エナロデュスタット

第 2 部 CTD の概要（サマリー）
2.4 非臨床試験の概括評価

日本たばこ産業株式会社

目次

略号及び用語の定義一覧 5

2.4 非臨床試験の概括評価 9

2.4.1 非臨床試験計画概要 9
2.4.1.1 背景 9
2.4.1.2 薬理試験 11
2.4.1.3 薬物動態試験 11
2.4.1.4 毒性試験 11
2.4.2 薬理試験 13
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 13
2.4.2.1.1 *In vitro* 作用 13
2.4.2.1.2 *In vivo* 作用 14
2.4.2.2 副次的薬理試験 15
2.4.2.2.1 各種受容体及び酵素に対する作用 15
2.4.2.3 安全性薬理試験 15
2.4.2.3.1 中枢神経系 15
2.4.2.3.2 心血管系 15
2.4.2.3.3 呼吸系 15
2.4.2.3.4 その他の安全性薬理試験 15
2.4.2.4 代謝物，光学異性体及び不純物の薬理作用 16
2.4.2.4.1 代謝物の *in vitro* 作用 16
2.4.2.5 薬力学的薬物相互作用 16
2.4.3 薬物動態試験 17
2.4.3.1 分析方法 17
2.4.3.2 吸収 17
2.4.3.3 分布 18
2.4.3.4 代謝 18
2.4.3.5 排泄 21
2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用 21
2.4.3.7 その他の薬物動態試験 21
2.4.4 毒性試験 22
2.4.4.1 単回投与毒性試験 22
2.4.4.2 反復投与毒性試験 24
2.4.4.2.1 マウス 25
2.4.4.2.2 ラット 26
2.4.4.2.3 イヌ 28
2.4.4.2.4 サル 30

2.4.4.2.5 反復経口投与毒性試験における全身曝露 32
2.4.4.3 遺伝毒性試験 33
2.4.4.4 がん原性試験 34
2.4.4.4.1 用量設定試験 34
2.4.4.4.2 がん原性試験 35
2.4.4.5 生殖発生毒性試験 36
2.4.4.5.1 受胎能並びに出生前及び出生後の発生と母体の機能に関する影響について 36
2.4.4.5.2 胚・胎児発生への影響 37
2.4.4.5.3 出生後の発生及び母体の機能に及ぼす影響 38
2.4.4.5.4 幼若動物を用いた試験 39
2.4.4.5.5 NOAEL における全身曝露と曝露量比 39
2.4.4.6 局所刺激性試験 40
2.4.4.7 その他の毒性試験 40
2.4.4.7.1 抗原性試験 40
2.4.4.7.2 光毒性試験 40
2.4.4.7.3 免疫毒性試験 40
2.4.4.7.4 その他の毒性試験 41
2.4.4.8 代謝物に関する試験 46
2.4.4.8.1 代謝物(R)-M2 に関する検討 46
2.4.4.9 不純物に関する試験 47
2.4.5 総括及び結論 48
2.4.5.1 薬理作用 48
2.4.5.2 薬物動態試験 48
2.4.5.3 安全性 49
2.4.5.4 まとめ 52
2.4.6 参考文献 53

表目次

表 1　マウス単回経口投与試験における JTZ-951 全身曝露 23
表 2　ラット単回経口投与試験における JTZ-951 全身曝露 24
表 3　イヌ単回経口投与試験における JTZ-951 全身曝露 24
表 4　主な反復経口投与毒性試験の NOAEL と臨床試験における JTZ-951 の曝露量比 33
表 5　がん原性試験の NOAEL と臨床試験における JTZ-951 の曝露量比 36
表 6　生殖発生毒性試験の NOAEL における JTZ-951 の全身曝露と曝露量比 40

図目次

図 1　HIF-PH 阻害剤 JTZ-951 の作用機序 [文献 3 を参考に作成] 9
図 2　^{14}C-JTZ-951 の構造及び標識位置 17
図 3　JTZ-951 の推定代謝経路 20

略号及び用語の定義一覧

略号及び用語	定義
^{14}C-JTZ-951	[carbonyl-^{14}C]JTZ-951，^{14}C で標識した JTZ-951
ALB	Albumin，アルブミン
ALT	Alanine aminotransferase，アラニンアミノトランスフェラーゼ
APTT	Activated partial thromboplastin time，活性化部分トロンボプラスチン時間
AST	Aspartate aminotransferase，アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
ATP	Adenosine triphosphate，アデノシン三リン酸
AUC	Area under the concentration-time curve，濃度－時間曲線下面積
AUC_{0-t}	Area under the concentration-time curve from the time of dosing until the any time, t，投与開始時から投与後 t 時間までの濃度－時間曲線下面積
AUC_{inf}	Area under the concentration-time curve from the time of dosing to infinity，投与開始時から投与後無限大時間までの濃度－時間曲線下面積
BA	Bioavailability，バイオアベイラビリティ
BCRP	Breast cancer resistance protein，乳癌耐性蛋白
Bil	Bilirubin，ビリルビン
BUN	Blood urea nitrogen，尿素窒素
Ca	Calcium，カルシウム
Caco-2 細胞	Human colonic adenocarcinoma cells，ヒト結腸腺癌由来細胞
CHL 細胞	Chinese hamster lung 細胞，チャイニーズハムスター肺細胞
CKD	Chronic kidney disease，慢性腎臓病
C_{max}	Maximum concentration，最高濃度
CM	Chylomicron，カイロミクロン
CPK	Creatine phosphokinase，クレアチンフォスフォキナーゼ
CRP	C-reactive protein，C 反応性タンパク
C_t	Drug concentration at any time t (t = 24, 48, or 72 hr)，投与後 t 時間の濃度
CTA	Cellulose triacetate，セルローストリアセテート
CYP	Cytochrome P450，チトクローム P450
DMSO	Dimethyl sulfoxide，ジメチルスルホキシド
DNA	Deoxyribonucleic acid，デオキシリボ核酸
EC_{50}	Half maximal (50%) effective concentration，50%効果濃度
EPO	Erythropoietin，エリスロポエチン
ESA	Erythropoiesis stimulating agent，赤血球造血刺激因子製剤
ET-1	Endothelin-1，エンドセリン－1
FIB	Fibrinogen，フィブリノゲン
Fe	Iron，鉄
GD	Gestational day，妊娠日
GLDH	Glutamate dehydrogenase，グルタミン酸脱水素酵素
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
GLU	Glucose，グルコース

略号及び用語	定義
GLUT-1	Glucose transpoter-1，グルコーストランスポーター1
GU	Guanase，グアナーゼ
Hb	Hemoglobin，ヘモグロビン
HD	Hemodialysis，血液透析
HEK293 細胞	Human embryonic kidney cells 293，ヒト胎児腎細胞 293
hERG	Human ether-a-go-go related gene，ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
HIF	Hypoxia inducible factor，低酸素誘導因子
HIF-PH	Hypoxia inducible factor-prolyl hydroxylase，低酸素誘導因子プロリン水酸化酵素（ドメイン含有タンパク）
HRE	Hypoxia response element，低酸素応答性領域
hOAT1	Human organic anion transporter 1，ヒト有機アニオントランスポーター1
hOAT3	Human organic anion transporter 3，ヒト有機アニオントランスポーター3
hOCT2	Human organic cation transporter 2，ヒト有機カチオントランスポーター2
hr	Hour(s)，時間
Ht	Hematocrit，ヘマトクリット
IC_{50}	Half maximal (50%) inhibitory concentration，50%阻害濃度
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use，医薬品規制調和国際会議
IP	Inorganic phosphorus，無機リン
Ki	Inhibition constant，阻害定数
Kim-1	Kidney injury molecule 1，腎障害分子 1
K_m	Michaelis constant，ミカエリス定数
LC/MS/MS	Liquid chromatography/tandem mass spectrometry，液体クロマトグラフィー／タンデムマススペクトロメトリー
LDH	Lactate dehydrogenase，乳酸脱水素酵素
LPL	Lipoprotein lipase，リポタンパク質リパーゼ
M/E 比	Myelocytic cell count / Erythroblastic cell count 比，顆粒球系細胞/赤芽球系細胞比率
M1～M6	Metabolite of JTZ-951，JTZ-951 の代謝物
MATE1	Multidrug and toxin extrusion 1，プロトン／有機カチオン逆輸送担体 1
MATE2-K	Multidrug and toxin extrusion 2-K，プロトン／有機カチオン逆輸送担体 2-K
MCH	Mean corpuscular hemoglobin，平均赤血球色素量
MCHC	Mean corpuscular hemoglobin concentration，平均赤血球血色素濃度
MCV	Mean corpuscular volume，平均赤血球容積
MDR1	Multidrug resistance protein 1，多剤耐性蛋白質 1（P-gp：P-glycoprotein，P 糖蛋白質）
MPV	Mean platelet volumes，平均血小板容積
mRNA	Messenger ribonucleic acid，伝令リボ核酸
ND	Not detected，検出限界未満
NOAEL	No observed adverse effect level，無毒性量

略号及び用語	定義
OATP1B1	Organic anion transporting polypeptide 1B1，有機アニオン輸送ポリペプチド 1B1
OATP1B3	Organic anion transporting polypeptide 1B3，有機アニオン輸送ポリペプチド 1B3
OECD	Organization for economic co-operation and development，経済協力開発機構
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor 1，プラスミノゲンアクチベータインヒビター 1
PD	Peritoneal dialysis，腹膜透析
PIC	α2 plasmin inhibitor- plasmin complex，プラスミン α2 プラスミンインヒビター複合体
PES	Polyethersulfone，ポリエーテルスルホン
PK	Pharmacokinetics，薬物動態
PL	Phospholipids，リン脂質
PLT	Platelet，血小板
PO	Oral administration，経口投与
PS	Polysulfone，ポリスルホン
PT	Prothrombin time，プロトロンビン時間
QOL	Quality of life，クオリティ・オブ・ライフ（生命や生活の質）
Radio-HPLC	High-performance liquid chromatography equipped with a radio-detector，ラジオ検出器付きの高速液体クロマトグラフィー
RBC	Red blood cell，赤血球
RDW	Red blood cell distribution width，赤血球粒度分布幅
Ret	Reticulocyte，網状赤血球
rHuEPO	Recombinant human erythropoietin，ヒトエリスロポエチン製剤
S_2 細胞	Mouse second portion of proximal tubule cells，マウス近位尿細管 S_2 領域由来細胞
SDH	Sorbitol dehydrogenase，ソルビトール脱水素酵素
TAT	Thrombin-antithrombin complex，トロンビンーアンチトロンビン複合体
T-CH	Total cholesterol，総コレステロール
TGL	Triglyceride，トリグリセリド
TgrasH2 マウス	CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic (+/- hemizygous c-Ha-ras)マウス
TP	Total protein，総蛋白
TK	Toxicokinetics，トキシコキネティクス
t_{max}	Time to reach peak or maximum concentration following drug administration，最高濃度到達時間
TSAT	Transferrin saturation，トランスフェリン飽和度
URO	Urobilinogen，ウロビリノーゲン
VEGF	Vascular endothelial growth factor，血管内皮細胞増殖因子
VHL	von Hippel-Lindau，フォン・ヒッペル・リンドウ
VLDL	Very low-density lipoprotein，超低密度リポタンパク質

略号及び用語	定義
WBC	White blood cell, 白血球

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概要

2.4.1.1 背景

JTZ-951（化学名：*N*-[7-Hydroxy-5-(2-phenylethyl)[1,2,4]triazolo[1,5-α]pyridine-8-carbonyl]glycine）は，日本たばこ産業株式会社医薬総合研究所において，ヒト HIF-PH に対する阻害活性を指標に見出された経口投与可能な新規の HIF-PH 阻害剤である。

HIF は細胞への酸素供給が不足状態に陥った際に細胞質中に誘導される転写因子である。HIF-α には HIF-1α，HIF-2α，HIF-3α のアイソフォームがあり，いずれも細胞質から核内へ移行した後，HIF-β と二量体を形成し，DNA 上の低酸素応答性領域と呼ばれる配列部位に結合することで種々の遺伝子の発現を制御し，細胞から組織，個体にいたるすべてのレベルの低酸素応答を制御している（図 1）。HIF で発現を制御されるタンパク質として，造血因子である EPO，鉄代謝に関連するヘプシジン等のタンパク質，血管新生促進因子である VEGF などが知られている[1, 2, 3]。

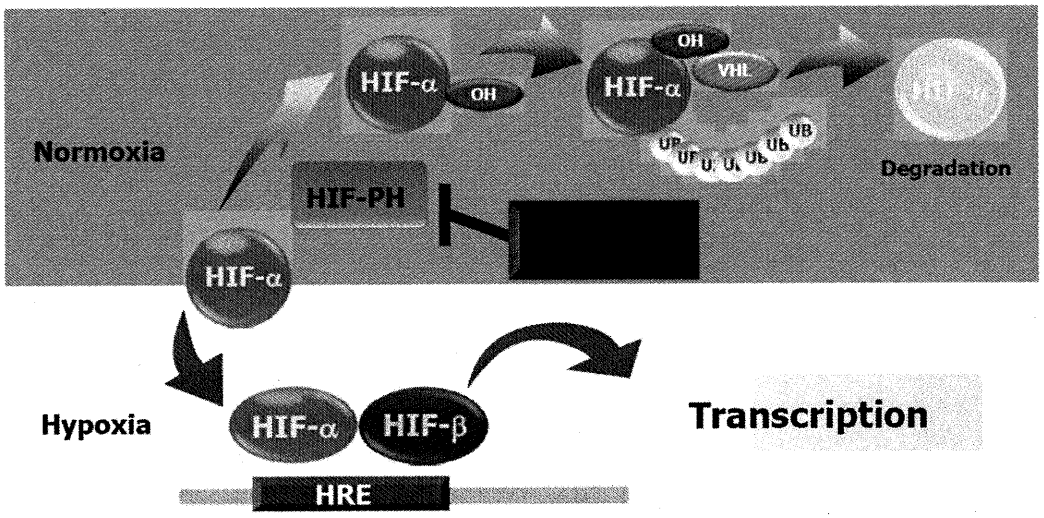


図 1　HIF-PH 阻害剤 JTZ-951 の作用機序 [文献 3 を参考に作成]

組織中の酸素が十分な状態では，HIF-PH によって HIF-α のプロリン残基がヒドロキシル化を受け，次いでユビキチン化酵素の VHL protein でユビキチン化された後にプロテアソームで分解される。HIF-PH の活性は細胞内の酸素濃度に依存しており，低酸素状態では HIF-PH による HIF-α のヒドロキシル化が抑制され，その結果 HIF-α が安定化し，低酸素応答が誘導される[1]。HIF-PH には HIF-PH1，HIF-PH2 及び HIF-PH3 の 3 種のアイソフォームが知られており，いずれも全身に広く分布している[1]。HIF-PH をノックアウトしたマウスは肝臓及び腎臓の HIF-α 発現亢進に伴い，EPO 産生も亢進しており，Hb 濃度が高値を示すことが報告されている[4]。また，一部の家族性多血症患者では HIF-α の HIF-PH 認識部位に変異があり，代謝を受けにくいことが報告されている[5]。ラットでは，出生時は肝臓が主要な EPO 産生臓器であるが，成長とともに腎臓が主要な EPO 産生臓器となり，肝臓の寄与は低くなる。しかし，低酸素や貧血の程度に応じて，成体でも肝臓

からのEPO産生が亢進することが知られている[6]。また，HIF-αは赤血球合成に欠かせない成分である鉄の利用に関与する遺伝子発現を制御することが知られている。VHL欠損によるHIF-α安定化マウスでは，肝臓でのヘプシジンのmRNA発現抑制や肝臓中から血清中へ鉄の放出を担うフェロポーチンmRNAの発現増加が認められている[2]。

腎性貧血は，腎臓でHb濃度の低下に見合った十分量のEPOが産生されないことによってひき起こされる貧血であり，貧血の主因が腎障害以外に求められないものと定義される[7]。腎機能障害に伴い，酸素濃度低下に応じたEPOが腎臓で産生されないことがその主たる要因と考えられている[8]。その他の要因としては，血中ヘプシジン上昇を介した鉄利用能の低下や腎機能低下に伴う尿毒症などによる赤血球寿命の短縮，食事制限に伴う鉄やビタミン不足による赤血球産生障害，血液透析患者における血液透析時の回路内残血等さまざまな因子の関与が示唆されている[7]。腎性貧血による赤血球数の減少に伴う酸素供給不足は，臓器でのエネルギー産生を低下させ，日常生活における運動能や活動性の低下を招き，QOLの低下を来たす。さらに，大規模な観察研究から，貧血はCKDの進展や心不全の独立した危険因子であると知られている[9]。

透析導入前の保存期CKD患者では，CKDステージG3付近から貧血の有病率が増加し，CKDステージG4，G5とステージが進行するにつれて急激に有病率が増加する[10]。本邦で慢性透析療法を受けている患者は年々増加しており，2017年末には33万人に達し，人口100万人あたりの透析患者数は約2640人と，人口対透析患者数の比率も年々増加している[11]。したがって，CKD患者数の増加に伴い，今後も腎性貧血の患者数は増加すると考えられる。

腎性貧血の主な治療には，ESA（rHuEPOや持続型ESA）が用いられている。ESAによる治療を受けている患者の割合もCKDステージの進行に伴い増加し[12]，血液透析及び腹膜透析患者では，その大部分がESAによる治療を受けている[13]。これらのESAは静脈内投与あるいは皮下投与することで，腎機能障害によりEPOが不足状態にある腎性貧血患者の赤血球産生を増加させる。いくつかの観察研究では，Hb濃度と死亡率の負の相関関係及びHb濃度とQOLの正の相関関係が示されており[14-17]，Hb濃度を上昇させることでQOLが改善することが報告されている[18-21]。したがって，既存のESAによる腎性貧血の治療介入は医療上の意義が高い。一方，無作為化比較試験を含む臨床試験において，高いHb濃度を目指した外因性EPOによるESA治療は，死亡率と心血管イベント発生等のリスクを増大させる可能性が指摘されている[22-24]。また，CHOIR試験の二次解析の結果から，ESAの高用量使用が予後悪化に関連する因子と報告されている[25,26]。その他に，鉄利用障害があると考えられるCKD患者では，体内には十分量の鉄が貯蔵されているにも関わらず，ESA治療による赤血球造血亢進状態の際にHb合成に利用可能な十分量の鉄の供給が追い付かず，十分な治療効果を発揮できないこともある。加えて，既存のESAは外因性EPOを注射剤で投与するため，抗EPO抗体産生を伴う赤芽球癆の副作用やESA（注射剤）特有の諸問題（注射時疼痛，薬剤管理の煩雑さ［冷所保存，医療廃棄物，複数の規格が必要であること等］，感染リスク等）[7, 27-29]が存在する。

以上，経口投与可能な新規のHIF-PH阻害剤であるJTZ-951は，腎臓や肝臓のHIF-αを安定化し，低酸素に対する生理応答を利用した内因性のEPO産生の誘導と鉄利用能の亢進により，腎性貧血患者の赤血球産生能を是正して貧血状態を改善する，新しいタイプの腎性貧血治療薬になると考えられる。

2.4.1.2 薬理試験

薬効薬理試験では，JTZ-951 の HIF-PH に対する阻害作用を検討した。また，ヒト肝臓由来 Hep3B 細胞における HIF 発現及び EPO 産生に対する作用を検討した。ラットに JTZ-951 を単回経口投与した際の肝臓及び腎臓中 EPO mRNA 量並びに血漿中 EPO 濃度を検討した。また，腎性貧血モデルである 5/6 腎臓摘出ラットを用いて，JTZ-951 を反復経口投与した際の赤血球造血に対する作用を検討した。さらに，JTZ-951 の鉄パラメータ及び肝臓でのヘプシジン mRNA 量に対する作用について，正常ラットを用いて rHuEPO との比較検討を行った。副次的薬理試験として，23 種類の受容体及び 5 種類の酵素に対する作用を検討した。

安全性薬理試験では，コアバッテリーとして中枢神経系，心血管系及び呼吸系に及ぼす JTZ-951 の影響を検討した。いずれも GLP 適用試験として，ICH ガイドラインに準拠して実施した。なお，心血管系については，フォローアップ試験も実施した（GLP 非適用試験）。

代謝物の薬理試験では，JTZ-951 のヒトにおける主代謝物である(R)-M2 について，HIF-PH に対する阻害作用及び Hep3B 細胞における EPO 産生に対する作用を検討した。

