ヴォリブリス錠2.5mg

製造販売承認事項一部変更承認申請書添付資料

第２部（モジュール２）CTDの概要（サマリー）

2.6.非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.6. 毒性試験の概要文
2.6.7. 毒性試験概要表

グラクソ・スミスクライン株式会社

Jul 10 2020 16:01:59

非臨床概要毒性試験の目次

項目 - 頁

2.6.6. 毒性試験の概要文 ..... 2.6.6 - p.1
2.6.6.1. まとめ ..... 2.6.6 - p.1
2.6.6.2. 急性毒性試験 ..... 2.6.6 - p.2
2.6.6.3. 反復投与毒性試験 ..... 2.6.6 - p.2
2.6.6.4. 遺伝毒性試験 ..... 2.6.6 - p.2
2.6.6.5. がん原性試験 ..... 2.6.6 - p.2
2.6.6.6. 生殖発生毒性試験 ..... 2.6.6 - p.2
2.6.6.7. 局所刺激性試験 ..... 2.6.6 - p.7
2.6.6.8. その他の毒性試験 ..... 2.6.6 - p.7
2.6.6.9. 考察及び結論 ..... 2.6.6 - p.7
2.6.6.10. 図表 ..... 2.6.6 - p.9
2.6.6.11. 参考文献 ..... 2.6.6 - p.9
2.6.7. 毒性試験概要表 ..... 2.6.7 - p.1
2.6.7.1. 毒性試験：一覧表 ..... 2.6.7 - p.1
2.6.7.2. トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧 ..... 2.6.7 - p.2
2.6.7.3. トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧 ..... 2.6.7 - p.3
2.6.7.4. 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧 ..... 2.6.7 - p.4
2.6.7.5. 単回投与毒性試験 ..... 2.6.7 - p.5
2.6.7.6. 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 ..... 2.6.7 - p.5
2.6.7.7. 反復投与毒性試験：重要な試験 ..... 2.6.7 - p.5
2.6.7.8. In Vitro 遺伝毒性試験 ..... 2.6.7 - p.5
2.6.7.9. In Vivo 遺伝毒性試験 ..... 2.6.7 - p.5
2.6.7.10. がん原性試験 ..... 2.6.7 - p.5
2.6.7.11. 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 ..... 2.6.7 - p.6
2.6.7.12. 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 ..... 2.6.7 - p.7
2.6.7.13. 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 ..... 2.6.7 - p.7
2.6.7.14. 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 ..... 2.6.7 - p.7
2.6.7.15. 新生児を用いた試験 ..... 2.6.7 - p.8
2.6.7.16. 局所刺激性試験 ..... 2.6.7 - p.19

2.6.7.17. その他の試験..... 2.6.7 - p.19

2.6.6 及び 2.6.7 の略号等一覧

略語（略称）	内容
AUC	血漿中濃度－時間曲線下面積
Cmax	最高血漿中濃度
CS	クレシルバイオレット
ET	エンドセリン
GLP	医薬品の安全性試験の実施に関する基準
HE	ヘマトキシリン・エオジン
LFB	ルクソールファストブルー
MRI	磁気共鳴画像
NOAEL	無毒性量
PAH	肺動脈性肺高血圧症
TK	トキシコキネティクス

2.6.6. 毒性試験の概要文

2.6.6.1. まとめ

アンブリセンタンの毒性については、既承認申請において審査された資料（1.13.1.3.）により既に評価されている。本承認申請は 8 歳以上の小児における肺動脈性肺高血圧症に対するアンブリセンタンの用量追加に係る製造販売承認事項一部変更承認申請であることから、幼若ラットを用いた 8 週間反復経口投与毒性試験を実施した。また、この試験において観察された脳重量低値及び異常呼吸音に関するフォローアップ試験として、脳における詳細な病理組織学的検査及び幼若ラットにおける呼吸機能への影響に関する試験（回復性の検討を含む）を新たに実施した。8 週間反復経口投与毒性試験は医薬品の安全性試験の実施に関する基準（GLP）に従って実施し、その他のフォローアップとして実施した試験も GLP の一般原則に従って実施した。投与量及び濃度は親化合物であるアンブリセンタンの量で示した。

各試験における主要所見の要約を以下に示す。

生殖発生毒性

幼若ラットを用いた 8 週間反復経口投与毒性試験（生後 7～62 日に投与）において、20 mg/kg/日群の雌雄各 1 例で死亡がみられたが、投与との関連性は不明であった。4 mg/kg/日以上の群で呼吸雑音、10 mg/kg/日以上の群で鼻甲介の炎症性変化、20 mg/kg/日群で体重増加量・摂餌量の低値、赤血球系パラメータの高値、心重量の高値及び脳重量の低値（4%）が認められた。脳重量低値に関連した一般状態の変化及び組織学的変化は認められなかった。また、対照群と 20 mg/kg/日群から採取した脳切片を用いてミエリン及びグリア細胞を特殊染色した追加の病理組織学的検査においても対照群及び 20 mg/kg/日群で明らかな相違は認められなかった。

幼若ラットにおける脳重量の低値と呼吸機能の変化との関連性を検討するため、アンブリセンタンの 20 mg/kg/日を生後 7～最長 36 日に投与した試験と、生後 7～26 日に投与した後に短期（2 日）又は長期（1 ヵ月）の休薬期間を設けた試験の計 2 試験を実施した。1 回目の試験では、異常呼吸音（クリック音）、無呼吸時間の延長を伴う低酸素血症及び脳重量の軽度低値がみられ、鼻腔上皮に軽微～軽度の炎症性変化（鼻甲介の閉塞には至らず）が認められた。2 回目の試験では、異常呼吸音（クリック音）及び無呼吸時間の延長を伴う低酸素血症がみられ、短期休薬期間終了後でも認められたが、長期休薬期間後では回復した。軟口蓋・咽頭・喉頭に投薬に関連した組織学的変化は認められなかった。長期休薬期間終了後に脳重量の軽度低値がみられたが、脳の病理組織学的検査及び神経行動学的検査において投薬に関連した変化は認められなかった。

2.6.6.2. 急性毒性試験

新たな試験は実施していない。

2.6.6.3. 反復投与毒性試験

新たな試験は実施していない。

2.6.6.4. 遺伝毒性試験

新たな試験は実施していない。

2.6.6.5. がん原性試験

新たな試験は実施していない。

2.6.6.6. 生殖発生毒性試験

アンブリセンタンが受胎能、胚・胎児発生、並びに出生前後の発生及び母体の機能に及ぼす影響は既に評価されている（1.13.1.3.）。本承認申請においては、アンブリセンタンが小児の成長発達に及ぼす影響について検討するため、幼若ラットを用いた 8 週間の反復経口投与毒性試験及びそのフォローアップ試験を実施した。実施した試験の一覧を 2.6.7.1.に示す。

2.6.6.6.1. 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

新たな試験は実施していない。

2.6.6.6.2. 胚・胎児発生に関する試験

新たな試験は実施していない。

2.6.6.6.3. 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

新たな試験は実施していない。

2.6.6.6.4. 新生児を用いた試験

2.6.6.6.4.1. 幼若ラットを用いた忍容性及び用量設定試験

本試験は、14 日間の忍容性フェーズ及び 14 日間の用量設定フェーズの 2 つから構成されている。忍容性フェーズでは生後 7 日のラット（各群雌雄各 6 匹）にアンブリセンタンの 0（媒体）、40、125 及び 400 mg/kg/日を、用量設定フェーズではラット（各群雌雄各 12 匹）に 0（媒体）、4、10 及び 40 mg/kg/日を投与した（生後 7 日=試験 1 日）。媒体には 0.66%塩化ナトリウム溶液を用いた。また、用量設定フェーズにおけるトキシコキネティクス評価のため、各群雌雄各 29 匹を追加した。

試験デザイン及び結果の要約を 2.6.7.11.に示す。忍容性フェーズにおいて 125 mg/kg/日以上の群で忍容性は示されず、体重減少（400 mg/kg/日群で試験 8 日に対照群の最大 0.71 倍）及び呼吸雑音がみられ、一般状態が悪化したため、試験 8～10 日（生後 14～16 日）に 125 mg/kg/日以上の群は早期安楽死させた。これらの群の多くの動物では剖検において下部消化管に異常内容物（橙黄色／ガス状）が認められた。

