Blood Marrow Transplant. 2010;16:157-68. ＜資料番号 5.4-3＞

5. Bunte MC, Patnaik MM, Pritzker MR, Burns LJ. Pulmonary veno-occlusive disease following hematopoietic stem cell transplantation: a rare model of endothelial dysfunction. Bone Marrow Transplant. 2008;41:677-86. ＜資料番号 4.3-16＞

6. Carreras E, Diaz-Ricart M. The role of the endothelium in the short-term complications of hematopoietic SCT. Bone Marrow Transplant. 2011;46:1495-502. ＜資料番号 4.3-17＞

7. Pescador R, Capuzzi L, Mantovani M, Fulgenzi A, Ferrero ME. Defibrotide: properties and clinical use of an old/new drug. Vascul Pharmacol. 2013;59:1-10. ＜資料番号 4.3-12＞

目次

2.6.2 薬理試験の概要文 3
2.6.2.1 まとめ 3
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 5
2.6.2.3 副次的薬理試験 18
2.6.2.4 安全性薬理試験 18
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 20
2.6.2.6 考察及び結論 20
2.6.2.7 図表 22
2.6.2.8 参考文献 22

略語一覧表

語句略語	語句略語内容
CD	cluster of differentiation：分化抗原群
FOB	functional observation battery：機能観察総合評価
FSC	forward scatter：前方散乱光
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
hERG	human ether-a-go-go related gene：ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
HEK293 細胞	human embryonic kidney 293 cells：ヒト胎児由来腎臓 293 細胞
HLA	human leukocyte antigen：ヒト白血球抗原
HMEC	human microvascular endothelial cell：ヒト微小血管内皮細胞
IL-8	interleukin-8：インターロイキン-8
MHC	major histocompatibility complex：腫瘍組織適合性複合体
MM	multiple myeloma cell：多発性骨髄腫細胞
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1：プラスミノーゲン活性化抑制因子-1
PI	propidium iodide：ヨウ化プロピジウム
SSC	side scatter：側方散乱光
TF	tissue factor：組織因子
TFPI	tissue factor pathway inhibitor：組織因子経路インヒビター
t-PA	tissue plasminogen activator：組織プラスミノーゲン活性化因子
vWF	von Willebrand factor：フォンヴィルブランド因子

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

（1） 効力を裏付ける試験

血管内皮細胞への血清飢餓による細胞障害モデル及び薬物誘発性のアポトーシスモデルに対するデフィブロチドナトリウムの影響を検討した。さらに、プラスミン活性に対する影響及び骨髄移植マウスの生存に対する影響を検討した。

1） 血清飢餓による細胞障害に対する作用

ヒト微小血管内皮細胞（HMEC）を血清非存在下で培養することにより生ずる細胞障害を、デフィブロチドナトリウムは 150 μg/mL の濃度で有意に抑制した。

2） フルダラビン誘発アポトーシスに対する作用

フルダラビン（終濃度 10 μg/mL）を 48 時間処置したときの HMEC 中のアポトーシス細胞の割合は 30.6%、対照群は 3.6%であった。フルダラビンにデフィブロチドナトリウム（終濃度 0.1、1、10 及び 100 μg/mL）を併用した場合では、それぞれ 33.5%、16.6%、4.4%及び 3.2%であった。

3） フルダラビン誘発アポトーシスにおける活性化カスパーゼ-3 の発現に対する作用

フルダラビン（終濃度 10 μg/mL）を 0 から 60 時間まで処置したときの HMEC 中の活性型カスパーゼ-3 の発現は時間経過とともに増加したのに対し、フルダラビンに 100 μg/mL デフィブロチドナトリウムを併用した群では活性型カスパーゼ-3 の発現増加は認められなかった。

4） フルダラビン誘発アポトーシスにおける関連因子の発現に対する作用

フルダラビン（終濃度 10 μg/mL）を HMEC に 24 時間処置したときのヘパラナーゼ mRNA の発現は、100 μg/mL デフィブロチドナトリウムの併用群の方が低かった。インターロイキン-8（IL-8） mRNA 及び CD146 の発現はフルダラビン処置（終濃度 10 μg/mL）により増加し、100 μg/mL デフィブロチドナトリウムの併用群ではこの増加は認められなかった。

5） サリドマイド誘発アポトーシスに対する作用

サリドマイド（終濃度 100 μg/mL）を HMEC に 24 時間処置したときのアポトーシス細胞の割合は対照群より増加したが、150 μg/mL デフィブロチドナトリウム併用下では増加は認められなかった。一方、骨髄腫細胞株 RPMI-8226 にサリドマイドを同様に処置した場合もアポトーシス細胞の割合は増加したが、この抗腫瘍作用（アポトーシス細胞の割合の増加）は 150 μg/mL デフィブロチドナトリウム併用下でも認められた。

6） サリドマイドによる組織プラスミノーゲン活性化因子（t-PA）抑制及びプラスミノーゲン活性化抑制因子（PAI）-1 誘導に対する作用

サリドマイド（終濃度 100 μg/mL）を HMEC に 24 時間処置したときの t-PA 量は対照群より低下した。この条件下で 150 μg/mL デフィブロチドナトリウムを併用したときの t-PA 量はサリドマイド単独群より高かった。

また、HMEC と RPMI-8226 の共培養系での t-PA 量は HMEC 単独の場合より低かった。この共培養系において、サリドマイド（終濃度 100 μg/mL）の 24 時間処置により t-PA 量はさらに低下し、150 μg/mL デフィブロチドナトリウム併用下での t-PA 量はサリドマイド単独群より高かった。

一方、PAI-1 量は HMEC 単独より RMPI-8226 との共培養系の方が高かった。この共培養系にサリドマイド（終濃度 100 μg/mL）を 24 時間処置すると PAI-1 量はさらに増加し、150 μg/mL デフィブロチドナトリウム併用下の PAI-1 量はサリドマイド単独群より低かった。

7） サリドマイドによるプラスミン活性阻害に対する作用

サリドマイド（終濃度 100 μg/mL）を HMEC に 24 時間処置したときのプラスミン活性は対照群より低下した。この条件下で 150 及び 400 μg/mL デフィブロチドナトリウムを併用したとき、400 μg/mL 併用群のプラスミン活性はサリドマイド単独群より有意に高かった。

8） プラスミン活性に対する作用

ウシ血漿ユーグロブリン分画を用いた場合は 5～250 μg/mL デフィブロチドナトリウム存在下で、ヒト血漿由来プラスミンを用いた場合は 0.50～5.10 μg/mL デフィブロチドナトリウム存在下で、プラスミン活性の濃度依存的な増加が認められた。

9） 骨髄移植モデルマウスの生存に対する作用

骨髄細胞を静脈内移植した BALB/c 系雌性マウスに、生理食塩液（対照）又はデフィブロチドナトリウム（400 mg/kg）を 1 日 2 回、移植前日から移植後 14 日目まで反復腹腔内投与し、移植日から移植後 15 日目の生存を評価した。対照群のマウスの生存時間の中央値は 5.0 日（95%信頼区間：5.0～6.0 日）、デフィブロチドナトリウム群は 6.0 日（95%信頼区間：5.0～7.0 日）であり、デフィブロチドナトリウム群の生存時間は有意に延長した。

（2） 副次的薬理試験

該当試験なし。

（3） 安全性薬理試験

デフィブロチドナトリウムの中枢神経系、心血管系並びに呼吸系に及ぼす影響は、独立した安全性薬理試験としては実施せず、反復投与毒性試験に組み込んで検討した。安全性薬理の評価としては、主な重要器官系（中枢神経系、心血管系あるいは呼吸系）に対する重大なリスクは示されなかったと判断した。

（4） 薬力学的薬物相互作用

該当試験なし。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 血管内皮細胞に対する影響

2.6.2.2.1.1 血清飢餓による細胞障害に対する作用（試験番号 RB2008010、資料番号 4.2.1.1-1、評価資料）

（1） 方法

ヒト微小血管内皮細胞（HMEC）を用いて、血清飢餓による細胞障害に対するデフィブロチドナトリウムの影響を検討した。細胞障害は MTT 法にて測定した。

まず、HMEC を血清非存在下で 24 時間培養した後、デフィブロチドナトリウム（終濃度 150 μg/mL）を添加し、さらに血清非存在下で 24 時間培養した。

次に、血清存在下の HMEC にデフィブロチドナトリウム（終濃度 50、150 及び 400 μg/mL）を添加して 24 時間培養した。その後、血清含有培養液を除去し、血清不含培養液でさらに 24 時間培養を継続した。対照群については、血清存在下にデフィブロチドナトリウムを含まない培養液で、この期間中の培養を継続した。

（2） 成績

血清飢餓処置（48 時間）による HMEC の細胞障害を MTT 法で測定したところ、血清飢餓群の MTT 還元能は対照群より低下した（図 2.6.2.2.1.1-1）。それに対し、血清非存在下で 24 時間培養後にデフィブロチドナトリウム（終濃度 150 μg/mL）を添加して 24 時間培養を継続した群の MTT 還元能は、血清飢餓群より高かった。すなわち、デフィブロチドナトリウムは血清飢餓による細胞障害を抑制した。

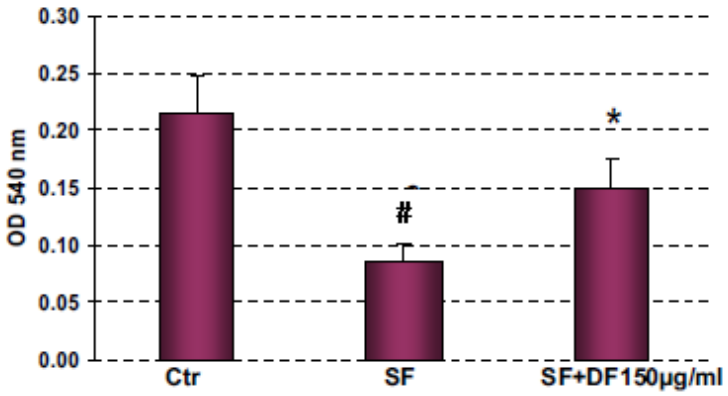


図 2.6.2.2.1.1-1 血清飢餓（48 時間）による細胞障害に対する作用

Ctr：対照、SF：血清飢餓、DF：デフィブロチドナトリウム
デフィブロチドナトリウムは、血清飢餓開始 24 時間後に添加した。
#P<0.05（Student's t-test（両側）、対照群との比較）
*P<0.05（Student's t-test（両側）、血清飢餓群との比較）