2.4.1.3 薬物動態試験

ラット，イヌ及びサルを用いて JTZ-951 の吸収，分布，代謝，排泄及び薬物相互作用を検討した。

吸収については，用量比例性，食餌の影響，性差及び反復投与による影響を検討した。

分布については，^{14}C-JTZ-951 を用いて組織内濃度を評価した。加えて，ラットにおいては全身オートラジオグラフィーも実施した。また，*in vitro* で動物及びヒトの JTZ-951 の血漿蛋白結合及び血球移行並びに精製ヒト蛋白への結合性を評価した。

代謝については，^{14}C-JTZ-951 を投与したラット，イヌ及びサルの生体試料及び JTZ-951 を投与したヒト血漿及び尿試料を用いて代謝物の構造及び組成について検討した。併せて，動物及びヒトの肝ミクロソーム，肝細胞及び CYP 発現系酵素を用いて JTZ-951 の代謝経路を検討した。JTZ-951 の CYP 阻害作用について，ヒト肝ミクロソームを用いて検討した。また，JTZ-951 の CYP 誘導作用について，ヒト肝細胞を用いて検討した。

排泄については，^{14}C-JTZ-951 を動物（ラット，イヌ及びサル）に投与し，排泄経路について検討した。

薬物相互作用については，Caco-2 細胞及び各種ヒトトランスポーターを発現した HEK293 細胞及び S_2 細胞を用いて JTZ-951 が各種トランスポーターの基質であるか否か及び JTZ-951 の各種トランスポーターに対する阻害作用を検討した。

また，種々の透析膜による JTZ-951 の除去について評価した。

2.4.1.4 毒性試験

JTZ-951 の毒性を，マウス（3 ヵ月間），ラット（1, 3 及び 6 ヵ月間），イヌ（1 及び 3 ヵ月間），サル（3 及び 9 ヵ月間）の反復経口投与毒性試験により評価した。遺伝毒性については，*in vitro* 試験（細菌を用いる復帰突然変異試験及びほ乳類培養細胞［CHL 細胞及びヒト末梢血リンパ球］を用いる染色体異常試験）及び *in vivo* 試験（ラット骨髄細胞を用いる染色体異常試験及びラット

単細胞ゲル電気泳動試験［コメットアッセイ］）により評価した。がん原性については，TgrasH2マウスを用いた6ヵ月間反復経口投与試験及びラットを用いた2年間反復経口投与試験により評価した。生殖発生毒性については，ラットにおける雄性及び雌性生殖能への影響，ラット及びウサギにおける胚・胎児発生への影響並びにラットにおける出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に及ぼす影響を評価した。光毒性については，ほ乳類培養細胞（Balb/c 3T3 細胞）を用いて評価した。一般毒性試験，*in vivo* 遺伝毒性試験，生殖発生毒性試験及びがん原性試験においてはJTZ-951の全身曝露も評価した。以上の毒性試験は，いずれもGLP適用試験として，ICHガイドライン及びOECDガイドラインに準拠して実施した。

また，JTZ-951の高用量単回経口投与時の急性毒性については，ラット及びイヌを用いた単回経口投与試験（GLP非適用試験）において検討した。さらに，反復投与毒性試験において認められた種々の変化，及びCHL細胞を用いた *in vitro* 遺伝毒性試験において認められた染色体異常について，その発現機序又はバイオマーカーの探索のための補強試験をGLP非適用試験で実施した。また，JTZ-951のヒトにおける主代謝物(R)-M2の毒性を評価するために，JTZ-951又は(R)-M2を投与した一般毒性，遺伝毒性及び生殖毒性試験を実施し，(R)-M2の全身曝露も評価した。

2.4.2 薬理試験

効力を裏付ける試験として，2.4.2.1 項に記載した試験を実施した。副次的薬理試験として，2.4.2.2 項に記載した試験を実施した。安全性薬理試験として，2.4.2.3 項に記載した試験を実施した。代謝物の薬理試験として，2.4.2.4 項に記載した試験を実施した。

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

In vitro 試験では，JTZ-951 の HIF-PH に対する阻害作用を検討した。また，ヒト肝臓由来 Hep3B 細胞を用いて，JTZ-951 による HIF 発現及び EPO 産生に対する作用を検討した。

In vivo 試験では，正常ラットに JTZ-951 を単回経口投与した際の肝臓及び腎臓中 EPO mRNA 量を検討した。また，5/6 腎臓摘出ラットに JTZ-951 を単回経口投与した際の血漿中 EPO 濃度を検討した。さらに，5/6 腎臓摘出ラットに JTZ-951 を反復経口投与した際の Hb 濃度を評価することにより，腎性貧血モデルにおける赤血球造血に対する作用を検討した。また，JTZ-951 を反復経口投与した際の鉄パラメータに対する作用及び単回経口投与した際の肝臓中ヘプシジン mRNA 量に対する作用について，正常ラットを用いて rHuEPO との比較検討を行った。

2.4.2.1.1 *In vitro* 作用

2.4.2.1.1.1 HIF-PH に対する作用

（評価資料：CTD4.2.1.1-1）

ヒト HIF-PH に対する JTZ-951 の阻害作用及び阻害様式について検討した。酵素源として組換えヒト HIF-PH1，HIF-PH2 及び HIF-PH3 精製酵素を，基質として HIF ペプチド及び α-ケトグルタル酸を用いて，JTZ-951 存在下で酵素反応を行った。その結果，JTZ-951 のヒト HIF-PH1，HIF-PH2 及び HIF-PH3 に対する Ki 値は，それぞれ 0.016，0.061 及び 0.101 μmol/L であり，その阻害様式は α-ケトグルタル酸競合阻害型であった。

以上より，JTZ-951 は HIF-PH 阻害剤であることが確認された。

2.4.2.1.1.2 EPO 産生に対する作用

（評価資料：CTD4.2.1.1-2，4.2.1.1-3）

ヒト肝臓由来 Hep3B 細胞における HIF 発現に対する JTZ-951 の作用を検討した。Hep3B 細胞に JTZ-951 を添加し，HIF-1α，HIF-2α 及び HIF-1β の発現に対する作用を評価した。その結果，JTZ-951 は 10 μmol/L の濃度で，添加 1 時間後から HIF-1α 及び HIF-2α の発現量を増加させた。HIF-1β の発現量に変化は認められなかった。

Hep3B 細胞における EPO 産生に対する JTZ-951 の作用を検討した。Hep3B 細胞に JTZ-951（10 μmol/L）を添加し，EPO 産生の経時変化を評価した。また，Hep3B 細胞に JTZ-951（0.1～10 μmol/L）を添加し，添加 24 時間後における EPO 産生作用を評価した。その結果，JTZ-951 は 10 μmol/L の濃度で，添加 8 時間後から EPO 産生を亢進させた。また，添加 24 時間後において，JTZ-951 は添加濃度に応じた EPO 産生亢進作用を示し，その EC_{50} 値は 4.7 μmol/L であった。

以上より，Hep3B 細胞において，JTZ-951 は HIF を安定化させることにより，EPO 産生を亢進させることが示唆された。

2.4.2.1.2 *In vivo* 作用

2.4.2.1.2.1 EPO 産生に対する作用

（評価資料：CTD4.2.1.1-4，4.2.1.1-5）

肝臓及び腎臓中 EPO mRNA 量に対する JTZ-951 の作用を検討した。正常ラットに JTZ-951（0.3，1 及び 3 mg/kg）又は媒体を単回経口投与し，経時的に肝臓及び腎臓中 EPO mRNA 量を評価した。その結果，JTZ-951 は 1 mg/kg から用量に応じて肝臓及び腎臓中 EPO mRNA 量を増加させた。その際の EPO mRNA 量は，投与 4 時間後まで増加した後，投与 24 時間後までに媒体群と同程度まで減少した。

血漿中 EPO 濃度に対する JTZ-951 の作用を検討した。5/6 腎臓摘出ラットに JTZ-951（0.3，1 及び 3 mg/kg）又は媒体を単回経口投与し，経時的に血漿中の EPO 濃度を評価した。その結果，JTZ-951 は，3 mg/kg の用量で血漿中 EPO 濃度を有意に上昇させた。その際の血漿中 EPO 濃度は，投与 8 時間後まで上昇した後，投与 24 時間後までに媒体群と同程度まで低下した。

以上より，ラットにおいて，JTZ-951 は腎臓のみならず肝臓においても EPO 産生を一過性に亢進させることが示唆された。

2.4.2.1.2.2 赤血球造血に対する作用

（評価資料：CTD4.2.1.1-7）

腎性貧血モデルである 5/6 腎臓摘出ラットを用いて，赤血球造血に対する JTZ-951 の作用を検討した。5/6 腎臓摘出ラットに JTZ-951（0.3，1 及び 3 mg/kg）又は媒体を 1 日 1 回，42 日間反復経口投与し，赤血球パラメータとして Hb 濃度を経日的に測定した。その結果，JTZ-951 は 1 mg/kg から用量に応じて Hb 濃度を有意に上昇させた。

以上より，ラット腎性貧血モデルにおいて，JTZ-951 は 1 mg/kg の用量から赤血球造血亢進作用を示すことが確認された。

2.4.2.1.2.3 鉄利用に対する作用

（評価資料：CTD4.2.1.1-8，4.2.1.1-9）

鉄パラメータに対する JTZ-951 の作用を rHuEPO と比較検討した。正常ラットに JTZ-951（3 mg/kg，経口投与），rHuEPO（50 IU/kg，皮下投与）又は媒体を 1 日 1 回，42 日間反復投与し，Hb 濃度，TSAT 及び血清鉄濃度を経日的に評価した。その結果，JTZ-951 は，rHuEPO と同程度に Hb 濃度を上昇させた。この時，rHuEPO は鉄利用の指標として用いられる TSAT 及び血清鉄濃度を有意に低下させたが，JTZ-951 は低下させなかった。

JTZ-951 の単回投与による肝臓中ヘプシジン mRNA 量に対する作用を rHuEPO と比較検討した。正常ラットに JTZ-951（3 mg/kg，経口投与），rHuEPO（50 IU/kg，皮下投与）又は媒体を単回投与し，鉄利用を負に制御するヘプシジンの mRNA 量を評価した。その結果，JTZ-951 は肝臓中ヘプシジン mRNA 量を有意に減少させたが，rHuEPO は減少させなかった。

以上より，正常ラットにおいて，JTZ-951 は鉄利用能を低下させることなく赤血球造血亢進作用を示し，その要因として JTZ-951 のヘプシジン産生抑制作用の関与が示唆された。

2.4.2.2 副次的薬理試験

副次的薬理試験として，23 種類の受容体及び 5 種類の酵素に対する阻害作用を検討した。

2.4.2.2.1 各種受容体及び酵素に対する作用

（評価資料：CTD4.2.1.2-1）

JTZ-951 の非特異的作用を把握するため，23 種類の受容体及び 5 種類の酵素に対する作用を検討した。評価した受容体及び酵素に対する JTZ-951 の IC_{50} 値は，いずれも 10 μmol/L より大きかった。

2.4.2.3 安全性薬理試験

安全性薬理試験では，すべての *in vivo* 試験において単回経口投与により評価した。

2.4.2.3.1 中枢神経系

（評価資料：CTD4.2.1.3-1）

JTZ-951 の中枢神経系に対する作用を，ラットの一般症状及び行動観察（Irwin 変法）により評価した。JTZ-951 は，いずれの観察項目についても 3，10 及び 30 mg/kg の用量で影響を及ぼさなかった。以上より，JTZ-951 は中枢神経系に影響を及ぼさないと考えられた。

2.4.2.3.2 心血管系

（評価資料：CTD4.2.1.3-2，4.2.1.3-3，4.2.1.3-4）

JTZ-951 の心血管系に対する作用を *in vitro* 及び *in vivo* 試験で評価した。

hERG 電流に対して，JTZ-951 は 10，30 及び 100 μmol/L の濃度で影響を及ぼさなかった。

無麻酔イヌの血圧，心拍数及び心電図に対して，JTZ-951 は 1，3 及び 10 mg/kg の用量で影響を及ぼさなかった。

無麻酔ラットの血圧及び心拍数に対して，JTZ-951 は 3 及び 10 mg/kg の用量では影響を及ぼさなかった。一方，30 mg/kg の用量では一過性に収縮期血圧を低下させ，心拍数を増加させた。

以上より，JTZ-951 は hERG 電流及びイヌの心電図に対して影響を及ぼさなかった。したがって，JTZ-951 が心室再分極に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。一方，JTZ-951 はラットにおいて収縮期血圧を低下させ，心拍数を増加させた。しかしながら，これらの作用は一過性であった。

2.4.2.3.3 呼吸系

（評価資料：CTD4.2.1.3-3）

JTZ-951 の呼吸系に対する作用を無麻酔イヌの呼吸数及び換気量を指標に評価した。呼吸数，1 回換気量及び分時換気量に対して JTZ-951 は 1，3 及び 10 mg/kg の用量で影響を及ぼさなかった。以上より，JTZ-951 は呼吸系に影響を及ぼさないと考えられた。

2.4.2.3.4 その他の安全性薬理試験

実施せず。

2.4.2.4 代謝物，光学異性体及び不純物の薬理作用

JTZ-951 のヒトにおける主代謝物である(R)-M2 について，ヒト HIF-PH に対する阻害作用及びヒト肝臓由来 Hep3B 細胞における EPO 産生に対する作用を検討した。

2.4.2.4.1 代謝物の *in vitro* 作用

2.4.2.4.1.1 HIF-PH に対する作用

（参考資料：CTD4.2.1.3-5）

ヒト HIF-PH に対する(R)-M2 の阻害作用を検討した。酵素源として組換えヒト HIF-PH1，HIF-PH2 及び HIF-PH3 精製酵素を，基質として HIF ペプチド及び α-ケトグルタル酸を用いて，(R)-M2 存在下で酵素反応を行った。その結果，(R)-M2 のヒト HIF-PH1，HIF-PH2 及び HIF-PH3 に対する IC_{50} 値は，それぞれ 0.027，0.142 及び 0.350 μmol/L であり，JTZ-951 とほぼ同等であった。

2.4.2.4.1.2 EPO 産生に対する作用

（参考資料：CTD4.2.1.3-6）

ヒト肝臓由来 Hep3B 細胞における EPO 産生に対する(R)-M2 の作用を検討した。Hep3B 細胞に(R)-M2 を添加し，24 時間後における EPO 産生作用を評価した。その結果，(R)-M2 は添加濃度に応じた EPO 産生亢進作用を示した（EC_{50} 値：>100 μmol/L）が，その作用は JTZ-951 と比較して弱いことが確認された。

2.4.2.5 薬力学的薬物相互作用

実施せず。

2.4.3 薬物動態試験

分析方法，，吸収，分布，代謝，排泄，薬物動態学的薬物相互作用及びその他の薬物動態試験を 2.4.3.1 項～2.4.3.7 項のとおり実施した。

2.4.3.1 分析方法

（参考資料：CTD4.2.2.1-1, 4.2.2.1-2, 4.2.2.1-3, 4.2.2.1-4, 4.2.2.1-5）

（評価資料：CTD4.2.2.1-6, 4.2.2.1-7, 4.2.2.1-8, 4.2.2.1-9, 4.2.2.1-10, 4.2.2.1-11, 4.2.2.1-12, 4.2.2.1-13, 4.2.2.1-14）

^{14}C-JTZ-951 の標識位置と比放射能及び放射化学的純度を図 2 に示した。放射能の測定には液体シンチレーションカウンターを用いた。

マウス，ラット，ウサギ，イヌ及びサル血漿サンプル中の JTZ-951 の測定は，バリデートされた LC/MS/MS 法を用いた。定量法バリデーション試験において，すべてのバリデーション項目は許容基準を満たした。LC/MS/MS 法を用いたマウス，ラット，ウサギ，イヌ及びサル血漿サンプルにおける JTZ-951 の定量範囲は 0.01～10 μg/mL 又は 0.02～10 μg/mL（マウス TK 試験），5～2500 ng/mL（ラット及びイヌ PK 試験），0.01～50 μg/mL（ラット，ウサギ及びイヌ TK 試験）又は 0.02～100 μg/mL（サル PK 及びサル TK 試験）であり，JTZ-951 は凍結保存条件下で，ウサギ血漿サンプル中において少なくとも 2 ヵ月間，ラット及びイヌ血漿サンプル中において少なくとも 3 ヵ月間，マウス及びサル血漿サンプル中において少なくとも 4 ヵ月間安定であることを確認した。

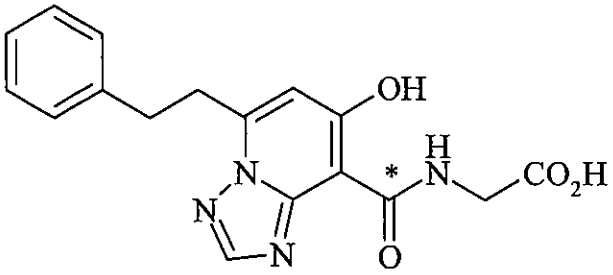


図 2 ^{14}C-JTZ-951 の構造及び標識位置

*：^{14}C-標識位置
比活性：6.46 又は 6.73 MBq/mg
放射化学的純度：95.9%，98.1%又は 98.2%（Radio-HPLC）

2.4.3.2 吸収

（評価資料：CTD4.2.2.2-1, 4.2.2.2-2, 4.2.2.2-3, 4.2.2.2-4, 4.2.2.2-5, 4.2.2.2-6, 4.2.2.2-7, 4.2.2.2-9）

JTZ-951 を 1 mg/kg の用量でラット，イヌ及びサルに経口投与すると，速やかに吸収され，投与後 0.33～0.8 時間で C_{max}（ラット；2.69 μg/mL，イヌ；0.797 μg/mL，サル；1.480 μg/mL）に達した後，ラットは 1.4 時間，イヌは 1.7 時間，サルは 1.8 時間の半減期で速やかに消失した。BA はそれぞれラットで 74.5%，イヌで 39.4%，サルで 41.7%であった。

JTZ-951 を非絶食ラット及び絶食したイヌに 0.3, 1 及び 3 mg/kg の用量で経口投与した時の C_{max}

及び $AUC_{0\text{-}8}$, 並びに絶食したサルに 1, 3 及び 30 mg/kg の用量で経口投与した時の C_{max} 及び AUC_{inf} は，イヌではほぼ用量比に応じて増加し，ラット及びサルでは用量比以上の増加を示した。

ラット，イヌともに非絶食又は食後に経口投与すると C_{max} 及び AUC_{inf} が低下し，食餌の影響が認められた。

雌雄のマウス及びラットは反復投与により JTZ-951 の全身曝露が上昇し反復投与による影響が認められたが，イヌ及びサルにおいては反復投与の影響は認められなかった。

2.4.3.3 分布

（評価資料：CTD4.2.2.3-1, 4.2.2.3-2, 4.2.2.3-3, 4.2.2.3-4, 4.2.2.3-5, 4.2.2.3-6, 4.2.2.3-7, 4.2.2.3-8, 4.2.2.3-9, 4.2.2.3-10）

^{14}C-JTZ-951 を 1 mg/kg の用量で経口投与したラットにおける組織内濃度及び全身オートラジオグラフィーの結果から，放射能は速やかに全身に分布することが示された。投与後 1 時間には消化管以外のすべての組織が最高濃度を示し，血漿より高い放射能濃度を示した組織は腎臓及び肝臓のみであった。各組織に分布した放射能は経時的に減少し，投与後 168 時間では排泄経路である肝臓及び腎臓のほかに，副腎，精巣，精巣上体，精嚢及び皮膚等の組織に放射能が検出されたが，投与後 1 時間の濃度と比較すると，いずれの組織においても 5%以下に低下しており，残留性は低いと考えられた。^{14}C-JTZ-951 を 1 mg/kg の用量で経口投与したイヌの投与後 168 時間では，肝臓，腎臓，副腎，精巣及び皮膚等の組織に，サルの投与後 168 時間では，肝臓，腎臓，皮膚，精巣上体及び精嚢等に放射能が検出された。^{14}C-JTZ-951 を 1 mg/kg の用量で GD18 のラットに単回経口投与すると，放射能は胎盤を通過し胎児組織へも分布したが，胎児全身への放射能の分布率はすべての時点で総投与量の 0.03%以下であった。1～300 μg/mL の濃度範囲でラット，イヌ，サル及びヒトの蛋白結合率を評価したところ，1～10 μg/mL の濃度範囲はそれぞれ 98.3%～98.4%, 96.0%～96.7%, 99.0%及び 99.5%とほぼ一定であったが，100～300 μg/mL の濃度範囲ではそれぞれ 94.6%～97.6%，91.3%～94.0%，97.7%～98.6%及び 97.9%～99.1%といずれの動物種でも 100 μg/mL 以上の濃度において飽和傾向が認められた。1～10 μg/mL の濃度範囲におけるマウスの蛋白結合率は 91.1%～92.2%であり他の動物に比べ低い結合率を示した。また，JTZ-951 のヒト血漿蛋白結合における主成分はアルブミンであると考えられた。

