MD-711

第 2 部（モジュール 2）
CTD の概要（サマリー）

2.4 非臨床試験の概括評価

持田製薬株式会社

目次

2.4 非臨床試験の概括評価....4
2.4.1 非臨床試験計画概略....4
2.4.1.1 薬理試験....4
2.4.1.2 薬物動態試験....5
2.4.1.3 毒性試験....5
2.4.2 薬理試験....7
2.4.2.1 効力を裏付ける試験....7
2.4.2.2 安全性薬理試験....7
2.4.3 薬物動態試験....7
2.4.3.1 吸収....7
2.4.3.2 代謝....8
2.4.3.3 薬物動態学的薬物相互作用....8
2.4.4 毒性試験....8
2.4.4.1 単回投与毒性試験....8
2.4.4.2 反復投与毒性試験....9
2.4.4.3 がん原性試験....12
2.4.5 総括および結論....13
2.4.5.1 薬理試験の総括....13
2.4.5.2 薬物動態試験の総括....13
2.4.5.3 毒性試験の総括....14
2.4.6 参考文献....15

略号一覧

略号	英語表記	日本語表記
$AUC_{0-\infty}$	Area under the plasma concentration-time curve from time zero to infinity	無限大時間までの血漿中薬物濃度時間曲線下面積
AUC_{0-t}	Area under the plasma concentration-time curve from time zero to the last measurable point	測定可能なポイントまでの血漿中薬物濃度時間曲線下面積
C_{max}	Maximum plasma concentration	最高血漿中薬物濃度
CYP	Cytochrome P450	チトクローム P450
DEA	Diethanolamine	ジエタノールアミン
GLP	Good laboratory practice	安全性に関する非臨床試験の実施の基準
MPV	Mean platelet volume	平均血小板容積
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form	還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
NO	Nitric oxide	一酸化窒素
PGI_2	Prostaglandin I_2	プロスタグランジン I_2
t_{max}	Time to maximum plasma concentration	最高血漿中濃度到達時間
$t_{1/2}$	Elimination half-life	消失半減期
UDPGA	Uridine diphosphate glucuronic acid	ウリジン二リン酸グルクロン酸

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

肺動脈性肺高血圧症は、肺動脈における血管平滑筋の収縮、血管壁構成細胞の増殖および微小血栓の形成に伴う肺動脈の狭窄によって、肺動脈圧および肺血管抵抗が持続的に増加して右心室に圧負荷がかかり、その結果、心拍出量が減少して右心室不全に至る疾患である[1) -7)]。肺動脈性肺高血圧症患者の肺血管内皮細胞では、血管拡張作用および血小板凝集抑制作用を有するPGI_2やNOの産生が減少していることに加え、血管収縮作用および平滑筋細胞増殖作用を有するエンドセリンの産生が増加していることが報告されている[2) ,6) ,8)]。そのため、血管内皮細胞の機能不全によるこれら因子の不均衡が本症の発症・進展に関与すると考えられている[8)]。

トレプロスチニルは、血中半減期の短いPGI_2を化学的に修飾して安定化した化合物であり、PGI_2と同様に、血管拡張作用および血小板凝集抑制作用により肺動脈の収縮および血栓形成を抑制し、肺動脈圧および肺血管抵抗を低下させることで、肺動脈性肺高血圧症に対する有効性を示すと考えられている[9)]。本邦においては、トレプロスチニルを有効成分とするトレプロスト®注射液が、肺動脈性肺高血圧症を効能・効果として持続皮下投与もしくは持続静脈内投与の用法で承認されている。MD-711はトレプロスチニルを有効成分とする吸入剤であり、携帯型ネブライザを用いることで非侵襲的な投与を可能とし、標的臓器である肺にトレプロスチニルを直接曝露させることでトレプロスト®注射液で発現する全身性有害事象のリスクを軽減することが期待される。

皮下投与および静脈内投与を中心としたトレプロスチニルの非臨床試験成績は、トレプロスト®注射液の初回申請時に提出済みである。吸入投与への投与経路変更に伴い、主に吸入投与による薬理試験、薬物動態試験および毒性試験を追加で実施した。また、海外で承認済みの経口剤（Orenitram®）開発で実施したトレプロスチニルのがん原性試験成績についても本申請資料に含めた。実施した非臨床試験の一覧を表 2.4.1-1に示す。[redacted]は、医薬品第Ⅰ相試験開始前相談（オーファン以外）（薬機審長発第[redacted]号、平成[redacted]年[redacted]月[redacted]日）において確認済みである。また、同相談における機構からの助言に基づき[redacted]した。