［4.2.1.1-1 Fig.4a を引用］

24 時間の血清飢餓処置においても MTT 還元能は対照群と比べて低下した（図 2.6.2.2.1.1-2）。血清存在下であらかじめデフィブロチドナトリウムを 24 時間曝露した場合では、3 種類の製造バッチ（RS001、DF836、DF515）のいずれの濃度においても血清飢餓群と比較して MTT 還元能は高く、血清飢餓処置による細胞障害への影響は認められなかった。

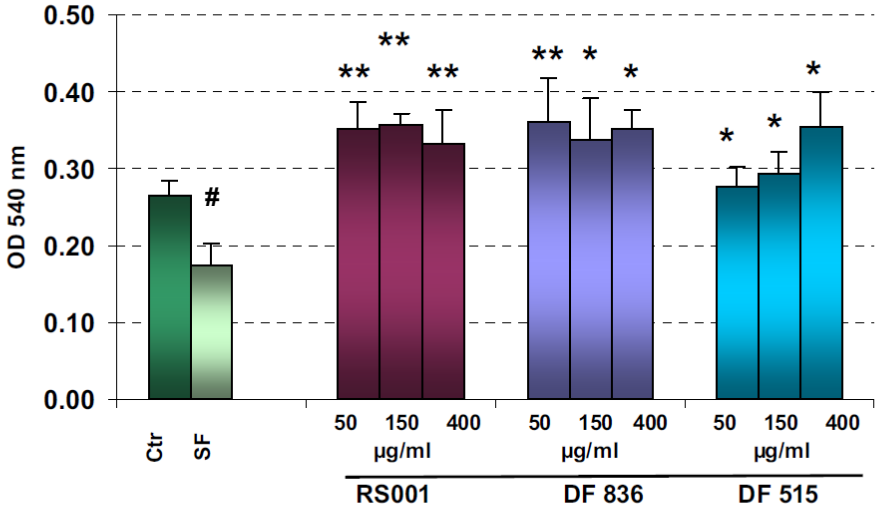


図 2.6.2.2.1.1-2　血清飢餓（24 時間）による細胞障害に対する作用

Ctr：対照、SF：血清飢餓、RS001、DF836、DF515：デフィブロチドナトリウムの製造バッチ
デフィブロチドナトリウムは、血清飢餓開始 24 時間前に添加した。
#P<0.05（Student's t-test（両側）、対照群との比較）
*P<0.05，**P<0.01（Student's t-test（両側）、血清飢餓群との比較）

［4.2.1.1-1 Fig.5 を引用］

2.6.2.2.1.2　フルダラビン誘発アポトーシスに対する作用（試験番号 RB2008020、資料番号 4.2.1.1-2、評価資料）

フルダラビンは代謝拮抗作用を持つプリンアナログであり、アポトーシスを誘導することが知られている [1)]。そこで、フルダラビン誘発アポトーシスに対するデフィブロチドナトリウムの作用について検討した。

（1）　方法

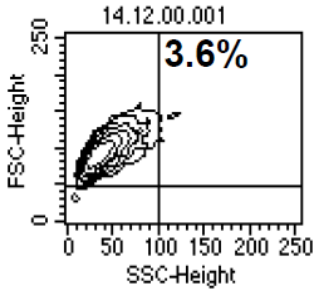
HMEC に、対照群には血清含有培養液を、フルダラビン群にはフルダラビン（終濃度 10 μg/mL）を添加して 48 時間培養後にアポトーシスを評価した。デフィブロチドナトリウム（終濃度 0.1、1、10 及び 100 μg/mL）の影響を検討する場合は、フルダラビンと同時に添加して 48 時間培養した。

アポトーシスは、フローサイトメトリーを用いて Propidium Iodide（PI）陰性細胞における前方散乱光（FSC）及び側方散乱光（SSC）を測定し、アポトーシス細胞の割合を求めることで評価した。

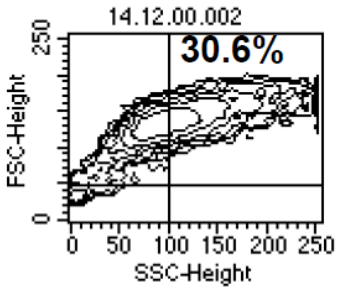
（2） 成績

HMEC 中のアポトーシス細胞の割合は、対照群で 3.6%、フルダラビン 10 µg/mL 処置群で 30.6%であった（図 2.6.2.2.1.2-1A 及び 1B）。フルダラビンにデフィブロチドナトリウム（終濃度 0.1、1、10 及び 100 µg/mL）を併用したときのアポトーシス細胞の割合は、それぞれ 33.5%、16.6%、4.4%及び 3.2%であった（図 2.6.2.2.1.2-1C～1F）。このうち、デフィブロチドナトリウムの 10 及び 100 µg/mL 存在下でのアポトーシス細胞の割合は、対照群と同程度であった。

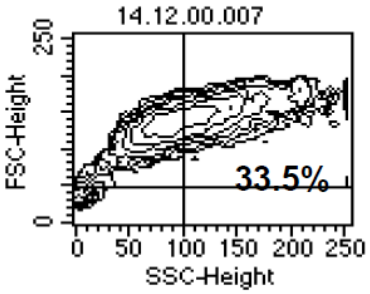
(A) Control



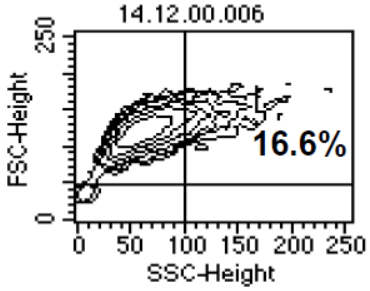
(B) 10 µg/mL F-Ara



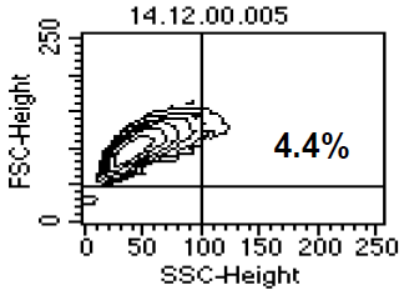
(C) 10 µg/mL F-Ara + 0.1 µg/mL DF



(D) 10 µg/mL F-Ara + 1 µg/mL DF



(E) 10 µg/mL F-Ara + 10 µg/mL DF



(F) 10 µg/mL F-Ara + 100 µg/mL DF

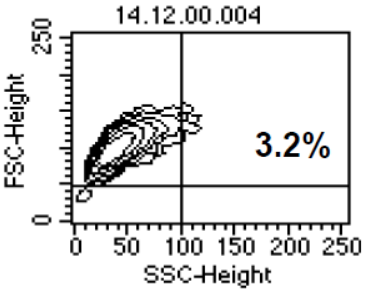


図 2.6.2.2.1.2-1 フルダラビン誘発アポトーシスに対する作用

Control：対照、F-Ara：フルダラビン、DF：デフィブロチドナトリウム
図中の数値（百分率）は、アポトーシス細胞の割合を表す。

［4.2.1.1-2 Fig.1b を引用］

2.6.2.2.1.3 フルダラビン誘発アポトーシスにおける活性型カスパーゼ-3 の発現に対する作用（試験番号 RB2008010、資料番号 4.2.1.1-1、評価資料）

フルダラビンで誘発されるアポトーシスにおいて、アポトーシス経路で重要な役割を果たす活性型カスパーゼ-3 の発現に対するデフィブロチドナトリウムの影響を検討した。

（1） 方法

HMEC を媒体（血清含有培養液、対照）、100 μg/mL デフィブロチドナトリウム、10 μg/mL フルダラビン及び 10 μg/mL フルダラビン + 100 μg/mL デフィブロチドナトリウムの 4 群で培養し、0、3、6、9、12、16、24、48 及び 60 時間後の各時点のカスパーゼ-3 の発現に対する作用を検討した。抗カスパーゼ-3 抗体を付けたビーズを使用する cytometric bead array 法を用い、活性型カスパーゼ-3 の発現をフローサイトメトリーにより測定した。

（2） 成績

対照群及び 100 μg/mL デフィブロチドナトリウム群では、HMEC 中の活性型カスパーゼ-3 の発現量に大きな変動は認められなかった（図 2.6.2.2.1.3-1）。フルダラビン群の活性型カスパーゼ-3 の発現量は時間経過とともに増加した。それに対し、フルダラビンにデフィブロチドナトリウム（終濃度 100 μg/mL）を併用した群では、フルダラビン群のような活性型カスパーゼ-3 の発現量増加は認められなかった。

なお、デフィブロチドナトリウムはカスパーゼ-3 mRNA の発現を抑制しており（4.2.1.1-1 Fig.10 参照）、フルダラビンとの併用群で認められた活性型カスパーゼ-3 の発現量増加抑制は、カスパーゼ-3 mRNA の発現抑制に起因した作用と考えられた。