ラット，イヌ，サル及びヒトにおける血球移行率は，いずれも 20%未満と低かった。

2.4.3.4 代謝

（評価資料：CTD4.2.2.4-1, 4.2.2.4-2, 4.2.2.4-3, 4.2.2.4-4, 4.2.2.4-5, 4.2.2.4-6, 4.2.2.4-7, 4.2.2.4-8, 4.2.2.4-9, 4.2.2.4-10, 4.2.2.4-11）

JTZ-951 は，フェニルエチル基のベンゼン環が水酸化され M1 へ，ベンジル位が水酸化され M2 へ，さらに M1 あるいは M2 が硫酸抱合されて M3 へと代謝された。また，JTZ-951 は，グルコース抱合を受け M4 へ，グルクロン酸抱合を受け M5 へと代謝された。サルでは N-カルボニルグリシン部以外が酸化された M6 にも代謝された（図 3）。

JTZ-951 は代謝されにくく，ラット，イヌ及びサルにおける血漿，尿，糞及びラット胆汁中の主成分は JTZ-951 であった。維持血液透析患者に JTZ-951 を 10 mg/man の用量で 15 日間反復経口投

与した時の血漿中の主成分はJTZ-951で，代謝物としてM2のみ認められた。M2は鏡像異性体の混合物であり，血漿中の異性体比を確認したところ主成分は(R)-M2であった。

肝ミクロソーム及び肝細胞中でもJTZ-951は代謝されにくく，ヒト及びラットでわずかにM1及びM2が生成し，ヒトではM3も検出された。また，サル肝ミクロソームではM2及びM6が，サル肝細胞ではM3，M4，M5及びM6がわずかに生成した。

CYP発現系酵素及び特異的CYP阻害剤を用いた試験の結果から，JTZ-951の酸化的代謝には，主にCYP2C8及び2C9が寄与し，CYP3A4も関与すると考えられた。

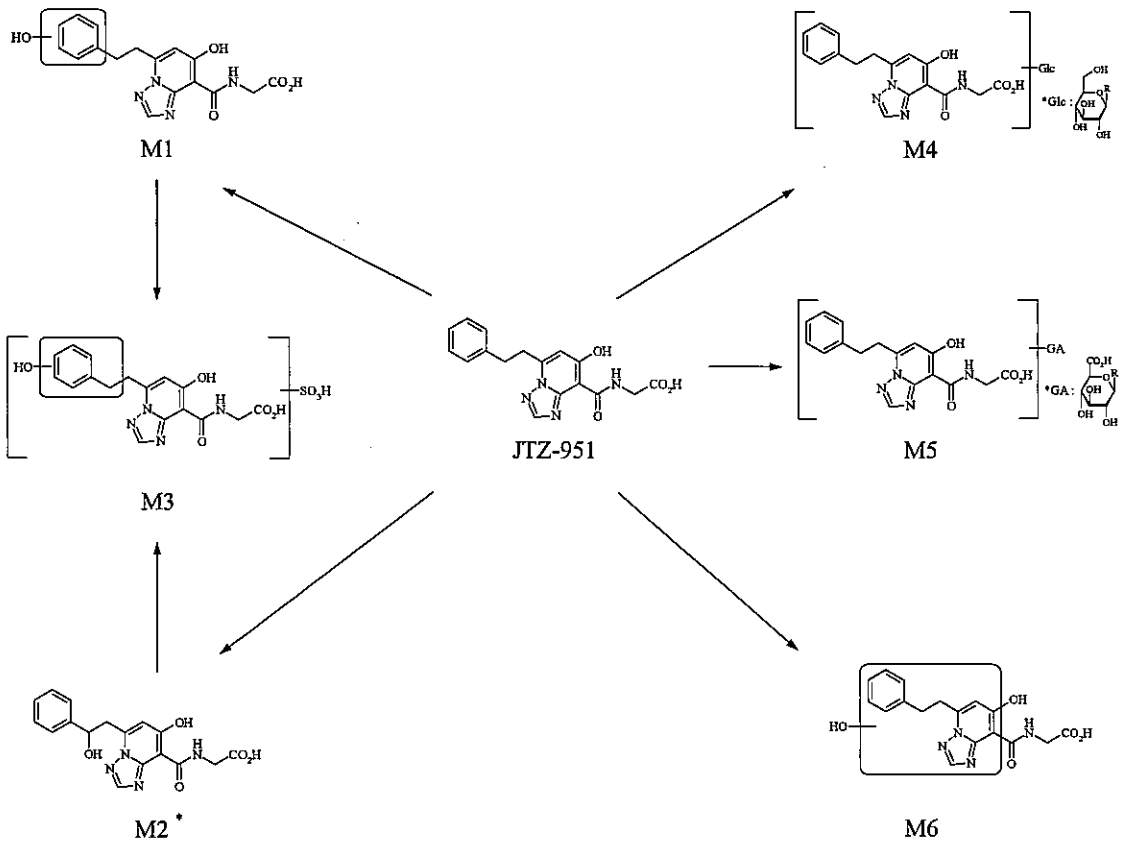


図 3 JTZ-951 の推定代謝経路

*：M2 は(R)-M2 と(S)-M2 の混合物

ヒト肝ミクロソームを用いた CYP 阻害試験において，JTZ-951 は CYP1A2，2A6，2C19，2D6 及び 3A4/5 の活性を阻害しなかった。JTZ-951 を 100 μmol/L 添加することで，CYP2B6，2C8 及び 2C9 の活性は若干阻害され，それぞれの活性残存率は 75.3%，54.4%及び 83.4%であった。また，JTZ-951 は，いずれの分子種においても時間依存的阻害は認められなかった。

ヒト肝細胞を用いた CYP 誘導試験（72 時間培養）において，JTZ-951 の濃度に依存した CYP1A2 及び 3A4 の mRNA 発現量の低下が認められた。

2.4.3.5 排泄

（評価資料：CTD4.2.2.5-1, 4.2.2.5-2, 4.2.2.5-3, 4.2.2.5-4）

^{14}C-JTZ-951 を 1 mg/kg の用量で経口投与すると，投与後 168 時間までにラットでは投与放射能の 43.7%及び 50.0%が，イヌでは投与放射能の 8.5%及び 87.6%が，サルでは投与放射能の 23.3%及び 70.3%がそれぞれ尿及び糞中に排泄された。また，胆管瘻ラットに ^{14}C-JTZ-951 を経口投与すると，投与後 48 時間までに投与放射能の 70.0%，15.5%及び 10.7%がそれぞれ胆汁，尿及び糞中に排泄された。腸肝循環試験では投与放射能の 53.9%及び 10.5%がそれぞれ胆汁及び尿中に排泄され，少なくとも胆汁中に排泄された放射能の 64%は消化管から再吸収され，腸肝循環を受けながら主に糞中に排泄されると考えられた。

^{14}C-JTZ-951 を 1 mg/kg の用量で授乳期のラット（分娩後 10 日目）に投与すると，放射能は乳汁中へ移行した。授乳ラットにおける放射能の乳汁中濃度は，投与後 1 時間以降は血漿中濃度より高値を示し，その濃度は投与後の時間経過に従って低下した。

2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用

（評価資料：CTD4.2.2.6-1, 4.2.2.6-2）

JTZ-951 は MDR1 の基質ではなく，阻害作用も示さなかった。JTZ-951 は BCRP の基質であり，また阻害作用も示し，その IC_{50} は 43.2 μmol/L であった。JTZ-951 は腎臓の取込みトランスポーターである hOAT1 の基質であり K_m は 15.0 μmol/L であった。また阻害作用も示し，IC_{50} は 0.956 μmol/L であった。hOAT3 に対しては基質ではないが，阻害作用を示し，IC_{50} は 1.67 μmol/L であった。hOCT2，MATE1 及び MATE2-K については基質ではなく，阻害も示さなかった。ヒト肝臓の取込みトランスポーターである OATP1B1 に対しては基質ではないが，阻害作用を示し，IC_{50} は 30.0 μmol/L であった。一方，OATP1B3 に対しては基質ではなく，阻害も示さなかった。

2.4.3.7 その他の薬物動態試験

(1) *In vitro* 透析クリアランス

（評価資料：CTD4.2.2.7-1）

ヒト血漿と各種小型血液透析膜（PS，CTA 及び PES）を用いて，JTZ-951 の透析膜による除去について評価した。JTZ-951（最終濃度：0.1，1 及び 10 μg/mL）の透析除去率（透析 120 分間）を算出すると，PS は 3.02%～5.03%，CTA は 0.361%～1.92%，PES は 3.02%～5.12%であり，いずれの膜でもほとんど除去されないことが示された。

2.4.4 毒性試験

単回投与毒性試験，反復投与毒性試験，遺伝毒性試験，がん原性試験，生殖発生毒性試験及びその他の毒性試験を 2.4.4.1 項～2.4.4.9 項のとおり実施した。

2.4.4.1 単回投与毒性試験

JTZ-951 の高用量単回投与時の急性毒性については，ラット及びイヌを用いた単回経口投与試験において検討した。また，がん原性試験の予備試験として TgrasH2 wild type マウスを用いた単回経口投与試験を実施した。これらの試験はいずれも GLP 非適用試験として実施した。

(1) マウス

（参考資料：CTD4.2.3.1-1）

雄性 TgrasH2 wild type マウスを用いた単回経口投与試験（用量：3，6，20 及び 60 mg/kg 又は 3，10，30 及び 60 mg/kg）では，いずれの用量においても一般状態，体重及び摂餌量に影響は認められず，明らかな毒性徴候は認められなかった。JTZ-951 の全身曝露（C_{max} 及び AUC）は最高用量まで用量依存的に上昇した（表 1）。いずれの用量においても JTZ-951 の全身曝露は投与後 0.5 時間に C_{max} に達し，その後速やかに消失した。また，10 mg/kg 以上で血中 EPO 濃度が，30 mg/kg 以上では血中 VEGF 濃度が用量依存的に増加した。

(2) ラット

（参考資料：CTD4.2.3.1-2，4.2.3.1-3，4.2.3.1-4）

雄性ラットを用いた単回経口投与試験（用量：125，250，500，1000 及び 2000 mg/kg）では，1000 mg/kg 以上の全例が死亡した。死亡例の剖検では，顕著な循環障害を示唆する変化が認められた。500 mg/kg 以上で，体重の減少を伴う摂餌量の減少，体温低下，自発運動の低下，糞便量減少及び呼吸促迫が認められ，250 mg/kg で体重及び摂餌量の軽度の減少が認められた。以上より，ラットにおける致死量は 1000 mg/kg であり，多血による重度の循環障害により死亡したと考えられた。

JTZ-951 を雄性ラットに 3，10，30，100 及び 300 mg/kg の用量で単回経口投与し，血漿中 JTZ-951 濃度及び EPO 濃度と摂餌量の関係を検討した。100 mg/kg 以上で投与後 2 日目から摂餌量及び体重の減少が認められた。摂餌量及び体重への影響は投与後 3 又は 4 日目以降消失した。30 mg/kg 以下では，摂餌量及び体重に対する影響は認められなかった。JTZ-951 の全身曝露（C_{max} 及び AUC）は 300 mg/kg まで用量依存的に上昇した（表 2）。いずれの用量においても血漿中 JTZ-951 濃度は投与後 0.5～0.9 時間に C_{max} に達し，その後速やかに消失した。また，血中 EPO 濃度は，300 mg/kg まで用量依存的に増加し，全用量で投与後 8 時間に最大に達し，その後，経時的に減少したが，300 mg/kg においては，投与後 24 時間までその濃度が維持された。摂餌の回復が認められた時点（100 mg/kg：投与後 3 日目，300 mg/kg：投与後 4 日目）において，EPO 濃度は低値であった。以上より，摂餌量の減少とそれに伴う体重増加量及び体重の減少は，血中 EPO 濃度が著しく高い値を維持している期間に発現し，血中 EPO 濃度の減少に伴って消失すると考えられた。

また，JTZ-951 を雄性ラットに非絶食下で 3，10，30 及び 100 mg/kg の用量で単回経口投与し，Ret 数及び赤血球関連パラメータ（RBC 数，Hb 濃度，Ht 値）に対する影響を検討した。単回投与

後 5 日目に 3 mg/kg から Ret 数の用量依存的な増加が認められた。投与後 5～10 日目にかけて 3 mg/kg から赤血球関連パラメータの増加が認められたが，明らかな用量依存性は認められなかった。

(3) イヌ

（参考資料：CTD4.2.3.1-5）

雄性イヌを用いた単回経口投与試験（用量：1，3，10 及び 30 mg/kg）では，30 mg/kg で投与日から投与後 6 日目まで摂餌量の顕著な減少が認められ，それに伴う体重減少，無便又は糞便量の減少が認められた。補液処置により全身状態は改善し，投与後 7 日目以降に摂餌量への影響は消失した。以上より，30 mg/kg は明らかな毒性徴候が発現する用量と判断した。10 mg/kg 以下では，摂餌量，体重及び一般状態に明らかな影響は認められなかった。

血中 EPO 濃度は 30 mg/kg まで用量依存的に増加し，いずれの用量においても投与後 8 時間に最高濃度に達した。30 mg/kg における血中 EPO 濃度は，投与後数日経過しても高い濃度で推移した。

JTZ-951 の全身曝露（C_{max} 及び AUC）は，30 mg/kg まで用量依存的に上昇した（表 3）。また，いずれの用量においても血漿中 JTZ-951 濃度は投与後 0.3～1.3 時間に C_{max} に達し，その後速やかに消失した。

摂餌量の減少とそれに伴う体重減少は，血中 EPO 濃度が著しく高い値を維持している期間に発現し，血中 EPO 濃度の減少に伴い消失したことから，高い血中 EPO 濃度に関連した変化であると考えられた。

1 mg/kg から 10 mg/kg で投与後 4～10 日目に，Ret 数，Ht 値及び MCV の増加，MCHC の減少が認められた。30 mg/kg では投与後 4～14 日目に Ret 数及び MCV が増加し，投与後 4 又は 7 日目をピークに RBC 数，Ht 値及び Hb 濃度が増加した。

(4) 単回投与試験における全身曝露

マウス，ラット及びイヌの単回経口投与試験における JTZ-951 の全身曝露を表 1，表 2 及び表 3 に示した。

表 1　マウス単回経口投与試験における JTZ-951 全身曝露

投与量 (mg/kg)	t_{max} (hr)	C_{max} (μg/mL)	AUC_{0-24} (μg·hr/mL)
3	0.5	1.033	3.339
6	0.5	4.002	8.922
20	0.5	16.120	45.984
60	0.5	102.345	223.460

表 2　ラット単回経口投与試験における JTZ-951 全身曝露

投与量 (mg/kg)	t_{max} (hr)	C_{max} (μg/mL)	C_{24} (μg/mL)	C_{48} (μg/mL)	C_{72} (μg/mL)	AUC_{0-24} (μg·hr/mL)	AUC_{0-72} (μg·hr/mL)
3	0.5	2.7	0.003	ND	ND	7.9	8.0
10	0.5	12.3	0.012	ND	ND	38.7	38.9
30	0.7	49.5	0.012	ND	ND	163.5	163.6
100	0.9	164.9	1.733	0.022	ND	668.4	689.8
300	0.6	238.0	24.665	2.156	0.037	1664.9	2013.1

表 3　イヌ単回経口投与試験における JTZ-951 全身曝露

投与量 (mg/kg)	t_{max} (hr)	C_{max} (μg/mL)	C_{24} (μg/mL)	C_{48} (μg/mL)	C_{72} (μg/mL)	AUC_{0-24} (μg·hr/mL)	AUC_{0-72} (μg·hr/mL)
1	0.3	1.2	0.007	ND	ND	3.3	3.4
3	0.6	4.4	0.019	ND	ND	11.5	11.7
10	0.7	15.5	0.162	0.055	0.037	33.6	37.4
30	1.3	70.7	0.983	0.634	0.344	287.0	318.0

2.4.4.2 反復投与毒性試験

JTZ-951 の一般毒性プロファイルを調べるため，マウス（2 及び 3 ヵ月間），ラット（1，3 及び 6 ヵ月間），イヌ（1 及び 3 ヵ月間），サル（1，3 及び 9 ヵ月間）の反復経口投与毒性試験により評価した。

JTZ-951 の毒性試験で認められた所見は，いずれも JTZ-951 の薬理作用（赤血球造血／EPO 産生亢進）又は HIF-PH 阻害に関連する変化であり，JTZ-951 の化学構造に由来する全身毒性又は臓器毒性を示唆する変化は認められなかった。観察された変化の多くは休薬により消失又は消失傾向を示し，可逆性のものであった。

認められた主な所見は下記(a)～(f)に分類された。

(a) EPO 産生亢進による赤血球造血亢進に関連した変化

(b) 赤血球増多に関連した変化

(c) 多血状態の持続に起因した変化，多血状態の持続に起因した循環障害による変化

(d) EPO 産生亢進に関連すると考えられるその他の変化

(e) EPO 産生亢進以外の HIF-PH 阻害作用による変化

(f) EPO 産生亢進又は HIF-PH 阻害に起因した血液凝固系及び線溶系への影響

また，イヌ及びサル毒性試験の高用量で認められた体重減少及び全身状態の悪化は，血中 EPO 濃度が長時間高値を維持することによって誘発された顕著な摂餌量の減少に起因するものと考えられた。

反復経口投与毒性試験の NOAEL の判断には，ラット及びサルでは多血状態の持続に関連した循環障害を示唆する変化を，イヌでは摂餌量の減少に関連した変化又は体重への影響及び多血状態の持続に起因した循環障害を示唆する変化を用いた。なお，マウスについては NOAEL を設定

可能な用量域で試験を実施していない。

2.4.4.2.1 マウス

（評価資料：CTD4.2.3.2-2）
（参考資料：CTD4.2.3.2-1）

マウスを用いた反復経口投与毒性試験は，TgrasH2 マウス 6 ヵ月間がん原性試験の予備試験として 2 及び 3 ヵ月間の投与期間で実施した。マウス反復経口投与毒性試験の用量は，2 ヵ月間試験は 10，30 及び 60 mg/kg，3 ヵ月間試験は 6，10 及び 20 mg/kg とした。

雌雄 TgrasH2 wild type マウスを用いた 2 ヵ月間反復経口投与毒性試験（用量：10, 30 及び 60 mg/kg）では，雌雄とも 30 mg/kg 以上で死亡が認められた。死因は JTZ-951 の薬理作用の過剰発現による循環障害と考えられた。

JTZ-951 の薬理作用（赤血球造血／EPO 産生亢進）に関連する種々の変化が認められた。

(a) **EPO 産生亢進による赤血球造血亢進に関連した変化**：10 mg/kg で赤血球関連パラメータの増加，脾臓の腫大，脾臓の重量増加，脾臓における赤芽球系髄外造血の増加

(b) **赤血球増多に関連した変化**：10 mg/kg で皮膚赤色化

(c) **多血状態の持続に起因した変化，多血状態の持続に起因した循環障害による変化**：10 mg/kg で膵臓，肝臓及び小腸の暗赤色化，肝臓，腎臓，心臓及び肺の重量増加，肺の血栓，全身諸臓器のうっ血

(d) **EPO 産生亢進に関連すると考えられるその他の変化**：10 mg/kg で PLT の減少，WBC，好塩基球及びリンパ球の増加

以上より，30 mg/kg 以上は致死量であり，10 mg/kg は忍容性ありと判断した。

雌雄 TgrasH2 wild type マウスを用いた 3 ヵ月間反復経口投与毒性試験（用量：6, 10 及び 20 mg/kg）では，雌雄とも 20 mg/kg で死亡が認められた。死因は JTZ-951 の薬理作用の過剰発現による循環障害と考えられた。

JTZ-951 の薬理作用（赤血球造血／EPO 産生亢進）に関連する種々の変化が認められた。

(a) **EPO 産生亢進による赤血球造血亢進に関連した変化**：6 mg/kg 以上で赤血球関連パラメータの増加，脾臓重量の増加，脾臓における赤芽球系髄外造血の増加，10 mg/kg で MPV の増加，10 mg/kg 以上で脾臓の腫大，血球形態の変化