2.4.1.1 薬理試験

トレプロスチニルまたはトレプロスチニル DEA を用いた薬理試験は、20[redacted]年～20[redacted]年[redacted]月に実施した。「効力を裏付ける試験」としてトロンボキサン類縁化合物誘発肺高血圧ラットの血行動態に及ぼす影響を検討し、ウサギ摘出灌流肺の血行動態に及ぼす影響、トロンボキサン類縁化合物誘発肺高血圧ウサギの血行動態に及ぼす影響およびモノクロタリン誘発ラット肺高血圧モデルに及ぼす影響についても評価した。「安全性薬理試験」として、静脈内投与による覚醒イヌの心血管系に及ぼす影響、吸入投与による覚醒ラットの呼吸機能に及ぼす影響を検討した。「副次的薬理試験」および「薬力学的薬物相互作用試験」は新たに実施していない。安全性薬理試験は、医薬品 GLP に従って実施した。

2.4.1.2 薬物動態試験

トレプロスチニルまたはトレプロスチニル DEA を用いた薬物動態試験は、20[redacted] 年 [redacted] 月～20[redacted] 年 [redacted] 月に実施した。「吸収試験」として、ラットにおける単回吸入投与試験を実施し、ラットにおける単回吸入投与毒性試験、7 日間および 13 週間吸入投与毒性試験、イヌにおける 7 日間および 13 週間吸入投与毒性試験の TK データに関しても検討した。「代謝試験」として、ヒト肝および肺のミクロソームおよび S9 を用いてトレプロスチニルの被代謝活性を *in vitro* で比較した。「薬物動態学的薬物相互作用試験」として、ヒト初代培養肝細胞を用いてシルデナフィルおよびボセンタンとの相互作用を *in vitro* で検討した。「分布試験」および「排泄試験」は新たに実施していない。

2.4.1.3 毒性試験

トレプロスチニルまたはトレプロスチニル DEA を用いた毒性試験は、20[redacted] 年 [redacted] 月～20[redacted] 年 [redacted] 月に実施した。「単回投与毒性試験」としてラットおよびイヌにおける単回および 7 日間吸入投与毒性試験、「反復投与毒性試験」としてラットおよびイヌにおける 13 週間吸入投与毒性試験、「がん原性試験」としてラットにおける 13 週間吸入投与がん原性用量設定試験、ラットにおける 2 年間吸入投与がん原性試験および 2 年間経口投与がん原性試験、Tg.rasH2 マウスにおける 26 週間経口投与がん原性試験を実施した。「遺伝毒性試験」および「生殖発生毒性試験」は新たに実施していない。なお、吸入投与時の局所刺激性は、反復投与毒性試験の投与部位（呼吸器）の所見で評価した。すべての毒性試験は、医薬品 GLP に従って実施した。

表 2.4.1-1 非臨床試験一覧

区分	試験の種類	試験系	投与方法
薬理試験	効力を裏付ける試験		
	ウサギ摘出灌流肺の血行動態に及ぼす影響（参考資料）	ウサギ摘出灌流肺	吸入
	トロンボキサン類縁化合物誘発肺高血圧ウサギの血行動態に及ぼす影響（参考資料）	ラット	吸入
	モノクロタリン誘発ラット肺高血圧モデルに及ぼす影響（参考資料）	ウサギ	吸入
	トロンボキサン類縁化合物誘発肺高血圧ラットの血行動態に及ぼす影響	ラット	吸入
	安全性薬理試験		
	覚醒イヌの心血管系に及ぼす影響	イヌ	静脈内
	覚醒ラットの呼吸機能に及ぼす影響	ラット	吸入
薬物動態試験	吸収		
	単回投与時の吸収	ラット	吸入
	反復投与時の吸収（7 日間吸入）	ラット	吸入
	反復投与時の吸収（13 週間吸入）	ラット	吸入
	反復投与時の吸収（7 日間吸入）	イヌ	吸入
	反復投与時の吸収（13 週間吸入）	イヌ	吸入
	代謝		
	ヒト肝・肺ミクロソームおよび S9 による代謝比較	ヒト肝・肺ミクロソーム	*in vitro*
	薬物相互作用		
	シルデナフィルおよびボセンタンとの相互作用	ヒト初代培養肝細胞	*in vitro*
毒性試験	単回投与毒性試験		
	単回および 7 日間吸入投与試験	ラット	吸入
	単回および 7 日間吸入投与試験	イヌ	吸入
	反復投与毒性試験		
	13 週間吸入投与試験	ラット	吸入
	13 週間吸入投与試験	イヌ	吸入
	がん原性試験		
	13 週間吸入投与がん原性用量設定試験	ラット	吸入
	2 年間吸入投与がん原性試験	ラット	吸入
	2 年間経口投与がん原性試験	ラット	強制経口
	26 週間経口投与がん原性試験	マウス	強制経口

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

ウサギ摘出灌流肺にトレプロスチニルを噴霧投与した結果、トロンボキサン類縁化合物により誘発される肺動脈圧の上昇が抑制された。ラットおよびウサギにトレプロスチニルを吸入投与した結果、トロンボキサン類縁化合物により誘発される肺動脈圧および肺血管抵抗の上昇が抑制された。モノクロタリン誘発ラット肺高血圧症モデルにトレプロスチニルを反復吸入投与した結果、生存率の低下が抑制された。