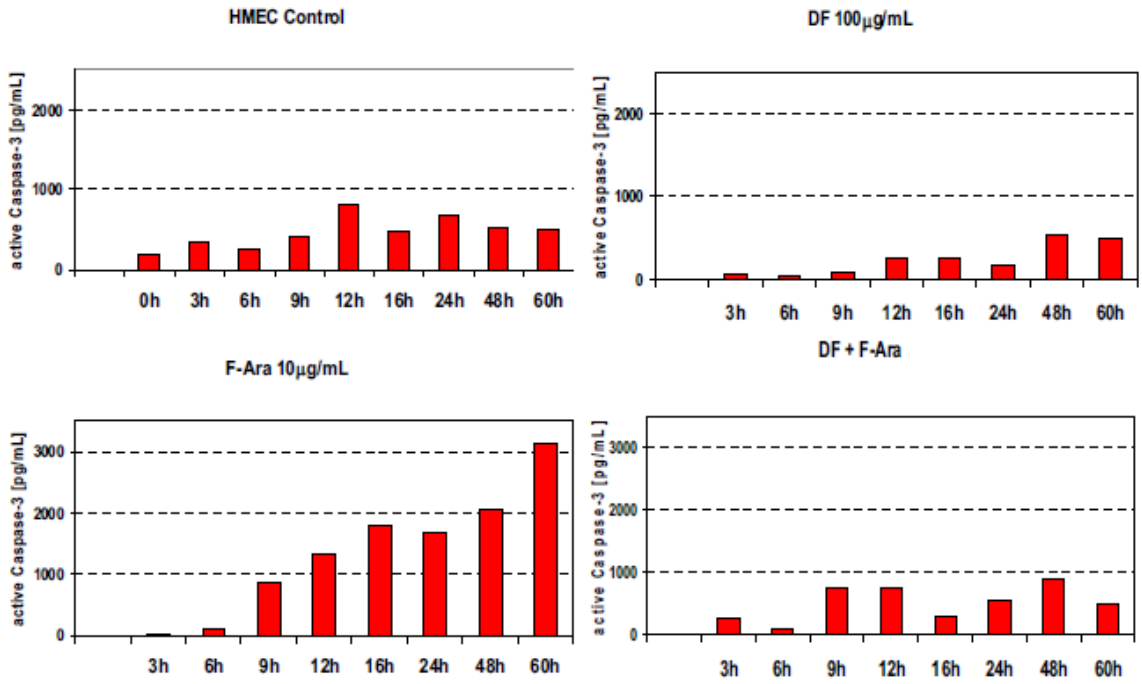


図 2.6.2.2.1.3-1 フルダラビン誘発活性型カスパーゼ-3 の発現に対する作用

Control：対照、F-Ara：フルダラビン、DF：デフィブロチドナトリウム

［4.2.1.1-1 Fig.11a を引用］

2.6.2.2.1.4 フルダラビン誘発アポトーシスにおける関連因子の発現に対する作用（試験番号 RB2010010、資料番号 4.2.1.1-3、評価資料）

フルダラビンで誘発されるアポトーシスにおいて、細胞接着や細胞移動に関与するヘパラナーゼ、自然免疫応答に関与するケモカインである IL-8、細胞接着に関与する細胞表面マーカーCD146 及び腫瘍組織適合性複合体（MHC）class II の 1 つである HLA-DR の発現に対するデフィブロチドナトリウムの影響を検討した。

（1） 方法

HMEC を媒体（血清含有培養液、対照）、10 μg/mL フルダラビン、100 μg/mL デフィブロチドナトリウム及び 10 μg/mL フルダラビン + 100 μg/mL デフィブロチドナトリウムの 4 群で 24 時間培養した。

HMEC から total RNA を抽出し、ヘパラナーゼ及び IL-8 mRNA の発現を real time PCR 法で解析した。また、フローサイトメトリーを用いて細胞表面における CD146 及び HLA-DR の発現を測定した。

（2） 成績

フルダラビン群で認められたヘパラナーゼ mRNA の発現に比べて、100 μg/mL デフィブロチドナトリウムとの併用群ではその発現が低かった（図 2.6.2.2.1.4-1）。また、フルダラビン群の IL-8 mRNA の発現は対照群より高く、この増加は 100 μg/mL デフィブロチドナトリウムとの併用群では認められなかった（図 2.6.2.2.1.4-2）。

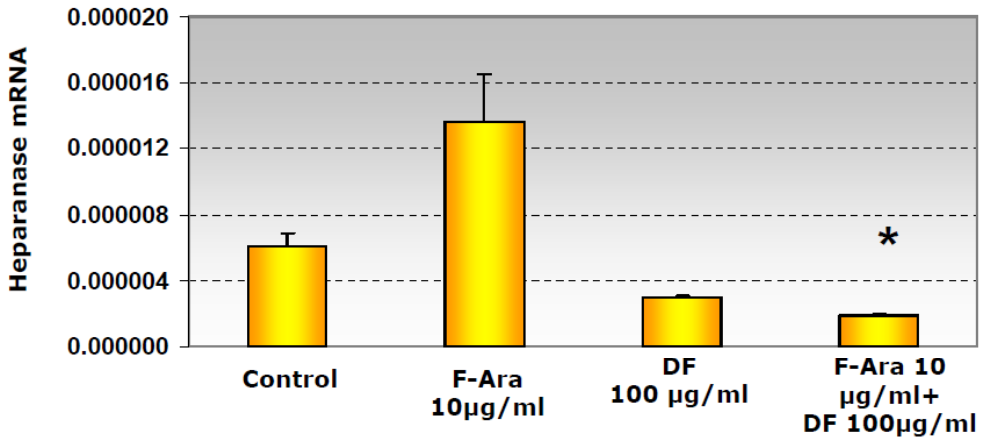


図 2.6.2.2.1.4-1 ヘパラナーゼ mRNA 発現に対する作用

Control：対照、F-Ara：フルダラビン、DF：デフィブロチドナトリウム
mRNA 発現は、β-actin との比率で表す。
*P<0.05（Student's t-test（両側）、フルダラビン群との比較）

［4.2.1.1-3 Fig.2 を引用］

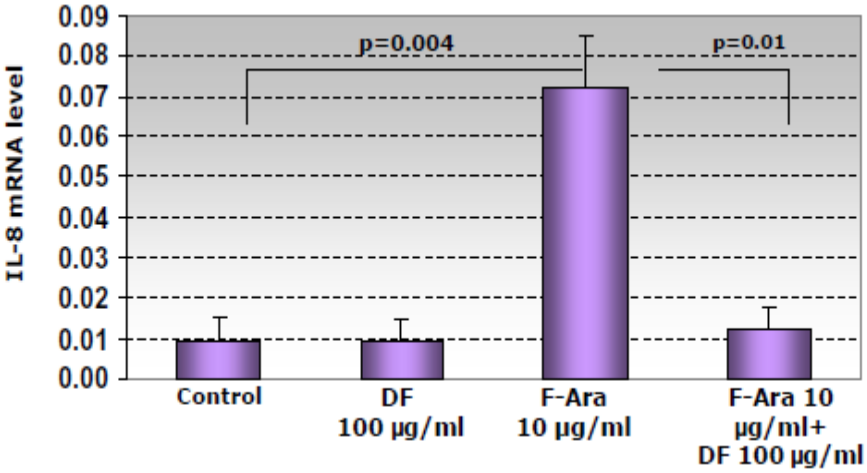


図 2.6.2.2.1.4-2 IL-8 mRNA 発現に対する作用

Control：対照、F-Ara：フルダラビン、DF：デフィブロチドナトリウム
mRNA 発現は、β-actin との比率で表す。
P=0.004（Student's t-test（両側）、フルダラビン群との比較）
P=0.01（Student's t-test（両側）、フルダラビン群との比較）

［4.2.1.1-3 Fig.3 を引用］

フルダラビン群の CD146 の発現は対照群より高く、この増加は 100 µg/mL デフィブロチドナトリウムとの併用群では認められなかった（図 2.6.2.2.1.4-3）。また、HLA-DR の発現は、対照群 7.5%、フルダラビン群 36.5%、フルダラビンと 100 µg/mL デフィブロチドナトリウムの併用群 10.8%であった（図 2.6.2.2.1.4-4）。

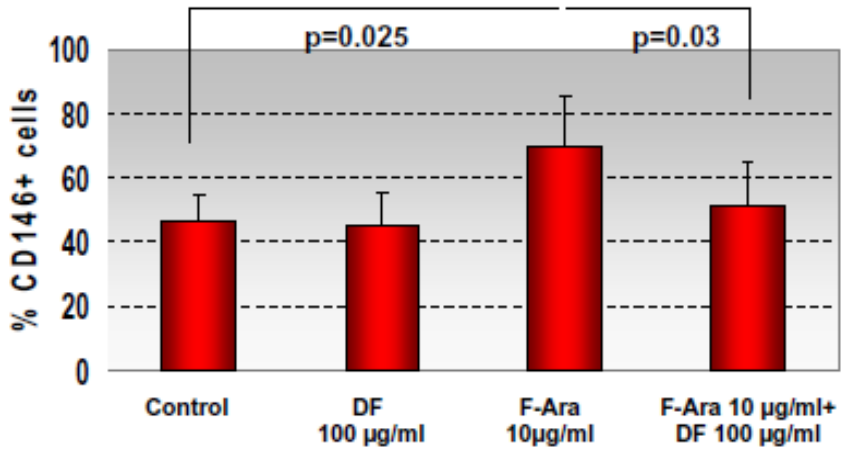


図 2.6.2.2.1.4-3 CD146 の発現に対する作用

Control：対照、F-Ara：フルダラビン、DF：デフィブロチドナトリウム
P=0.025（Student's t-test（両側）、フルダラビン群との比較）
P=0.03（Student's t-test（両側）、フルダラビン群との比較）

［4.2.1.1-3 Fig.6 を引用］

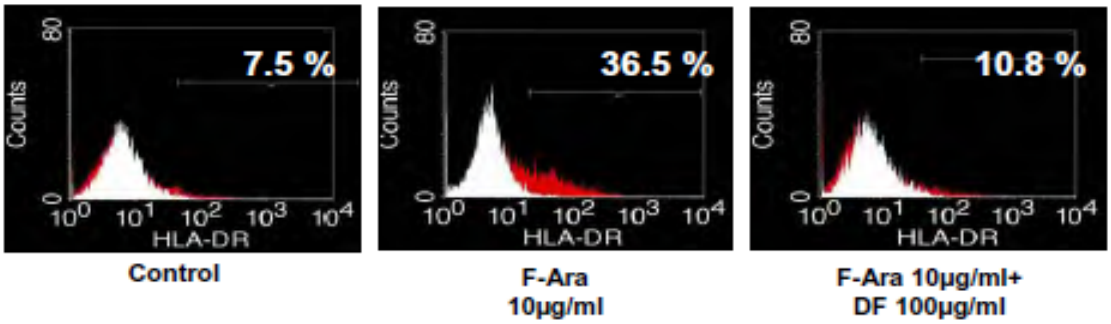


図 2.6.2.2.1.4-4 HLA-DR の発現に対する作用

Control：対照、F-Ara：フルダラビン、DF：デフィブロチドナトリウム
図中の数値は、抗 HLA-DR 抗体陽性細胞の割合を示す。

［4.2.1.1-3 Fig.7 を引用］

2.6.2.2.1.5 サリドマイド誘発アポトーシスに対する作用（試験番号 RB2009010、資料番号 4.2.1.1-4、評価資料）

多発性骨髄腫の治療薬であるサリドマイドは、アポトーシス誘導作用を示すことが知られている[2)]。そこで、サリドマイドによるアポトーシス誘導作用に対するデフィブロチドナトリウムの影響について検討した。