用量設定フェーズにおいて、4～40 mg/kg/日を投与したときの曝露量（Cmax 及び AUC）はおおむね用量に比例して増加し、雌雄で明らかな相違はみられなかった。忍容性フェーズの結果とは異なり、40 mg/kg/日群で忍容性は示されず、体重減少及び呼吸雑音が認められたため、試験 10～13 日（生後 16～19 日）に早期安楽死させた。40 mg/kg/日群では病理組織学的検査において鼻甲介の骨過形成及び嗅上皮における細胞配列異常が認められた。4 及び 10 mg/kg/日群では忍容性が示され、死亡は認められなかった。10 mg/kg/日群で一過性かつ低頻度の呼吸雑音がみられたが、その他に 4 及び 10 mg/kg/日群において体重増加量への影響及び肉眼的又は組織学的変化は認められなかった。

2.6.6.6.4.2. 幼若ラットを用いた 8 週間反復経口投与毒性試験

生後 7 日のラット（各群雌雄各 12 匹）にアンブリセンタンの 0（媒体）、4、10 及び 20 mg/kg/日を 8 週間経口投与した（生後 7 日=試験 1 日）。媒体には 0.66% (w/v)塩化ナトリウム溶液を用いた。休薬群として各群雌雄各 6 匹を追加し、投与期間終了後に 8 週間の回復期間を設けた。また、トキシコキネティクス評価のため、各群雌雄各 18 匹を追加した。

試験デザイン及び結果の要約を 2.6.7.15.1.に示す。曝露量（Cmax 及び AUC）はおおむね用量に比例して増加し、雌雄で明らかな相違はみられなかった。

20 mg/kg/日群で 2 例（雌雄各 1 例）の死亡（試験 15 及び 19 日）がみられたが、投与との関連性は不明［雄：おそらくは中等度の心外膜炎（原因不明）に関連、雌：不明］であった。

生存例の投与期間終了時の病理組織学的検査では、鼻甲介の上皮（嗅上皮／呼吸上皮／移行上皮）において、10 mg/kg/日以上の群で炎症、20 mg/kg/日群で萎縮／再生／細胞配列異常／過形成、鼻甲介の出血／気道の炎症性滲出液が認められた。これらの変化に関連して、10 及び 20 mg/kg/日群では試験 6～7 日以降に呼吸雑音が認められ、大部分の動物で試験 33 日まで観察されたが、それ以降はいずれの群でも発現例数は減少し、投与期間終了時では数例でのみ確認された。4 mg/kg/日群においても呼吸雑音がみられたが、10 mg/kg/日以上の群よりも発現例数／回数は低かった（雌雄でそれぞれ 9/18 及び 3/18 例、試験 13～26 日で最大

3 回）。また、20 mg/kg/日群では体重増加量の低値及び摂餌量の低値（離乳後）、赤血球系パラメータ（赤血球数、ヘマトクリット、ヘモグロビン等）の軽度高値及び心重量の高値が認められた。休薬後においては、20 mg/kg/日群で心重量の高値がみられたが、それ以外の変化はいずれもおおむね回復した。

全投薬群において試験 8 週に瞳孔膜遺残（片側／両側性）の発現頻度の増加がみられた。瞳孔膜は前部水晶体血管膜が消失せず残ったものであり[久保田, 1998]、げっ歯類では通常、生後 10～12 日までにおおむね消失する[Ito, 1999]。ET-1 及び ET-1 受容体は眼においても発現しており[Kalani, 2008; Keles, 2014]、また、エンドセリンが神経堤細胞の増殖・分化において重要な役割を担っている[Brand, 1998]ことから、アンブリセンタンに関連した変化である可能性は否定できない。しかしながら、眼科学的検査及び病理組織学的検査においてその他に眼の構造への影響はみられておらず、一般状態や摂餌／摂水行動に明らかな異常も観察されていないことから、本所見は悪影響とは判断されなかった。

20 mg/kg/日群の雌雄で投与期間終了後に脳重量の低値（4%）がみられ、雌では休薬後においても低値を示した。なお、脳重量低値に関連した中枢系への影響を示唆する一般状態変化、並びに脳における肉眼的及び組織学的変化は観察されなかった。

全投薬群で尺骨長の軽度短縮がみられ、4 及び 10 mg/kg/日では一過性に、20 mg/kg/日群の雌雄では投与期間を通して低値を示したが、投与期間終了時までの尺骨長の総伸長量はいずれの群（対照群を含む）でもおおむね同程度であった。本所見は体重増加量の低値に関連した変化と考えられる。

以上のように、10 mg/kg/日以上の群での鼻腔等への悪影響がみられたことから、本試験における無毒性量は雌雄ともに 4 mg/kg/日と推定された。本用量投与時の試験 8 週における AUC 及び Cmax は雄でそれぞれ 7.91 μg.h/mL 及び 2.90 μg/mL、雌でそれぞれ 9.70 μg.h/mL 及び 3.72 μg/mL であった。

2.6.6.6.4.3. 脳重量低値に関する追加病理組織学的検査

幼若ラットを用いた 8 週間反復経口投与毒性試験（2.6.6.6.4.2.）で認められた脳重量の低値について検討するため、詳細な脳の病理組織学的検査を実施した。先の試験において投与期間終了時に剖検した対照群及び 20 mg/kg/日群の全例から採取した脳切片を HE・LFB-CS で染色した後、ミエリン塩基性蛋白質及びグリア線維性酸性タンパク質を免疫染色し、定性的評価を行った。

試験デザイン及び結果の要約を 2.6.7.15.2.に示す。対照群及び 20 mg/kg/日群から採取した脳切片において脳重量の低値に関連するような明らかな相違は認められなかった。

2.6.6.6.4.4. 幼若ラットにおける呼吸機能への影響に関する試験（1）

幼若ラットを用いた 8 週間反復経口投与毒性試験（2.6.6.6.4.2.）で認められた脳重量の低値と呼吸機能の変化との関連性を検討するため、ラット（各群雌雄各 18 匹）にアンブリセンタンの 0（媒体）及び 20 mg/kg/日を生後 7 日から生後 20、27 又は 36 日まで経口投与し、各時点で各群雌雄各 6 匹を剖検した（生後 7 日=試験 1 日）。媒体には 0.66%塩化ナトリウム溶液を用いた。酸素飽和度測定を生後 19、26 及び 35 日に、換気量測定（全身プレチスモ

グラフィにより）、動脈血ガス分析、体重・脳重量測定及び鼻部（鼻腔及び鼻咽頭）の病理組織学的検査を生後 20、27 及び 36 日に実施した。

試験デザイン及び結果の要約を 2.6.7.15.3.に示す。投薬に関連する死亡は認められなかった。20 mg/kg/日群で生後 17～36 日に異常呼吸音（クリック音）が観察された。また、先の試験（2.6.6.6.4.2.）と同様、20 mg/kg/日群で試験 2 週目より体重増加量の低値がみられ、これに伴い生後 36 日に体重の低値（対照群と比較して雌雄でそれぞれ 13 及び 20%）が認められた。20 mg/kg/日群の雌で生後 20、27 及び 36 日に脳重量の低値（それぞれ 1.4、1.3 及び 2%）がみられ、雄でも生後 27 及び 36 日に低値（それぞれ 5.7 及び 7.6%）が認められた。

投薬に関連した低酸素血症が生後 20 日にみられ、その後の測定時点（生後 27 及び 36 日）においてもおおむね一貫して認められた。低酸素血症は雌雄でおおむね同程度であった。20 mg/kg/日群の雄における動脈血酸素分圧は、生後 20、27 及び 36 日でそれぞれ 74、64 及び 52 mm Hg の低値（それぞれ 19、31 及び 39%低値）を示した。酸素飽和度の低下が雌雄ともに生後 19、26 及び 35 日にみられ、動脈血酸素飽和度（動脈血中の酸素結合ヘモグロビンの相対量）は対照群と比較して 1.5～6.5%の低値を示した。また、雄では二酸化炭素分圧が生後 20、27 及び 36 日でそれぞれ 57、57 及び 61 mmHg の高値（それぞれ 50、43 及び 45%）を示した。20 mg/kg/日群で生後 20、27 及び 36 日に呼吸数の低値がみられ、対照群と比較して、雄でそれぞれ 14、9 及び 10%低値、雌でそれぞれ 5、3 及び 5%低値であったが、20 mg/kg/日群で生後 20、27 及び 36 日に呼気終末休止期の延長（雄でそれぞれ 94、723 及び 211%、雌でそれぞれ 72、655 及び 233%）が認められた。動脈血中の酸素分圧の低下を伴う二酸化炭素分圧の上昇は一般的に低換気症を示唆するが、換気量測定では動脈血ガスの変化を説明しうる総肺換気量（分時容積）への影響は認められなかった。呼気終末休止期の延長は呼吸周期における無呼吸発作を示唆するものであり、呼気終末休止期の延長が動脈血ガスの変化の原因である可能性が考えられる。