2.4.2.2 安全性薬理試験

トレプロスチニルの*in vivo*における心血管系に及ぼす影響評価として、覚醒イヌを用いた皮下投与による試験を初回申請時に提出済みである。一方、吸入投与された薬物は気道や肺胞に付着した後速やかに血液中に吸収されて肺静脈から心臓、全身循環に移行するため[10),11)]、皮下投与に比べて心臓への最大曝露量が高くなる可能性が考えられることから、トレプロスチニルの急速静脈内投与による覚醒イヌを用いた心血管系試験を追加した。覚醒下の雌性ビーグル犬にトレプロスチニルを単回静脈内投与した結果、最高用量の200 μg/kg投与において血圧低下に対する交感神経反射と考えられる血圧上昇および心拍数の高値が認められたものの、心電図パラメータに異常は認められなかった。

トレプロスチニルの呼吸器系に及ぼす影響評価として、覚醒ラットを用いた皮下投与による試験を初回申請時に提出済みである。吸入投与では薬物を肺に直接曝露させることから、トレプロスチニル吸入投与による覚醒ラットを用いた呼吸器系試験を追加した。覚醒下の雄性Sprague-Dawleyラットにトレプロスチニルを単回吸入投与した結果、平均肺到達用量が299.2 μg/kg/日以上で吸入開始後15分以内に呼吸数の減少およびそれに伴う分時換気量の減少が認められ、吸入中は低下したままであったが、投与後24時間にはいずれも回復していた。

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 吸収

トレプロスチニルをラットに単回吸入投与したときの血漿中トレプロスチニル濃度推移、ならびに、ラットまたはイヌに単回または 7 日間もしくは 13 週間反復吸入投与したトキシコキネティクス試験における血漿中トレプロスチニルの濃度推移を検討した。

トレプロスチニルをラットに単回吸入投与したときの C_{max} および $AUC_{0-\infty}$は、投与量の増加に伴って上昇し、薬物動態パラメータに明らかな性差は認められなかった。t_{max} が吸入投与終了時またはその直後に観察されたことから、トレプロスチニルは吸入投与後速やかに吸収されることが示唆された。

トレプロスチニルをラットに 7 日間反復吸入投与したときの AUC_{0-t} は投与量の増加に伴って上昇した。7 日間反復投与による蓄積性はほとんど認められず、薬物動態パラメータに明らかな性差も認められなかった。

トレプロスチニルをラットに 13 週間反復吸入投与した試験および 13 週間反復吸入投与によるがん原性用量設定試験では、用量増加に伴い雄ラットの AUC_{0-t} は雌ラットより大きく上昇し、体内動態に性差があることが示唆された。

トレプロスチニルをラットに 13 週間静脈内持続投与および 26 週間皮下持続投与した際に、投与量が増加すると血漿中トレプロスチニル濃度が雌より雄で高くなる傾向が認められており、血漿中の代謝物濃度に性差が存在することが推察されていること、および *in vitro* でラット肝細胞により生成した代謝物の生成比が雌雄で異なること（初回申請時資料）から、ラットにおける体内動態の性差は代謝の性差に起因していると考えられた。

トレプロスチニルをイヌに 7 日間反復吸入投与したときの AUC_{0-t} は投与量の増加に伴って上昇し、C_{max} は単位時間当たりの投与量と関連していた。また、13 週間反復吸入投与したときの AUC_{0-t} および C_{max} は投与量の増加に伴って上昇した。反復投与による薬物の蓄積は認められず、イヌではラットで認められた体内動態の性差は認められなかった。

2.4.3.2 代謝

トレプロスチニルは *in vitro* で NADPH 存在下または NADPH と UDPGA 存在下でヒト肝ミクロソームにより 60 分までにほぼ代謝された。また、NADPH 存在下または NADPH と UDPGA 存在下でのヒト肝 S9 による 60 分までの代謝は、ヒト肝ミクロソームと比較して小さいものであった。ヒト肺ミクロソームまたは S9 によるトレプロスチニルの代謝は、NADPH 存在下または NADPH と UDPGA 存在下で 60 分まで観察されなかった。これらの *in vitro* データから、*in vivo* におけるトレプロスチニルの肺での被代謝活性は、肝に比べて極めて低いことが示唆された。

2.4.3.3 薬物動態学的薬物相互作用

トレプロスチニル DEA は、明らかな薬物代謝誘導能を示さなかった。ヒト肝細胞によるシルデナフィルおよびボセンタンの代謝は、トレプロスチニル DEA による影響を受けなかった。同様に、トレプロスチニル DEA の代謝も、シルデナフィルおよびボセンタンによる影響を受けなかった。したがって、トレプロスチニル DEA とシルデナフィルまたはボセンタンの間で薬物動態学的相互作用が生じる可能性は低いと考えられた。