（1） 方法

HMEC に媒体（対照）、サリドマイド（終濃度 100 μg/mL）及びサリドマイド（終濃度 100 μg/mL）+ デフィブロチドナトリウム（終濃度 150 μg/mL）を添加し、24 時間培養した。

また、多発性骨髄腫細胞株 RPMI-8226 を用いて同様の検討を行った。

アポトーシスは、フローサイトメトリーを用いて PI 陰性細胞における FSC 及び SSC を測定し、アポトーシス細胞の割合を求めることで評価した。

（2） 成績

HMEC へのサリドマイド処置によりアポトーシス細胞の割合は増加したが、150 μg/mL デフィブロチドナトリウム併用下では増加は認められなかった（図 2.6.2.2.1.5-1）。

一方、RPMI-8226 に対してサリドマイドの抗腫瘍作用、すなわちアポトーシス細胞の割合の増加が認められたが、この作用にはデフィブロチドナトリウムは影響しなかった（図 2.6.2.2.1.5-2）。

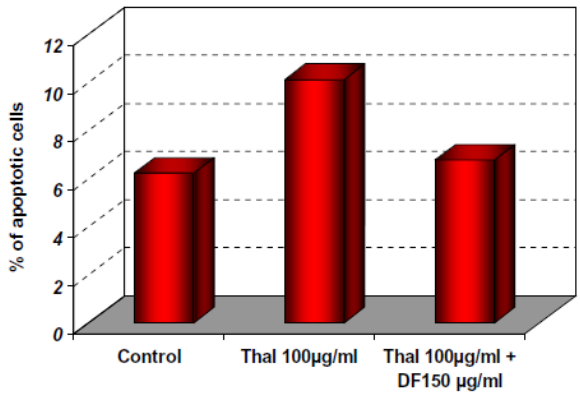


図 2.6.2.2.1.5-1　HMEC におけるサリドマイド誘発アポトーシスに対する作用

Control：対照、Thal：サリドマイド、DF：デフィブロチドナトリウム

［4.2.1.1-4 Fig.5 を引用］

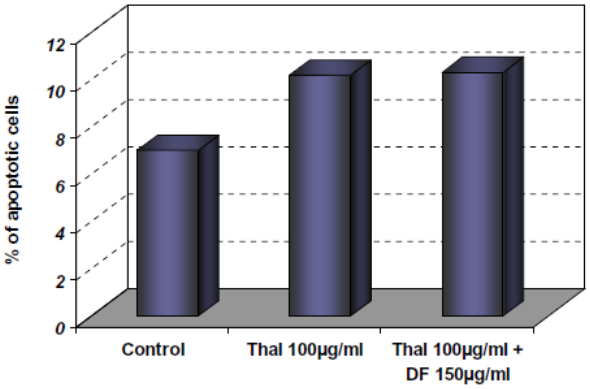


図 2.6.2.2.1.5-2　RPMI-8226 におけるサリドマイド誘発アポトーシスに対する作用

Control：対照、Thal：サリドマイド、DF：デフィブロチドナトリウム

［4.2.1.1-4 Fig.7 を引用］

2.6.2.2.2　凝固・線溶系に対する影響

2.6.2.2.1　サリドマイドによる t-PA 抑制及び PAI-1 誘導に対する作用（試験番号 RB2009010、資料番号 4.2.1.1-4、評価資料）

多発性骨髄腫の患者への治療において、サリドマイドを投与する際の副作用の 1 つとして血栓症が知られている。そこで、サリドマイド処置下の線溶系に対するデフィブロチドナトリウムの影響を検討した。

（1）　方法

HMEC を媒体（対照）、50 及び 100 µg/mL サリドマイド存在下で 24 時間培養した。デフィブロチドナトリウムの影響を検討する場合は、50 及び 100 µg/mL サリドマイド群を 150 µg/mL デフィブロチドナトリウムの存在、非存在下で 24 時間培養した。

また、HMEC と RPMI-8226 を共培養した試験系においても同様の検討を行った。細胞外液中に遊離される t-PA 及び PAI-1 量を ELISA 法で測定した。

（2） 成績

HMEC の外液中に遊離される t-PA 量は、対照群と比較して 50 及び 100 μg/mL サリドマイド群で低下した（図 2.6.2.2.2.1-1A）。サリドマイドに 150 μg/mL デフィブロチドナトリウムを併用した群の t-PA 量は、サリドマイド単独群より高かった（図 2.6.2.2.2.1-1B）。

また、共培養細胞系の外液中に遊離される t-PA 量は、HMEC 単独の場合と比べて低かった（図 2.6.2.2.2.1-2A）。この共培養系においてサリドマイドに 150 μg/mL デフィブロチドナトリウムを併用した群の t-PA 量は、サリドマイド単独群より高かった（図 2.6.2.2.2.1-2B）。

一方、PAI-1 量は HMEC 単独より共培養系の方が高かった（図 2.6.2.2.2.1-3A）。この共培養系への 100 μg/mL サリドマイド処置により PAI-1 量は増加したが、150 μg/mL デフィブロチドナトリウムとの併用群の PAI-1 量はサリドマイド単独群より低かった（図 2.6.2.2.2.1-3B）。

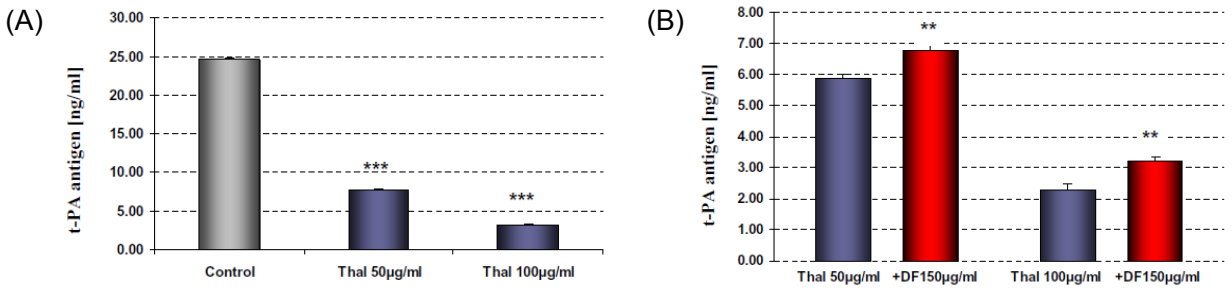


図 2.6.2.2.2.1-1 HMEC におけるサリドマイドによる t-PA の遊離抑制に対する作用

Control：対照、Thal：サリドマイド、DF：デフィブロチドナトリウム
***P<0.001（Student's t-test（両側）、対照群との比較）
**P<0.01（Student's t-test（両側）、サリドマイド群との比較）

［4.2.1.1-4 Fig.1 を引用］

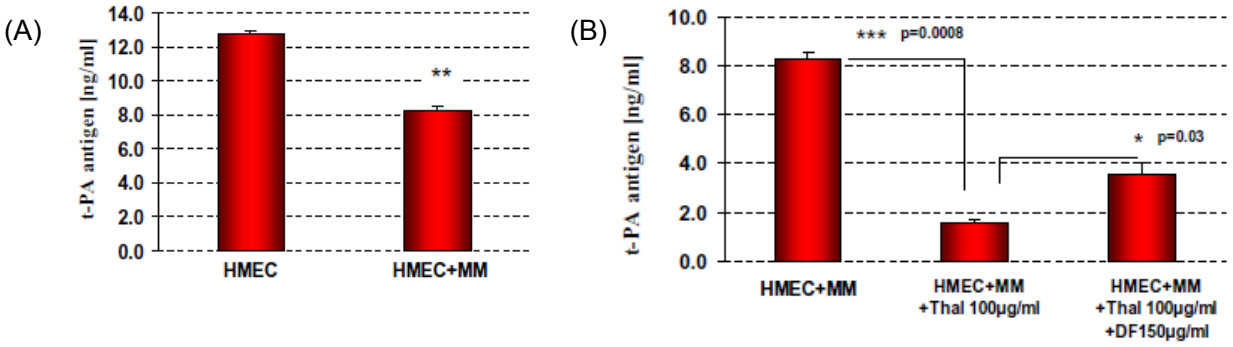


図 2.6.2.2.2.1-2 HMEC 及び RPMI-8226 共培養下におけるサリドマイドによる t-PA の遊離抑制に対する作用

HMEC：HMEC のみの培養系、HMEC+MM：HMEC と RPMI-8226 の共培養系
Thal：サリドマイド、DF：デフィブロチドナトリウム
**P<0.01（Student's t-test（両側）、HMEC 単独との比較）
***P<0.001（Student's t-test（両側）、HMEC と RPMI-8226 の共培養系との比較）
*P<0.05（Student's t-test（両側）、サリドマイド群との比較）

［4.2.1.1-4 Fig.2 を引用］

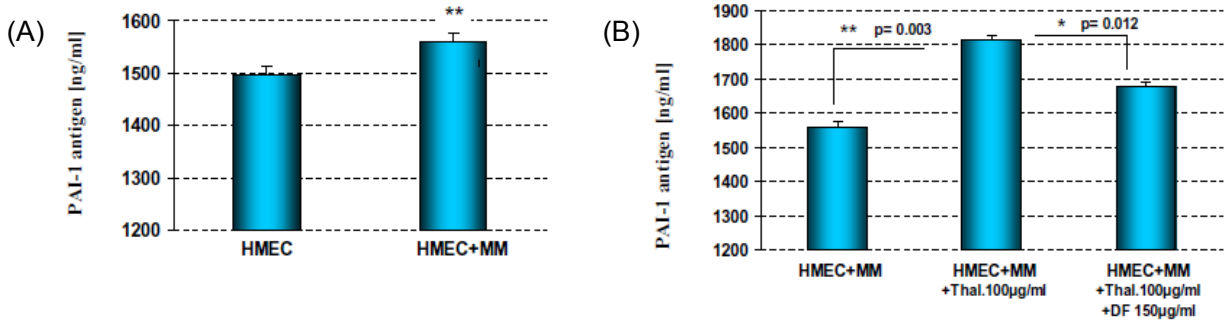


図 2.6.2.2.2.1-3 HMEC 及び RPMI-8226 共培養下におけるサリドマイドによる PAI-1 の遊離誘導に対する作用

HMEC：HMEC のみの培養系、HMEC+MM：HMEC と RPMI-8226 の共培養系
Thal：サリドマイド、DF：デフィブロチドナトリウム
**P<0.01（Student's t-test（両側）、HMEC 単独との比較）
**P<0.01（Student's t-test（両側）、HMEC と RPMI-8226 の共培養系との比較）
*P<0.05（Student's t-test（両側）、サリドマイド群との比較）