(c) **多血状態の持続に起因した変化，多血状態の持続に起因した循環障害による変化**：6 mg/kg 以上で体重及び腎臓重量の増加，肝臓及び腎臓のうっ血，10 mg/kg 以上で肝臓重量増加，20 mg/kg で心臓重量の増加

(d) **EPO 産生亢進に関連すると考えられるその他の変化**：6 mg/kg 以上で PLT の減少，20 mg/kg で WBC，好中球，リンパ球及び単球の増加

以上，20 mg/kg は致死量であり，10 mg/kg は忍容性ありと判断した。

2.4.4.2.2 ラット

（評価資料：CTD4.2.3.2-3, 4.2.3.2-4, 4.2.3.2-6）
（参考資料：CTD4.2.3.7.7-2, 4.2.3.2-5）

ラットを用いた反復経口投与毒性試験は，1，3 及び 6 ヵ月間の反復経口投与により実施した。ラット反復経口投与毒性試験の用量は，1 ヵ月間試験は 3，10 及び 30 mg/kg，3 ヵ月間試験は 1，3 及び 6 mg/kg，6 ヵ月間試験は 0.3，1 及び 3 mg/kg とした。また，週 3 回投与の 3 ヵ月間間歇経口投与試験も実施した。

JTZ-951（用量：3，10 及び 30 mg/kg）を雌雄ラットに 1 日 1 回，1 ヵ月間反復経口投与し，その影響及び回復性を検討した。いずれの投与群においても死亡は認められなかった。

JTZ-951 の薬理作用（赤血球造血／EPO 産生亢進）又は HIF-PH 阻害に関連する種々の変化が認められた。

(a) **EPO 産生亢進による赤血球造血亢進に関連した変化**：3 mg/kg 以上で赤血球関連パラメータ及び Ret 数増加，MCV の増加及び MCHC の減少，鉄関連パラメータの変動，10 mg/kg 以上で脾臓の腫大／重量増加及び髄外造血亢進，骨髄の赤芽球系細胞の造血亢進，骨髄赤芽球系細胞の増加に伴う骨髄 M/E 比の減少，30 mg/kg で血球形態の変化

(b) **赤血球増多に関連した変化**：10 mg/kg 以上で皮膚の赤色化，網脈絡膜の赤色化，血中 AST，LDH 及び CPK 活性の上昇，血中間接 Bil 濃度の増加，30 mg/kg で腎臓尿細管のヘモジデリン沈着，尿中 Bil 及び URO 濃度の増加，尿潜血（回復期間終了時のみ），血中 K 濃度の増加

(c) **多血状態の持続に起因した変化，多血状態の持続に起因した循環障害による変化**：3 mg/kg 以上で前立腺及び精嚢重量の減少，10 mg/kg 以上で心臓及び肺の重量増加，肝臓の小葉中心性類洞拡張に伴う肝細胞の萎縮，腺胃粘膜のびらん，30 mg/kg で肺の出血及び血栓形成。なお，3 mg/kg 以上で前立腺及び精嚢重量の減少が認められたが，これらの変化は病理組織学的変化を伴わなかったため，毒性学的意義の乏しい変化と判断した。

(d) **EPO 産生亢進に関連すると考えられるその他の変化**：3 mg/kg 以上で PLT 数減少，10 mg/kg 以上で白血球比率の変化，T-CH 及び PL の減少

(e) **EPO 産生亢進以外の HIF-PH 阻害作用による変化**：3 mg/kg 以上で小葉辺縁性肝細胞脂肪化の増加，10 mg/kg 以上で腎臓の近位尿細管上皮脂肪化の増加，血中 TGL 濃度の増加，血中 Ca 濃度の減少，30 mg/kg で大腿骨の骨芽細胞増生及び不整骨梁形成，血中 IP 濃度の減少，血中 GLU 濃度の減少

(f) **EPO 産生亢進又は HIF-PH 阻害に起因した血液凝固系及び線溶系への影響**：30 mg/kg で PT の延長

上記観察された変化の多くは休薬により消失又は消失傾向を示す可逆性のものであった。

ラット 1 ヵ月間反復経口投与毒性試験における NOAEL は 3 mg/kg と考えられた。

3 ヵ月間反復投与（連日投与）の影響を予備的に検討するため，ラット 1 ヵ月間反復経口投与毒性試験（用量：3，10 及び 30 mg/kg）の TK サテライト動物を用いてさらに 2 ヵ月間投与を継続

した。10 mg/kg 以上で薬理作用の過剰発現に関連した循環障害による死亡又は瀕死が認められた（30 mg/kg では投与 34 日目以降，10 mg/kg では投与 69 日目以降）。

以上より，ラットへの 10 mg/kg 以上の連日投与は 3 ヵ月間の毒性試験の用量に設定することは不可能であると考えられた。

JTZ-951（用量：1，3 及び 6 mg/kg）を雌雄ラットに 1 日 1 回，3 ヵ月間反復経口投与し，その影響及び回復性を検討した。6 mg/kg で投与期間後半（投与 64～93 日目）に薬理作用の過剰発現に起因した循環障害による死亡が認められた。

JTZ-951 の薬理作用（赤血球造血／EPO 産生亢進）又は HIF-PH 阻害に関連する種々の変化が認められた。

(a) **EPO 産生亢進による赤血球造血亢進に関連した変化**：雄 1 mg/kg 以上，雌 3 mg/kg 以上で赤血球関連パラメータ増加，3 mg/kg 以上で Ret 数増加，鉄関連パラメータの変動，脾臓の腫大／重量増加，脾臓の髄外造血亢進，骨髄の造血亢進，6 mg/kg で骨髄 M/E 比の減少

(b) **赤血球増多に関連した変化**：3 mg/kg 以上で皮膚及び網脈絡膜の赤色化，血中 AST，LDH，CPK，GU 活性上昇，間接 Bil の増加を主体とする血中総 Bil 濃度の増加，脾臓のヘモジデリン沈着減少，6 mg/kg で尿潜血，尿中 Bil 濃度の増加，血中 K 濃度の増加

(c) **多血状態の持続に起因した変化，多血状態の持続に起因した循環障害による変化**：3 mg/kg 以上で血中 TP，ALB 濃度の減少，肝臓の重量減少，腎臓の大型／重量増加，心臓及び肺の重量増加，諸臓器のうっ血，腺胃粘膜のびらん，精嚢の重量減少，6 mg/kg で肝臓の小型化，大腿骨骨髄の血栓形成，脳の融解壊死，肝臓の小葉中心性の類洞拡張に伴う肝細胞の萎縮，尿タンパクの増加，円形上皮増加，BUN の増加，腎臓の再生尿細管増加，赤血球円柱，赤色尿

(d) **EPO 産生亢進に関連すると考えられるその他の変化**：1 mg/kg 以上で PLT 数減少，3 mg/kg 以上で T-CH 及び PL の減少，白血球比率の変化

(e) **EPO 産生亢進以外の HIF-PH 阻害作用による変化**：3 mg/kg 以上で肝臓の小葉辺縁性肝細胞脂肪化の増加，血中 Ca 濃度の減少，大腿骨の骨芽細胞／間葉系細胞の増生，6 mg/kg で血中 TGL 濃度の増加，大腿骨の不整骨梁形成

(f) **EPO 産生亢進又は HIF-PH 阻害に起因した血液凝固系及び線溶系への影響**：3 mg/kg 以上で血中 FIB の減少，6 mg/kg で PT 及び APTT の延長，血中 D-dimer の増加

上記観察された変化の多くは休薬により消失又は消失傾向を示す可逆性のものであった。

ラット 3 ヵ月間反復経口投与毒性試験における NOAEL は 1 mg/kg と考えられた。

また，間歇投与条件下での影響を検討するため，JTZ-951（用量：10，20 及び 30 mg/kg）を雌雄ラットに週 3 回，3 ヵ月間反復経口投与し，その影響及び回復性を検討した。20 mg/kg 以上で薬理作用の過剰発現に起因した循環障害による死亡が認められた。最低用量の 10 mg/kg から，1 及び 3 ヵ月間の反復経口投与毒性試験（連日投与）と同様の薬理作用に関連する種々の変化が認められた。

JTZ-951（用量：0.3，1 及び 3 mg/kg）を雌雄ラットに 1 日 1 回，6 ヵ月間反復経口投与した。いずれの投与群においても死亡は認められなかった。1 mg/kg から血中 EPO 濃度の増加が認められ，主に 3 mg/kg で 1 及び 3 ヵ月間反復経口投与毒性試験と同様の薬理作用に関連する種々の変化が認められた。なお，3 ヵ月間反復経口投与毒性試験の中間用量である 3 mg/kg と比較して本試験の高用量である 3 mg/kg では，投与期間終了後の造血亢進作用は同等であり投与期間の延長に伴う変化の明らかな増強は認められなかった。

JTZ-951 の薬理作用（赤血球造血／EPO 産生亢進）又は HIF-PH 阻害に関連する種々の変化が認められた。

(a) **EPO 産生亢進による赤血球造血亢進に関連した変化**：1 mg/kg 以上で鉄関連パラメータの変動，3 mg/kg で赤血球関連パラメータ及び Ret 数増加，脾臓の重量増加及び髄外造血の亢進，骨髄の赤芽球造血亢進

(b) **赤血球増多に関連した変化**：3 mg/kg で血中 GU 活性の上昇及び血中 K 濃度増加

(c) **多血状態の持続に起因した変化，多血状態の持続に起因した循環障害による変化**：3 mg/kg で血中 TP 及び ALB 減少，腎臓重量増加，再生尿細管／遠位尿細管拡張／炎症性細胞浸潤，乳頭部線維化及び集合管拡張，尿中 Kim-1 増加，副腎及び肺重量増加，肝臓重量減少，小葉中心性のうっ血及び肝細胞の萎縮，心臓器質化血栓，後肢腫脹，浮腫及び肉芽組織／炎症性細胞浸潤

(d) **EPO 産生亢進に関連すると考えられるその他の変化**：1 mg/kg 以上で T-CH，PL の減少，3 mg/kg で PLT 数減少，好塩基球数の増加

(e) **EPO 産生亢進以外の HIF-PH 阻害作用による変化**：3 mg/kg 以上で血中 GLU の減少

(f) **EPO 産生亢進又は HIF-PH 阻害に起因した血液凝固系及び線溶系への影響**：1 mg/kg 以上で血中 EPO 及び PAI-1 濃度増加，FIB 減少，3 mg/kg で PT 及び APTT の延長

ラット 6 ヵ月間反復経口投与毒性試験における NOAEL は 1 mg/kg と考えられた。

2.4.4.2.3 イヌ

（評価資料：CTD4.2.3.2-7, 4.2.3.2-8）
（参考資料：CTD4.2.3.2-9）

イヌを用いた反復経口投与毒性試験は，1 及び 3 ヵ月間の反復経口投与により実施した。イヌ反復経口投与毒性試験の用量は，1 ヵ月間試験は 1，3 及び 10 mg/kg，3 ヵ月間試験は 0.3，1 及び 3 mg/kg とした。また，週 2 回投与の 3 ヵ月間間歇経口投与試験も実施した。

JTZ-951（用量：1, 3 及び 10 mg/kg）を雌雄イヌに 1 日 1 回，1 ヵ月間反復経口投与した。10 mg/kg では，摂餌量減少，体重減少及び脱水症状など全身状態の悪化が認められたため，投与 7～23 日目まで休薬した。

JTZ-951 の薬理作用（赤血球造血／EPO 産生亢進）又は HIF-PH 阻害に関連する種々の変化が認められた。

(a) **EPO 産生亢進による赤血球造血亢進に関連した変化**：1 mg/kg 以上で赤血球関連パラメータ及び Ret 数増加，骨髄赤芽球系細胞の造血亢進及び鉄関連パラメータの変動，脾臓重量

増加，3 mg/kg 以上で脾臓赤芽球系髄外造血の亢進，骨髄の赤色化及び骨髄脂肪細胞の減少

(b) **赤血球増多に関連した変化**：3 mg/kg 以上で尿中 Bil 増加，10 mg/kg で血中間接 Bil 増加

(c) **多血状態の持続に起因した変化，多血状態の持続に起因した循環障害による変化**：1 mg/kg 以上で肝臓小葉中心性の類洞拡張に伴う肝細胞の萎縮，3 mg/kg 以上で肝臓小葉中心性の炎症性細胞浸潤，肺重量増加，肺血栓形成，10 mg/kg で肺の赤色巣，心臓及び肺の出血，眼球脈絡膜の血管内皮細胞及び線維芽細胞増生，網膜外顆粒層の萎縮，血中 ET-1 及び CRP 増加。なお，1 mg/kg で認められた肝臓小葉中心性の類洞拡張に伴う肝細胞の萎縮は，雌 1 例のみの変化であり，炎症細胞浸潤を伴わないごく軽度の変化であった。また，肝細胞に変性・壊死などの障害性変化はなく，肝臓の機能障害パラメータ（AST，LDH，GLDH，SDH）にも明らかな変化は認められなかった。以上より，この変化は多血状態の持続に起因した変化であり，毒性学的意義の低い変化と判断した。

(d) **EPO 産生亢進に関連すると考えられるその他の変化**：1 mg/kg 以上で PLT 数増加，3 mg/kg 以上で軽度の摂餌量減少及び体重増加抑制，白血球数増加，白血球比率の変化，10 mg/kg で血中 T-CH 及び PL 増加

(e) **EPO 産生亢進以外の HIF-PH 阻害作用による変化**：1 mg/kg 以上で胆嚢上皮の脂肪化，3 mg/kg 以上で血中 TGL 増加及び GLU 減少，腎臓近位尿細管上皮の脂肪化増加，10 mg/kg で血中乳酸増加

10 mg/kg で認められた全身状態の悪化は休薬により回復した。体重減少及び全身状態の悪化は，血中 EPO 濃度が長時間高値を維持することによって誘発された顕著な摂餌量の減少に起因するものと考えられた。また，10 mg/kg における投与 6 日目の血中 EPO 濃度の C_{24} 値は，単回経口投与試験（2.6.6.2.3 (1)項）において摂餌量減少が認められた 30 mg/kg を投与した時の値とほぼ同等の値まで増加した。したがって，本試験で認められた摂餌量の減少は，単回投与時と同様に血中 EPO 濃度が長時間高値を維持することによって発現したものと考えられた。

イヌ 1 ヵ月間反復経口投与毒性試験における NOAEL は 1 mg/kg と考えられた。

JTZ-951（用量：0.3，1 及び 3 mg/kg）を雌雄イヌに 1 日 1 回，3 ヵ月間反復経口投与し，その影響及び回復性を検討した。いずれの投与群においても死亡は認められず，投与期間を通じて一般状態，摂水量，眼科学的検査及び心電図検査において被験物質投与に関連する変化は認められなかった。3 mg/kg では，摂餌量及び体重が減少したが，これらの変化は軽度であり，一部の個体に限られていた。

JTZ-951 の薬理作用（赤血球造血／EPO 産生亢進）又は HIF-PH 阻害に関連する種々の変化が認められた。

(a) **EPO 産生亢進による赤血球造血亢進に関連した変化**：1 mg/kg 以上で赤血球関連パラメータ増加，鉄関連パラメータの変動，血中 EPO 濃度増加，Ret 数増加，MCV，MCH 及び MCHC の減少，3 mg/kg で脾臓重量増加及び髄外造血亢進，骨髄造血亢進，赤血球形態の変化

(b) **赤血球増多に関連した変化**：1 mg/kg 以上で肝臓 Kupffer 細胞及び肝細胞のヘモジデリン沈

着（休薬終了時），3 mg/kg で血中 Bil 増加，尿中 Bil 増加

(c) **多血状態の持続に起因した変化，多血状態の持続に起因した循環障害による変化**：3 mg/kg で血中 ALT 及び GLDH 上昇，脾臓のうっ血，肝臓の小葉中心性のうっ血に伴う肝細胞の萎縮／単細胞壊死，Kupffer 細胞のリポフスチン沈着，炎症性細胞浸潤，休薬終了時の変化として Kupffer 細胞のリポフスチン及び胆汁沈着，肝臓表面の粗造化，炎症性細胞浸潤，胆管の増生，肝線維化

(d) **EPO 産生亢進に関連すると考えられるその他の変化**：3 mg/kg で軽度の摂餌量減少及び体重減少，PLT 数及び好塩基球数の増加，大型血小板の発現

(e) **EPO 産生亢進以外の HIF-PH 阻害作用による変化**：3 mg/kg で血中 VEGF 濃度増加及び血中 GLU 濃度の軽度減少

投与期間終了時までに認められた上記の変化は回復期間中に消失又は消失傾向を示した。

イヌ 3 ヵ月間反復経口投与毒性試験における NOAEL は 1 mg/kg と考えられた。

間歇投与条件下での影響を検討するため，JTZ-951（用量：3，6 及び 10 mg/kg）を雌雄イヌに週 2 回，3 ヵ月間反復経口投与し，その影響を検討した。いずれの投与群においても死亡は認められなかった。最低用量の 3 mg/kg から，1 及び 3 ヵ月間の反復経口投与毒性試験（連日投与）で認められた変化と同様の薬理作用に関連する種々の変化が認められた。

2.4.4.2.4 サル

（評価資料：CTD4.2.3.2-10，4.2.3.2-11）

（参考資料：CTD4.2.3.7.7-3）

サルを用いた反復経口投与毒性試験は，3 及び 9 ヵ月間の反復経口投与により実施した。サル反復経口投与毒性試験の用量は，3 ヵ月間試験は 3，10 及び 30 mg/kg，9 ヵ月間試験は 1，3 及び 30（→10）mg/kg とした。また，予備的な検討として 1 ヵ月間反復経口投与毒性試験も実施した。

予備的な検討として，JTZ-951（10，30 及び 100 mg/kg）を雄性サルに 1 日 1 回，1 ヵ月間反復経口投与した。100 mg/kg の 2/3 例で全身状態が悪化したため投与 7 又は 9 日目に切迫殺し，同用量の残り 1 例については投与 14 日目より投与を中止した。100 mg/kg の切迫殺例では，摂餌量減少，全身状態の悪化，顕著な低血糖，腎臓の褪色，尿細管結晶析出とそれに伴う尿細管の変性／炎症性細胞浸潤などが認められた。

JTZ-951 の薬理作用（赤血球造血／EPO 産生亢進）又は HIF-PH 阻害に関連する種々の変化が認められた。

(a) **EPO 産生亢進による赤血球造血亢進に関連した変化**：10 mg/kg 以上で赤血球関連パラメータ及び Ret 数増加，赤血球の形態変化（大赤血球：100 mg/kg，多染性赤血球：30 mg/kg 以上），100 mg/kg で鉄関連パラメータ変動

(b) **赤血球増多に関連した変化**：100 mg/kg で血中 AST 及び LDH 活性の上昇

(d) **EPO 産生亢進に関連すると考えられるその他の変化**：100 mg/kg で血中 T-CH 及び PL の減少

(e) **EPO 産生亢進以外の HIF-PH 阻害作用による変化**：30 mg/kg 以上で血中 TGL 増加，100 mg/kg の生存例で顕著な血中 GLU の減少

(f) **EPO 産生亢進又は HIF-PH 阻害に起因した血液凝固系及び線溶系への影響**：10 mg/kg 以上で血中 PAI-1 増加，FIB 減少，血中 D-dimer 増加，30 mg/kg 以上で，血中 PIC 増加，APTT 延長

以上より，100 mg/kg は長期の反復投与に耐えない用量であり，30 mg/kg は忍容性ありと判断した。

JTZ-951（用量：3，10 及び 30 mg/kg）を雌雄サルに 1 日 1 回，3 ヵ月間反復経口投与し，その影響及び回復性を検討した。投与期間及び休薬期間を通して摂餌量，体重及び摂水量にも明らかな影響は認められなかった。

JTZ-951 の薬理作用（赤血球造血／EPO 産生亢進）又は HIF-PH 阻害に関連する種々の変化が認められた。

(a) **EPO 産生亢進による赤血球造血亢進に関連した変化**：3 mg/kg 以上で赤血球関連パラメータ及び Ret 数増加，鉄関連パラメータ変動，10 mg/kg 以上で MCV 増加，骨髄の赤芽球系細胞の造血亢進，M/E 比の減少，赤血球形態の変化