2.4.4 毒性試験

2.4.4.1 単回投与毒性試験

ラットにおける単回吸入投与（65、193、333、667 および 1009 μg/kg）では、667 μg/kg 以上の群で努力呼吸、呼吸数増加および衰弱が認められたが、667 μg/kg 群では軽度であり、発現頻度も低かった。1009 μg/kg 投与によっても死亡例は認められず、概略の致死量は 1009 μg/kg 超であった。7 日間吸入投与（289、415 および 528 μg/kg/日）では、289 μg/kg/日以上の群で流涎、肺および肝臓重量の増加、胸腺重量の減少（胸腺の萎縮）、鼻腔の呼吸上皮の過形成/扁平

上皮化生、杯細胞の過形成/肥大、喉頭の過形成/扁平上皮化生、肺の出血、415 μg/kg/日以上の群で MPV の増加、528 μg/kg/日群で体重増加量および血小板数の減少が認められた。

イヌにおける単回吸入投与（560、840、3190 および 4800 μg/kg）では、3190 μg/kg 以上の群で活動性の低下、4800 μg/kg 群ではさらに体温低下、横臥位、嘔吐および運動失調が認められたが、死亡例は発生せず、概略の致死量は 4800 μg/kg 超であった。7 日間吸入投与（530、860 および 2990/2280 μg/kg/日）では、530 μg/kg/日以上の群で軟便/液状便、体重増加量の減少、860 μg/kg/日以上の群で嘔吐、流涎、振戦、運動失調、心拍数の増加および鼻腔の呼吸上皮の再生、2990/2280 μg/kg/日群で衰弱、鼻腔の亜急性炎症・潰瘍・呼吸上皮の扁平上皮化生、心筋変性または壊死が認められた。

2.4.4.2 反復投与毒性試験

ラットにおける 13 週間吸入投与毒性試験（7.0、66.6 および 463.5 μg/kg/日）では、7.0 μg/kg/日以上の群で体重増加量の減少、66.6 μg/kg/日以上の群で体重および摂餌量の減少、463.5 μg/kg/日群で体温低下、運動失調、努力呼吸、活動性および筋緊張の低下などが認められた。その他、7.0 μg/kg/日以上の群で肺の暗色巣/部位、66.6 μg/kg/日以上の群で分時換気量の減少、肺、副腎および甲状腺重量の増加、胸腺重量の減少、副腎の肥大および退色、精巣の小型化、463.5 μg/kg/日群で血小板数の減少、MPV の増加、精巣重量の減少が認められた。病理組織学的検査では、7.0 μg/kg/日以上の群で鼻腔の杯細胞の過形成/肥大、喉頭の扁平上皮化生、肺の出血およびマクロファージ集簇、副腎皮質の肥大、心筋変性/線維化、精巣の精上皮変性、66.6 μg/kg/日以上の群で鼻腔の呼吸上皮変性/再生、精巣上体の精子減少/消失、463.5 μg/kg/日群で副腎皮質球状層細胞の空胞化、胸腺リンパ系組織の萎縮/壊死、鼻腔の好中球浸潤、呼吸上皮の潰瘍および嗅上皮の変性/再生が認められた。投与期間終了時に認められた変化は、心筋変性/線維化を除き、4 週間の休薬により回復または回復傾向を示した。7.0 μg/kg/日群で認められた体重増加量の減少および病理組織学的変化に基づき、本試験の無毒性量は 7.0 μg/kg/日未満と考えられた。

イヌにおける 13 週間吸入投与毒性試験（107.3、322.1 および 1557.9 μg/kg/日）では、107.3 μg/kg/日以上の群で軟便および液状便、322.1 μg/kg/日以上の群で吸入投与中の嘔吐および脱糞、投与初期の摂餌量の減少、1557.9 μg/kg/日群で活動性の低下、運動失調、円背位、横臥位、脱水、流涎、振戦、腹側皮膚の赤色化、散瞳、努力呼吸、異常呼吸音、体重増加量の減少が認められた。心血管系検査では、投与 30 日に 322.1 μg/kg/日以上の群で中等度の洞性頻脈が認められたが、投与 80 日には 1557.9 μg/kg/日群で軽度に認められたのみであった。血液学的検査では、1557.9 μg/kg/日群で血小板数の減少および MPV の増加が認められた。病理組織学的検査では、322.1 μg/kg/日以上の群で鼻腔の呼吸上皮の変性/再生および喉頭の線毛上皮の変性、1557.9 μg/kg/日群で鼻腔の杯細胞の過形成/肥大、扁平上皮および呼吸上皮の潰瘍、扁平上皮の変性/壊死ならびに肺の出血が認められた。投与終了時に見られた変化は、4 週間の休薬によりいずれも回復性を示した。322.1 μg/kg/日以上の群で認められた呼吸器の病理組織学的変化より、本試験の無毒性量は 107.3 μg/kg/日と考えられた。

