TABLE OF CONTENTS

LIST OF TABLES 3
LIST OF FIGURES 4
本項で使用する用語・略語 5
1. 非臨床試験計画概略 8
2. 薬理試験 9
2.1. 効力を裏付ける試験 9
2.1.1. In vitro 薬効薬理試験 11
2.1.1.1. 各種キナーゼに対する活性および選択性 11
2.1.1.2. 各種キナーゼに対する共有結合による不活性化の反応速度 11
2.1.1.3. ヒト血清アルブミンとの反応性 12
2.1.1.4. ヒト末梢血単核球および CD34 陽性前駆細胞に対する活性 13
2.1.1.5. ヒトならびにラットおよびイヌ全血細胞に対する活性 13
2.1.1.6. ヒト単球由来マクロファージにおける LPS 誘発サイトカイン産生に及ぼす作用 14
2.1.1.7. IL-27 処理ヒトマクロファージにおける TNFαおよび IL-1βシグナル伝達に及ぼす作用 14
2.1.1.8. ヒト Th1，Th17 および B 細胞の分化に及ぼす作用 14
2.1.1.9. B 細胞受容体および T 細胞受容体が関与する CD69 発現上昇に及ぼす作用 15
2.1.1.10. ヒト NK 細胞および CD8 陽性 T 細胞の機能に及ぼす作用 15
2.1.1.11. IL-4，IL-13，IL-22 および IL-31 誘発性 STAT リン酸化に対する作用 15
2.1.1.12. 溶解したヒト PBMC における JAK3 および TEC ファミリーに対する占有率 16
2.1.1.13. JAK3 および TEC ファミリーキナーゼの触媒ドメインの配列相同性 16
2.1.1.14. ヒト巨核球前駆細胞における TPO および IL-6 誘発性 STAT リン酸化に対する作用 16
2.1.1.15. ヒト血小板による TPO の消失に対する作用 17
2.1.2. In vivo 薬効薬理試験 17
2.1.2.1. ラットアジュバント誘発関節炎（AIA）モデルにおける有効性 17
2.1.2.2. 炎症性腸疾患（IBD）マウスモデルにおける有効性 17
2.1.2.3. 多発性硬化症の EAE マウスモデルにおける有効性 18

2.1.2.4. AA マウスモデルにおける有効性 18
2.2. 副次的薬理試験 18
2.3. 安全性薬理試験 19
2.4. 薬力学的薬物相互作用 21
3. 薬物動態試験 22
3.1. 分析法 22
3.2. 吸収 22
3.3. 分布 24
3.3.1. 血漿蛋白結合率および血球移行性 24
3.3.2. 組織分布 24
3.4. 代謝 25
3.4.1. 各動物種の代謝物プロファイル 27
3.5. 排泄 29
3.5.1. ヒトにおける体内動態の考察 29
3.6. 薬物動態学的薬物相互作用 30
3.6.1. P450 を介した相互作用 31
3.6.2. UGT，GST および SULT を介した相互作用 32
3.6.3. トランスポーターを介した相互作用 33
4. 毒性試験 35
4.1. 単回投与毒性試験 37
4.2. 反復投与毒性試験 38
4.2.1. ラットを用いた反復投与毒性試験 38
4.2.2. イヌを用いた反復投与毒性試験 40
4.3. 遺伝毒性試験 43
4.4. がん原性試験 44
4.4.1. マウス 44
4.4.2. ラット 44
4.5. 生殖発生毒性試験 45
4.5.1. 受胎能および着床までの初期胚発生に関する試験 45
4.5.2. 胚・胎児発生に関する試験 46
4.5.2.1. ラット 46
4.5.2.2. ウサギ 46