病理組織学的検査では、20 mg/kg/日群で鼻腔（扁平上皮、呼吸上皮、嗅上皮又は移行上皮）に軽微～軽度のびらん、萎縮／細胞配列異常、アポトーシス／単細胞壊死、再生、扁平上皮化生、炎症性滲出液又は混合性炎症細胞浸潤が認められたが、これらの変化の程度は上気道の閉塞を引き起こすほどではないと考えられた。

2.6.6.6.4.5. 幼若ラットにおける呼吸機能への影響に関する試験（2）

先の試験（2.6.6.6.4.2.及び 2.6.6.6.4.4.）で幼若ラットにおいて観察された脳重量の低値又はその原因の可能性が考えられる低酸素血症に関連した中枢神経系への影響の有無、呼吸機能への影響の回復性、並びに異常呼吸音及び無呼吸が上気道の局所閉塞によるものか否かについて検討するため、幼若ラット（各群雌雄各 24 匹）にアンブリセンタンの 0（媒体）及び 20 mg/kg/日を生後 7～26 日に経口投与した（生後 7 日=試験 1 日）。各群雌雄各 6 匹からなるサブグループを 3 つ設け、それぞれ投与期間終了時、短期（2 日間：アンブリセンタンの半減期の 5 倍以上となるように設定）休薬期間終了後及び長期（28 日間）休薬期間終了後に剖検した。神経行動学的検査（触反応、興奮／鎮静状態の確認、対光反射、筋緊張等）を投与期間終了時（生後 25 日）及び長期休薬期間終了後（生後 53 日）に実施した。換気量測定（全身プレチスモグラフィにより）、動脈血ガス分析、体重・脳重量測定、脳・軟口

蓋・咽頭・喉頭（喉頭蓋を含む）の病理組織学的検査及び脳における低酸素応答遺伝子の発現解析を生後 26、28 及び 54 日に実施した。また、呼吸異常と関連する可能性のある鼻咽頭組織の動的変化を可視化するため、生後 26/27、28/29 及び 53/54 日の各時点において各群雌雄各 2 匹に麻酔を施し、MRI 検査を実施した。

試験デザイン及び結果の要約を 2.6.7.15.4.に示す。20 mg/kg/日群の 1 例では、体重減少及び脱水がみられたため、生後 17 日に安楽死させた。一般状態悪化の原因は特定されず、投与との関連性は不明であった。20 mg/kg/日群では反復投与により異常呼吸音（クリック音）がみられた。クリック音は生後 11 日（試験 5 日）から発現し、その後、生後 17 日（試験 11 日）から投与期間終了時まで全例で認められた。クリック音は短期休薬期間終了後（生後 28 日）でも全例でみられ、長期休薬期間終了群においても大部分の動物で生後 39 日まで観察されたが、その後、長期休薬期間中（生後 48 日）に消失した。

20 mg/kg/日群における生後 13、20 及び 26 日の体重増加量は、対照群と比較してそれぞれ 9～11%、14～18%及び 14～15%低値であった。短期休薬期間中では体重増加量の高値がみられたが、長期休薬期間中は対照群と同程度又はそれ以下であった。また、20 mg/kg/日群の生後 26、28 及び 54 日における体重は、対照群と比較して雄でそれぞれ 7、6 及び 9%低値、雌でそれぞれ 10、7 及び 3.7%低値であった。脳重量については、投与期間終了時（生後 26 日）には影響はみられなかったが、短期及び長期休薬期間終了後では、対照群と比較して、20 mg/kg/日群の雄で生後 54 日に 2.7%、雌で生後 28 及び 54 日にそれぞれ 1.9 及び 2.9%の低値であった。

投薬に関連した低酸素血症及び高炭酸ガス血症が生後 26 日及び短期休薬期間終了後（生後 28 日）に認められたが、長期休薬期間終了後（生後 54 日）では認められなかった。また、動脈血中の酸素分圧の低下及びそれに伴う二酸化炭素分圧の上昇が投与期間終了時（生後 26 日）及び短期休薬期間終了後（生後 28 日）にみられたが、長期休薬期間終了後（生後 54 日）では対照群と同程度であった。低酸素血症は雌雄でおおむね同程度であった。

20 mg/kg/日群で呼気終末休止期の延長及び最大呼気流量の増加が投与期間終了時及び短期休薬期間終了後（生後 28 日）にみられたが、長期休薬期間終了後（生後 54 日）では対照群と同程度であった。

神経行動学的検査において投薬に関連した変化は認められなかった。

脳・軟口蓋・咽頭・喉頭（喉頭蓋を含む）の病理組織学的検査において投薬に関連した変化は認められなかった。クリック音と関連する可能性のある呼吸中の組織の動きを可視化するため、麻酔下で能動呼吸中のラットの軟口蓋、鼻咽頭及び喉頭蓋を MRI により画像化した（in vivo）。その結果、軟口蓋の形態に対照群と 20 mg/kg/日群で明らかな変化はみられなかったが、解像度の限界により鼻咽頭付近の組織（軟口蓋、喉頭蓋及び披裂軟骨）の相互作用については明らかにはできなかった。形態計測データはばらつきが大きかったため、用いたサンプル数（各群雌雄各 2 例）では最終的な判断に至る結果は得られなかった。また、ラット頭部の病理組織サンプルを用いて喉頭蓋長を測定した ex vivo MRI 検査においても対照群と 20 mg/kg/日群で明らかな相違は認められなかった（サンプル数：各群雌雄各 2 例）。

生後 26、28 及び 54 日に採取したラット脳サンプル中の低酸素応答遺伝子発現に投薬に関連した変化はみられなかった。

2.6.6.7. 局所刺激性試験

新たな試験は実施していない。

2.6.6.8. その他の毒性試験

新たな試験は実施していない。

2.6.6.9. 考察及び結論

幼若ラットにおけるアンブリセンタンの毒性を評価するために、幼若ラットを用いた 8 週間経口投与毒性試験及びそのフォローアップ試験を実施した。

幼若ラットを用いた 8 週間反復経口投与毒性試験において、アンブリセンタンの 4、10 及び 20 mg/kg/日を生後 7～62 日に経口投与した結果、4 mg/kg/日以上の群で呼吸雑音、10 mg/kg/日以上の群で鼻腔への悪影響（炎症、上皮の萎縮･再生･過形成等）、20 mg/kg/日群で体重増加量及び摂餌量の低値並びに赤血球系パラメータの軽度の高値及び心重量の高値が認められた。8 週間の休薬後においても 20 mg/kg/日群で心重量の高値がみられたが、それ以外の所見はいずれもおおむね回復した。投与期間終了時では、全投薬群で瞳孔膜遺残の発現頻度増加及び尺骨長の軽度短縮がみられ、20 mg/kg/日群では脳重量の低値（4%）（雌では休薬後でも低値）が観察された。なお、脳重量の低値に関連した中枢神経系への影響を示唆する一般状態変化はみられず、脳の病理組織学的検査（ミエリン及びグリア細胞の免疫組織化学染色による評価を含む）においても投薬による影響は認められなかった。10 mg/kg/日以上の群における鼻腔への影響等に基づき、無毒性量は雌雄ともに 4 mg/kg/日と推定された。このときの試験 8 週における AUC 及び Cmax（雌雄合算値）はそれぞれ 8.81 μg.h/mL 及び 3.31 μg/mL であり、小児患者においてアンブリセンタンの高用量（5～10 mg）を投与したときの推定曝露量（AUC 及び Cmax）のそれぞれ 1.0 及び 3.4 倍に相当する（表 2.6.6-1）。

上記試験で観察された脳重量低値と呼吸機能の変化との関連性を検討するために実施した 1 回目の呼吸機能への影響に関する試験（2.6.6.6.4.4.）では、アンブリセンタンの 20 mg/kg/日を生後 7 日から生後 20、27 又は 36 日まで経口投与した。試験 11 日（生後 17 日）以降、異常呼吸音（呼吸周期と明らかに同調した呼吸休止を伴うクリック音）がみられ、投与期間終了時の生後 20、27 又は 36 日の検査では、呼吸周期中の呼気終末休止期（無呼吸時間）の延長、低酸素血症及び脳重量低値（雄で 5.7～7.6%、雌で 1.3～2%）が認められた。鼻咽頭部の病理組織学的検査では、鼻腔に軽微～軽度な炎症性変化がみられたが、上気道閉塞に至る程度ではなく、その他に投薬に関連した変化は認められなかった。本試験の結果を踏まえて実施した 2 回目の呼吸機能への影響に関する試験（2.6.6.6.4.5.）では、アンブリセンタンの 20 mg/kg/日を生後 7～26 日に経口投与した。試験 5 日（生後 11 日）からクリック音がみられ、試験 11 日（生後 17 日）以降、投与期間終了時まで全例で観察されたが、投与期間終了約 3 週間後ではいずれの動物においても観察されなかった。投与期間終了時（生後 26 日）及び休薬 2 日後（生後 28 日）の検査では、低酸素血症、高炭酸ガス症、呼気終末休止期（無呼吸時間）の延長及び最大呼気流量の増加がみられたが、休薬 1 ヵ月後（生後 54 日）には消失した。脳重量の変化は投与期間終了時にはみられなかったが、休薬 2 日後（生