［4.2.1.1-4 Fig.3 を引用］

2.6.2.2.2.2 サリドマイドによるプラスミン活性阻害に対する作用（試験番号 RB2009010、資料番号 4.2.1.1-4、評価資料）

サリドマイドによるプラスミン活性阻害に対するデフィブロチドナトリウムの作用を検討した。

（1） 方法

HMEC を媒体（対照）及び 100 μg/mL サリドマイド存在下で 24 時間培養した。デフィブロチドナトリウムの影響を検討する場合は、100 μg/mL サリドマイド群を 150 及び 400 μg/mL デフィブロチドナトリウムの存在、非存在下で 24 時間培養した。

回収した細胞培養液にフィブリノーゲン、プラスミノーゲン及びトロンビンの混合液並びに発色基質 S-2251 を加えて反応させた。反応液中のプラスミンが S-2251 を分解することにより生成した *p*-ニトロアニリンの吸光度（405 nm）を測定することで、プラスミン活性を求めた。

（2） 成績

サリドマイド群のプラスミン活性は対照群より低下した。サリドマイドにデフィブロチドナトリウムを併用した場合、400 μg/mL デフィブロチドナトリウム併用群のプラスミン活性はサリドマイド群より有意に高かった（図 2.6.2.2.2.2-1）。

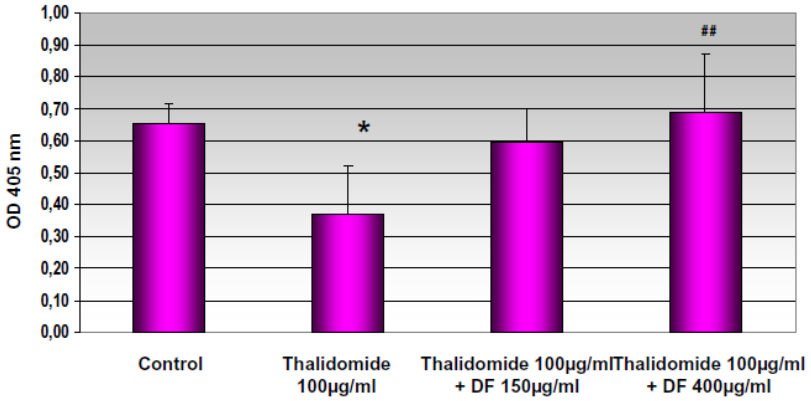


図 2.6.2.2.2.2-1 サリドマイドによるプラスミン活性阻害に対する作用

Control：対照、Thalidomide：サリドマイド、DF：デフィブロチドナトリウム
*P<0.05（Student's t-test（両側）、対照群との比較）
##P<0.01（Student's t-test（両側）、サリドマイド群との比較）

［4.2.1.1-4 Fig.9 を引用］

2.6.2.2.2.3 プラスミン活性に対する作用（試験番号 RQCVL049R011, RQCVL050R011、資料番号 4.2.1.1-5, 4.2.1.1-6、評価資料）

（1） 方法

デフィブロチドナトリウムを 0、1.25、2.5、5、12.5、25、50、100、250 及び 500 µg/mL の濃度で発色基質 S-2251 及びウシ血漿から抽出したユーグロブリン分画と反応させた。基質分解により生成した *p*-ニトロアニリンを 405 nm の吸光度で測定し、血漿ユーグロブリン分画中のプラスミン活性に対するデフィブロチドナトリウムの影響を検討した（4.2.1.1-5）。

同様に、ヒト血漿由来のプラスミン（カルビオケム社）を用いた場合では、デフィブロチドナトリウムを 0.25、0.50、1.00、1.51、2.26、3.40、5.10、10.20、25.50、51.00 及び 102.00 µg/mL の濃度で検討した（4.2.1.1-6）。

（2） 成績

デフィブロチドナトリウムの存在下で、ウシ血漿から抽出したユーグロブリン分画中のプラスミン活性は増加した。その作用は低濃度から認められ、約 100 µg/mL でほぼ最大となった（図 2.6.2.2.2.3-1）。デフィブロチドナトリウムの 5～250 µg/mL におけるプラスミン活性の回帰直線を図 2.6.2.2.2.3-2 に示す。

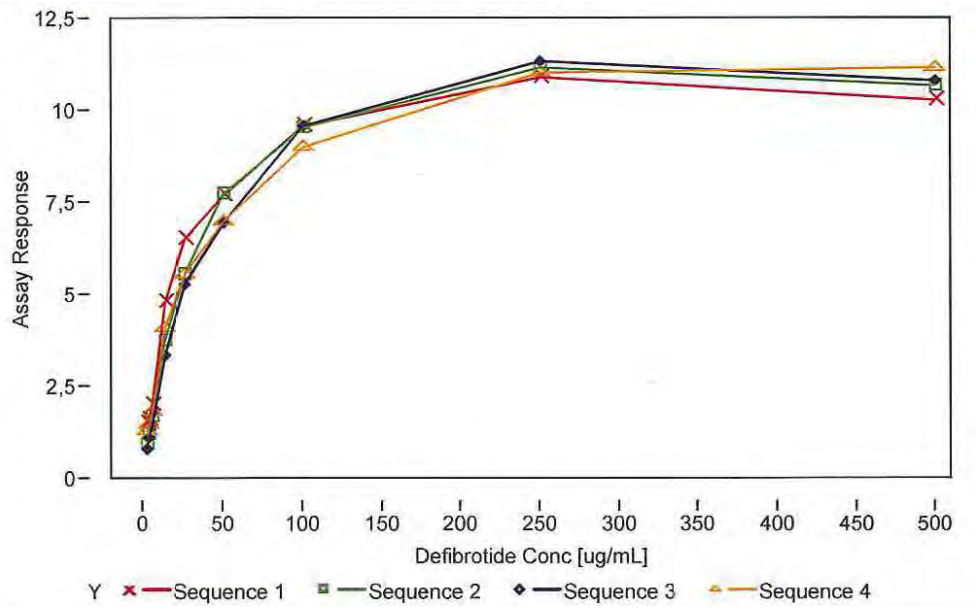
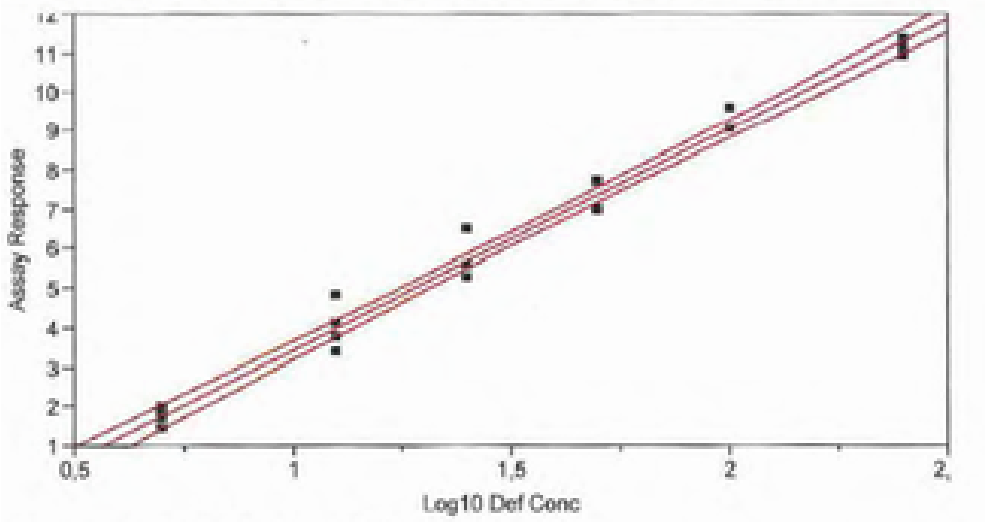


図 2.6.2.2.2.3-1 ウシ血漿ユーグロブリンのプラスミン活性の濃度反応曲線

［4.2.1.1-5 Plot 4.6.1 を引用］

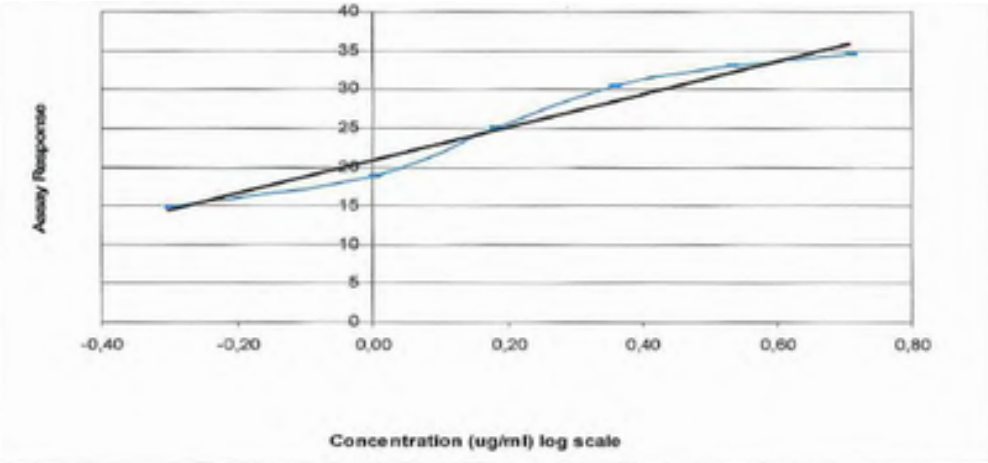


Assay response = -2.163 + 5.61Log10[defibrotide concentration]（R^2 = 0.985）

図 2.6.2.2.2.3-2 ウシ血漿ユーグロブリンのプラスミン活性の回帰分析

［4.2.1.1-5 Plot 4.6.3 を引用］

ヒト血漿由来のプラスミンを用いて検討した場合も、デフィブロチドナトリウムはプラスミン活性を増加させた。デフィブロチドナトリウムの 0.50～5.10 μg/mL におけるプラスミン活性の回帰直線を図 2.6.2.2.2.3-3 に示す。