反復投与毒性試験で認められた変化と臨床への外挿性について、以下に考察する（2.6.6.9 項）。

（1）一般状態への影響

ラットおよびイヌへの吸入投与により、両者に共通して活動性の低下、運動失調、流涎、努力呼吸、体温低下などが認められた。これらの症状は、トレプロスチニルの薬理作用である血圧低下作用および吸入投与による呼吸器への直接作用が過度に発現した影響と考えられた。また、イヌにおいては嘔吐、軟便/液状便などの消化器症状も認められた。軟便/液状便等の消化器への影響はトレプロスチニル注射液の毒性試験においてもイヌの方が強く認められており、臨床では下痢、悪心、嘔吐、上腹部痛などの消化器症状が認められている（初回申請時資料）。吸入投与毒性試験でも注射剤と同様の傾向が認められたことから、消化器への影響は吸入剤においても注意すべきと考えられた。

（2）血小板への影響

ラットの7日間吸入投与毒性試験ならびにラットおよびイヌの13週間吸入投与毒性試験で血小板数の減少とMPVの増加が認められ、MPVを測定しなかったラットの13週間吸入投与がん原性用量設定試験では血小板数の減少が認められた。血小板数の減少とMPVの増加はトレプロスチニル注射液の一般毒性試験においても認められており、その発現機序は明らかでないものの、PGI_2誘導体に共通した変化と考えられている（初回申請時資料）ことから、吸入剤においても注意すべきと考えられた。

（3）呼吸器への影響

ラットおよびイヌの反復吸入投与毒性試験において、呼吸器（鼻腔、喉頭、肺）に対する局所刺激性を示す病理組織学的所見が認められた。呼吸器に対する刺激性変化は投与薬液の濃度に依存し、低濃度では適応性変化（鼻腔の杯細胞過形成/肥大、喉頭の扁平上皮化生、肺胞マクロファージの増加）のみであったが、高濃度では傷害性変化（扁平上皮の潰瘍または変性/壊死、呼吸上皮および嗅部嗅細胞の変性／再生、好中球の浸潤、呼吸上皮の潰瘍、肺の赤血球食細胞増加、亜急性炎症および間質性炎症など）も認められた。臨床の吸入濃度（約 75 μg/L）はイヌで傷害性変化が認められた濃度（224 μg/L）以下ではあるが、ラットで傷害性変化がみられた濃度（約 40 μg/L）を超えていることから、呼吸器に対する刺激性（咳嗽やのどの痛み等）は臨床においても注意すべきと考えられた。一方、ラットの吸入時間（30～225 分）に比べて臨床の吸入時間は短く（1～2 分/回、4 回/日）、吸入後の薬液は呼吸で速やかに希釈されることから、臨床で呼吸器の傷害性変化が起きる可能性は低いと考えられた。

ラットの 13 週間吸入投与毒性試験では 66.6 μg/kg/日以上の群で吸入投与中に分時換気量の減少が認められたが、ラットの 2 年間吸入投与がん原性試験およびイヌの 13 週間吸入投与毒性試験では呼吸機能への影響は認められなかった。ラットで呼吸機能への影響が認められなかった最高用量である 36.90 μg/kg/日は、保守的（肺到達率 100%）に推定した臨床肺到達量（3.60

μg/kg/日）の約 10 倍に相当することから、臨床で呼吸機能への影響が認められる可能性は低いと考えられた。

（4）心筋への影響

イヌの 7 日間吸入投与毒性試験の 2990/2280 μg/kg/日群およびラットの 13 週間吸入投与毒性試験の 7.0 μg/kg/日以上の群で、心筋の変性および線維化が認められた。トレプロスチニルを正常動物に大量投与した際には、血圧低下後に交感神経反射による血圧上昇と心拍数増加を示すこと（2.6.2.4 項）、実験動物およびヒトにおいて持続的な頻脈が心筋症を誘発すると報告されていることから [12)]、心筋の病理組織学的変化はトレプロスチニルの直接的な作用ではなく、血圧低下に対する交感神経反射による心拍数増加の二次的な影響と考えられた。ラットで心筋への影響が認められた最低用量である 7.0 μg/kg/日投与時のトレプロスチニル曝露量は、臨床最大用量（54 μg×4 回/日）投与時曝露量に対して C_{max} では 12～20 倍の乖離があるが、AUC では 1.5～2.5 倍であることから（表 2.4.4-1）、臨床では血圧および心拍数の変化に注意すべきと考えられた。