後 28 日）及び休薬 1 ヵ月後（生後 54 日）に低値［雄で 2.7%（生後 54 日）、雌で 1.9 及び 2.9%（それぞれ生後 28 及び 54 日）］が認められた。神経行動学的検査、脳組織の低酸素応答遺伝子の発現解析及び脳・咽頭・喉頭部（喉頭蓋を含む）の病理組織学的検査において、投薬に関連した変化は認められなかった。

上述した毒性試験において、アンブリセンタンを投与した幼若ラットで脳重量の低値がみられたが、脳の組織学的変化は認められなかった。げっ歯類では、幼若期（生後 2 日以降の脳が急速に発達する重要な期間）に低酸素条件下で飼育した場合、脳重量が低値を示すことが報告されている[Ment, 1998; Farahani, 2008]。フォローアップ試験では、生後 20～36 日の検査で低酸素血症が認められている。これらのことから、脳重量低値については、同時に観察された低酸素血症によるものと考えられる。フォローアップ試験で実施した上気道の病理組織学的検査では、鼻腔に軽微～軽度な炎症性変化がみられたが、上気道閉塞に至る程度ではなく、その他に投薬に関連した変化は認められなかった。下気道（肺・気管）の病理組織学的検査については、これらのフォローアップ試験では実施していないが、8 週間反復経口投与毒性試験において異常は認められなかった。このように、生後 20 日以降に観察された低酸素血症に関連する呼吸器の組織学的変化は認められなかった。一方、フォローアップ試験では、低酸素血症が投与期間終了時及び短期休薬期間終了時に観察され、同時期にクリック音及び無呼吸時間の延長も認められた。これらの所見はいずれも長期休薬期間終了時には消失した。これらのことから、低酸素血症についてはクリック音及び無呼吸に関連した変化と考えられる。フォローアップ試験において、これらの呼吸異常と関連すると考えられる組織学的変化は認められなかったが、クリック音についてはヒト小児において軟口蓋筋の異常な運動に関連していることが報告されている[Schwartz, 2012]。アンブリセンタンは、他の ET_A 受容体阻害薬と同様、ラットの胚・胎児発生試験において軟口蓋、硬口蓋、下顎等の頭頸部の形態形成異常を引き起こす（1.13.1.3.）ことから、これらの組織に作用する可能性が示唆される。また、ラットでは軟口蓋の発達は生後 6～8 週まで継続し[Srivastava, 1979]、上記の試験における投与時期（生後 7～最長 36 日）はこの時期と一致している。これらのことから、クリック音及び無呼吸時間の延長については、アンブリセンタンが呼吸時の軟口蓋及び喉頭蓋の機能的連動を障害し、各呼吸周期における上気道の断続的な閉鎖を引き起こしたことによるものと推察される。アンブリセンタンを生後 63 日まで投与した 8 週間反復経口投与毒性試験では、10 及び 20 mg/kg/日群で試験 6～7 日以降に呼吸雑音が認められ、大部分の動物で試験 33 日まで観察されたが、それ以降は投与期間中にもかかわらず、いずれの群でも発現例数は減少し、投与期間終了時では数例でのみ確認された。このことから、本所見は永続的な変化ではなく、成長に伴い消失することが示唆される。

ヒト乳幼児期では、上気道の構造が解剖学的にげっ歯類及び他の哺乳類と類似しており、軟口蓋と喉頭蓋が接近し、食道と気道を分離することで哺乳と呼吸を同時に行うことができる。ヒトでは、成長に伴い舌骨及び喉頭が下降し始め、喉頭下降は生後 3 年には完了する。そのため、その後は、乳幼児期のように軟口蓋と喉頭蓋が近接し相互作用することはない[Laitman, 1993; Barsh, 1999]。また、ヒトでは生後急速に脳が発達し、約 2～3 歳までに脳重量は成人の約 90～95%に達する[Semple, 2013]。これらのことから、本承認申請の対象であ

る 8 歳以上の小児患者において、幼若ラットで観察されたような呼吸障害及び脳重量低値が生じるリスクは極めて低いと考えられる。

以上のように、幼若動物の 8 週間反復経口投与試験における無毒性量での曝露量は、小児患者の臨床曝露量と同程度以上であった。本試験では、脳重量の低値が認められたが、本所見は軟口蓋及び喉頭蓋に対する本薬の影響により生じたこれらの部位における呼吸時の機能的連動障害と、それに関連した上気道の断続的な閉塞による無呼吸時間の延長並びに低酸素血症によるものと考えられる。喉頭下降が未完で咽喉頭部の発達が完了していない乳幼児（0～3 歳）では、幼若ラットと同様、呼吸障害及び低酸素血症により、脳重量への影響が発現する可能性は否定できない。しかしながら、喉頭下降が完了する 4 歳以上では、軟口蓋及び喉頭蓋は近接しておらず、本申請の対象年齢である 8 歳以上の小児患者において、これらの所見が発現するリスクは極めて低いと考えられる。これらのことから、アンブリセンタンを予定用法・用量で 8 歳以上の小児 PAH 患者に投与することにより、危惧すべき作用が発現する可能性は極めて低いと考えられる。

表 2.6.6-1　アンブリセンタンの経口投与時の動物／ヒト曝露量比

試験の種類	投与量 (mg/kg/日)	性	Cmax (μg/mL)		AUC (μg.h/mL)		動物／ヒト曝露量比			
							Cmax		AUC	
			Day 1	Week 8	Day 1	Week 8	Day1	Week 8	Day1	Week 8
8 週間投与試験 (2012N143182)	4 (NOAEL)	M	2.42	2.90	18.4	7.91	2.5	3.0	2.0	0.9
		F	2.59	3.72	24.4	9.70	2.6	3.8	2.7	1.1
		MF	2.50	3.31	21.4	8.81	2.6	3.4	2.3	1.0
	10	M	7.14	7.94	57.2	21.9	7.3	8.1	6.3	2.4
		F	6.08	3.87	47.8	8.92	6.2	3.9	5.2	1.0
		MF	6.61	5.91	52.5	15.4	6.7	6.0	5.7	1.7
	20	M	11.8	11.5	96.6	43.4	12.0	11.7	10.6	4.7
		F	11.2	13.7	81.9	26.9	11.4	14.0	9.0	2.9
		MF	11.5	12.6	89.3	35.1	11.7	12.8	9.8	3.8
ヒト小児 [a]	高用量 (5-10 mg)	-	0.981		9.15		NA		NA	

M＝ 雄、F＝ 雌、MF＝ 雌雄合算平均値、NA＝ 該当せず、Day1＝生後 7 日
a＝8 歳以上 18 歳未満の小児 PAH 患者を対象とした AMB112529 試験で得られた成績をもとにした推定値（2.7.2.3.1.2.2.）

2.6.6.10. 図表

図表は本文中に記載した。

2.6.6.11. 参考文献

Barsh LI. The Origin of Pharyngeal Obstruction during Sleep. Sleep Breath. 1999;3:17-22.

Brand M, Le Moullec JM, Corvol P, et al. Ontogeny of endothelins-1 and -3, their receptors, and endothelin converting enzyme-1 in the early human embryo. J Clin Invest. 1998;101(3):549-59.

Farahani R, Kanaan A, Gavrialov O, et al. Differential Effects of Chronic Intermittent and Chronic Constant Hypoxia on Postnatal Growth and Development. Pediatr Pulmonol. 2008;43(1):20-8.

Ito M, Yoshioka M. Regression of the hyaloid vessels and papillary membrane of the mouse. Ant Embryol. 1999;200(4):403-11.

Kalani M. The importance of endothelin-1 for microvascular dysfunction in diabtes. Vasc Health Risk Manag. 2008;4(5):1061-8.

Keles S, Halici Z, Atmaca HT, et al. The ocular endothelin system: a novel target for the treatment of endotoxin-induced uveitis with bosentan. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2014;55(6):3517-24.

Laitman JT, Reidenberg JS. Specializations of the human upper respiratory and upper digestive systems as seen through comparative and developmental anatomy. Dysphagia. 1993;8:318-25.