(b) **赤血球増多に関連した変化**：10 mg/kg 以上で心拍数の軽度減少及び PR 間隔の軽度延長，腎尿細管上皮ヘモジデリン沈着，30 mg/kg で皮膚及び結膜の赤色化，結膜充血，尿潜血，血中 AST 及び LDH 活性の上昇，血中クレアチニン及び総 Bil 濃度の増加

(c) **多血状態の持続に起因した変化，多血状態の持続に起因した循環障害による変化**：10 mg/kg 以上で肝臓の小葉中心性のうっ血及び肝細胞萎縮，諸臓器のうっ血，30 mg/kg で心臓重量増加，心臓器質化血栓，心臓冠動脈脂肪組織における炎症細胞浸潤，諸臓器（心臓［冠動脈脂肪組織］，肺，胃及び空腸）の出血，胃及び空腸粘膜のびらん／炎症性細胞浸潤，膵臓の腺房細胞萎縮，血中 ALT，GLDH 及び GU 活性の軽度な上昇

(d) **EPO 産生亢進に関連すると考えられるその他の変化**：10 mg/kg 以上で血中 T-CH，PL 濃度減少，30 mg/kg で PLT 数の減少

(e) **EPO 産生亢進以外の HIF-PH 阻害作用による変化**：30 mg/kg で血中 TGL 増加，GLU 減少

(f) **EPO 産生亢進又は HIF-PH 阻害に起因した血液凝固系及び線溶系への影響**：3 mg/kg 以上で血中 PAI-1 増加，10 mg/kg 以上で D-dimer 及び PIC 増加，PT 及び APTT 延長，血中 FIB 減少

休薬群においては，投与期間終了時に認められた多くの変化は回復期間中に消失した。

サル 3 ヵ月間反復経口投与毒性試験における NOAEL は 3 mg/kg と考えられた。

JTZ-951（用量：1，3 及び 30/10 mg/kg）を雌雄サルに 1 日 1 回，9 ヵ月間反復経口投与した。いずれの投与群においても死亡は認められなかった。30 mg/kg では顕著な多血による全身状態悪化が認められたため投与 8 又は 12 週から一時休薬とし，動物の状態が回復した投与 17 週目より 10 mg/kg に用量を変更して投与を再開した。

JTZ-951 の薬理作用（赤血球造血／EPO 産生亢進）又は HIF-PH 阻害に関連する種々の変化が認

められた。

(a) **EPO 産生亢進による赤血球造血亢進に関連した変化**：1 mg/kg 以上で血中 EPO 濃度増加，鉄関連パラメータの変動，3 mg/kg 以上で赤血球関連パラメータ，Ret 数の増加，30/10 mg/kg で MCH 及び MCV 増加，MCHC の減少，骨髄の赤芽球系細胞の造血亢進，M/E 比減少

(b) **赤血球増多に関連した変化**：3 mg/kg 以上で血中 GU 及び LDH 活性上昇，総 Bil の増加，30/10 mg/kg で皮膚，口腔粘膜及び結膜の赤色化，結膜充血，血中 AST 活性上昇，血中 K の増加，小葉辺縁性肝細胞のヘモジデリン沈着

(c) **多血状態の持続に起因した変化，多血状態の持続に起因した循環障害による変化**：30/10 mg/kg で血中 ALT，GLDH の活性上昇，血中 TP，ALB の減少，肝臓の小葉中心性のうっ血を伴う肝細胞の萎縮及びリポフスチン沈着，膵臓の腺房細胞萎縮

(d) **EPO 産生亢進に関連すると考えられるその他の変化**：30/10 mg/kg で PLT 数，T-CH 及び PL の減少

(e) **EPO 産生亢進以外の HIF-PH 阻害作用による変化**：30/10 mg/kg で血中 GLU 濃度の減少，小葉中間帯～辺縁性肝細胞脂肪化

(f) **EPO 産生亢進又は HIF-PH 阻害に起因した血液凝固系及び線溶系への影響**：3 mg/kg 以上で血中 PAI-1 濃度の一過的な増加，30/10 mg/kg で D-dimer 及び PIC 増加，PT 及び APTT 延長，血中 FIB 減少

サル 9 ヵ月間反復経口投与毒性試験の NOAEL は 3 mg/kg と考えられた。

2.4.4.2.5 反復経口投与毒性試験における全身曝露

(1) マウス

JTZ-951 を TgrasH2 wild type マウスに 6，10 及び 20 mg/kg の用量で 3 ヵ月間反復経口投与したときの JTZ-951 の全身曝露（C_{max} 及び AUC_{0-24}）は 20 mg/kg まで用量依存的に上昇し，全身曝露は雄に比較して雌で高かった。JTZ-951 の全身曝露は投与 1 日目と比し投与 87 日目（雄の 20 mg/kg 群は 50 日目）で高値を示した。

(2) ラット

JTZ-951 をラットに 1，3 及び 6 ヵ月間（連日）及び 3 ヵ月間（間歇）反復経口投与したときの JTZ-951 の全身曝露（C_{max} 及び AUC_{0-24}）は，最高用量まで用量依存的に上昇し，性差はなかった。3 ヵ月間反復経口投与（連日及び間歇）したときの JTZ-951 の全身曝露は，いずれの用量においても投与 1 日目に比較し，投与 55 日目まで上昇し，連日投与では投与 55 日目以降も上昇傾向，間歇投与では投与 55 日目までに定常状態を示した。6 ヵ月間反復経口投与毒性試験では，いずれの用量においても投与 1 日目に比較し，反復投与で上昇する傾向にあり，投与 91 日までに定常状態に達した。

(3) イヌ

JTZ-951 をイヌに 1 ヵ月間反復経口投与（1，3 及び 10 mg/kg）したときの投与 1 日目における JTZ-951 の全身曝露（C_{max} 及び AUC_{0-24}）は，最高用量である 10 mg/kg まで用量依存的に上昇し，

性差はなかった。1及び3 mg/kgでは雌雄とも，全身曝露に反復投与の影響はなかった。10 mg/kgでは，全身状態の悪化により投与7～23日目の間投薬を中断した。この用量では，投与6日目の$AUC_{0\text{-}24}$は投与1日目の約2倍であった。投薬再開日（投与24日目）のC_{max}及び$AUC_{0\text{-}24}$は，投与1日目とほぼ同等であったが，投与28日目の$AUC_{0\text{-}24}$は投与24日目の約2倍であった。3ヵ月間反復経口投与（0.3，1及び3 mg/kg）した際のJTZ-951の全身曝露は，最高用量の3 mg/kgまで用量依存的に上昇し，性差はなかった。また，いずれの用量においても反復投与による明らかな影響はなかった。3ヵ月間間歇経口投与（3，6及び10 mg/kg，週2回投与）した際のJTZ-951の全身曝露は，最高用量の10 mg/kgまで用量依存的に上昇し，性差はなく，反復投与による明らかな影響はなかった。

(4) サル

JTZ-951をサルに1日1回，3ヵ月間反復経口投与（3，10及び30 mg/kg）した際のJTZ-951の全身曝露（C_{max}及び$AUC_{0\text{-}24}$）は，最高用量まで用量依存的に上昇し，性差はなかった。全身曝露は投与1日目に比較し，投与28日目に減少したが，投与28日目以降はほぼ定常状態に達した。9ヵ月間反復経口投与毒性試験では最高用量の30又は10 mg/kgまで用量依存的に上昇し，明らかな性差はなく，反復投与による明らかな影響もなかった。

(5) NOAELにおける全身曝露と曝露量比

反復投与毒性試験のNOAELにおける曝露量と維持血液透析患者にJTZ-951（臨床最高用量：8 mg）を単回経口投与した際の推定曝露量との比較を下表（表4）に示す。なお，JTZ-951の蛋白結合率には種差があり（1～10 μg/mLの濃度範囲における蛋白非結合率は，ヒト：0.5%，ラット：1.6%～1.7%，サル：1.0%）（2.4.3.3項参照），蛋白非結合血漿中薬物濃度で比較すると，ヒトとの曝露量比は下表よりもラットで3.2～3.4倍，サルで2倍それぞれ大きくなると考えられた。

表4　主な反復経口投与毒性試験のNOAELと臨床試験におけるJTZ-951の曝露量比

試験	性	NOAEL (mg/kg)	$AUC_{0\text{-}24}$ [a] (μg·hr/mL)	C_{max} [a] (μg/mL)	曝露量比(倍) [b]	
					AUC_{inf}	C_{max}
ラット6ヵ月	雄	1	6.184	2.930	0.6	2.5
	雌	1	4.501	1.544	0.4	1.3
サル9ヵ月	雄	3	24.937	9.368	2.4	8.1
	雌	3	22.700	5.493	2.2	4.8

a) NOAELにおける各試験の最終測定値
b) 日本人維持血液透析患者に8 mg/日を投与した時の推定曝露量（AUC_{inf}：10301.8 ng·hr/mL，C_{max}：1154.7 ng/mL）を用いて算出した。なお，AUC_{inf}は定常状態における$AUC_{0\text{-}24}$に相当する。

2.4.4.3 遺伝毒性試験

(1) *In vitro* 遺伝毒性

（評価資料：CTD4.2.3.3.1-1, 4.2.3.3.1-2, 4.2.3.3.1-3）

細菌を用いる復帰突然変異試験において，JTZ-951は，*S. typhimurium* 4菌株，*E. coli* 1菌株に対してS9 mixの有無に関わらず，処理用量の範囲で復帰突然変異能を示さなかった（3000又は

5000 μg/plate まで実施）。

ほ乳類培養細胞（CHL 細胞）を用いる染色体異常試験において，染色体異常（構造異常）の誘発が，S9 mix 非存在下 24 時間処理の 100 及び 150 μg/mL でそれぞれ 6.0%及び 18.5%の頻度で認められた（判定基準：異常細胞出現率 5%未満：陰性，5%以上 10%未満：疑陽性，10%以上：陽性）。数的異常（倍数性細胞の誘発）はいずれの処理においても認められなかった（150 又は 450 μg/mL まで実施）。

ヒト末梢血リンパ球を用いる染色体異常試験において，分裂指数（mitotic index）の相対値（%）が 50%以下となる用量を最高用量として観察した結果，S9 mix 存在下 3 時間処理では 320 μg/mL まで，S9 mix 非存在下 3 時間処理では 360 μg/mL まで及び S9 mix 非存在下 24 時間処理では 15 μg/mL まで，JTZ-951 による染色体異常誘発能は認められなかった。

以上の結果から，JTZ-951 は復帰突然変異能を有さないと判断した。また，JTZ-951 は CHL 細胞に対して染色体異常（構造異常）誘発能を有するが，ヒト末梢血リンパ球に対し，染色体異常誘発能を有さないものと判断した。

(2) *In vivo* 遺伝毒性

（評価資料：CTD4.2.3.3.2-1, 4.2.3.3.2-2）

雄性ラットの骨髄細胞を用いた染色体異常試験（用量：62.5，125 及び 250 mg/kg，絶食下で単回経口投与）において，JTZ-951 は最高用量 250 mg/kg まで染色体異常（構造異常及び倍数性）の誘発又は骨髄抑制を示さなかった。以上の結果から，JTZ-951 のラット骨髄細胞における染色体異常誘発能は陰性と判断した。

雄性ラットの肝臓及び末梢血を用いた JTZ-951 の単細胞ゲル電気泳動試験（コメットアッセイ，用量：62.5，125 及び 250 mg/kg，絶食下で 2 日間連続経口投与）において，JTZ-951 は最大耐量である 250 mg/kg まで DNA 損傷の誘発は認められなかった。

以上の結果から，JTZ-951 は *in vivo* 試験において染色体異常誘発能及び DNA 損傷性を有さないものと判断した。

250 mg/kg 単回投与時における全身曝露は，C_{max}：262.48 μg/mL，AUC_{0-24}：1866.79 μg·hr/mL 及び AUC_{0-48}：2131.50 μg·hr/mL であった。

2.4.4.4 がん原性試験

2.4.4.4.1 用量設定試験

(1) TgrasH2 wild type マウスを用いた単回経口投与トキシコキネティクス試験

（評価資料：CTD4.2.3.4.2-1）

TgrasH2 マウスを用いた 6 ヵ月間がん原性試験の低及び中間用量における JTZ-951 の全身曝露を確認するため，TgrasH2 wild type マウスに JTZ-951（用量：0.6 及び 2 mg/kg）を単回経口投与し，血中 JTZ-951 濃度を測定した。JTZ-951 の全身曝露（C_{max} 及び AUC_{0-24}）は用量依存的に上昇し，全身曝露は雄に比較して雌で高い傾向であった。

(2) TgrasH2 wild type マウスを用いた 3 ヵ月間反復経口投与試験

(評価資料：CTD4.2.3.4.2-2)

TgrasH2 マウスを用いた 6 ヵ月間がん原性試験の用量設定のため，JTZ-951（用量： 6，10 及び 20 mg/kg）を雌雄 TgrasH2 wild type マウスに 1 日 1 回，3 ヵ月間反復経口投与した（2.4.4.2.1 項参照）。雌雄とも 20 mg/kg で死亡が認められた。6 mg/kg 以上で全身に種々の変化が認められたが，これらはすべて JTZ-951 の薬理作用に起因した変化であると考えられた。以上より，20 mg/kg は致死用量であり，10 mg/kg 群は投与期間終了時まで忍容であったが，著しい脾臓の腫大及び脾臓重量の増加が認められたため，6 ヵ月間の反復投与には耐えないと判断した。

2.4.4.4.2 がん原性試験

(1) TgrasH2 マウスの 6 ヵ月間がん原性試験

(評価資料：CTD4.2.3.4.2-3)

JTZ-951（用量：0.6，2 及び 6 mg/kg）を雌雄 TgrasH2 マウスに 1 日 1 回，6 ヵ月間反復経口投与した。陽性対照群には，ウレタン（1000 mg/kg）を投与 1，3 及び 5 日目に腹腔内投与した。

JTZ-951 の全身曝露（C_{max} 及び AUC_{0-24}）は，最高用量まで用量依存的に上昇し，用量設定試験及び予備 TK 試験の同用量の全身曝露と同等であった。雌雄いずれの用量においても死亡は認められなかった。最高用量の 6 mg/kg まで JTZ-951 投与に起因した腫瘍発現頻度の増加は認められなかった。陽性対照群では，全例で肺腫瘍が認められた。

0.6 mg/kg 以上で PLT の減少，2 mg/kg 以上で腎臓の重量増加及びうっ血が認められた。6 mg/kg で，赤血球関連パラメータ（RBC 数，Hb 濃度，Ht 値），RDW，Ret 数，MCV 及び MCH の増加，脾臓の腫大，脾臓重量の増加，脾臓における赤芽球系髄外造血の亢進が認められた。これらはすべて JTZ-951 の薬理作用に起因した変化であると考えられた。

(2) ラットの 2 年間がん原性試験

(評価資料：CTD4.2.3.4.1-1)

JTZ-951（用量：0.1，0.3 及び 1 mg/kg）を雌雄ラットに 1 日 1 回，2 年間反復経口投与した。

JTZ-951 の全身曝露（C_{max} 及び AUC_{0-24}）は，最高用量まで用量依存的に上昇し，全身曝露に性差は認められなかった。反復投与により全身曝露は上昇する傾向が認められた。

最高用量の 1 mg/kg まで生存率，一般状態，体重及び摂餌量に JTZ-951 投与の影響は認められず，腫瘍発現頻度の増加も認められなかった。1 mg/kg では，薬理作用に関連した赤血球関連パラメータ（RBC 数，Hb 濃度，Ht 値）の増加傾向が認められた。

(3) NOAEL における全身曝露と曝露量比

がん原性試験の NOAEL における曝露量と維持血液透析患者に JTZ-951（臨床最高用量：8 mg）を単回経口投与した際の推定曝露量との比較を表 5 に示す。なお，JTZ-951 の蛋白結合率には種差があり（1～10 μg/mL の濃度範囲における蛋白非結合率は，ヒト：0.5%，ラット：1.6%～1.7%，マウス［TgrasH2 wild type］：7.8%～8.9%）（2.4.3.3 項参照），蛋白非結合血漿中薬物濃度で比較すると，ヒトとの曝露量比は下表よりもマウスで 15.6～17.8 倍，ラットで 3.2～3.4 倍それぞれ

大きくなると考えられた。

表 5　がん原性試験の NOAEL と臨床試験における JTZ-951 の曝露量比

試験	性	NOAEL (mg/kg)	$AUC_{0\text{-}24}$ a) (μg·hr/mL)	C_{max} a) (μg/mL)	曝露量比(倍) b)	
					AUC_{inf}	C_{max}
ラット 2 年がん原性	雄	>1	>4.900	>2.400	>0.5	>2.1
	雌	>1	>3.260	>1.550	>0.3	>1.3
Tg マウス 6 ヵ月がん原性	雄	>6	>10.732	>5.215	>1.0	>4.5
	雌	>6	>17.135	>7.433	>1.7	>6.4

a) NOAEL における各試験の最終測定値（ただし，Tg マウス 6 ヵ月がん原性試験は用量設定試験 [■■■■.■■■.■■■] の測定値を使用）

b) 日本人維持血液透析患者に 8 mg/日を投与した時の推定曝露量（AUC_{inf}：10301.8 ng· hr/mL，C_{max}：1154.7 ng/mL）を用いて算出した。なお，AUC_{inf}は定常状態における $AUC_{0\text{-}24}$ に相当する。

2.4.4.5 生殖発生毒性試験

2.4.4.5.1 受胎能並びに出生前及び出生後の発生と母体の機能に関する影響について

(1) 雌ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する経口投与試験

（評価資料：CTD4.2.3.5.1-1）

JTZ-951（用量：3，10 及び 30 mg/kg）を雌ラットに交配前 14 日間及び交配期間中から GD 7 まで（約 3 週間）1 日 1 回経口投与し，雌の生殖能及び初期胚の発生に及ぼす影響について検討した。

30 mg/kg の 1 例が GD 8 に死亡した。死亡例では死亡前日に体重及び摂餌量が減少し，剖検で肺の暗赤色調及び大型，脾臓の大型，肝臓及び副腎の暗赤色調が認められたことから，JTZ-951 の薬理作用の過剰発現による持続的な多血に基づく循環障害の状態が，動物の死因と考えられた。

30 mg/kg では妊娠期間を通して摂餌量が低値で推移し，GD 13 に軽度な体重増加抑制が認められた。10 mg/kg 以上で皮膚の赤色化が，30 mg/kg の 1 例で GD 13 に膣出血が認められた。生存雌動物の剖検では，10 mg/kg 以上で肺の黒色巣が，30 mg/kg で脾臓の大型，肝臓の暗赤色調，腎臓の白色巣，膣出血が認められた。10 mg/kg 以上で脾臓，心臓及び肺重量が増加した。性周期，交尾率及び受胎率に明らかな変化は認められなかった。30 mg/kg の 1 例で着床数及び着床率の減少が認められた。10 mg/kg 以上で胚・胎児死亡数及び死亡率が増加し，これに伴い生存胎児数が減少した。

上記の雌動物における各種変化はラット反復経口投与毒性試験において認められている変化と同様に JTZ-951 の薬理作用である赤血球造血／EPO 産生亢進と関連した変化と考えられた。胚・胎児の変化は雌動物における JTZ-951 の薬理作用の過剰発現が二次的に影響を及ぼしたものと考えられた。

本試験条件下における NOAEL は，雌動物の一般毒性は 3 mg/kg，雌動物の性周期，交尾能及び受胎率は 30 mg/kg を上回る用量，着床は 10 mg/kg，初期胚発生は 3 mg/kg と考えられた。

(2) 雄ラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

(評価資料：CTD4.2.3.5.1-2)

JTZ-951（用量：3，10 及び 30 mg/kg）を雄ラットに交配前 14 日間及び交配期間を通して剖検前日まで（投与期間：21 又は 28 日間）1 日 1 回反復経口投与し，雄の生殖能及び初期胚の発生に及ぼす影響について検討した。

死亡は認められなかった。30 mg/kg では，交配前期間中を通して体重増加量及び摂餌量が低下し，1 例で投与 22 日目に自発運動量の減少が認められた。10 mg/kg 以上で皮膚の赤色化が認められた。10 mg/kg 以上で脾臓，心臓及び肺重量の増加が，30 mg/kg で脾臓の大型，肺及び盲腸の暗赤色巣並びに肝臓の白色巣が認められた。これらの変化は JTZ-951 の薬理作用である赤血球造血／EPO 産生亢進と関連した変化と考えられた。30 mg/kg で精嚢重量の軽度な減少が認められたが，雄ラットの生殖能及び初期胚の発生に影響がなかったことから，毒性学的意義に乏しい変化と考えられた。