($R^2 = 0.96$)

図 2.6.2.2.2.3-3　ヒト血漿プラスミン活性の回帰分析

［4.2.1.1-6 Plot 4.6.3 を引用］

2.6.2.2.3　骨髄移植モデルマウスに対する影響

2.6.2.2.3.1　骨髄移植モデルマウスの生存に対する作用（試験番号 PH-073-002、資料番号 4.2.1.1-7、評価資料）

（1）　方法

骨髄移植モデルは BALB/c 系雌性マウスに 7.5Gy の放射線を照射後、C57BL/6 系雄性マウスから調製した骨髄細胞（5×10^6 細胞/匹）を尾静脈から静脈内移植することで作製した。移植前日に、生理食塩液（対照）又はデフィブロチドナトリウム（400 mg/kg）を BALB/c 系雌性マウスに 1 日 2 回腹腔内投与し、移植後 14 日目までの 16 日間反復投与した。骨髄移植モデルの評価はマウスの生存とし、移植日から移植後 15 日目までマウスの生存観察を行った。なお、移植前日の体重から 20%以上減少したマウスは安楽死させ、当該日を死亡日とした。

（2）　成績

生存時間解析の結果、対照群の生存時間の中央値は 5.0 日（95%信頼区間：5.0～6.0 日）、デフィブロチドナトリウム群は 6.0 日（95%信頼区間：5.0～7.0 日）であり、デフィブロチドナトリウム群の生存時間は有意に延長した（P=0.0178、log-rank 検定）。

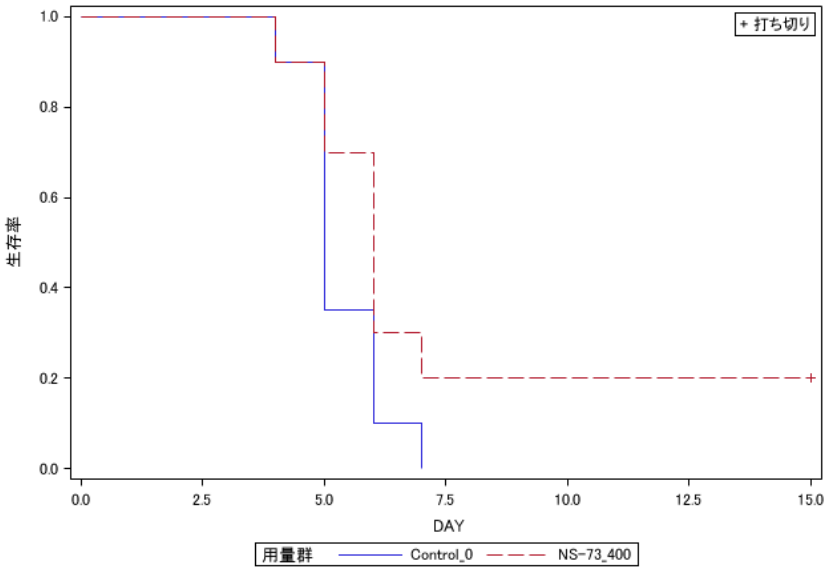


図 2.6.2.2.3.1-1 骨髄移植モデルマウスの生存に対する作用

Day 0：移植日、Day 15：観察終了日、Day -1～14：1 日 2 回反復腹腔内投与
Control：対照、NS-73：デフィブロチドナトリウム
P=0.0178（log-rank 検定、Control 群との比較、n=20）

［4.2.1.1-7 図 1 を引用］

2.6.2.3 副次的薬理試験

該当試験なし。

2.6.2.4 安全性薬理試験

デフィブロチドナトリウムの安全性薬理プロファイルを検討するにあたり、独立した安全性薬理試験としては実施せず、反復投与毒性試験に組み込んで、デフィブロチドナトリウムを静脈内投与したときのラット及びイヌの中枢神経系及び心血管系に及ぼす影響を評価し、呼吸系については一般症状及び病理組織学的検査から評価した。また、心血管系の *in vitro* 試験において human ether-a-go-go related gene（hERG）電流に及ぼす影響を検討した。

2.6.2.4.1 中枢神経系

2.6.2.4.1.1 一般症状に及ぼす影響（試験番号 1529-001、資料番号 4.2.3.2-3、評価資料）

Crl:CD（SD）ラット（雌雄各群 15 例）を用いた 13 週間反復投与毒性試験の中で、ホームケージ観察、ハンドリング観察、オープンフィールド観察などの評価を含む機能観察総合評価（FOB）法を用いて、デフィブロチドナトリウムの中枢神経系に及ぼす影響を評価した。デフィブロチドナトリウムを 0（対照群、媒体：生理食塩水）、240、1200 及び 4800 mg/kg/日の用量で外科的手法を用いて大腿部に留置したカテーテルより持続静脈内投与した。なお、長期間のカテーテル留置に関連すると考えられる投与部位の炎症並びに二次的な合併症が発現したため、試験は 9 週間で終了した。FOB 評価は、雌雄各投与群の最初に投与した 10 例に対して投与前に実施し、投与開始

後 25±2 時間時点（2 日目）及び投与終了時点（9 週目）については、その 10 例のうちの生存動物に対して実施した。一般状態観察では、対照群を含む全群の雌雄で、活動性低下、軟便、四肢の機能障害、皮膚の変色、粗毛等が認められた。対照群でも観察されたことからカテーテル処置に関連したものと考えられたが、デフィブロチドナトリウム投与群ではその発現頻度がより高かった。240 mg/kg/日以上の投与群の雄及び 1200 mg/kg/日以上の投与群の雌で円背位が、240 及び 1200 mg/kg/日投与群の雄で浅速呼吸が、240 mg/kg/日投与群の雄及び 4800 mg/kg/日投与群の雌で呼吸困難が認められた。活動/覚醒測定においては、投与終了時点（9 週目）の 1200 mg/kg/日の雌で、立ち上がり回数と覚醒度の低下が認められた。神経筋測定においては、投与 2 日目の 1200 及び 4800 mg/kg/日の雌雄で、平均後肢握力及び/又は後肢開脚幅が低下したが、投与終了時点（9 週目）には回復した。体重測定においては、投与終了時点（9 週目）の 1200 mg/kg/日の雄及び 4800 mg/kg/日の雌で、同時期の媒体群と比較して平均体重の減少が認められた。

2.6.2.4.1.2 正常体温に及ぼす影響（試験番号 10202b、資料番号 4.2.1.3-1、参考資料）

雄性 SD ラット（各群 10 例）にデフィブロチドナトリウムを 0（媒体：生理食塩水）、50 及び 100 mg/kg の用量で腹腔内投与し、正常体温に及ぼす影響を検討した。いずれの用量においても正常体温に影響を及ぼさなかった。

2.6.2.4.1.3 ペントバルビタール誘発睡眠に及ぼす影響（試験番号 10202b、資料番号 4.2.1.3-1、参考資料）

雄性 SD ラット（各群 15 例）にデフィブロチドナトリウムを 0（媒体：生理食塩水）、25、50、100 及び 200 mg/kg の用量で静脈内投与し、ペントバルビタール（30 mg/kg、腹腔内投与）誘発睡眠に及ぼす影響を検討した。いずれの用量においてもペントバルビタール誘発睡眠に対する影響は認められなかった。

2.6.2.4.1.4 ペンテトラゾール誘発けいれんに及ぼす影響（試験番号 10202b、資料番号 4.2.1.3-1、参考資料）

雄性 SD ラット（各群 15 例）にデフィブロチドナトリウムを 0（媒体：生理食塩水）、50 及び 100 mg/kg の用量で腹腔内投与し、ペンテトラゾール（110 mg/kg、筋肉内投与）により誘発されるけいれんに及ぼす影響を検討した。いずれの用量においてもペンテトラゾール誘発けいれんに対する影響は認められなかった。

2.6.2.4.2 心血管系

2.6.2.4.2.1 hERG 電流に及ぼす影響（試験番号 0040-2010、資料番号 4.2.1.3-2、参考資料）

デフィブロチドナトリウムの hERG 電流阻害の可能性を検討するため、hERG チャネルを安定発現させたヒト胎児由来腎臓 293 細胞（HEK293 細胞）にデフィブロチドナトリウムを 0（媒体：Tyrode 液）、50、150 及び 500 μg/mL の濃度で適用し、膜電位固定法を用いたパッチクランプ実験を実施した。デフィブロチドナトリウムはいずれの濃度においても hERG 電流を阻害せず、hERG チャネル阻害作用はないものと考えられた。

陽性対照物質である E-4031 は 300 nmol/L で hERG 電流を顕著に抑制した。

2.6.2.4.2.2 心電図に及ぼす影響（試験番号 1529-002、資料番号 4.2.3.2-6、評価資料）

Beagle イヌ（雌雄各群 4 例）にデフィブロチドナトリウムを 0（媒体：生理食塩水）、60、300、1600 mg/kg/日の用量で静脈内投与する 13 週間反復投与毒性試験の中で評価した。投与は 1 日 4 回（6 時間ごと）とし、1 回の投与は 2 時間かけての静脈内投与とした。心電図評価は、投与前、投与後 6 週目及び投与最終日の剖検前に実施した。標準 10 誘導心電図は、50 mm/sec で記録し、主として第 II 誘導心電図から RR 間隔、PR 間隔、QT 間隔及び QRS 幅を計測し、心拍数を算出した。QTc の算出には Fridericia の補正式を用いた。全波形の解析は、心臓専門獣医により評価と報告がなされた。すべての動物で洞調律あるいは洞性不整脈が認められたが、これらはイヌでは正常範囲内の脈拍リズムであった。また、デフィブロチドナトリウムは各種の心電図パラメータ（RR 間隔、PR 間隔、QT 間隔、QRS 幅及び QTc）に対して影響を及ぼさず、異常波形も認められなかった。