Ment LR, Schwartz M, Makuch RW, et al. Association of chronic sublethal hypoxia with ventriculomegaly in the developing rat brain. Brain Res Dev Brain Res. 1998;111(2):197-203.

Schwartz RH, Bahadori RS, myseros JS. Loud Clicking Sounds Associated With Rapid Soft Palate Muscle Contractions. Pediatr Emerg Care. 2012;28(2):158-9.

Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, et al. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. Prog Neurobiol. 2013;106-107:1-16.

Srivastava HC, Vyas DC. Postnatal development of rat soft palate. J Anat. 1979;128(1):97-105.

久保田 敏昭, 本田 祐恵, 猪俣 孟. 眼の組織・病理アトラス・145 瞳孔膜遺残. 臨眼. 1998;52(12):1770-1.

2.6.7. 毒性試験概要表

2.6.7.1. 毒性試験：一覧表

Test Article: Ambrisentan

Type of Study	Species (strain)	Method of Admin.	Animals/ Sex/Group	Doses (mg/kg/day)	Duration of Dosing	GLP	Testing Facility	Report Number (Study Number)	Location in CTD
Juvenile Toxicity									
	Rat (Wistar)	Oral (gavage)	6M/6F 12M/12F	0, 40, 125, 400 0, 4, 10, 40	14 days	No	[redacted]	2011N126125 (R29641)	m4.2.3.5.4
	Rat (Wistar)	Oral (gavage)	12M/12F 6M/6F R 18M/18F TK	0, 4, 10, 20	8 Weeks (8 weeks recovery)	Yes	[redacted]	2012N143182 (R29823)	m4.2.3.5.4
	Rat (Wistar)	NA	12M+12F	0, 20	NA	Yes	GSK	2015N234412 (V31139G)	m4.2.3.5.4
	Rat (Wistar)	Oral (gavage)	18M+18F	0, 20	Up to 30 days (PND 7 to 36)	No	GSK	2014N219912 (R70638N)	m4.2.3.5.4
	Rat (Wistar)	Oral (gavage)	24M+24F	0, 20	Up to 20 days (PND 7 to 26)	No	GSK	2017N319267 (R71004N)	m4.2.3.5.4

Key:
M = Male, F = Female
TK = Toxicokinetic animals, R = Recovery Animals
PND = Postnatal Day
NA = Not applicable

Testing Facility:
[redacted] = [redacted]
GSK = GlaxoSmithKline

2.6.7.2. トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧

Type of Study	Species (Strain)	Method of Administration	Dose (mg/kg/day)	Duration of Dosing	GLP	Report No. (Study No.)	Location in CTD
Toxicokinetics	Rat (Wistar)	Oral (gavage)	0, 4, 10, 40	14 Days	No	2011N126125 (R29641)	m4.2.3.5.4
Toxicokinetics	Rat (Wistar)	Oral (gavage)	0, 4, 10, 20	8 weeks	Yes	2012N143182 (R29823)	m4.2.3.5.4

2.6.7.3. トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧

Overview of toxicokinetics data – AUC0-t (µg.h/mL)

Dose (mg/kg/day)	Rat	
	Male	Female
4[a]	21.7	19.6
4[b]	7.91	9.70
10[a]	46.5	49.7
10[b]	21.9	8.92
20[b]	43.4	26.9
40[a]	276*	306*

a = 2011N126125
b = 2012N143182
* = Samples collected at premature termination when animals had received up to 10-13 doses.

2.6.7.4. 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧

Test Article: Ambrisentan

Batch Number	Purity (%)	Impurities									Report (Study) Number	Type of Study
		Specified						Unspecified	Total	R-Enantiomer		
		A	B	C	D	E	F					
PROPOSED SPECIFICATION (% area)	98.0-102.0	NMT 0.15	NMT 0.15	NMT 0.15	NMT 0.15	NMT 0.15	NMT 0.15	NMT 0.10	NMT 0.5	NMT 0.5		
1005943	99.6	≤0.05	≤0.05	≤0.05	≤0.05	≤0.05	≤0.05	RRT 0.76 = 0.07	0.07	0.2	2012N143182 (R29823)	Juvenile toxicity

Key:
A = Benzophenone (starting material)
B = 4,6-dimethyl-2-(2,2-diphenyl-vinyloxy) pyrimidine (degradant)
C = 2-hydroxy-3-methoxy-3,3-diphenyl propionic acid (intermediate)
D = 4,6-dimethyl-2-methylsulfonylpyrimidine (starting material)
E = (S)-1-(4-Chlorophenyl) ethylamine
F = 2-Hydroxy-3-methoxy-3,3-diphenylpropionic acid methyl ester

2.6.7.5. 単回投与毒性試験

新たな試験は実施していない。

2.6.7.6. 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

新たな試験は実施していない。

2.6.7.7. 反復投与毒性試験：重要な試験

新たな試験は実施していない。

2.6.7.8. In Vitro 遺伝毒性試験

新たな試験は実施していない。

2.6.7.9. In Vivo 遺伝毒性試験

新たな試験は実施していない。

2.6.7.10. がん原性試験

新たな試験は実施していない。

2.6.7.11. 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

Test Article: Ambrisentan

Species/ Strain	Route (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)	Number of Animals/Sex	Noteworthy Findings	Report/ (Study No.)
Juvenile Rat (Wistar)	Oral (gavage) (solution in 0.66% (w/v) aqueous sodium chloride)	14 Days	Tolerability phase: 0, 40, 125, 400	6M/6F	Treatment with ambrisentan at 125 or 400 mg/kg/day exceeded the maximum tolerated dose. Weight loss (at 400 mg/kg/day up to 0.71X of Control at Day 8) and respiration changes necessitated the premature sacrifice of both groups between Day 8 and 10 of treatment (Days 14 and 16 of age) and gastrointestinal changes were evident macroscopically.	2011N126125 (R29641)
			DRF phase: 0, 4, 10, 40	12M/12F	Although previously tolerated for 14 days, 40 mg/kg/day was not tolerated in the DRF phase. Weight loss and noisy respiration necessitated premature sacrifice of this group between Day 10 and 13 of treatment. Ambrisentan at 40 mg/kg/day evoked microscopic nasal changes (osseous hyperplasia of turbinates and disorganization of olfactory epithelium). Dose levels of 4 or 10 mg/kg/day were tolerated for 14 days, with no mortalities, a low incidence of transient noisy respiration at 10 mg/kg/day, no clear effects on mean body weight gain and no treatment-related macroscopic or microscopic abnormalities.	

2.6.7.12. 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

新たな試験は実施していない。

2.6.7.13. 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

新たな試験は実施していない。

2.6.7.14. 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

新たな試験は実施していない。

Jul 09 2020 11:28:07

2.6.7.15. 新生児を用いた試験

2.6.7.15.1. 幼若ラットを用いた 8 週間反復投与毒性試験

Report Title: GSK1325760: Toxicity study in the neonatal/juvenile rat by oral (gavage) administration for 8 weeks (from Day 7 of age) with 8 weeks of recovery

Test Article: Ambrisentan

Species/Strain: Rat/RccHan™;WIST.

Duration of Dosing: 8 weeks (from Day 7 of age)

Duration of Recovery: 8 weeks

GSK Document Number: 2012N143182_00

GSK Reference No.: R29823

Initial Age: Day 7 of age

Route/Frequency: Oral by gavage, once daily

Batch No.: 1005943

Date of First Dose: 20 October 2011

Vehicle/Formulation: 0.66% (w/v) aqueous sodium chloride

Study in Compliance with GLP: Yes

Data Collected: Dose concentration, toxicokinetics, clinical observations, body weights, food consumption, ulna length/growth, sexual maturation, ophthalmoscopy, haematology, clinical chemistry, urinalysis, organ weights, macroscopic and microscopic pathology

Conclusion: There were two deaths during the study (one male and one female) in the 20 mg/kg/day group which were considered of uncertain relationship to the administration of ambrisentan. Adverse epithelial changes in the nasal cavity were apparent, comprising inflammation at 10 or 20 mg/kg/day and atrophy/regeneration/ disorganisation/hyperplasia, haemorrhage and inflammatory exudate in the airways at 20 mg/kg/day, which correlated with in-life signs of noisy nasal respiration. Following the onset of these clinical signs, and as a consequence of these respiratory changes, reductions in body weight gain and food intake (from weaning) were apparent at 20 mg/kg/day, along with some minor variations in red cell parameters and an increase in heart weight. Reversibility of the nasal epithelium and red cell parameter changes occurred with the cessation of treatment. Heart weight was still increased at the end of the 8-week recovery period. In all treated groups, at Week 8 of treatment, there was an increase (compared to Controls) in the incidence of unilateral/bilateral persistent pupillary membrane on the iris. Adjusted brain weight was marginally low for males and females at 20 mg/kg/day after 8 weeks of treatment, and was still apparent in females at the end of the 8-week recovery period. There was an effect of treatment on mean ulna length. A transient effect on growth was observed at 4 and 10 mg/kg/day. Mean ulna length was slightly shorter for males and females at 20 mg/kg/day on each recording occasion throughout treatment. At the end of the treatment period, overall mean change (growth) of the ulna was similar in all treatment groups. Based on the nasal effects at doses ≥10 mg/kg/day, the No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) for systemic toxicity was considered to be 4 mg/kg/day in both sexes (Week 8 mean AUC0-t 7.91 µg.h/mL, Cmax 2.90 µg/mL for males and Week 8 mean AUC0-t 9.70 µg.h/mL, Cmax 3.72 µg/mL for females).