いずれの用量においても，雄ラットの生殖能及び初期胚発生に JTZ-951 の影響は認められなかった。

本試験条件下における NOAEL は，雄動物の一般毒性は 3 mg/kg，雄ラットの生殖能及び初期胚発生は 30 mg/kg を上回る用量と考えられた。

2.4.4.5.2 胚・胎児発生への影響

(1) ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験

(評価資料：CTD4.2.3.5.2-1)

JTZ-951（用量：3，10 及び 30 mg/kg）を妊娠ラットに GD 7～17 に 1 日 1 回経口投与し，母動物及び胚・胎児発生に及ぼす影響を検討した。

死亡は認められなかった。30 mg/kg では，体重増加量が GD 19～20 に，摂餌量が GD 17～18 に軽度に減少した。30 mg/kg で皮膚の赤色化，脾臓の大型，心臓及び肺重量の増加が，10 mg/kg 以上で脾臓重量の増加が認められた。

30 mg/kg では，胎児発育遅延を示唆する変化が認められた：1）着床後胚・胎児死亡の増加，2）生存胎児体重の減少，3）胎盤重量増加，4）胸椎体二分骨化が認められた胎児を有する母動物数の増加，5）胸椎体二分骨化の発現頻度の軽度な増加，6）仙尾椎又は中手骨数の減少傾向。胎児の外表検査及び内臓検査では，いずれの用量においても，JTZ-951 の影響は認められず，骨格異常も認められなかった。催奇形性を示唆する変化は認められなかった。

上記の母動物における各種変化はラット反復経口投与毒性試験において認められている変化と同様に JTZ-951 の薬理作用である赤血球造血／EPO 産生亢進と関連した変化と考えられた。胚・胎児の変化は母動物における JTZ-951 の薬理作用の過剰発現が二次的に影響を及ぼしたものと考えられた。

JTZ-951 の全身曝露は，GD 7（投与 1 日目）及び GD 17（投与 11 日目）ともに，最高用量の 30 mg/kg まで用量依存的に上昇した。いずれの用量においても，C_{max} は投与 1 及び 11 日目ともに同程度であった。10 及び 30 mg/kg では，投与 11 日目の $AUC_{0\text{-}24}$ の平均値は，投与 1 日目に比較してやや

高値であったが，反復投与の明らかな影響は認められなかった。

本試験条件下における NOAEL は，母動物の一般毒性及び胚・胎児発生は 10 mg/kg，催奇形性は 30 mg/kg を上回ると考えられた。

(2) ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験

（評価資料：CTD4.2.3.5.2-2）

JTZ-951（用量：20，60 及び 200 mg/kg）を妊娠ウサギに GD 6～18 に 1 日 1 回経口投与し，母動物及び胚・胎児発生に及ぼす影響を検討した。

200 mg/kg では，摂餌量が顕著に減少し，体重及び糞便量の減少が認められ，その結果 5 例が死亡し，1 例が状態悪化のため切迫殺，6 例で流産が認められた。60 mg/kg では，1 例で摂餌の廃絶による流産が認められた。60 及び 200 mg/kg で流産，死亡又は切迫殺した母動物の剖検では，腎臓の白色化，胃の暗赤色巣又は毛玉の貯留／盲腸内の水様内容物の貯留が認められた。いずれの用量においても，生存した母動物には肉眼所見は認められなかった。

200 mg/kg では，着床後胚・胎児死亡率の増加及び生存胎児数の減少が軽度に認められた。いずれの用量においても，胎児外表，内臓，骨格及び胎盤に JTZ-951 の影響は認められなかった。また，性比，胎児体重，胎盤重量，骨化進行に対して JTZ-951 の影響は認められなかった。胎児発育遅延及び催奇形性を示唆する変化は認められなかった。

上記の母動物における各種変化はラットを用いた試験において認められた変化と同様に JTZ-951 の薬理作用である赤血球造血／EPO 産生亢進と関連した変化と考えられた。流産は顕著な摂餌量減少に伴う母動物の全身状態の悪化による二次的影響と考えられ，JTZ-951 の直接的な影響ではないと考えられた。胚・胎児の変化についても，母動物における JTZ-951 の薬理作用の過剰発現が二次的に影響を及ぼしたものと考えられた。

JTZ-951 の全身曝露は最高用量の 200 mg/kg まで用量依存的に上昇した。20 及び 60 mg/kg における GD 6（投与 1 日目）及び GD 18（投与 13 日目）の C_{max} 及び AUC_{0-24} の平均値は同程度であった。200 mg/kg において，2 匹の母動物で投与 13 日目の全身曝露が投与 1 日目より高値だったものの，他の母動物では投与 1 日目及び投与 13 日目の JTZ-951 の全身曝露は同程度であった。全身曝露が高値であった 2 匹の母動物は最終投与日付近（GD 18 を含む）で摂餌が減少した。

本試験条件下における NOAEL は，母動物の一般毒性及び流産は 20 mg/kg，胚・胎児発生は 60 mg/kg，催奇形性は 200 mg/kg を上回ると考えられた。

2.4.4.5.3 出生後の発生及び母体の機能に及ぼす影響

(1) ラットを用い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

（評価資料：CTD4.2.3.5.3-1）

JTZ-951 を 1，3 及び 10 mg/kg の用量で，雌ラットに妊娠 7 日目から分娩後 20 日目まで（約 5 週間）1 日 1 回，経口投与し，妊娠／授乳期の雌動物及び出生児の発生に及ぼす影響を検討した。

いずれの用量においても母動物の死亡は認められなかった。10 mg/kg では哺育期間中の摂餌量が軽度に減少し，皮膚の赤色化，脾臓の大型並びに脾臓，心臓及び肺重量の増加が認められた。

出生児では，10 mg/kg で眼瞼の開裂時期の遅延が認められた。また同用量群では出生児の体重

が生後 4～21 日目まで低値を示したが，離乳（生後 21 日）以降は対照群との体重差は縮小した。出生児の外表検査，出生児総数，出生日の生存児数，出生率，性比，生後 4 日目の生存児数，生後生存率，離乳時の生存児数，離乳率，一般状態，機能発達検査，剖検，生殖器の形態分化，行動及び学習検査，交尾行動及び妊娠 15 日目の帝王切開時検査において，いずれの用量においても JTZ-951 の影響は認められなかった。

上記の母動物における各種変化はラット反復経口投与毒性試験において認められている変化と同様に JTZ-951 の薬理作用である赤血球造血／EPO 産生亢進と関連した変化と考えられた。出生児の変化は発育遅延を示唆する変化であり，母動物における JTZ-951 の薬理作用の過剰発現が二次的に影響を及ぼしたものと考えられた。

本試験条件下における NOAEL は，母動物の一般毒性及び出生児の身体発育は 3 mg/kg，出生児の生存性，行動発達及び生殖能は 10 mg/kg を上回ると考えられた。

2.4.4.5.4 幼若動物を用いた試験

実施せず。

2.4.4.5.5 NOAEL における全身曝露と曝露量比

生殖発生毒性試験の NOAEL における曝露量と維持血液透析患者に JTZ-951（臨床最高用量：8 mg）を単回経口投与した際の推定曝露量との比較を下表（表 6）に示す。なお，JTZ-951 の蛋白結合率には種差があり（1～10 μg/mL の濃度範囲における蛋白非結合率は，ヒト：0.5%，ラット：1.6%～1.7%，ウサギはデータなし）（2.4.3.3 項参照），蛋白非結合血漿中薬物濃度で比較すると，ヒトとの曝露量比は下表よりもラットで 3.2～3.4 倍大きくなると考えられた。

表 6　生殖発生毒性試験の NOAEL における JTZ-951 の全身曝露と曝露量比

試験	性	NOAEL (mg/kg)	AUC_{0-24} [a] (μg·hr/mL)	C_{max} [a] (μg/mL)	曝露量比(倍) [c]	
					AUC_{inf}	C_{max}
ラット雌雄生殖能/初期胚発生	雄	3 [d]	5.91 [b]	2.277 [b]	0.6	2.0
		>30 [e], [f]	>128.457 [b]	>38.661 [b]	>12.5	>33.5
	雌	3 [d], [e]	7.435 [b]	1.838 [b]	0.7	1.6
		10 [g]	47.852 [b]	10.606 [b]	4.6	9.2
		>30 [h]	>143.266 [b]	>52.194 [b]	>13.9	>45.2
ラット胚/胎児発生	雌	10 [d], [i]	59.007	16.517	5.7	14.3
		>30 [j]	>379.017	>57.151	>36.8	>49.5
ウサギ胚/胎児発生	雌	20 [d], [k]	18.295	3.139	1.8	2.7
		60 [i]	39.231	10.441	3.8	9.0
		>200 [j]	119.445 [b]	22.786 [b]	>11.6	>19.7
ラット出生前後の発生/母動物の機能	雌	3 [d], [l]	7.435	1.838	0.7	1.6
		>10 [m]	47.852	10.606	>4.6	>9.2

a) NOAEL における各試験の最終測定値（ただし，ラット雌雄生殖能/初期胚発生，ラット出生前後の発生/母動物の機能試験はラット 1 ヵ月間反復経口投与毒性試験の測定値を使用）
b) NOAEL における各試験の投与 1 日目測定値
c) 日本人維持血液透析患者に 8 mg/日を投与した時の推定曝露量（AUC_{inf}：10301.8 ng· hr/mL，C_{max}：1154.7 ng/mL）を用いて算出した。なお，AUC_{inf} は定常状態における AUC_{0-24} に相当する。
d) 親動物の一般毒性に関する NOAEL
e) 初期胚発生に関する NOAEL
f) 生殖能に関する NOAEL
g) 着床に関する NOAEL
h) 性周期，交尾能及び受胎率に関する NOAEL
i) 胚・胎児発生に関する NOAEL
j) 催奇形性に関する NOAEL
k) 流産に関する NOAEL
l) 出生児の身体発育に関する NOAEL
m) 出生児の生存性，行動，学習及び生殖能に関する NOAEL

2.4.4.6 局所刺激性試験

実施せず。

2.4.4.7 その他の毒性試験

2.4.4.7.1 抗原性試験

実施せず。

2.4.4.7.2 光毒性試験

(1) Balb/c 3T3 細胞を用いる光毒性試験

（評価資料：CTD4.2.3.7.7-1）

ほ乳類培養細胞（Balb/c 3T3 細胞）を用いた光毒性試験において，JTZ-951 は光毒性を有さなかった。

2.4.4.7.3 免疫毒性試験

実施せず。

2.4.4.7.4 その他の毒性試験

2.4.4.7.4.1 多血に関連した所見に関する検討

（参考資料：CTD4.2.3.7.7-4）

一連の毒性試験で認められた所見について，多血状態の持続に関連する変化を明らかにする目的で，ラットに瀉血を施し Ht 値の著しい増加を抑えつつ，JTZ-951（30 mg/kg）を 7 週間反復経口投与した。

主な結果について，ラット 3 ヵ月間反復経口投与予備毒性試験（2.6.6.3.2 (3)項）の 30 mg/kg 群（非瀉血条件：投与 4 週目以降で動物の死亡あり）と比較した。

本試験では瀉血を実施しても緩やかな Ht 値の増加が認められたものの，動物の死亡はみられず，非瀉血条件と比較して，動物の生存期間が延長した。瀉血条件下では以下の所見が軽減又は発生時期が遅延した；皮膚の赤色化，RBC 数，Hb 濃度，Ht 値及び Ret の増加，血中 Bil 濃度の増加，LDH，CPK 活性の上昇，心臓及び肺重量の増加，諸臓器（骨髄，脳，心臓，腎臓及び肺）の血栓形成及び出血。

一方，体重増加量及び摂餌量の減少，PLT 数の減少，白血球比率の変化，血中 TGL の増加，血中 GLU，T-CH 及び PL の減少，血中 Ca 及び IP の減少，大腿骨の骨芽細胞の増生及び不整骨梁形成，小葉辺縁性の肝細胞脂肪化，腎臓の近位尿細管上皮の脂肪化については瀉血の効果はみられなかった。

以上の結果から，瀉血によって多血状態を緩和することにより，非瀉血条件で認められた動物の死亡，循環障害を示唆する種々の変化が軽減又は消失することが明らかとなった。その他，瀉血による効果の認められなかった変化については，EPO 濃度の増加及び HIF 安定化に起因する変化と考えられた。

2.4.4.7.4.2 反復経口投与毒性試験における血中 EPO 濃度測定

（参考資料：CTD4.2.3.7.7-5, 4.2.3.7.7-6, 4.2.3.7.7-7）

イヌ 1 ヵ月間反復経口投与毒性試験（用量：1，3 及び 10 mg/kg）における血中 EPO 濃度を測定した結果，雌雄いずれの用量においても，血中 EPO 濃度は投与後 8 時間に最大に達し，用量依存的に増加した。1 及び 3 mg/kg 投与群では，血中 EPO 濃度に反復投与による影響はなかったが，10 mg/kg 群では血中 EPO 濃度（C_{max} 及び C_{24}）は反復投与により増加した。

サル 1 ヵ月間反復経口投与毒性試験（用量：10，30 及び 100 mg/kg）における血中 EPO 濃度を測定した結果，10 mg/kg 以上の用量において血中 EPO 濃度（C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}8}$）が用量依存的に増加した。

サル 3 ヵ月間反復経口投与毒性試験（用量：3，10 及び 30 mg/kg）における血中 EPO 濃度を測定した結果，血中 EPO 濃度（C_8，C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}8}$）は，3 mg/kg 以上で用量依存的に増加した。また，雌雄差は認められなかった。

2.4.4.7.4.3 心臓及び肺への影響に関する検討

（参考資料：CTD4.2.3.7.7-8, 4.2.3.7.7-9）

マウス，ラット，イヌ及びサルの反復経口投与毒性試験において，心臓及び肺重量増加が認め

られた。これら所見の発現が多血状態に基づくものであるかを調べる目的で，ラットを用いて，心臓及び肺重量増加と循環血液量との関係を検討した。さらに，反復投与による血圧及び心拍数に対する影響についても検討した。

JTZ-951 を雌性ラットに 1 ヵ月間反復経口投与した結果，赤血球関連パラメータの増加に伴い循環血液量の増加が認められ，循環血液量の増加と心臓及び肺重量増加には良好な正の相関が認められた。1 ヵ月間の休薬により，赤血球関連パラメータの増加，循環血液量の増加，心臓及び肺重量の増加は消失又は消失傾向が認められた。以上のことより，心臓及び肺重量の増加は，JTZ-951 の薬理作用による赤血球増多に起因し，循環血液量が顕著に増加したことに対する適応性変化と考えられた。

また，JTZ-951 の血圧及び心拍数に対する作用について，反復投与による明らかな影響は認められなかった。

2.4.4.7.4.4 肝臓への影響に関する検討

（参考資料：CTD4.2.3.7.7-10, 4.2.3.7.7-11, 4.2.3.7.7-12）

ラット，イヌ及びサルの反復経口投与毒性試験において，小葉中心性の類洞拡張又はうっ血に伴う肝細胞萎縮が認められた。また，HIF 安定化に起因すると考えられる変化として，小葉辺縁性の肝細胞脂肪化が認められた（ラット及びサル）。

小葉中心性の類洞拡張に伴う肝細胞萎縮が多血状態の持続によるものかを調べるために，イヌを用いて瀉血試験を実施した。その結果，瀉血条件下では変化が軽減した。よって，小葉中心性の肝細胞萎縮は，JTZ-951 の薬理作用による赤血球増多に起因した循環血液量の増加が長期間持続したことで，肝臓の類洞が拡張し，その物理的圧迫により二次的に生じたものと考えられた。

また，上記肝臓の変化の毒性学的意義を考察するために肝機能バイオマーカーを測定した。ラット及びイヌの 1 ヵ月間反復経口投与毒性試験における血中 GLDH 及び SDH 活性を測定した結果，これらのパラメータに明らかな変化は認められなかった。以上より，ラット及びイヌの 1 ヵ月間反復経口投与毒性試験において最高用量まで肝臓の機能障害はないものと考えられた。

2.4.4.7.4.5 腎臓への影響に関する検討

（参考資料：CTD4.2.3.7.7-12, 4.2.3.7.7-13, 4.2.3.7.7-14, 4.2.3.7.7-15）

ラット及びイヌの 1 ヵ月間反復経口投与毒性試験で，HIF 安定化によると考えられる変化として，腎臓の近位尿細管上皮細胞の脂肪化が認められた。腎機能バイオマーカーを測定するとともに，腎臓の電子顕微鏡学的検査を行った。

ラット 1 ヵ月間反復経口投与毒性試験（用量：3，10 及び 30 mg/kg）における尿中 β2 マイクログロブリン，Kim-1，Clusterin 及び Cystatin C を測定した結果，いずれの投与群においても，腎機能マーカーの変化は認められなかった。イヌ 1 ヵ月間反復経口投与毒性試験（用量：1，3 及び 10 mg/kg）の尿中 Kim-1 濃度を測定した結果，いずれの投与群においても，尿中 Kim-1 濃度に変化は認められなかった。両種共に，腎臓の電子顕微鏡学的検査では尿細管上皮の細胞障害を示唆する所見は認められなかった。近位尿細管上皮において，ミトコンドリアの膨化及び空胞化が高用量で軽度に認められたが，これは JTZ-951 の薬理作用である HIF の安定化に伴う細胞内の擬似

低酸素化及び多血状態の持続に起因した循環障害による細胞内の低酸素状態によって生じた変化と考えられた。細胞質内の脂肪滴又はライソゾームは，対照群に比較して高用量ではその数が増加し一部は大型化していたが，対照群，投与群間で脂肪滴に質的な違いは認められなかった。また，尿細管上皮細胞間の密着結合に異常は認められなかった。

以上より，ラット及びイヌの 1 ヵ月間反復経口投与毒性試験において最高用量まで腎臓の機能障害はないものと考えられた。

2.4.4.7.4.6 骨への影響に関する検討

（参考資料：CTD4.2.3.7.7-16）

ラット 1 及び 3 ヵ月間反復経口投与毒性試験において，大腿骨骨幹の骨芽細胞の増生及び不整骨梁形成が認められたため，骨代謝マーカーを測定した。ラット 1 ヵ月間反復経口投与毒性試験（3，10 及び 30 mg/kg）の血中オステオカルシン濃度（骨形成マーカー）及び尿中デオキシピリジノリン／クレアチニン濃度比（骨吸収マーカー）を測定した結果，雌の 30 mg/kg 群で血中オステオカルシン濃度の増加が認められた。雄の血中オステオカルシン濃度及び雌雄の尿中デオキシピリジノリン／クレアチニン濃度比については，いずれの用量においても変化は認められなかった。オステオカルシンは骨芽細胞から産生され，骨形成の促進に関与する。本検討で認められた血中オステオカルシン濃度の増加は，ラット反復経口投与毒性試験で認められた骨の所見に関連していると考えられた。これらの変化と類似した骨の変化は，HIF の消去系酵素である VHL のノックアウトマウスや骨／骨髄の物理的破壊モデル動物においても報告されている[30]。また，EPO は造血以外のメカニズムで骨形成に促進的に作用することが知られ[31]，同様の骨の変化は ESA の投与時の多血状態の動物においても認められる[32]。これらのことから，ラットで認められた骨の変化は JTZ-951 の薬理作用である HIF 安定化に関連して生じたものと推察された。

2.4.4.7.4.7 網脈絡膜への影響に関する検討

（参考資料：CTD4.2.3.7.7-17, 4.2.3.7.7-18, 4.2.3.7.7-10, 4.2.3.7.7-11, 4.2.3.7.7-12）

イヌ 1 ヵ月間反復経口投与毒性試験では，最高用量の 10 mg/kg で網膜の萎縮及び脈絡膜の血管内皮／線維芽細胞の増生が認められた。これらの所見の発現機序が多血の長時間持続による循環障害に基づくものであるかを調べる目的で，イヌを用いて瀉血試験を実施した。

イヌを用いた瀉血試験において，非瀉血群では蛍光眼底検査及び病理組織学的検査で網膜動脈内の蛍光色素到達不良，視神経乳頭部の動脈拡張，視神経乳頭近傍の赤色巣及び網膜組織への漿液漏出を示唆する過蛍光スポット及び網膜萎縮が認められた。これらの変化は瀉血条件下では消失又は明らかに軽減した。以上の結果から，非瀉血群では網膜血管における循環障害により血管から網膜組織へ漿液の漏出が起きているものと考えられ，瀉血によって多血状態を緩和することにより，これらの変化が軽減又は消失することが明らかとなった。