（5）副腎および胸腺への影響

ラットの 13 週間吸入投与毒性試験の 7.0 μg/kg/日以上の群で副腎皮質の肥大、66.6 μg/kg/日以上の群で副腎重量の増加および胸腺重量の減少、463.5 μg/kg/日群で副腎皮質球状層細胞の空胞化および胸腺リンパ系組織の萎縮/壊死が認められ、ラットの 13 週間吸入投与がん原性用量設定試験では副腎重量増加が 34.1 μg/kg/日以上の群、球状層の微小空胞増加が 77.1 μg/kg/日以上の群、副腎皮質の肥大、胸腺重量の減少、胸腺リンパ系組織萎縮/減少が 273.0 μg/kg/日群で認められた。副腎皮質球状層で産生される主なホルモンはアルドステロンであるため、副腎皮質球状層の変化はトレプロスチニルの血圧低下作用に対する適応性変化と考えられた。一方、13 週間吸入投与毒性試験の 7.0 μg/kg/日以上の群で認められた副腎皮質の肥大は、高用量群以外は球状層の変化を伴っておらず、胸腺の萎縮性変化と同様、非特異的なストレス反応と考えられた。球状層への影響が認められなかった 66.6 μg/kg/日投与時のトレプロスチニル曝露量は、臨床最大用量投与時曝露量の C_{max} で 60～92 倍、AUC で 10～17 倍の乖離があることから（表 2.4.4-1）、臨床で副腎への影響が認められる可能性は低いものと考えられた。

（6）精子形成への影響

ラットの 13 週間吸入投与毒性試験では、7.0 μg/kg/日以上の群で精巣の精上皮の変性、66.6 μg/kg/日以上の群で精巣上体の細胞残渣および精子減少/消失が認められ、がん原性用量設定試験では、精巣の変化は 77.1 μg/kg/日以上の群、精巣上体の変化は 237.0 μg/kg/日群で認められた。一方、トレプロスチニル注射液の一般毒性試験で同様の変化は認められず（初回申請時資料）、ラットより高用量まで投与したイヌの 13 週間吸入投与毒性試験では精巣および精巣上体の変化が認められなかった。したがって、ラットの吸入投与で認められた精子形成に及ぼす影響は、吸入投与時にチューブ式ホルダーで長時間（20～225 分）拘束されたことによるスト

レスと、トレプロスチニルの血管拡張作用により精巣の血流量が増加し、密閉環境で拘束されたことで放熱阻害による精巣の温度上昇が起きたことに起因するものと考えられた。精子形成への影響はチューブ式ホルダーを用いたラットの吸入投与毒性試験に限定されており、臨床で同様の副作用が発現する可能性は低いと考えられた。

（7）甲状腺への影響

ラットの 13 週間吸入投与毒性試験およびがん原性用量設定試験で甲状腺重量の増加が認められたが、病理組織学的変化はみられなかった。甲状腺重量のみの変化ではあるが、PGI_2 製剤が甲状腺機能に影響を及ぼす可能性が示唆されていること [13)，14)]、トレプロスチニル注射剤の添付文書において甲状腺機能亢進症を重要な基本的注意事項としている（初回申請時資料）ことから、吸入剤においても注意すべきと考えられた。

表 2.4.4-1 吸入投与時の肺到達用量および曝露量比

試験名	投与量 [a] (μg/kg/日)	臨床用量比	C_{max} (ng/mL)		$AUC_{0\text{-}t}$ (ng·h/mL)	
			雄	雌	雄	雌
臨床 [b]	3.60 [c]	1	1.32		3.90	
ラット 13 週間投与試験	7.0	1.94	15.7	26.8	5.92	9.75
	66.6	18.5	122	78.6	67.9	40.0
	463.5	129	564	212	1195	505
イヌ 13 週間投与試験	107.3	29.8	44.6	54.5	18.8	21.2
	322.1	89.5	347	338	82.0	80.8
	1557.9	433	1706	1170	531	413
ラットがん原性用量設定試験	34.1	9.47	58.3	73.7	50.2	53.4
	77.1	21.4	150	95.0	105	86.4
	237.0	65.8	758	298	506	240
ラットがん原性試験	36.90	10.3	54.0	39.8	38.9	32.3

a：推定肺到達用量の雌雄平均値

b：海外臨床薬理試験（RIN-PH-103）における 54 μg 単回吸入投与時の C_{max} および $AUC_{0\text{-}t}$×4

c：臨床用量＝ (54 μg×4 回/日)×肺到達率 (100%) ÷体重 (60 kg)

2.4.4.3 がん原性試験

ラットにおける 13 週間吸入投与がん原性用量設定試験（2.60、5.26、10.6、34.1、77.1 および 237.0 μg/kg/日）では、34.1 μg/kg/日以上の群で体重の減少、77.1 μg/kg/日以上の群で活動性の低下、努力呼吸、閉眼、円背位、体温低下および食欲低下など、237.0 μg/kg/日群で横臥位が認められた。病理組織学的検査では、77.1 μg/kg/日以上の群で副腎皮質球状層の微小空胞の増加、精巣の精上皮の変性/萎縮、237.0 μg/kg/日群で鼻腔の呼吸上皮の扁平上皮化生、杯細胞の過形成/肥大および嗅上皮の萎縮、喉頭の扁平上皮化生、肺の亜急性炎症、胸腺および脾臓のリンパ系組織萎縮/減少、精巣上体の細胞残渣および精子減少/消失、副腎皮質の肥大、腎盂炎および膀胱尿路上皮過形成/炎症の頻度増加が認められた。34.1 μg/kg/日以上の群で体重減少、77.1 μg/kg/