2.6.7.15.1. 幼若ラットを用いた 8 週間反復投与毒性試験（続き）

Test Article: Ambrisentan

	Male				Female			
Daily Dose (mg/kg/day)[a]	0	4	10	20	0	4	10	20
Numbers of Animals: Main	12	12	12	12	12	12	12	12
Recovery	6	6	6	6	6	6	6	6
Toxicokinetic (Single Dose on Day 1)	18	18	18	18	18	18	18	18
AUC(0-t) (µg.h/mL) Day 1 of treatment	-	18.4	57.2	96.6	-	24.4	47.8	81.9
Week 8	-	7.91	21.9	43.4	-	9.70	8.92	26.9
Cmax (µg/mL) Day 1 of treatment	-	2.42	7.14	11.8	-	2.59	6.08	11.2
Week 8	-	2.90	7.94	11.5	-	3.72	3.87	13.7
Noteworthy Findings								
Unscheduled Deaths	0	0	0	1[d]	0	0	0	1[d]
Clinical Observations	Noisy nasal respiration was observed at a low incidence at 4 mg/kg/day and in the majority of animals receiving 10 or 20 mg/kg/day. Signs generally became apparent from Day 6-10 of treatment and persisted in the majority of animals at 10 mg/kg/day until Day 33 of treatment and until Day 43 of treatment at 20 mg/kg/day, after which the signs were only recorded at a low incidence.							
Ophthalmoscopy								
Number examined (Week 8)	18	18	18	17	18	18	18	17
Persistent pupillary membrane								
Unilateral	0	2	3	6	0	2	0	4
Bilateral	0	1	2	3	0	1	1	3
Body Weight Gain (X Control[c])								
Day 1-6	13.4g	0.97	0.94	0.95	13.2g	0.96	0.92	0.96
Day 6-15	27.1g	0.97	0.91*	0.61**	25.0g	1.00	0.94	0.77**
Day 15-22	32g	1.03	0.94	0.88**	28g	0.93	0.93	0.86**
Day 22-29	45g	1.02	0.98	0.93*	35g	1.03	0.97	1.00
Day 29-57	153g	1.05	0.99	0.99	70g	1.04	1.10*	1.16*
Day 1-57	270.5g	1.03	0.98	0.92*	171.8g	1.01	1.01	1.01
Food Consumption (X Control[c])								
Day 15-28	14g/day	1.00	0.93	0.86**	13g/day	0.92	0.92*	0.85**
Day 28-42	23g/day	1.00	0.96	0.87**	18g/day	0.94	0.94	1.00
Day 43-56	25g/day	1.04	1.00	1.00	18g/day	1.00	1.00	1.06
Day 15-56	21g/day	1.00	0.95	0.90*	16g/day	1.00	1.00	1.00

2.6.7.15.1. 幼若ラットを用いた 8 週間反復投与毒性試験（続き）

Test Article: Ambrisentan

	Male				Female			
Daily Dose (mg/kg/day)[a]	0	4	10	20	0	4	10	20
Ulna Length (mm)								
Group mean change (mm) (Day 14-56)	14.7	14.9	14.7	14.2	13.0	12.9	13.2	12.8
Day 14	18.2	17.7**	17.6**	17.5**	17.8	17.5*	17.5*	17.3**
Day 28	25.2	24.8	24.8	23.8	24.5	24.2	24.1*	23.7**
Day 42	29.8	29.6	29.3	28.5	28.4	28.2	28.2	27.6*
Day 56	32.9	32.6	32.3	31.7	30.8	30.3	30.6	30.1*
Hematology[b]								
Hematocrit (L/L)								
Week 4	0.370	0.373	0.373	0.394*	0.373	0.381	0.393*	0.399*
Week 8	0.452	0.454	0.457	0.481**	0.442	0.441	0.466*	0.467*
Week 8 of recovery	0.474	0.471	0.455*	0.456*	0.447	0.456	0.439	0.454
Hemoglobin (g/dL)								
Week 4	12.0	11.8	11.9	12.5	11.7	12.0	12.3	12.5*
Week 8	15.0	15.0	15.2	15.8**	15.0	14.9	15.6	15.9**
Week 8 of recovery	16.2	16.0	15.5	15.9	15.3	15.4	15.1	15.5
Erythrocytes ($x10^{12}$/L)								
Week 4	6.11	6.02	6.22	6.24	6.18	6.11	6.42	6.68**
Week 8	8.04	8.05	8.12	8.23	7.96	7.92	8.36*	8.40*
Week 8 of recovery	9.43	9.47	8.83	9.30	8.43	8.50	8.25	8.77
Mean cell hemoglobin (pg)								
Week 4	19.5	19.7	19.2	20.0	19.0	19.7	19.2	18.8
Week 8	18.6	18.6	18.8	19.3**	18.9	18.9	18.7	18.9
Week 8 of recovery	17.2	16.9	17.6	17.1	18.1	18.2	18.3	17.7
Mean cell volume (fL)								
Week 4	60.6	62.0	60.0	63.3	60.4	62.4	61.2	59.6
Week 8	56.2	56.4	56.3	58.4**	55.6	55.7	55.7	55.7
Week 8 of recovery	50.3	49.8	51.6*	49.0	53.0	53.8	53.3	51.8

2.6.7.15.1. 幼若ラットを用いた 8 週間反復投与毒性試験（続き）

Test Article: Ambrisentan

	Male				Female			
Daily Dose (mg/kg/day)[a]	0	4	10	20	0	4	10	20
Red cell distribution width (%)								
Week 4	16.4	16.0	16.6	20.6**	15.7	16.7	17.6*	18.8**
Week 8	12.1	12.0	12.1	12.1	11.3	12.5	11.6	11.9*
Week 8 of recovery	12.8	12.8	12.6	13.1	11.2	11.1	11.3	11.6
Anisocytosis Week 4	An increased incidence of moderate/marked anisocytosis was observed in females at 10 mg/kg/day and males and females at 20 mg/kg/day.							
Total leucocytes ($x10^9$/L)								
Week 4	8.49	8.40	7.88	6.89	7.85	7.55	7.63	7.54
Week 8	8.18	10.10	8.58	8.13	5.59	5.87	6.22	6.76
Week 8 of recovery	8.85	8.66	8.76	8.80	5.53	5.68	6.60	6.09
Neutrophils ($x10^9$/L)								
Week 4	0.96	0.79	0.88	0.90	0.90	0.78	0.88	0.89
Week 8	1.05	1.21	1.15	0.99	0.61	0.76	0.82	0.88*
Week 8 of recovery	1.70	1.70	1.89	1.56	0.79	0.97	0.81	1.16
Lymphocytes ($x10^9$/L)								
Week 4	7.21	7.31	6.70	5.66	6.66	6.47	6.46	6.50
Week 8	6.82	8.51	7.07	6.82	4.75	4.88	5.14	5.60
Week 8 of recovery	6.79	6.55	6.47	6.87	4.52	4.45	5.52	4.58
Eosinophils ($x10^9$/L)								
Week 4	0.05	0.06	0.06	0.06	0.05	0.06	0.07	0.06
Week 8	0.06	0.07	0.08	0.08	0.05	0.06	0.08*	0.09**
Week 8 of recovery	0.07	0.09	0.10*	0.11*	0.06	0.10	0.09	0.13*
Clinical Chemistry[b]								
Creatinine (µmol/L)								
Week 4	9	9	8	5**	11	10	8	9
Week 8	28	29	24	25	33	33	31	32
Week 8 of recovery	33	35	32	33	-	-	-	-