2.6.2.4.3 呼吸系

2.6.2.4.3.1 呼吸系に及ぼす影響（試験番号 1529-001, 1529-002、資料番号 4.2.3.2-3, 4.2.3.2-6、評価資料）

ラットを用いた 13 週間反復投与毒性試験（状態悪化により 9 週間で試験終了）において、一般症状観察では 240 及び 1200 mg/kg/日投与群の雄で浅速呼吸が、240 mg/kg/日投与群の雄及び 4800 mg/kg/日投与群の雌で呼吸困難が認められた。イヌを用いた 13 週間反復投与毒性試験においては、呼吸窮迫を示唆する一般症状は認められなかった。いずれの試験においても、呼吸系組織の肉眼的/組織的解剖を行ったが、副作用を示唆する所見は認められなかった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当試験なし。

2.6.2.6 考察及び結論

デフィブロチドナトリウムは、ブタ腸粘膜から単離した[redacted]を出発物質として調製した[redacted]分子量 13000～20000 の一本鎖のポリデオキシリボヌクレオチドのナトリウム塩である。本薬は血管内皮細胞膜と相互作用し[3,4]、さらに細胞内にも取り込まれることで薬理作用を発揮すると考えられる[5]。

培養細胞を用いた実験系において、本薬は主に 50～150 μg/mL で HMEC への血清飢餓による細胞障害及びフルダラビンやサリドマイドによる薬物誘発性アポトーシスを抑制した。この細胞系ではアポトーシスに関係するカスパーゼ-3 などの細胞内シグナルの変動も捉えられており、本薬は同程度の濃度でそれらの変動も抑制した。さらに、*in vitro* 系でヒトプラスミン活性に対する本薬の影響を検討したところ、低濃度からプラスミン活性を濃度依存的に増加させた。ウシ血漿から抽出したユーグロブリン分画を用いて本薬の濃度反応性を検討すると、本薬の濃度が 100 μg/mL 前後でプラスミン活性の増強作用はほぼ最大に達する飽和曲線となった。また、Echart らは、フ

ィブリン塊の分解を指標とした検討において、本薬はプラスミノーゲンには影響せず、10 μg/mL 以上でプラスミン活性を有意に増強したことを報告した [6]。これらのことから本薬がプラスミンに結合することでプラスミン活性を増強するものの、高濃度になると本薬の結合が飽和状態となるため数十 μg/mL の濃度で本薬の効力が発揮されると推察された。

凝固系については、HMEC を用いた検討において、本薬 12.5、50、200 及び 800 μg/mL はリポポリサッカライドで誘発したときの組織因子（TF）の発現増加及び TF を介した凝固活性の増強を抑制した [7]。その他、トロンボモジュリンの発現促進 [8]、von Willebrand factor（vWF）の増加抑制 [9]や組織因子経路インヒビター（TFPI）の遊離増加 [10]が報告されている。このように凝固系に対しては抑制的に作用し、線溶系に対しては上述のように促進的に作用することから、本薬が凝固･線溶系の両方の種々の因子に影響を及ぼすことで抗血栓活性の方が優位になると考えられた。実験的血栓モデルにおいても、マウスへのトロンビンの静脈内投与により誘発される致死に対して本薬は保護作用を示した [11]。

また、骨髄移植モデルマウスを用いて本薬の生存に対する影響を検討した。投与経路は臨床適用経路である静脈内投与をマウスの尾静脈で反復するのは困難なため、腹腔内投与とした。本薬の動物への投与例としては、マウスに 100～175 mg/kg での静脈内投与 [11]、ラットに 25～200 mg/kg での静脈内投与 [12]、マウス及びラットに 200～2000 mg/kg での経口投与 [13]などがある。これらの報告を参考に、この試験では 400 mg/kg を 1 日 2 回、16 日間反復腹腔内投与した。

本薬を投与したときの血漿中濃度については、ラットに 4800 mg/kg/日で 7 日間持続静脈内投与したときの投与終了直前の各個体の血漿中濃度は 654、1110、742 μg/mL であり（2.6.7.6 項参照）、平均すると 835 μg/mL となる。また、イヌに 1600 mg/kg/日を 1 日 4 回、各 2 時間かけて 7 日間静脈内投与したときの投与終了直後の各個体の血漿中濃度は 285、355、462 μg/mL であり（2.6.7.6 項参照）、平均すると 367 μg/mL となる。さらにマウスへの投与量である 800 mg/kg/日（400 mg/kg を 1 日 2 回）に換算すると、ラットが 139 μg/mL、イヌが 184 μg/mL となる。骨髄移植モデルマウスへの腹腔内投与とは条件が異なるため直接的な比較はできないものの、緩徐な静脈内投与における 139～184 μg/mL の濃度域が目安となり、静脈内投与より吸収効率が劣る腹腔内投与ではこの濃度域より低い水準になると推察された。また、国内第 II 相臨床試験（FMU-DF-002 試験）において、VOD 患者にデフィブロチドナトリウム（6.25 mg/kg）を 2 時間かけて静脈内投与したときの C_{max} の平均値は 25.996 μg/mL（2.7.6.5 項参照）であり、大きな乖離はないと考えられた。さらに、上述したようにヒト血管内皮由来の培養細胞を用いた検討において、概ね数十 μg/mL の濃度域で細胞保護作用を示した。したがって、本薬投与時もこの濃度域で薬効発現すると考えられた。

安全性薬理の評価では、中枢神経系において、神経筋測定の投与 2 日目の 1200 及び 4800 mg/kg/日の雌雄で、平均後肢握力及び/又は後肢開脚幅が低下したが、投与終了時点（9 週目）では回復性が認められた。立ち上がり回数と覚醒度は、投与終了時点（9 週目）の 1200 mg/kg/日の雌のみで低下したが、用量相関性は認められなかった。また、体重測定では、1200 mg/kg/日の雄及び 4800 mg/kg/日の雌で、同時期の媒体群と比較して平均体重が減少したが、用量相関性は認められなかった。当該試験では、長期間のカテーテル留置に関連すると考えられる投与部位の炎症並びに二次的な合併症の発現により、9 週間で試験を終了した。そのため、上述の作用は被験物質の薬理作用に加えてカテーテル留置に関連した影響を含む可能性があり、被験物質投与による

影響を明確に否定できないが、いずれの作用も用量相関性が認められていないことから、臨床使用にあたり特別に注意を要する作用ではないと考えられた。心血管系では、非 GLP 試験であるものの hERG 電流に対する影響はなく、また、イヌを用いた心電図評価でも影響は認められていないことから、臨床使用にあたり特別に注意を要する作用は認められなかった。呼吸系では、ラットにおいて浅速呼吸（240 及び 1200 mg/kg/日投与群の雄）あるいは呼吸困難（240 mg/kg/日投与群の雄及び 4800 mg/kg/日投与群の雌）が認められた。呼吸系の測定時刻は投与後の決まった時間ではないこと、病理学的検査（肉眼的/組織的解剖）の影響は C_{max} よりも AUC に依存していることから、ヒトでの曝露量と安全性薬理試験で所見が認められた際の曝露量の比較には、毒性試験と同じく $AUC_{0\text{-}6hr}$ を用いた（2.6.6.9 項参照）。安全性薬理試験でラット浅速呼吸と呼吸困難が認められ、その際の最低用量の曝露量（$AUC_{0\text{-}6hr}$）は 201.8 μg· hr/mL（240 mg/kg/日、雄、初回投与時）であり、その曝露比は 3.1 であった。しかしながら、用量相関性はなく、病理学的検査において副作用を示唆する所見は認められず、イヌにおいては呼吸窮迫を示唆する一般症状は認められなかったことから、本薬の呼吸系への影響については、ヒトの臨床使用上の留意すべき事象に該当しないと考えられた。これらの安全性薬理の評価においては、中枢神経系、心血管系及び呼吸系に対する重大なリスクは見出されなかった。

以上、本薬の作用機序は明確でないものの、凝固・線溶系の種々の因子に影響を及ぼすことで血管内皮細胞に保護的に働き [14]、その結果、肝中心静脈閉塞症（肝類洞閉塞症候群）の治療に貢献すると推察された。

2.6.2.7 図表

図表は、本文中の適切な場所に記載した。

2.6.2.8 参考文献

1. Podhorecka M, Klimek P, Chocholska S, Szymczyk A, Macheta A, Kowal M, et al. The rate of in vitro fludarabine-induced peripheral blood and bone marrow cell apoptosis may predict the chemotherapy outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia. Eur J Clin Pharmacol. 2015;71:1121-7. ＜資料番号 4.3-18＞

2. Hideshima T, Chauhan D, Shima Y, Raje N, Davies FE, Tai YT, et al. Thalidomide and its analogs overcome drug resistance of human multiple myeloma cells to conventional therapy. Blood. 2000;96:2943-50. ＜資料番号 4.3-19＞

3. Bilsel S, Yalçin AS, Taga Y, Emerk K. Interaction of ^{3}H-defibrotide with cultured human umbilical vein endothelial cells. Thromb Res. 1990;58:455-60. ＜資料番号 4.3-1＞

4. Bilsel S, Erşahin C, Taga Y, Emerk K. Subcellular localization of radioactively labelled defibrotide in cultured endothelial cells. Thromb Res. 1992;66:385-90. ＜資料番号 4.3-2＞

5. Palomo M, Mir E, Rovira M, Escolar G, Carreras E, Daiz-Ricart M. What is going on between defibrotide and endothelial cells? Snapshots reveal the hot spots of their romance. Blood. 2016;127:1719-27. ＜資料番号 4.3-3＞

6. Echart CL, Graziadio B, Somaini S, Ferro LI, Richardson PG, Fareed J, et al. The fibrinolytic mechanism of defibrotide: effect of defibrotide on plasmin activity. Blood Coagul Fibrinolysis. 2009;20:627-34. ＜資料番号 4.3-4＞

7. Falanga A, Vignoli A, Marchetti M, Barbui T. Defibrotide reduces procoagulant activity and increases fibrinolytic properties of endothelial cells. Leukemia. 2003;17:1636-42. ＜資料番号 4.3-5＞