日以上の群で一般状態の変化および病理組織学的変化が認められたことから、2 年間吸入投与がん原性試験の高用量は 34.1 μg/kg/日とすることが妥当と判断された。

トレプロスチニルのラットにおける 2 年間吸入投与がん原性試験（5.93、12.28 および 36.90 μg/kg/日）、トレプロスチニル DEA のラットにおける 2 年間経口投与がん原性試験（1、3、10 mg/kg/日）および Tg.rasH2 マウスにおける 26 週間経口投与がん原性試験（雄：5.0、10.0、20.0 mg/kg/日、雌：3.0、7.5、15.0 mg/kg/日）のいずれにおいても腫瘍性病変の増加は認められず、がん原性は陰性であった。MD-711 の臨床最大用量（54 μg×4 回/日）吸入時の C_{max} は 1.32 ng/mL、AUC は 3.90 ng·h/mL であり、吸入投与がん原性試験の高用量群の曝露量は C_{max} で 30～41 倍、AUC で 8.3～10 倍であった。また、経口投与がん原性試験では、マウスで約 50～100 倍、ラットで約 150～250 倍の AUC まで曝露しており、トレプロスチニルのがん原性を評価するために十分な曝露量であったと考えられた（2.6.6.9（8）2）項）。

2.4.5 総括および結論

2.4.5.1 薬理試験の総括

2.4.5.1.1 効力を裏付ける試験

ウサギ摘出灌流肺、ラットおよびウサギを用いて有効性を評価した結果、トレプロスチニルを噴霧・吸入投与することでトロンボキサン類縁化合物により誘発される肺動脈圧や肺血管抵抗の上昇が抑制された。また、トレプロスチニルを吸入投与することでモノクロタリン誘発ラット肺高血圧症モデルにおける生存率の減少が抑制された。したがって、吸入投与されたトレプロスチニルはトレプロスト®注射液と同様の作用機序で薬理作用を示すと考えられた。

2.4.5.1.2 安全性薬理試験

覚醒下の雌性ビーグル犬にトレプロスチニルを単回静脈内投与して心血管系に及ぼす影響を評価した結果、最高用量の200 μg/kg投与において血圧低下に対する交感神経反射と考えられる血圧上昇および心拍数の高値が認められた。これらの変化は20 μg/kg以下の投与では認められなかったことから、本試験におけるトレプロスチニルの無毒性量は20 μg/kgと考えられた。

覚醒下の雄性 Sprague-Dawley ラットにトレプロスチニルを単回吸入投与して呼吸機能に及ぼす影響を評価した結果、いずれの用量においても呼吸数および分時換気量の減少が吸入開始後 15 分以内に認められたが、投与後 24 時間にはいずれも回復していた。これらの変化は最低用量（平均肺到達用量：299.2 μg/kg/日）でも認められたことから、本試験における無毒性量を得られなかったが、より低用量を用いた毒性試験では、ラットの呼吸機能に影響が認められなかったときの最高用量は 36.90 μg/kg/日であった（2.6.6.9（3）2）項）。

2.4.5.2 薬物動態試験の総括

2.4.5.2.1 吸収

血漿中トレプロスチニルの t_{max} はいずれの試験においても、そのほとんどは吸入投与終了時またはその直後に観察されることから、トレプロスチニルは吸入投与後速やかに吸収されるこ

とが示唆された。また、$t_{1/2}$ は動物種、性、投与量および投与期間（単回または反復）に係らず、その多くはおよそ 20～60 分の範囲であった。

トレプロスチニルをラットに単回吸入投与したときの C_{max} および $AUC_{0-\infty}$ は、投与量の増加に伴って上昇し、薬物動態パラメータに明らかな性差は認められなかった。ラットに 7 日間反復吸入投与したときの AUC_{0-t} も投与量の増加に従って上昇したが、C_{max} は投与量によらず比較的一定であった。また、薬物動態パラメータに明らかな性差は認められなかった。ラットに 13 週間吸入投与したときの C_{max} および AUC_{0-t} は高用量群で雄が雌より高値を示した。同様の性差は注射剤の反復投与試験でも認められており、ラットではトレプロスチニルの代謝過程に性差があるものと考えられている（初回申請時資料）。一方、イヌの反復吸入投与ではラットで認められた体内動態の性差は認められなかった。

2.4.5.2.2 代謝

ヒト肺ミクロソームまたは S9 によるトレプロスチニルの代謝は、NADPH 存在下または NADPH と UDPGA 存在下で観察されなかった。これらの *in vitro* データから、*in vivo* におけるトレプロスチニルの肺での被代謝活性は肝に比べて極めて低いことが示唆された。トレプロスチニルは肺でほとんど代謝されないことから、肝での代謝が主であり、吸入投与時に生成する代謝物は注射剤投与時と同様であると推察された。