2.6.7.15.1. 幼若ラットを用いた 8 週間反復投与毒性試験（続き）

Test Article: Ambrisentan

	Male				Female			
Daily Dose (mg/kg/day)[a]	0	4	10	20	0	4	10	20
Triglycerides (mmol/L)								
Week 4	0.81	0.98	0.75	0.69	0.71	0.67	0.54	0.58
Week 8	0.54	0.46	0.49	0.41	0.35	0.33	0.33	0.35
Week 8 of recovery	0.92	0.79	0.70	0.74	0.69	0.59	0.44	0.51
Sodium (mmol/L)								
Week 4	137	138	138	140*	137	139	139	138
Week 8	140	140	140	140	139	140	140	140
Potassium (mmol/L)								
Week 4	6.4	5.9	6.3	5.5	6.4	5.5	5.5	6.5
Week 8	4.8	4.8	4.7	4.6	4.6	4.4	4.4	4.3
Week 8 of recovery	5.1	5.5	4.6	4.8	-	-	-	-
Chloride (mmol/L)								
Week 4	101	100	98*	98*	100	100	98	97*
Week 8	101	101	99	99*	101	102	101	100
Week 8 of recovery	100	101	103*	100	101	101	100	99
Calcium (mmol/L)								
Week 4	2.62	2.62	2.62	2.71*	2.63	2.63	2.63	2.63
Week 8	2.67	2.65	2.68	2.70	2.62	2.65	2.69**	2.69**
Phosphorus (mmol/L)								
Week 4	2.59	2.61	2.92**	2.96**	2.75	2.64	2.82	2.87
Week 8	2.62	2.58	2.55	2.69	2.21	2.18	2.24	2.46**
Week 8 of recovery	1.82	1.78	1.98	1.93	1.45	1.57	1.76**	1.67**
Total protein (mmol/L)								
Week 4	49	49	48*	47**	50	49	49	48*
Week 8	60	59	58	57**	61	62	61	60

2.6.7.15.1. 幼若ラットを用いた 8 週間反復投与毒性試験（続き）

Test Article: Ambrisentan

Daily Dose (mg/kg/day)[a]	Male				Female			
	0	4	10	20	0	4	10	20
Organ Weights (X Control[c])								
Heart								
Terminal kill; Relative % body weight	0.332	0.99	1.08	1.29**	0.371	1.00	1.06	1.16**
Recovery kill; Relative % body weight	0.274	1.04	1.00	1.26**	0.334	1.03	1.03	1.13
Thymus								
Terminal kill; Relative % body weight	0.205	1.19*	1.26**	1.37**	0.276	0.96	1.06	1.12
Recovery kill; Relative % body weight	0.094	1.07	1.16	1.06	0.148	1.08	1.17	1.09
Brain								
Terminal kill; Absolute (adjusted - g)	1.91	0.98	0.99	0.96**	1.80	0.99	0.98	0.96*
Recovery kill; Absolute (adjusted - g)	1.97	1.02	1.02	0.98	1.88	0.98	0.99	0.96
Kidney								
Terminal kill; Relative % body weight	0.801	0.97	0.96	0.93*	0.802	0.98	0.96	0.98
Recovery kill; Relative % body weight	0.619	1.08	1.04	0.99	0.738	0.95	0.95	0.95
Liver								
Terminal kill; Relative % body weight	4.23	1.03	1.03	1.03	4.09	1.05	1.05	1.09*
Recovery kill; Relative % body weight	3.42	0.98	0.98	0.99	3.74	0.98	0.99	0.97
Microscopic Examination								
Nasal turbinates								
Terminal kill (no. examined)	12	12	12	11	12	12	12	11
Recovery kill (no. examined)	6	6	6	6	6	6	6	6
Terminal kill; Haemorrhage	1	1	1	5	1	1	1	0
Recovery kill; Haemorrhage	2	2	1	1	0	0	1	3
Terminal kill; Inflammatory Exudate in Airways	0	0	0	3	0	0	0	1
Terminal kill; Olfactory Epithelium - Atrophy/Disorganisation	0	0	0	5	0	0	0	1
Recovery kill; Olfactory Epithelium - Atrophy/Disorganisation	0	0	0	1	0	0	0	1
Terminal kill; Olfactory Nerve Fibres - Atrophy	0	0	0	1	0	0	0	0

2.6.7.15.1. 幼若ラットを用いた 8 週間反復投与毒性試験（続き）

Test Article: Ambrisentan

Daily Dose (mg/kg/day)[a]	Male				Female			
	0	4	10	20	0	4	10	20
Terminal kill; Respiratory Epithelium - Atrophy/Disorganisation	0	0	0	1	0	0	2	0
Terminal kill; Respiratory Epithelium - Inflammation	0	2	6	7	0	0	3	6
Terminal kill; Transitional Epithelium - Disorganisation/Regeneration	0	1	1	5	0	0	0	6
Recovery kill; Transitional Epithelium - Disorganisation/Regeneration	0	0	0	1	0	0	0	1
Terminal kill; Transitional Epithelium - Goblet Cell Hyperplasia	0	0	0	0	0	0	0	1
Recovery kill; Transitional Epithelium - Goblet Cell Hyperplasia	0	0	1	0	0	0	0	0
Terminal kill; Transitional Epithelium, Inflammation	0	0	0	3	0	0	0	1
Recovery kill; Transitional Epithelium, Inflammation	0	0	1	1	0	0	0	0

- Not examined

a. Doses expressed in terms of parent

b. For controls, group means are presented. For test article treated groups, change from control is shown. Statistical significance is based on actual data not change.

c. For controls, group means are shown for absolute and/or relative weights. For test article-treated groups, fold-change from control is shown.

d. One male at 20mg/kg/day was found dead on Day 15 of treatment. Microscopic examination revealed evidence of cardiovascular disease, manifest as moderate epicarditis, along with vacuolation of the adrenals, centrilobular hepatocyte vacuolation in the liver and alveolar haemorrhage in the lungs. The cause of death was considered likely to be associated with a moderate degree of epicarditis of unknown aetiology. One female at 20mg/kg/day was found dead on Day 19. Microscopic examination did not reveal a cause of death.

2.6.7.15.2. 脳重量低値に関する追加病理組織学的検査

Report Title: GSK1325760: Additional Investigations into Target Organ Toxicity Using Brain Tissues Generated From [redacted] Study Number BVR1515 (GSK Reference Number R29823)

Test Article: Ambrisentan (parent compound)

Species/Strain: Rats/ RCCHanTM Wistar[1]

Duration of Dosing: 8 Weeks (from Day 7 of age)[1]

Duration of Recovery: 8 Weeks[1]

GSK Document Number: 2015N234412_00

Study No.: V31139G

Initial Age: Day 7 of age[1]

Route/Frequency: Oral by gavage, once daily[1]

Batch No.: 1005943[1]

Date of First Dose: 20 October 2011[1]

Vehicle/Formulation: 0.66% (w/v) aqueous sodium chloride[1] /suspension

Study in Compliance with GLP: Yes

Data Collected: Microscopic examination (brain only using H&E, specialized stains and immunohistochemistry)

Conclusion: Qualitative examination of haematoxylin and eosin (H&E), Luxol fast blue-cresyl violet (LFB-CS) stained and myelin basic protein (MBP) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunostained brain sections from juvenile rats given 0 or 20 mg/kg/day ambrisentan from a previous study (2012N143182_00) did not reveal any relevant qualitative differences between control and ambrisentan treated groups which could have accounted for the brain weight decrease observed in the original study. The number of matched sections to a level was considered insufficient to provide reproducible linear measurements across animals within each group, which in turn would limit the value of intergroup comparisons. Therefore, quantitative evaluation was not conducted.

1 = Details taken from the report for Study BVR1515 (GSK Reference Number R29823) [2012N143182_00].

2.6.7.15.3. 幼若ラットにおける呼吸機能への影響に関する試験（1）

Report Title: GSK1325760: Investigative Study of the Potential Effects on Respiratory Function in Rats Following Daily Oral Dosing from Post-Natal Days (PND) 7 through 36 (Safety Pharmacology Study)

Test Article: Ambrisentan (parent compound)

GLP Compliance:	Strain/species:	Method of Administration:	Dose (mg/kg/day)[a]:	GSK Document Number/ Study Number:
No	Crl:WI (Han) /Rats	Oral Gavage	20	2014N221912_00 / R70638N

Conclusion: Ambrisentan was given orally, once daily, to subsets of juvenile Wistar-Han rats (n = 6 litters each of 3/sex/litter) at 0 or 20 mg/kg/day beginning on PND 7 until PND 20, 27 or 36. Respiratory function (measured by ventilatory parameters and changes in arterial blood gases), body weight, brain weight and histopathologic changes in the nasal turbinates and oropharynx were assessed. Ambrisentan produced decreases in brain weight, and caused respiratory sounds described as a clicking noise. At all timepoints there was both hypoxemia and hypercapnea that was associated with an increase in the duration of end-expiratory pauses, or apneic times, during the breathing cycle. Based on published studies that have established a relationship between hypoxemia and decreases in brain weight in juvenile rodents, the presence of hypoxemia provides a likely mechanism for the decrease in brain weight observed in this study. In the nasal cavity at all timepoints, there were minimal to mild microscopic epithelial and inflammatory changes, not considered sufficient to result in upper airway obstruction. The mechanism for the hypoxemia remains unclear, but it may be related to the apneic episodes.