8. Zhou Q, Chu X, Ruan C. Defibrotide stimulates expression of thrombomodulin in human endothelial cells. Thromb Haemost. 1994;71:507-10. ＜資料番号 4.3-6＞

9. Palomo M, Diaz-Ricart M, Rovira M, Escolar G, Carreras E. Defibrotide prevents the activation of macrovascular and microvascular endothelia caused by soluble factors released to blood by autologous hematopoietic stem cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 2011;17:497-506. ＜資料番号 4.3-7＞

10. Cella G, Sbarai A, Mazzaro G, Motta G, Carraro P, Andreozzi GM, et al. Tissue factor pathway inhibitor release induced by defibrotide and heparins. Clin Appl Thromb Hemost. 2001;7:225-8. ＜資料番号 4.3-8＞

11. Paul W, Gresele P, Momi S, Bianchi G, Page CP. The effect of defibrotide on thromboembolism in the pulmonary vasculature of mice and rabbits and in the cerebral vasculature of rabbits. Br J Pharmacol. 1993 ;110:1565-71. ＜資料番号 4.3-9＞

12. Jamieson A, Alcock P, Tuffin DP. The action of polyanionic agents defibrotide and pentosan sulphate on fibrinolytic activity in the laboratory rat. Fibrinolysis. 1996;10:27-35. ＜資料番号 4.3-10＞

13. Nunziata A, Mariani MF, Cascone M, Calvani AB, Pescador R. Increased plasma t-PA activity and urinary PGE_2 after repeated oral administration of defibrotide to the rat and the mouse. Thromb Res. 1991;64:279-84. ＜資料番号 4.3-11＞

14. Pescador R, Capuzzi L, Mantovani M, Fulgenzi A, Ferrero ME. Defibrotide: properties and clinical use of an old/new drug. Vascul Pharmacol. 2013;59:1-10. ＜資料番号 4.3-12＞

目次

2.6.3 薬理試験概要表 2
2.6.3.1 薬理試験：一覧表 2
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 4
2.6.3.3 副次的薬理試験 5
2.6.3.4 安全性薬理試験 6
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 8
2.6.3.6 参考文献 8

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

一覧表（1/2）

被験物質：defibrotide

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	CTD 記載箇所
効力を裏付ける試験					
血清飢餓による細胞障害に対する作用	ヒト微小血管内皮細胞	*in vitro*	Gentium（イタリア）	RB2008010	4.2.1.1-1（評価資料）
フルダラビン誘発アポトーシスに対する作用	ヒト微小血管内皮細胞	*in vitro*	University of Regensburg（ドイツ）	RB2008020	4.2.1.1-2（評価資料）
フルダラビン誘発アポトーシスにおける活性型カスパーゼ-3 の発現に対する作用	ヒト微小血管内皮細胞	*in vitro*	Gentium（イタリア）	RB2008010	4.2.1.1-1（評価資料）
フルダラビン誘発アポトーシスにおける関連因子の発現に対する作用	ヒト微小血管内皮細胞	*in vitro*	Gentium（イタリア）	RB2010010	4.2.1.1-3（評価資料）
サリドマイド誘発アポトーシスに対する作用	ヒト微小血管内皮細胞、多発性骨髄腫細胞株 RPMI-8226	*in vitro*	Gentium（イタリア）	RB2009010	4.2.1.1-4（評価資料）
サリドマイドによる t-PA 抑制及び PAI-1 誘導に対する作用	ヒト微小血管内皮細胞、多発性骨髄腫細胞株 RPMI-8226	*in vitro*	Gentium（イタリア）	RB2009010	4.2.1.1-4（評価資料）
サリドマイドによるプラスミン活性阻害に対する作用	ヒト微小血管内皮細胞	*in vitro*	Gentium（イタリア）	RB2009010	4.2.1.1-4（評価資料）
プラスミン活性に対する作用	ウシ血漿ユーグロブリン分画	*in vitro*	Gentium（イタリア）	RQCVL049R011	4.2.1.1-5（評価資料）
	ヒト血漿プラスミン	*in vitro*	Gentium（イタリア）	RQCVL050R011	4.2.1.1-6（評価資料）
骨髄移植モデルマウスの生存に対する作用	骨髄移植モデルマウス	腹腔内	日本新薬	PH-073-002	4.2.1.1-7（評価資料）
副次的薬理試験：該当試験なし					

t-PA：組織プラスミノーゲン活性化因子、PAI-1：プラスミノーゲン活性化抑制因子-1

一覧表（2/2）

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	CTD 記載箇所
安全性薬理試験					
一般症状に及ぼす影響	ラット	静脈内	[redacted]（米国）	1529-001	4.2.3.2-3 （評価資料）
中枢神経系に及ぼす影響	ラット	静脈内、 腹腔内	Crinos Laboratori di Ricerche Biologiche (イタリア)	10202b	4.2.1.3-1 （参考資料）
hERG 電流に及ぼす影響	hERG チャネル安定発現 HEK293 細胞	*in vitro*	[redacted]（イタリア）	0040-2010	4.2.1.3-2 （参考資料）
心電図に及ぼす影響	イヌ	静脈内	[redacted]（米国）	1529-002	4.2.3.2-6 （評価資料）
呼吸系に及ぼす影響	ラット	静脈内	[redacted]（米国）	1529-001	4.2.3.2-3 （評価資料）
	イヌ	静脈内	[redacted]（米国）	1529-002	4.2.3.2-6 （評価資料）
薬力学的薬物相互作用試験：該当試験なし					

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

2.6.3.2.1 血管内皮細胞に対する影響

モジュール 2.6.2 薬理試験の概要文を参照。

2.6.3.2.2 凝固・線溶系に対する影響

モジュール 2.6.2 薬理試験の概要文を参照。

2.6.3.2.3 骨髄移植モデルマウスに対する影響

2.6.3.2.3.1 骨髄移植モデルマウスの生存に対する作用

被験物質：defibrotide

試験項目	試験系 投与経路	投与量 (mg/kg)	試験成績 [a]			試験番号 (CTD 記載箇所)
			動物番号	媒体 [b]	デフィブロチドナトリウム	
生存に対する作用	骨髄移植マウス (BALB/c 系、 雌性) 腹腔内	400	1	5	5	PH-073-002 (4.2.1.1-7、 評価資料)
			2	6	4	
			3	4	6	
			4	5	6	
			5	4	15	
			6	7	15	
			7	5	7	
			8	5	5	
			9	5	7	
			10	5	6	
			11	6	5	
			12	5	4	
			13	5	15	
			14	5	6	
			15	6	5	
			16	5	6	
			17	5	6	
			18	6	15	
			19	6	6	
			20	7	6	

Day 0：移植日、Day 15：観察終了日、Day -1～14：1 日 2 回反復腹腔内投与

a：死亡確認日（移植後日数）を示す。移植前日の体重から 20%以上減少したマウスは当該日に安楽死させた。また、観察終了日まで生存していた動物は 15 日とした。

b：生理食塩液

2.6.3.3 副次的薬理試験

該当試験なし。

2.6.3.4 安全性薬理試験

2.6.3.4.1 中枢神経系に及ぼす影響

（1/2）

被験物質：defibrotide

試験項目	動物種/系統	投与方法	投与量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP適用	試験番号（CTD 記載箇所）
一般症状（FOB 法）	ラット/Crl:CD(SD)	持続静脈内、9 週間	0, 240, 1200, 4800 mg/kg/日	雌雄　各 10[a]	一般症状観察 対照群を含む全ての投与群で活動性低下、軟便、四肢の機能障害、皮膚の変色、粗毛が認められた。 ≧240 mg/kg/日（雄）及び≧1200 mg/kg/日（雌） 円背位 活動/覚醒測定 1200 mg/kg/日（雌）： 立ち上がり回数及び覚醒度低下（投与終了時） 神経筋測定 1200 及び 4800 mg/kg/日（雌雄）： 平均後肢握力及び/又は後肢開脚幅の低下（投与 2 日目） 体重測定 1200 mg/kg/日（雄）及び 4800 mg/kg/日（雌）： 平均体重の減少（投与終了時）	適	1529-001（4.2.3.2-3、評価資料）

a：一般症状悪化に伴って死亡動物が多数認められたので 9 週間で試験を終了しており、評価時点での生存動物に対して評価を実施した。

（2/2）

試験項目	動物種/系統	投与方法	投与量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP適用	試験番号（CTD 記載箇所）
正常体温	ラット/SD	腹腔内	0, 50, 100 mg/kg	雄　10	なし	不適	10202b（4.2.1.3-1、参考資料）
ペントバルビタール誘発睡眠	ラット/SD	静脈内	0, 25, 50, 100, 200 mg/kg	雄　15	なし	不適	
ペンテトラゾール誘発けいれん	ラット/SD	腹腔内	0, 50, 100 mg/kg	雄　15	なし	不適	

2.6.3.4.2　心血管系に及ぼす影響

被験物質：defibrotide

試験項目	動物種/系統	投与方法	投与量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP適用	試験番号（CTD 記載箇所）
hERG 電流	hERG チャネル安定発現 HEK293 細胞	*in vitro*	0, 50, 150, 500 µg/mL	3 例	なし	不適	0040-2010（4.2.1.3-2、参考資料）
心電図	イヌ/Beagle	2 時間かけて静脈内、1 日 4 回、13 週間	0, 60, 300, 1600 mg/kg/日	雌雄　各 4	なし	適	1529-002（4.2.3.2-6、評価資料）

2.6.3.4.3　呼吸系に及ぼす影響

被験物質：defibrotide

試験項目	動物種/系統	投与方法	投与量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP適用	試験番号（CTD 記載箇所）
呼吸系	ラット/Crl:CD(SD)	持続静脈内、9 週間	0, 240, 1200, 4800 mg/kg/日	雌雄　各 15	240 及び 1200 mg/kg/日（雄）：浅速呼吸 240 mg/kg/日（雄）及び 4800 mg/kg/日（雌）：呼吸困難	適	1529-001（4.2.3.2-3、評価資料）
	イヌ/Beagle	2 時間かけて静脈内、1 日 4 回、13 週間	0, 60, 300, 1600 mg/kg/日	雌雄　各 4	なし	適	1529-002（4.2.3.2-6、評価資料）

2.6.3.5　薬力学的薬物相互作用試験

該当試験なし。

2.6.3.6　参考文献

なし。