なお，瀉血群の 1 例では，瀉血処置により Ht 値の増加が抑制されていたにも関わらず，網膜血管における循環障害を示唆する変化が認められた。この個体は，瀉血操作により全身状態が著しく悪化し，切迫殺した個体であったことから，網膜血管における循環障害は，多血による循環障害だけではなく，動物の全身状態の極度の悪化によっても惹起されるものと考えられた。

また，イヌ 1 ヵ月間反復経口投与毒性試験について，血中 ET-1 及び CRP 濃度を測定した。イヌ 1 ヵ月間反復経口投与毒性試験（1, 3 及び 10 mg/kg）では，血中 ET-1 濃度の増加が雄の 10 mg/kg 及び雌の 3 mg/kg 以上で，血中 CRP 濃度の増加が 3 mg/kg 以上で認められた。CRP 濃度は 10 mg/kg の全例で顕著に増加したが，休薬により減少し，投与再開後に再び増加した。3 mg/kg の CRP 濃度の増加は一過性で軽度であり，一部の動物に限られた。

ラット 1 ヵ月間反復経口投与毒性試験（3，10 及び 30 mg/kg）では，雌雄いずれの投与群においても，血中 CRP 濃度に変化は認められなかった。

網脈絡膜病変の発現は，イヌ 1 ヵ月間反復経口投与毒性試験の最高用量（10 mg/kg）のみで認められたが，この用量では，投与初期における急激な造血亢進とそれに引き続く極度の多血状態の持続や，血中 ET-1 濃度の増加による循環障害を示唆する種々の変化に加え，摂餌量減少に伴う全身状態の悪化や組織の炎症を示唆する血中 CRP の顕著な増加が認められた。また，全身状態の悪化が最も顕著であった動物で特に強く網脈絡膜の変化が認められた。よって，網膜の微小循環障害は，持続的な多血のみならず全身状態の悪化により生じると考えられた。

2.4.4.7.4.8 副生殖器（前立腺及び精嚢）への影響に関する検討

（参考資料：CTD4.2.3.7.7-19）

ラット 1 ヵ月間反復経口投与毒性試験（3，10 及び 30 mg/kg）では，3 mg/kg から前立腺及び精嚢重量の減少が認められたが，病理組織学的検査で投与の影響を示唆する所見は認められず，血中テストステロン濃度にも投与の影響は認められなかった。これらの変化は病理組織学的変化を伴わなかったため，毒性学的意義の乏しい変化と判断した。

2.4.4.7.4.9 血中 TGL 濃度の増加に関する検討

（参考資料：CTD4.2.3.7.7-20, 4.2.3.7.7-21, 4.2.3.7.7-22, 4.2.3.7.7-23, 4.2.3.7.7-24, 4.2.3.7.7-25, 4.2.3.7.7-26）

ラット，イヌ及びサルの反復経口投与毒性試験において血中 TGL 濃度の軽度な増加が認められた。ラット及びイヌを用いて血中 TGL 濃度増加のプロファイル及び機序を検討した。

雄性ラットに JTZ-951（3，10 及び 30 mg/kg）を非絶食条件下で単回経口投与し，血中 TGL 濃度の経時的推移を検討した。10 mg/kg 以上で，血中 TGL 濃度は投与後 2 時間から用量依存的に増加し，投与後 8 時間に最も高い値を示し，その後次第に減少した。また，血中 TGL 濃度増加に対する食餌の影響を検討した結果，絶食及び非絶食条件で血中 TGL 濃度増加の程度はほぼ同等であった。また，リポタンパク解析の結果，絶食及び非絶食条件ともに VLDL-TGL 及び CM-TGL の増加が認められた。雄性イヌに JTZ-951（1，3，10 及び 30 mg/kg）を絶食条件下（投与後 4 から 8 時間に給餌）で単回経口投与し，血中 TGL 濃度を測定した。3 mg/kg 以上で投与後 4 時間に血中 TGL 濃度の増加が認められたが，給餌後は JTZ-951 投与の影響は認められなかった。JTZ-951 による血中 TGL 濃度の増加は摂餌による血中 TGL 濃度増加の変動範囲内の変化であった。

さらに，血中 TGL 濃度増加の機序について検討するため，ラットを用いた試験を実施した。雄性ラットに JTZ-951（30 mg/kg）を経口投与後，LPL 阻害剤を静脈内投与し，経時的に血中 TGL 濃度を測定して肝臓からの TGL 放出速度を求めた。その結果，JTZ-951 は肝 TGL 放出速度に影響

を及ぼさなかった。雄性ラットにJTZ-951（30 mg/kg）を経口投与後，TGLを静脈内投与し，経時的に血中のTGL濃度を測定して血中TGLの消失半減期を算出した。その結果，JTZ-951投与により血中TGLの消失半減期が延長した。雄性ラットにJTZ-951（30 mg/kg）を経口投与し，血中LPL活性を評価した結果，JTZ-951投与により，血中LPL活性は低下した。

LPL活性を抑制する因子としてANGPTL4の関与が知られており[33]，ANGPTL4のmRNAの発現はHIFにより誘導されることが報告されている[34]。雄性ラットにJTZ-951（30 mg/kg）を単回経口投与し，肝臓及び腎臓におけるANGPTL4 mRNA発現を測定した。その結果，JTZ-951は肝臓及び腎臓ANGPTL4 mRNA発現を増加させた。

以上の結果より，JTZ-951投与による血中TGL濃度の増加は，LPL活性の低下によるものであり，この低下には，HIF-PH阻害によるHIF安定化に伴い増加するANGPTL4の関与が考えられた。

2.4.4.7.4.10 VEGFへの影響に関する検討

（参考資料：CTD4.2.3.7.7-27, 4.2.3.7.7-28, 4.2.3.7.7-29, 4.2.3.7.7-30）

HIF安定化に伴い，VEGFの発現が誘導されることが知られている[35]。イヌ3ヵ月間反復経口投与毒性試験では3 mg/kg群（連日投与）及び10 mg/kg群（間歇投与）において，血中VEGF濃度が投与後4及び8時間で一過性に増加した。ここでは，ラットを用いて血中VEGF濃度増加のプロファイルとJTZ-951による網膜血管透過性に対する影響について検討した。

雄性ラットにJTZ-951（3，10及び30 mg/kg）を単回経口投与し，経時的に血中VEGF濃度を測定した。その結果，30 mg/kgで血中VEGF濃度が増加した。血中VEGF濃度は，投与後4時間まで増加した後，投与後24時間までに媒体群と同程度まで減少した。雄性ラットにJTZ-951（30 mg/kg）を単回経口投与し，網膜VEGF mRNA発現を測定した結果，JTZ-951は網膜VEGF mRNA発現を増加させなかった。また，ラットにJTZ-951（300 mg/kg）を単回経口投与し，網膜血管透過性に対する作用を検討した結果，JTZ-951は網膜血管透過性を亢進させなかった。

以上より，JTZ-951は血中VEGF濃度を増加させたが，網膜VEGF mRNA発現を増加させず，網膜血管透過性の亢進作用を示さないことが明らかとなった。

また，ヒト大腸がん細胞株を移植したマウス担がんモデルを用いて，JTZ-951投与（30 mg/kg）により増加した血中VEGFが腫瘍増殖に及ぼす影響を評価した。その結果，30 mg/kgの用量においてJTZ-951は，赤血球関連パラメータ及び血中VEGF濃度を増加させたが，腫瘍体積には明らかな影響を及ぼさなかった。

2.4.4.7.4.11 血栓形成機序に関する検討

（参考資料：CTD4.2.3.7.7-31, 4.2.3.7.7-32）

ラット，イヌ及びサルの反復経口投与毒性試験では，心臓及び肺を含め種々の臓器に血栓形成が認められた。その発現機序は多血状態の持続及びそれに引き続く循環障害によるものと考えられた。サル1ヵ月間反復経口投与毒性試験（10，30及び100 mg/kg）の肺ホルマリン固定材料についてComputer Tomography（CT）画像の撮影及び追加病理組織学的検査を実施し，血栓の有無について精査した。その結果，CTでは明らかな変化は認められなかったが，病理組織学的検査で10 mg/kg以上で肺に小血栓が認められた。以上より，サル1ヵ月間反復経口投与毒性試験で認め

られたD-dimerの軽度増加（10 mg/kg以上）は，血栓形成に起因した変化と考えられた。

また，JTZ-951高用量投与時における血栓形成機序を明らかにするため，ラットを用いた検討を実施した。雄性ラットにJTZ-951（100 mg/kg）を2，4及び7日間反復経口投与し，凝固系及び線溶系パラメータを測定した結果，投与2日目からRet数及びPAI-1濃度，4日目からMPV及びTAT濃度が増加した。Hb濃度は投与7日目に増加した。PLT数は投与7日目まで変化が認められなかった。肺及び心臓における血栓形成は投与4日目から認められた。以上より，JTZ-951の高用量投与時には，凝固系の亢進及び線溶系の低下が複合的に作用することで，多血状態を伴わなくても血栓形成が起こることが示唆された。

2.4.4.7.4.12 染色体異常誘発の基礎メカニズムに関する検討

（参考資料：CTD4.2.3.7.7-33）

JTZ-951のCHL細胞における染色体異常の誘発が，JTZ-951の薬理作用であるHIF-1α蛋白の安定化に関連するものかどうかを調べるため，HIF-1α 蛋白合成阻害剤又は蛋白翻訳阻害剤であるKC7F2[36, 37]を用いてJTZ-951によるCHL細胞の染色体異常の誘発に対する影響を評価した。

JTZ-951のみを処理した場合には，染色体異常が誘発された。JTZ-951によって誘発された染色体異常は，KC7F2前処理により抑制された。細胞内JTZ-951濃度は，JTZ-951を単独処理した場合とKC7F2を併用処理した場合との間で有意な差は認められなかった。以上のことから，CHL細胞におけるJTZ-951の染色体異常の誘発は，JTZ-951の薬理作用であるHIF-1α蛋白の安定化に関連しているものと考えられた。

2.4.4.8 代謝物に関する試験

2.4.4.8.1 代謝物(R)-M2に関する検討

（評価資料：CTD4.2.3.7.5-9）

（参考資料：CTD4.2.3.7.5-1, 4.2.3.7.5-2, 4.2.3.7.5-3, 4.2.3.7.5-4, 4.2.3.7.5-5, 4.2.3.7.5-6, 4.2.3.7.5-7, 4.2.3.7.5-8, 4.2.3.7.5-10）

JTZ-951のヒトにおける主代謝物(R)-M2について，(R)-M2自体を用いた毒性試験の実施又はJTZ-951を用いた毒性試験における(R)-M2の全身曝露を評価することで，毒性を評価した。(R)-M2の一般毒性については，(R)-M2を投与したマウス3ヵ月間反復経口投与毒性試験において評価した結果，全身又は臓器毒性を示唆する所見は認められなかった。(R)-M2の遺伝毒性については，(R)-M2を用いたAmes試験で陰性であった。また，JTZ-951の*in vivo*染色体異常試験及びコメットアッセイ試験は(R)-M2の曝露が十分な条件で行われ，結果は陰性であったため，(R)-M2についても染色体異常及びDNA損傷性はないと考えられた。(R)-M2の生殖毒性については，JTZ-951の生殖発生毒性試験で(R)-M2が十分に曝露されていることが確認されたため，JTZ-951の生殖発生毒性試験の中で評価した。JTZ-951の生殖発生毒性試験において，JTZ-951の薬理作用に起因する変化以外の変化は認められなかった。よって，(R)-M2の化学構造に起因する生殖毒性及び発生毒性はないものと判断した。さらに，*in silico*の評価においても，遺伝毒性や臓器毒性についての化学構造アラートは検出されなかった。これらの結果より，一般毒性，遺伝毒性及び生殖毒性において，(R)-M2の化学構造に起因する毒性はないと考えられた。なお，(R)-M2のがん原性評価に

ついては，FDA とがん原性試験プロトコールの Special Protocol Assessment にて協議を行い，評価は不要との合意に至ったことから実施しなかった。

2.4.4.9 不純物に関する試験

実施せず。

2.4.5 総括及び結論

2.4.5.1 薬理作用

JTZ-951 は，HIF-PH を阻害し，細胞において HIF を安定化させることで，EPO 産生を亢進させた。ラットにおいては，明らかな血中 EPO 濃度の上昇が認められない用量においても腎臓のみならず肝臓からの EPO 産生を一過性に亢進させた。また，ラット腎性貧血モデルにおいては，反復経口投与により用量に応じた赤血球造血亢進作用を示した。さらに，正常ラットにおいて，単回投与により肝臓でのヘプシジン産生を抑制し，反復投与により鉄利用能を低下させることなく赤血球造血亢進作用を示した。

以上より，JTZ-951 は HIF-PH 阻害により HIF を安定化させることで，明らかな血中 EPO 濃度の上昇が認められない用量においても腎臓のみならず肝臓からの EPO 産生を亢進させ，肝臓でのヘプシジン産生抑制作用に基づく鉄利用能の亢進と併せて赤血球造血亢進作用を示すと考えられた。

2.4.5.2 薬物動態試験

JTZ-951 をラット，イヌ及びサルに経口投与すると，速やかに吸収され，投与後 0.33～0.8 時間で最高血漿中濃度に達した後，それぞれ 1.4～1.8 時間の半減期で速やかに消失した。BA はそれぞれ 74.5%，39.4%及び 41.7%であった。全身曝露はマウスにおいて性差が認められたが，ラット，イヌ及びサルでは性差は認められなかった。また，反復投与するとマウス及びラットは JTZ-951 の全身曝露が上昇し反復投与による影響が認められたが，イヌ及びサルは反復投与の影響は認められなかった。JTZ-951 の吸収は食餌により低下した。

ラットに経口投与された JTZ-951 は，EPO 産生臓器である腎臓及び肝臓への移行性が比較的高く，その他の組織への移行性は低いことが示された。また，^{14}C-JTZ-951 を妊娠ラットに投与すると放射能は胎盤を通過して胎児に移行したが，胎児全身への放射能の分布率はすべての時点で総投与量の 0.03%以下であった。組織放射能の経時変化から薬物関連物質が組織内に残留する可能性は低いと考えられた。JTZ-951 のヒトにおける血漿蛋白結合率は 97.9%～99.5%であり，主にアルブミンと結合していると考えられた。JTZ-951 のヒトにおける血球移行性は低かった。

JTZ-951 は代謝を受けにくく，ラット，イヌ，サル及びヒトの生体試料中の主成分は JTZ-951 であり，代謝物としてはわずかに M1，M2，M3，M4 及び M5 が検出された。また，サルでは M6 にも代謝された。

JTZ-951 はヒトの CYP1A2，2A6，2C19，2D6 及び 3A4/5 の活性を阻害しなかったが，100 μmol/L で，CYP2B6，2C8 及び 2C9 の活性を若干阻害した。また，時間依存的阻害は認められなかった。

JTZ-951 のヒト肝細胞を用いた CYP 誘導試験において，JTZ-951 の濃度に依存した CYP1A2 及び 3A4 の mRNA 発現量の低下が認められた。ヒト肝腫瘍由来 HepaRG 細胞を低酸素条件などの HIF を安定化させた条件で培養すると，CYP の mRNA 発現量が低下することが報告されていることから[38]，JTZ-951 により認められた CYP1A 及び 3A4 の mRNA 発現量の低下は，JTZ-951 の薬理作用により HIF が安定化されることで生じたものであると考えられた。

JTZ-951 は MDR1 の基質ではなく，BCRP の基質であることが示された。また，腎臓の尿細管上皮細胞に発現している hOAT1 に対して JTZ-951 はモデル基質と同程度の親和性を示したが，

hOAT3，hOCT2，MATE1，MATE2-K，OATP1B1 及び OATP1B3 の基質ではなかった。JTZ-951 は BCRP，hOAT1，hOAT3 及び OATP1B1 に対してそれぞれ 43.2，0.956，1.67 及び 30.0 μmol/L の IC_{50} で阻害作用を示した。しかしながら，JTZ-951 の臨床用量における血漿中濃度及び蛋白結合率を考慮した非結合形濃度から考えて（AZ951-U-13-005 試験，「CTD2.7.2.2.5.2 項」参照），これらのトランスポーターを介した薬物間相互作用を起こす可能性は低いと考えられた。JTZ-951 は MDR1，hOCT2，MATE1，MATE2-K 及び OATP1B3 に対して阻害作用を示さなかった。

JTZ-951 は，主に胆汁中に排泄され，腸肝循環を受けながら糞中に排泄されると考えられた。

また，^{14}C-JTZ-951 を経口投与した授乳ラットでは放射能が乳汁へ移行したが，その濃度は投与後の時間経過に従って低下した。

JTZ-951 は PS，CTA 及び PES いずれの透析膜でもほとんど除去されなかった。したがって，透析によって JTZ-951 の血漿中濃度が影響を受けることはないと考えられた。

2.4.5.3 安全性

安全性薬理試験において，JTZ-951 は中枢神経系及び呼吸系に対して影響を及ぼさなかった。心血管系に対する検討では，JTZ-951 は hERG 電流及びイヌの心電図に対して影響を及ぼさなかったことから，心室再分極遅延に関連した潜在的な催不整脈リスクは低いと考えられた。JTZ-951 はラットにおいて一過性に血圧を低下させ，心拍数を増加させた。これらの変化はラットを低酸素状態に曝露した際の急性反応と類似しており[39, 40]，JTZ-951 の薬理作用に関連した所見と考えられた。なお，本所見は赤血球造血亢進作用よりも明らかに高い用量で認められた。

マウス，ラット，イヌ及びサルを用いて実施された一般毒性試験において認められた変化は，いずれも JTZ-951 の HIF-PH 阻害作用又は JTZ-951 の薬理作用である造血亢進作用に直接又は二次的に関連すると考えられる変化であり，JTZ-951 の化学構造に起因した臓器毒性は，いずれの動物種においても認められなかった。また，観察された変化のほとんどは休薬により消失又は消失傾向を示し，可逆性のものであった。

ラット及びイヌの単回経口投与毒性試験では，低用量（ラット 3 mg/kg，イヌ 1 mg/kg）から EPO 濃度の増加に起因する造血亢進を示唆する Ret 数の用量依存的な増加が認められた。高用量（ラット 100 mg/kg，イヌ 30 mg/kg）では血中 EPO 濃度の著しい増加に起因した変化（摂餌量の減少，全身状態の悪化）が認められた。ラットの 1000 mg/kg では高度な循環障害による動物の死亡が認められた。

マウス，ラット，イヌ及びサルの反復経口投与毒性試験では，すべての動物種において赤血球関連パラメータ（RBC 数，Hb 濃度及び Ht 値）の用量依存的な増加とともに，造血亢進に関連した変化（脾臓の髄外造血亢進，骨髄の造血亢進及び鉄消費による変化など：マウス 6 mg/kg 以上，ラット 1 mg/kg 以上，イヌ 1 mg/kg 以上，サル 1 mg/kg 以上）及び赤血球増多に関連する変化（血中 AST，間接 Bil 増加など：ラット 3 mg/kg 以上，イヌ 3 mg/kg 以上，サル 3 mg/kg 以上）が認められた。また，赤血球関連パラメータの増加に伴い循環血液量の顕著な増加が認められた。多血状態の持続に起因した変化（心臓及び肺の重量増加：マウス 10 mg/kg 以上，ラット 3 mg/kg 以上，イヌ 3 mg/kg 以上，サル 30 mg/kg，肝臓の小葉中心性のうっ血及び肝細胞の萎縮：マウス 6 mg/kg 以上，ラット 3 mg/kg 以上，イヌ 1 mg/kg 以上，サル 10 mg/kg 以上），多血状態の持続に起因し

た循環障害による変化（死亡：マウス 20 mg/kg，ラット 6 mg/kg 以上，心臓，肺及び諸臓器の血栓形成：ラット 3 mg/kg 以上，イヌ 3 mg/kg 以上，サル 30 mg/kg）が認められた。EPO 産生亢進に関連すると考えられるその他の変化（T-CH 及び PL の変化など：ラット 1 mg/kg 以上，イヌ 10 mg/kg，サル 10 mg/kg 以上）が認められた。以上の変化は ESA でも報告されており，EPO で惹起される変化と同質であると考えられる。