Organ Systems Evaluated	Gender, No. of Animals[b]	Age at Necropsy[b]	Noteworthy Findings[c]
Clinical Observations	18F, 15M	PND 20, 27, 36	Abnormal breathing (clicking) noted in test-article treated rats starting on PND 17 through PND 36. No abnormal clicking sound was heard in any vehicle treated rats.
Body weight and Brain weight	6F, 6M	PND 20	Female rats: decrease in body weight of 3%, decrease in brain weight of 1.4% Male rats: decrease in body weight of 5%, no change in brain weight.
	6F, 3M	PND 27	Female rats: no change in body weight, decrease in brain weight 1.3% Male rats: decrease in body weight of 12%, decrease in brain weight of 5.7%
	6F, 6M	PND 36	Female rats: decrease in body weight of 13%, decrease in brain weight 2% Male rats: decrease in body weight of 20%, decrease in brain weight 7.6%
Ventilatory Parameters	6F, 6M	PND 20	Female rats: decrease in P_aO_2 of 44%, increase in P_aCO_2 of 61%, increase in end expiratory pause of 72%. Male rats: decrease in P_aO_2 of 19%, increase in P_aCO_2 of 50%, increase in end expiratory pause of 94%.
	5F, 3M	PND 27	Female rats: decrease in P_aO_2 of 11%, increase in P_aCO_2 of 30%, increase in end expiratory pause of 655%. Male rats: decrease in P_aO_2 of 31%, increase in P_aCO_2 of 43%, increase in end expiratory pause of 723%.
	6F, 6M	PND 36	Female rats: decrease in P_aO_2 of 21%, increase in P_aCO_2 of 33%, increase in end expiratory pause of 233%. Male rats: decrease in P_aO_2 of 39%, increase in P_aCO_2 of 45%, increase in end expiratory pause of 211%.
Nasal cavity and nasopharynx	18F, 15M	PND 20, 27, 36	Minimal to mild inflammation and epithelial changes. No change in severity or incidence over time.

a. Animals were dosed on a daily basis beginning on post-natal day 7 and are expressed as the parent compound formulated in 0.66%(w/v) Aqueous Sodium Chloride

b. The juvenile rats were divided into subsets of 6 rats/sex/dose/subset. There were a total of 12 test-article treated rats per subset for a total of 24 rats on each necropsy day.

c. Percent changes are in comparison to vehicle control values on the same day.

2.6.7.15.4. 幼若ラットにおける呼吸機能への影響に関する試験（2）

Report Title: Further Investigative Study of Respiratory Function in Rats Following Daily Oral Dosing from Postnatal Days 7 through 26, including an Assessment of Recovery

Test Article: Ambrisentan (parent compound)

GLP Compliance:	Strain/species:	Method of Administration:	Dose (mg/kg/day)[a]:	GSK Document Number/ Study Number:
No	Crl:WI (Han) /Rats	Oral Gavage	0 or 20	2017N319267/ R71004N

Conclusion: Ambrisentan was given orally, once daily, to juvenile Wistar-Han rats (n = 8 litters each of 3/sex/litter) at 0 or 20 mg/kg/day beginning on PND 7 until PND 26. Respiratory function (measured by ventilatory parameters and changes in arterial blood gases), body weight, brain weight and histopathology (brain, soft palate, pharynx and larynx including epiglottis), magnetic resonance images (MRI) and brain gene expression were assessed at the end of treatment, 2 days off dose and after one month off dose. Neurobehavioral assessments were performed at the end of treatment and one month off dose. Ambrisentan caused respiratory sounds described as a singular click noise with pauses apparently synchronous with the breath cycle that lasted throughout the day. There was a delay to the onset and recovery of clicking; majority of rats started clicking after 5 days of dosing and continued for 10 days after dosing stopped. Hypoxemia, hypercapnea, an irregular respiratory wave form and increased duration in end expiratory pause (a measure of apnea) and peak expiratory flow were noted at the end of dosing, and at the 2 day off dose period, but fully recovered by one month after the end of dosing when the animals reached near adulthood (PND 54). Brain weight was not changed at the end of treatment, or 2 days after treatment, but a slight decrease was detected in males and females at the end of the one month off-dose period. There were no test article-related changes in neurobehavioral assessments, brain gene expression, or microscopic histopathology; and MRI and morphometrics were inconclusive.

Based on published studies that have established a relationship between hypoxemia and decreases in brain weight in juvenile rodents, the presence of hypoxemia, provides a likely mechanism for the decrease in brain weight. The mechanism for the hypoxemia is likely related to the apneic episodes and the clicking breathing sounds since these three parameters (clicking, apnea and hypoxemia) were affected in the same temporal pattern; at the end of treatment and the short term recovery period, but not after long term recovery. The delay of the onset of breathing sounds and the lack of recovery after the short recovery period are consistent with an improper interaction of rat laryngeal tissues which are in close opposition during breathing (soft palate, epiglottis, arytenoid), although this could not be confirmed by visualization of the pharynx via MRI or histologic methods.

Parameter	Animals per group per timepoint, Gender	Age at Evaluation	Noteworthy Findings for 20 mg/kg/day dose group[b]
Clinical Observations	24F, 24M	PND 7 through 54	Abnormal breathing sound (clicking) noted in all test-article treated rats. The clicking sounds started after five doses (PND 11) and continued in all treated rats through the terminal euthanasia on the last day of dosing (PND 26) and persisted in all rats through the first recovery time point 2 days post final dose (PND 28). Clicking sounds stopped in a majority of rats by 10 days after end of dosing. No abnormal breathing sounds were heard in any test-article treated rats on PND 54, or in vehicle-treated rats at any timepoint.
Body weight and Brain weight	6F, 6M	PND 26	Female rats: decrease in body weight of 10%, no decrease in brain weight Male rats: decrease in body weight of 7%, no decrease in brain weight
	6F, 6M	PND 28	Female rats: decrease in body weight of 7%, decrease in brain weight 1.9% Male rats: decrease in body weight of 6%, no decrease in brain weight
	6F, 6M	PND 54	Female rats: decrease in body weight of 4%, slight, not statistically significant, decrease in brain weight 2.9% Male rats: decrease in body weight of 9%, slight, not statistically significant, decrease in brain weight 2.7%

2.6.7.15.4. 幼若ラットにおける呼吸機能への影響に関する試験（2）（続き）

Test Article: Ambrisentan

Parameter	Animals per group per timepoint, Gender	Age at Evaluation	Noteworthy Findings for 20 mg/kg/day dose group[b]
Ventilatory Parameters	6F, 6M	PND 26	Female rats: decrease in P_aO_2 of 26%, increase in P_aCO_2 of 44%, increase in end expiratory pause of 72 msec and peak expiatory flow of 1.52 mL/min. Male rats: decrease in P_aO_2 of 18%, increase in P_aCO_2 of 44%, increase in end expiratory pause of 55 msec and peak expiratory flow of 0.69 mL/min.
	5F, 6M	PND 28	Female rats: decrease in P_aO_2 of 5%, increase in P_aCO_2 of 31%, increase in end expiratory pause of 42 msec and peak inspiratory flow of 0.75 mL/min. Male rats: decrease in P_aO_2 of 18%, increase in P_aCO_2 of 36%, increase in end expiratory pause of 43 msec and peak inspiratory flow of 0.85 mL/min.
	6F, 6M	PND 54	Female rats: no changes in P_aO_2, P_aCO_2 or end expiratory pause. Male rats: no changes in P_aO_2, P_aCO_2 or end expiratory pause.
Microscopic Pathology	6F, 6M	PND 26, 28, 54	No test article-related findings.
MRI	2F, 2M	PND 26/27	No obvious findings, generally inconclusive
	2F, 2M	PND 28/29	No obvious findings, generally inconclusive
	2F, 2M	PND 54/55	No obvious findings, generally inconclusive

a. Animals were orally dosed on a daily basis beginning on PND 7 to 26/27 and doses are expressed as the parent compound which was formulated in 0.66%(w/v) aqueous sodium chloride.

b. Percent changes are in comparison to vehicle control values on the same postnatal day.

2.6.7.16. 局所刺激性試験

新たな試験は実施していない。

2.6.7.17. その他の試験

新たな試験は実施していない。