4.5.3. 出生前および出生後の発生ならびに母体の機能に関する試験 47
4.6. 局所刺激性試験 47
4.7. その他の毒性試験 47
4.7.1. 光毒性試験 47
4.7.2. 抗原性試験 47
4.7.3. 免疫毒性試験 48
4.7.4. イヌを用いた中枢神経系・末梢神経系に対する毒性発現の機序に関する試験 48
4.7.5. 依存性試験 50
4.7.6. 代謝物の毒性試験 50
4.7.7. 不純物の毒性試験 50
4.7.7.1. 細菌を用いる復帰突然変異試験 51
4.7.7.2. 不純物試験 52
4.8. 所見と薬物動態の関係 52
4.9. 標的臓器毒性・主な所見 55
4.9.1. 中枢神経系および末梢神経系 56
4.9.2. 免疫系およびリンパ造血系 59
4.9.3. 胸腺および甲状腺 61
4.9.4. 受胎能，発生および生殖に関する所見 62
4.9.5. その他の所見 63
4.9.5.1. 腎臓 63
4.9.5.2. 肝臓 64
4.9.5.3. 副腎 64
4.9.5.4. 心血管系 64
4.9.5.5. 嘔吐および糞便異常 65
5. 総括及び結論 65
6. 参考文献 70

LIST OF TABLES

Table 1. 効力を裏付ける非臨床薬理試験の要約 10
Table 2. リトレシチニブおよびヒト代謝物 M2 の in vitro 酵素阻害活性の比較 11
Table 3. リトレシチニブの各種キナーゼに対する共有結合による不活性化 12

Table 4. 細胞レベルでの阻害活性 13
Table 5. ラット，イヌおよびヒト全血での阻害活性 14
Table 6. IL-4，IL-13，IL-22 および IL-31 誘発性 STAT リン酸化に対する阻害活性 16
Table 7. リトレシチニブの安全性薬理試験の概要 19
Table 8. 副次的薬理試験および安全性薬理試験の要約 21
Table 9. リトレシチニブおよび M2 の LC/MS/MS を用いた定量法のバリデーション 22
Table 10. リトレシチニブの吸収および血漿中濃度推移に関する検討 23
Table 11. リトレシチニブおよび M2 の血漿蛋白結合率（2 µmol/L）ならびに血液/血漿分布（1 µmol/L） 24
Table 12. リトレシチニブの組織分布 25
Table 13. リトレシチニブの代謝に関する検討 26
Table 14. ヒト，マウス，ラットおよびイヌの血漿中ならびに排泄物中における未変化体と主要代謝物 M2 27
Table 15. ラットとヒトの未変化体および M2 の曝露比 28
Table 16. リトレシチニブおよび M2 の排泄の要約 29
Table 17. リトレシチニブおよび M2 の P450 に対する in vitro 薬物相互作用試験の要約 32
Table 18. リトレシチニブおよび M2 の UGT，GST および SULT に対する In vitro 薬物相互作用試験の要約 33
Table 19. リトレシチニブおよび M2 の薬物トランスポーターに関する in vitro 試験の要約 35
Table 20. 毒性試験の概要 36
Table 21. 遺伝毒性試験の要約 43
Table 22. 不純物：細菌を用いる in vitro 変異原性試験 51
Table 23. PK と臨床曝露量（非結合型）の関係 53
Table 24. 標的臓器・主な所見，関連する NOAEL および曝露量比 56
Table 25. リトレシチニブ投与による軸索ジストロフィーと軸索変性の相違 57

LIST OF FIGURES

Figure 1. リトレシチニブを 50 mg で円形脱毛症患者に投与したときに予想される JAK3，BTK および ITK の遊離受容体（%）の経時変化 12
Figure 2. リトレシチニブのマスバランスおよび消失機序の要約 30