上述した 4 種の動物を用いた反復経口投与毒性試験において，主に高用量では重度の多血（赤血球関連パラメータ増加）及び多血状態の持続に関連した循環障害を示唆する変化が認められ，投与期間の延長に伴い循環障害は増強する傾向が認められた。循環障害の増強は，投与期間の延長により多血の程度が増強したこと，又は，重度の多血状態が長期間持続したことに起因すると考えられた。一方，ラット及びサル慢性毒性試験の低又は中間用量では，多血の程度は軽度であり，投与期間の延長による多血の明らかな増強は認められず，かつ循環障害の増強も認められなかった。以上より，多血の程度が顕著ではない用量域においては，循環障害が生じるリスクは低いと考えられた。

また，JTZ-951 投与による HIF 安定化に起因すると考えられる変化として，血液凝固系及び線溶系に関連する変化，血中 VEGF 濃度の増加及び脂質代謝／糖代謝への影響を示唆する変化が認められた。

JTZ-951 を極めて高い用量（100 mg/kg）でラットに投与すると，HIF の安定化又は EPO 濃度の増加による血液凝固系の亢進と線溶系の低下が複合的に作用することで，過剰な多血状態を伴わなくとも血栓形成が起こることが示されている。このように高用量投与により短期間で血栓形成が惹起されるような極端な条件では，血中 EPO 濃度のみならず PAI-1 濃度等が増加することにより血栓形成性が高まっていると考えられた。PAI-1 は線溶系を抑制する分子であり，その発現制御には HIF-1α 及び EPO が関連することが知られる。ラット及びサルの反復経口投与毒性試験においては，主に高用量（ラット 3 mg/kg 以上，サル 30 mg/kg）で重度の多血に関連して血液凝固及び線溶系パラメータの変動と血栓形成（心臓，肺及び諸臓器）が認められた。一方，ラット及びサルの慢性毒性試験の低又は中間用量では，血中 PAI-1 濃度の増加（ラット 1 mg/kg 以上，サル 3 mg/kg 以上）が投与後の一過性の変化として認められたものの，血栓形成は認められなかった。以上より，多血の程度が顕著ではない用量域においては，長期間投与しても血栓形成のリスクは低いと考えられた。

血中 VEGF 濃度の増加については，反復経口投与毒性試験において VEGF 増加に起因すると考えられる眼所見は認められなかった。さらに，補強試験において JTZ-951 はラット網膜 VEGF mRNA 発現を増加させず，網膜血管透過性の亢進を示唆する所見が認められなかったことから，JTZ-951 が網膜の血管透過性を亢進させる可能性は低いと考えられた。また，TgrasH2 マウスを用いた 6 ヵ月間がん原性試験及びラット 2 年間がん原性試験において JTZ-951 投与に起因した腫瘍発生頻度の増加は認められなかった。さらに，ヒト大腸がん細胞株を移植したマウス担がんモデルにおいて，JTZ-951 は血中 VEGF 濃度を増加させた一方で腫瘍体積には明らかな影響を及ぼさなかった。ラットで認められた骨の変化（骨芽細胞／間葉系細胞の増生及び不整骨梁の増生：ラット 6 mg/kg 以上）については，ESA でも報告されており，EPO の骨形成促進作用が関与している可能性に加え，HIF の消去系酵素である VHL のノックアウトマウス等の文献から VEGF が関与

している可能性も考えられた。しかし，骨形成及び骨代謝速度における種差の観点からは，JTZ-951 投与による骨の所見はヒトへの外挿性に乏しい変化であると考えられた。

脂質代謝／糖代謝への影響を示唆する変化として，血中 TGL 濃度の増加及び GLU 濃度の減少（ラット 3 mg/kg 以上，イヌ 3 mg/kg 以上及びサル 30/10 mg/kg），乳酸値の増加（ラット 10 mg/kg 以上及びイヌ 10 mg/kg），肝臓の小葉辺縁性の肝細胞脂肪化（ラット 3 mg/kg 以上及びサル 30/10 mg/kg），腎尿細管上皮の脂肪化（ラット 10 mg/kg 以上及びイヌ 3 mg/kg 以上），胆嚢上皮の脂肪化（イヌ 1 mg/kg 以上）などが認められた。血中 TGL 濃度の増加は，LPL 活性の低下によるものであり，この低下には HIF 安定化に伴い増加する ANGPTL4 の関与が考えられた。血中 GLU 濃度の減少及び乳酸値の増加は，HIF の安定化に伴う解糖系の亢進によるものと推察された。血中 TGL 濃度，GLU 濃度及び乳酸値の変化は軽度であり，明らかな用量依存性はなく投与期間の延長に伴う増強も認められなかった。肝臓，腎臓及び胆嚢における脂肪化は，HIF 安定化によりエネルギー産生における糖及び脂質代謝のバランスが変化したことに起因して発現したものと推察された。脂肪化の程度は軽度であり，脂肪化が認められた組織に変性，壊死などの障害性変化は伴わず，各臓器の機能への影響を示唆する所見も認められなかった。また，脂肪化の程度に明らかな用量依存性はなく，投与期間の延長に伴う増強も認められなかった。以上より，臨床で JTZ-951 投与により脂肪化に関連した肝及び腎障害が生じるリスクは低いと考えられた。

JTZ-951 は細菌を用いた復帰突然変異試験において，復帰突然変異を示さなかった。ほ乳類培養細胞（CHL 細胞）を用いた染色体異常試験において，S9 mix 非存在下 24 時間処理の 100 及び 150 μg/mL で染色体異常（構造異常）を誘発した。一方，ヒト末梢血リンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験においては，染色体異常の誘発は認められなかった。さらに，*in vivo* 試験では，ラット骨髄細胞を用いた染色体異常試験及びラット肝及び末梢血リンパ球を用いたコメットアッセイにおいて，最高用量の 250 mg/kg まで染色体異常又は DNA 損傷の誘発は認められなかった。また，最高用量の 250 mg/kg における最高血漿中濃度は，CHL 細胞において染色体異常が認められた濃度を上回るものであった。加えて，補強試験の結果から，CHL 細胞で認められた染色体異常は JTZ-951 の薬理作用（HIF 安定化）に関連することが示唆された。JTZ-951 による染色体異常の誘発は CHL 細胞のみに認められ，p53 機能が正常であるヒトリンパ球及びほ乳類組織では染色体異常が誘発されなかった。したがって，CHL 細胞で認められた染色体異常は CHL 細胞における p53 機能の欠損が関連しており，ヒトへの外挿性が乏しいものと考えられた。これらのことから，JTZ-951 が生体において染色体異常を誘発する可能性は極めて低いと考えられた。

JTZ-951 の TgrasH2 マウスを用いた 6 ヵ月間がん原性試験及びラット 2 年間がん原性試験において，JTZ-951 投与に起因した腫瘍発生頻度の増加は認められなかった。よって JTZ-951 には発がん作用はないと考えられた。

生殖発生毒性試験において，JTZ-951 の雌ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する検討では，性周期，交尾率及び受胎率に明らかな変化は認められなかったが，着床数及び着床率の減少（30 mg/kg），胚・胎児の死亡数及び死亡率の増加並びにそれに伴う生存胎児数の減少（10 mg/kg 以上）が認められた。JTZ-951 の雄ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する検討では，雄生殖能及び初期胚発生に対する影響は認められなかった。ラット及びウサギを用いた胚・胎児発生に関する検討では，胚・胎児死亡率の増加（ラット 30 mg/kg，ウサギ

200 mg/kg）が認められ，ラットでは胎児体重の減少傾向，骨化遅延を示唆する変化等（30 mg/kg）が認められたものの，催奇形性を示唆する変化は認められなかった。ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する検討では，一過性の出生児の体重低値（生後 4～21 日）及び眼瞼の開裂時期の遅延（10 mg/kg）が認められた。一連の生殖発生試験における着床，初期胚発生，胚・胎児及び出生児における変化は，親動物における JTZ-951 の薬理作用の過剰発現に関連した二次的変化と考えられた。

3T3 細胞を用いた光毒性試験において，JTZ-951 は光毒性を有さなかった。

JTZ-951 のヒトにおける主代謝物(R)-M2 について，一般毒性，遺伝毒性及び生殖毒性において，(R)-M2 に起因する毒性は認められなかった。

2.4.5.4 まとめ

JTZ-951 は HIF-PH を阻害し HIF を安定化させることで，経口投与により内因的な EPO 産生を腎臓のみならず肝臓でも増加させ，肝臓でのヘプシジン産生抑制作用に基づく鉄利用能の亢進と併せた赤血球造血亢進作用を有することが示唆された。

薬物動態試験において，吸収された JTZ-951 は代謝を受けにくく，主に肝臓でクリアランスを受けることが明らかとなっている。また，JTZ-951 は透析膜（PS，CTA 及び PES）でほとんど除去されなかった。これらのことから，血漿中 JTZ-951 濃度は腎機能の低下の程度や透析による影響を受けにくいと考えられる。ヒト肝細胞を用いた *in vitro* 酵素誘導試験において，JTZ-951 による HIF-PH 阻害に基づくと考えられる，JTZ-951 の濃度に依存した CYP1A2 及び 3A4 の mRNA 発現量の低下が認められている。また，JTZ-951 は BCRP 及び hOAT1 の基質であることが示されている。

JTZ-951 は造血亢進による変化（Ret 数，RBC 数，Hb 濃度及び Ht 値の増加），血中 EPO 濃度の著しい高値に起因した変化（摂餌量の減少及び全身状態の悪化），多血状態の持続（心臓及び肺の重量増加）又はそれに起因した循環障害を示唆する変化（諸臓器のうっ血，心臓及び肺の血栓形成並びに網脈絡膜の変化）といった薬理作用の過剰発現による毒性変化を誘発することが明らかになっている。しかし，多血及び血中 EPO 濃度増加が顕著ではない用量域においては，血栓形成及び循環障害を含む上記の変化が生じるリスクは低いと考えられた。

生殖発生毒性試験において，胎児の催奇形性はないものの，胚・胎児死亡率の増加及び出生児の発育遅延が認められている。

以上より，JTZ-951 は腎性貧血患者に対し，既存の ESA と比較して生理的な低酸素応答を利用した内因性の EPO 産生の誘導と鉄利用能の亢進により，赤血球産生能を是正し腎性貧血治療が可能と考えられた。また，JTZ-951 の血中濃度は腎機能障害の程度や透析による影響を受けにくいことが示唆された。一方，腎性貧血治療用量域においては，血栓形成及び循環障害を含む毒性変化が生じるリスクは低いことが想定された。したがって，JTZ-951 は腎性貧血治療において有用な経口投与可能な新規の治療薬となることが期待される。

2.4.6 参考文献

1. Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). Mol Pharmacol. 2006 Nov; 70(5): 1469-80. (CTD5.4-1)

2. Peyssonnaux C, Zinkernagel AS, Schuepbach RA, Rankin E, Vaulont S, Haase VH, et al. Regulation of iron homeostasis by thehypoxia-inducible transcription factors (HIFs). J Clin Invest. 2007 Jul; 117(7): 1926-32. (CTD5.4-2)

3. Sugahara M, Tanaka T, Nangaku M. Prolyl hydroxylase domain inhibitors as a novel therapeutic approach against anemia in chronic kidney disease. Kidney Int. 2017 Aug; 92(2):306-12. (CTD4.3-1)

4. Takeda K, Aguila HL, Parikh NS, Li X, Lamothe K, Duan LJ, et al. Regulation of adult erythropoiesis by prolyl hydroxylase domain proteins. Blood. 2008 Mar 15; 111(6): 3229-35. (CTD5.4-3)

5. Percy MJ, Furlow PW, Lucas GS, Li X, Lappin TR, McMullin MF, et al. A gain-of-function mutation in the HIF2A gene in familial erythrocytosis. N Engl J Med. 2008 Jan 10; 358(2): 162-8. (CTD5.4-4)

6. Eckardt KU, Ratcliffe PJ, Tan CC, Bauer C, Kurtz A. Age-dependent expression of the erythropoietin gene in rat liver and kidneys. J Clin Invest. 1992 Mar; 89(3): 753-60. (CTD5.4-5)

7. 社団法人 日本透析医学会. 2015 年版日本透析医学会「慢性腎臓病患者における腎性貧血治療のガイドライン」. 日本透析医学会雑誌. 2016; 49(2): 89-158. (CTD5.4-6)

8. Artunc F, Risler T. Serum erythropoietin concentrations and responses to anaemia in patients with or without chronic kidney disease. Nephrol Dial Transplant. 2007 Oct;22(10):2900-8. (CTD5.4-7)

9. Silverberg DS, Wexler D, Blum M, Keren G, Sheps D, Leibovitch E, et al. The use of subcutaneous erythropoietin and intravenous iron for the treatment of the anemia of severe, resistant congestive heart failure improves cardiac and renal function and functional cardiac class, and markedly reduces hospitalizations., J Am Coll Cardiol., 2000; 35: 1737-44. (CTD5.4-8)

10. KDOQI. KDOQI Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Anemia in Chronic Kidney Disease: 2007 Update of hemoglobin target. Am J Kidney Dis. 2006 May;47(5 Suppl 3):S11-145. (CTD4.3-2)

11. 新田孝作，政金生人，花房規男，谷口正智，長谷川毅，中井滋ほか. わが国の慢性透析療法の現況（2017 年 12 月 31 日現在）. 透析会誌.2018; 51(12): 699-766. (CTD5.4-13)

12. Imai E, Matsuo S, Makino H, Watanabe T, Akizawa T, Nitta K, Iimuro S, Ohashi Y, Hishida A. Chronic Kidney Disease Japan Cohort study: baseline characteristics and factors associated with causative diseases and renal function. Clin Exp Nephrol. 2010 Dec;14(6):558-70. (CTD5.4-11)

13. 中井滋，花房規男，政金生人，谷口正智，濱野高行，庄司哲雄ほか. わが国の慢性透析療法の現況（2012 年 12 月 31 日現在）. 透析会誌.2014; 47(1):1-56. (CTD5.4-12)

14. Ofsthun N, Labrecque J, Lacson E, Keen M, Lazarus JM. The effects of higher hemoglobin levels on mortality and hospitalization in hemodialysis patients. Kidney Int. 2003 May; 63(5): 1908-14. (CTD5.4-16)

15. Regidor DL, Kopple JD, Kovesdy CP, Kilpatrick RD, McAllister CJ, Aronovitz J, et al. Associations between changes in hemoglobin and administered erythropoiesis-stimulating agent and survival in hemodialysis patients. J Am Soc Nephrol. 2006 Apr; 17(4): 1181-91. (CTD5.4-17)

16. Akizawa T, Pisoni RL, Akiba T, Saito A, Fukuhara S, Asano Y, et al. Japanese haemodialysis anaemia management practices and outcomes (1999-2006): results from the DOPPS. Nephrol Dial Transplant. 2008 Nov; 23(11): 3643-53. (CTD5.4-18)

17. Akizawa T, Saito A, Gejyo F, Suzuki M, Nishizawa Y, Tomino Y, et al.; JET Study Group. Low hemoglobin levels and hypo-responsiveness to erythropoiesis-stimulating agent associated with poor survival in incident Japanese hemodialysis patients. Ther Apher Dial. 2014 Oct; 18(5): 404-13. (CTD5.4-19)

18. Fukuhara S, Akizawa T, Morita S, Koshikawa S. Quality of life improvements in dialysis patients receiving darbepoetin alfa. Ther Apher Dial. 2008 Feb;12(1):72-7. (CTD5.4-20)

19. Drüeke TB, Locatelli F, Clyne N, Eckardt KU, Macdougall IC, Tsakiris D, et al. Normalization of hemoglobin level in patients with chronic kidney disease and anemia. N Engl J Med. 2006 Nov 16;355(20):2071-84. (CTD5.4-21)

20. Johansen KL, Finkelstein FO, Revicki DA, Evans C, Wan S, Gitlin M, et al. Systematic review of the impact of erythropoiesis-stimulating agents on fatigue in dialysis patients. Nephrol Dial Transplant. 2012 Jun;27(6):2418-25. (CTD5.4-22)

21. Gandra SR, Finkelstein FO, Bennett AV, Lewis EF, Brazg T, Martin ML. Impact of erythropoiesis-stimulating agents on energy and physical function in nondialysis CKD patients with anemia: a systematic review. Am J Kidney Dis. 2010 Mar;55(3):519-34. (CTD5.4-23)

22. Singh AK, Szczech L, Tang KL, Barnhart H, Sapp S, Wolfson M, et al.; CHOIR Investigators. Correction of anemia with epoetin alfa in chronic kidney disease. N Engl J Med. 2006 Nov 16;355(20):2085-98. (CTD5.4-24)

23. Besarab A, Bolton WK, Browne JK, Egrie JC, Nissenson AR, Okamoto DM, et al. The effects of normal as compared with low hematocrit values in patients with cardiac disease who are receiving hemodialysis and epoetin. N Engl J Med. 1998 Aug; 339(9): 584-90. (CTD5.4-25)

24. Palmer SC, Navaneethan SD, Craig JC, Johnson DW, Tonelli M, Garg AX, et al. Metaanalysis: erythropoiesis-stimulating agents in patients with chronic kidney disease. Ann Intern Med. 2010 Jul; 153(1): 23-33. (CTD5.4-26)

25. Szczech LA, Barnhart HX, Inrig JK, Reddan DN, Sapp S, Califf RM, et al. Secondary analysis of the CHOIR trial epoetin-α dose and achieved hemoglobin outcomes. Kidney Int. 2008 Sep;74(6):791-8. (CTD5.4-27)

26. McCullough PA, Barnhart HX, Inrig JK, Reddan D, Sapp S, Patel UD, et al. Cardiovascular Toxicity of Epoetin-Alfa in Patients with Chronic Kidney Disease. Am J Nephrol. 2013;37(6):549-58. (CTD5.4-28)

27. 鈴木正司. 新しい ESA は何をもたらすか. 腎と透析. 2009; 67: 531-5. (CTD5.4-29)

28. 日本透析医学会統計調査委員会. 図説「わが国の慢性透析療法の現況」2008 年 12 月 31 日現在. 日本透析医学会.2009. (CTD5.4-30)

29. 公益社団法人 日本透析医会. 透析施設における標準的な透析操作と感染予防に関するガイドライン（四訂版）. 2015. (CTD5.4-31)

30. Wang Y, Wan C, Deng L, Liu X, Cao X, Gilbert SR, et al. The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. J Clin Invest. 2007 Jun; 117(6): 1616-26. (CTD4.3-6)

31. SJ McGee, AM Havens, Y Shiozawa, Y Jung, RS Taichman. Effects of Erythropoietin on the Bone Microenvironment. Growth Factors. 2012; 30(1): 22-8. (CTD4.3-7)

32. ネスプ静注用申請資料 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表　毒性試験 (CTD4.3-8)

33. Ge H, Yang G, Yu X, Pourbahrami T, Li C. Oligomerization state-dependent hyperlipidemic effect of angiopoietin-like protein 4. J Lipid Res. 2004 Nov; 45(11): 2071-9. (CTD4.3-9)

34. Le Jan S, Amy C, Cazes A, Monnot C, Lamandé N, Favier J, et al. Angiopoietin-like 4 is a proangiogenic factor produced during ischemia and in conventional renal cell carcinoma. Am J Pathol. 2003 May; 162(5): 1521-8. (CTD4.3-24)

35. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. Nature. 1992; 359: 843-5. (CTD4.3-10)

36. Koh MY, Spivak-Kroizman TR and Powis G. Inhibiting the hypoxia response for cancer therapy – the new kid on the block. Clinical Cancer Res. 2009 October 1; 15(19): 5945-6. (CTD4.3-11)

37. Narita T, Yin S, Gelin CF, et al. Identification of a novel small molecule HIF-1a translation inhibitor. Clinical Cancer Res. 2009 October 1; 15(19): 6128-36. (CTD4.3-12)

38. Legendre C, Hori T, Loyer P, Aninat C, Ishida S, Glaise D, et al. Drug-metabolising enzymes are down-regulated by hypoxia in differentiated human hepatoma HepaRG cells: HIF-1α involvement in CYP3A4 repression. Eur J Cancer. 2009 Nov; 45(16): 2882-92. (CTD4.3-13)

39. Lopez-Barneo J, Pardal R, Ortega-Sáenz P. Cellular mechanism of oxygen sensing. Annu Rev Physiol. 2001; 63: 259-87. (CTD4.3-14)

40. Marcus NJ, Olson EB Jr, Bird CE, Philippi NR, Morgan BJ. Time-dependent adaptation in the hemodynamic response to hypoxia. Respir Physiol Neurobiol. 2009 Jan 1; 165(1): 90-6. (CTD4.3-15)