2.4.5.2.3 薬物動態学的薬物相互作用

トレプロスチニル DEA は、明らかな薬物代謝誘導能を示さなかった。ヒト肝細胞によるシルデナフィルおよびボセンタンの代謝は、トレプロスチニル DEA による影響を受けなかった。同様に、トレプロスチニル DEA の代謝も、シルデナフィル、ボセンタンおよびリファンピシンによる影響を受けなかった。したがって、トレプロスチニル DEA とシルデナフィルまたはボセンタンの間で薬物動態学的相互作用が生じる可能性は低いと考えられた。

2.4.5.3 毒性試験の総括

2.4.5.3.1 単回投与毒性試験

トレプロスチニルの単回吸入投与による死亡例は認められず、概略の致死量はラットで 1009 μg/kg 超、イヌで 4800 μg/kg 超であった。

2.4.5.3.2 反復投与毒性試験

ラットおよびイヌの反復吸入投与毒性試験では、主に一般状態（活動性の低下、運動失調、流涎、努力呼吸、体温低下、嘔吐、下痢、軟便）、血小板（減少、MPV 増加）、呼吸器（刺激性変化）、心筋（変性/線維化）、副腎（重量増加、皮質肥大、球状層の空胞化）、胸腺（萎縮）、精子形成（阻害）および甲状腺（重量増加）に影響が認められ、13 週間吸入投与毒性試験の無毒性量は、ラットで 7.0 μg/kg/日未満、イヌで 107.3 μg/kg/日であった。これらの変化の内、消化

器症状、血小板に対する影響、呼吸器に対する刺激性、甲状腺に対する影響は、臨床でも注意すべき変化と考えられた。

2.4.5.3.3 がん原性試験

トレプロスチニルのラットにおける 2 年間吸入投与がん原性試験、トレプロスチニル DEA のラットにおける 2 年間経口投与がん原性試験および Tg.rasH2 マウスにおける 26 週間経口投与がん原性試験のいずれにおいても腫瘍性病変の増加は認められず、がん原性は陰性であった。

2.4.6 参考文献

1）Rich S. Clinical insights into the pathogenesis of primary pulmonary hypertension. Chest. 1998; 114:237S-41S.

＜資料番号 4.3.1.1＞

2）Ghamra ZW, Dweik RA. Primary pulmonary hypertension: an overview of epidemiology and pathogenesis. Cleve Clin J Med. 2003;70:S2-8.

＜資料番号 4.3.1.2＞

3）Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, et al. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. J Am Coll Cardiol. 2004;43:13S-24S.

＜資料番号 4.3.1.3＞

4）Farber HW, Loscalzo J. Pulmonary arterial hypertension. N Engl J Med. 2004;351:1655-65.

＜資料番号 4.3.1.4＞

5）Raiesdana A, Loscalzo J. Pulmonary arterial hypertension. Ann Med. 2006;38:95-110.

＜資料番号 4.3.1.5＞

6）Jain S, Ventura H, deBoisblanc B. Pathophysiology of pulmonary arterial hypertension. Semin Cardiothorac Vasc Anesth. 2007;11:104-9.

＜資料番号 4.3.1.6＞

7）Chan SY, Loscalzo J. Pathogenic mechanisms of pulmonary arterial hypertension. J Mol Cell Cardiol. 2008;44:14-30.

＜資料番号 4.3.1.7＞

8）堀之内孝宏, 真崎雄一, 寺田晃士, 東恒仁, 三輪聡一. 肺高血圧症治療薬の最近の進歩 : エンドセリンシステムから見た作用機序. 日本薬理学雑誌. 2016;148:231-8.

＜資料番号 4.3.1.8＞

9）齋藤亮, 大森庸子. トレプロスチニル（トレプロスト®注射液）の薬理学的特徴および臨床試験成績. 日本薬理学雑誌. 2016;147:56-62.

＜資料番号 4.3.1.9＞

10）小栗候二郎. 吸入剤の研究開発の進め方―特に吸入剤特有の包括的な評価―. Drug Delivery System. 2005;20:610-9.

＜資料番号 4.3.1.10＞

11）竹内洋文, 山本浩充, 川島嘉明. 吸入剤の粒子設計. 粉体工学会誌. 2002;39:108-13.

＜資料番号 4.3.1.11＞

12）Shinbane JS, Wood MA, Jensen DN, Ellenbogen KA, Fitzpatrick AP, Scheinman MM. Tachycardia-induced cardiomyopathy: a review of animal models and clinical studies. J Am Coll Cardiol. 1997;29:709-15.

＜資料番号 4.3.1.12＞

13）Chadha C, Pritzker M, Mariash CN. Effect of epoprostenol on the thyroid gland: enlargement and secretion of thyroid hormone. Endocr Pract. 2009;15:116-21.

＜資料番号 4.3.1.13＞

14）Menon AA, Sahay S, Braverman LE, Farber HW. Thyroid dysfunction in patients with pulmonary artery hypertension (PAH): the effect of therapies affecting the prostanoid pathway. Lung. 2019;197:761-8.

＜資料番号 4.3.1.14＞