本項で使用する用語・略語

用語・略号	省略していない表現または定義
AA	alopecia areata：円形脱毛症
A-B	apical to basolateral：頂端膜側から基底膜側
Abl	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
AIA	adjuvant-induced arthritis：アジュバント誘発関節炎
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 plasma concentration-time curve：血漿中濃度 - 時間曲線下面積
AUC_{24}	area under the plasma concentration-time curve from zero to 24 hours： 0 時間から 24 時間までの濃度-時間曲線下面積
AUC_{inf}	area under the plasma concentration-time curve from zero to infinity： 0 時間から無限大時間までの血漿中濃度 - 時間曲線下面積
AUC_t	area under the plasma concentration-time curve from zero to time t： 0 時間から t 時間までの血漿中濃度 - 時間曲線下面積
B-A	basolateral to apical：基底膜側から頂端膜側
BAEP	brainstem auditory evoked potential：脳幹聴覚誘発電位
BCR	B cell receptor：B 細胞受容体
BCRP	breast cancer resistance protein
BID	twice daily：1 日 2 回
BMX	bone marrow tyrosine kinase gene in chromosome X：X 染色体上の骨髄チロシンキナーゼ遺伝子
BSA	bovine serum albumin：ウシ血清アルブミン
BSEP	bile salt export pump
BTK	Bruton tyrosine kinase：ブルトン型チロシンキナーゼ
C_{av}	average plasma concentration：平均血漿中濃度
C_b/C_p	blood to plasma concentration ratio：血液/血漿中濃度比
CD	cluster of differentiation：表面抗原
CHO	Chinese hamster ovary：チャイニーズハムスター卵巣
CL_{tot}	total clearance：全身クリアランス
C_{max}	maximum plasma concentration：最高血漿中濃度
DOCK10	dedicator of cytokinesis 10
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis：実験的自己免疫性脳脊髄炎
EC_{av50}	50% effective average concentration：50%有効平均濃度
EMA	European Medicines Agency：欧州医薬品庁
EPO	erythropoietin：エリスロポエチン
F	bioavailability：バイオアベイラビリティ
F1	first generation offspring：第 1 世代
Fa	fraction absorbed：消化管での吸収率
FDA	Food and Drug Administration：米国食品医薬品局
Fg	fraction escaping gut metabolism：消化管での代謝回避率
FISH	fluorescence in situ hybridization：蛍光 in situ ハイブリダイゼーション
f_m	fraction metabolized：代謝寄与率
FOB	functional observational battery：機能観察総合評価法
FPKM	fragments per kilobase of exon per million reads mapped
f_u	fraction unbound：非結合型分率
GALT	gut-associated lymphoid tissue：腸管関連リンパ組織

用語・略号	省略していない表現または定義
GFR	glomerular filtration rate：糸球体濾過量
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
GST	glutathione S-transferase：グルタチオン S-トランスフェラーゼ
HEK	human embryonic kidney：ヒト胎児由来腎臓
hERG	human ether-a-go-go related gene：ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
HR	heart rate：心拍数
HSA	human serum albumin：ヒト血清アルブミン
IBD	inflammatory bowel disease：炎症性腸疾患
IC_{50}	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
IFN	interferon：インターフェロン
IHC	immunohistochemistry：免疫組織化学
IL	interleukin：インターロイキン
ITK	interleukin-2-inducible T-cell kinase
IV	intravenous：静脈内
JAK	Janus kinase：ヤヌスキナーゼ
KDR	kinase insert domain receptor
K_i	concentration at half-maximal rate of inhibition：阻害定数
K_I	concentration at half-maximal rate of inactivation (inactivation constant)：最大不活性化速度の 50%の速度をもたらす阻害薬の濃度
k_{inact}	maximal inactivation rate：最大不活性化速度定数
K_m	Michaelis Menton constant：ミカエリス・メンテン定数
LA	locomotor activity：自発運動量
LPS	lipopolysaccharide：リポ多糖
LVP	left ventricular pressure：左室圧
M#	metabolite identification：代謝物番号
m/z	mass-to-charge ratio：質量対電荷比
MATE	multidrug and toxin extrusion
MDCK	Madin-Darby canine kidney：Madin-Darby イヌ腎臓
MNU	N-Methyl-N-nitrosourea ：N-メチル-N-ニトロソウレア
MPL	thrombopoietin receptor：トロンボポエチン受容体
mRNA	messenger ribonucleic acid：メッセンジャーRNA
MS/MS	tandem mass spectrometry：タンデム質量分析法
MV	minute volume：分時換気量
MW	molecular weight：分子量
NA	not applicable：該当なし
NK	natural killer：ナチュラルキラー
NOAEL	no observable adverse effect level：無毒性量
OAT	organic anion transporter
OATP	organic anion transporting polypeptide
OCT	organic cation transporter
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development：経済協力開発機構
P450	cytochrome P450：シトクロム P450
PBMC	peripheral blood mononuclear cell：末梢血単核球
P-gp	P-glycoprotein：P-糖蛋白質
PK/PD	pharmacokinetic/pharmacodynamic：薬物動態/薬力学

用語・略号	省略していない表現または定義
PO	per os：経口
QD	once daily：1 日 1 回
QTc	corrected QT interval：補正 QT 間隔
S9	9000 g supernatant：ポストミトコンドリア上清
SDLN	skin draining lymph node：皮膚所属リンパ節
STAT	signal transducer and activator of transcription：シグナル伝達兼転写活性化因子
SULT	sulfotransferase：スルホトランスフェラーゼ
$t_{½}$	apparent terminal elimination half-life：終末相の見かけの消失半減期
TEC	tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma：肝細胞癌内で発現するチロシンキナーゼ
Tg	transgenic：トランスジェニック
THP-1	human leukemia monocytic cell line：ヒト単球性白血病細胞株
TK	toxicokinetics：トキシコキネティクス
TK6	thymidine kinase-6：ヒトリンパ芽球細胞株
T_{max}	time of occurrence of C_{max}：最高血漿中濃度到達時間
TPO	thrombopoietin：トロンボポエチン
TV	tidal volume：1 回換気量
TXK	tyrosine protein kinase encoded by the TXK gene：TXK 遺伝子にコードされたチロシンキナーゼ
TYK2	tyrosine-kinase 2：チロシンキナーゼ 2
UGT	uridine diphosphate glucuronosyl transferase：ウリジン二リン酸グルクロン酸転移酵素
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor：血管内皮増殖因子受容体
V_{ss}	volume of distribution at steady state：定常状態における分布容積

1. 非臨床試験計画概略

リトレシチニブは JAK3 および 5 種類の TEC ファミリーのキナーゼ（BMX，BTK，ITK，TEC および TXK）を不可逆的に阻害する共有結合形成型の経口阻害薬である。

リトレシチニブの効力を裏付ける試験として，4 種類の JAK アイソフォーム（JAK1，JAK2，JAK3 および TYK2）に対する阻害能および 304 種類にわたるパネルでキナーゼに対する選択性を in vitro で検討した。また，リトレシチニブのヒト循環血中の主代謝物である PF-07034562（M2）の JAK1，JAK2，JAK3，TYK2 および TEC ファミリーキナーゼに対する阻害能を評価した。複数分子の JAK アイソフォームが介在してシグナル伝達が行われる細胞内でのリトレシチニブによるサイトカイン誘発性シグナル伝達兼転写活性化因子（STAT）リン酸化阻害作用を，ヒト末梢血単核球（PBMC）/全血中のリンパ球，CD34 陽性前駆細胞，初代培養ヒトケラチノサイトなど種々の細胞を用いて検討した。ヒト PBMC を用いてリトレシチニブによる JAK3 ならびに TEC ファミリーキナーゼに対する占有率を評価した。IL-10 および IL-27 を介した免疫調節機能に対する影響についてヒトマクロファージを用いて検討した。単離ヒト白血球を用いて B 細胞受容体（BCR）および T 細胞受容体（TCR）シグナル伝達経路の重要なキナーゼである BTK および ITK に対する作用を細胞レベルで検討した。リトレシチニブの in vivo での薬理作用をラットの AIA モデルならびにマウスの化学物質誘発性 IBD モデル，T 細胞移入大腸炎モデルおよび EAE モデルといったげっ歯類の炎症性疾患モデルを用いて検討した。

副次的薬理試験では，広範な受容体，トランスポーター，イオンチャネルおよび酵素に対するリトレシチニブの作用を評価し，一部の標的に対しては細胞を用いた機能に対する追加試験も実施した。安全性薬理試験では，hERG に対する阻害能を in vitro で，心血管系，肺機能および神経機能に関してはラットおよびイヌを用いて in vivo で評価した。

リトレシチニブの吸収，分布，代謝および排泄を様々な in vitro 試験および in vivo 試験で評価した。In vivo 試験は主として毒性試験で使用した動物種であるマウス，ラットおよびイヌを用いて検討した。単回投与による血漿中濃度推移を検討した試験の投与経路は，静脈内または臨床投与経路である経口投与とした。吸収，代謝および薬物トランスポーターに関する検討には目的に応じた in vitro 試験系を用いた。分布ならびにヒトの代謝および排泄の検討には[^{14}C]リトレシチニブも使用した。血漿中のリトレシチニブ濃度の定量には高速液体クロマトグラフィ/タンデム質量分析法（HPLC/MS/MS）を用いた。

単回および反復投与試験によりリトレシチニブの毒性を包括的に評価した。ガイダンス（ICH M3[R2], 2009; EMEA/CHMP/SWP/28367/07 Rev 1, 2017）に従い，リトレシチニブの強制経口投与による薬理作用および全身曝露が認められたラットおよびイヌを安全性薬理試験および一般毒性試験に用いる動物種として選択した。ラット，イヌおよびヒトにおけるリトレシチニブの代謝は質的に類似しており，ヒト特有の代謝物は認められていない。また，ヒトとラットおよびイヌにおける JAK3/TEC ファミリーキナーゼの触媒ドメインのアミノ酸配列には高い相同性がみられ，これらの標的キナーゼに対するリトレシチニブの阻害能には大きな種差はないと考えられる。さらに，リトレシチニブによる JAK3 を介したラット，イヌおよびヒト全血での IL-15 に対する阻害活性にも差異は認められなかった。

臨床適用経路は経口投与を予定していることから，in vivo の毒性試験では投与経路には経口投与を選択し，0.5%メチルセルロース懸濁液として投与した。ラットおよびイヌを用いた反復投

与毒性試験における投与開始時期はそれぞれ約 7 週齢および 9～12 ヵ月齢であり，ヒトでは対象年齢である 12 歳以上に相当する年齢であった。

In vitro 遺伝毒性試験（細菌を用いた復帰突然変異試験および TK6 細胞を用いた染色体異常試験）および in vivo ラット小核試験を実施した。さらに，異数性を検討するために蛍光 in situ ハイブリダイゼーション（FISH）試験を実施した。トランスジェニック（tg）ヘミ接合体 rasH2 マウスを用いた 6 ヵ月間投与がん原性試験および Wistar Han ラットを用いた 104 週間投与がん原性試験でがん原性を評価した。

生殖発生毒性試験には，背景データが多いことおよび感受性の観点からラットあるいはウサギを用いた。ラットを用いた受胎能および着床までの初期胚発生に関する試験，ラットおよびウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験，ラットを用いた出生前および出生後の発生ならびに母体の機能に関する試験を実施した。

In vivo 光毒性試験では光毒性評価に適している有色の Long-Evans ラットを用い，眼および皮膚への影響を検討した。

毒性試験および安全性薬理試験における投与量（評価濃度）はいずれも遊離塩基換算の値で表記した。GLP 適用試験はリトレシチニブのマロン酸塩（PF-06651600-25）またはトシル酸塩（PF-06651600-15）を用いて実施した。すなわち，ラットまたはイヌを用いた 8 週間反復経口投与毒性試験，遺伝毒性試験，ラットを用いた神経機能および肺機能の評価，イヌを用いた心血管系の評価にはリトレシチニブのマロン酸塩（PF-06651600-25）を，hERG カリウム電流に対する影響の評価，ラットまたはイヌを用いた 6 ヵ月間または 9 ヵ月間反復経口投与毒性試験，光毒性試験，生殖発生毒性試験，がん原性試験にはリトレシチニブのトシル酸塩（PF-06651600-15）を用いた。ほとんどの重要な試験以外の毒性試験および安全性薬理試験，フォローアップとして実施した毒性発現の機序に関する試験ならびにマウスのアレルギーモデルを用いた試験ではリトレシチニブの遊離塩基を用いた。

すべての GLP 試験は，GLP 規則（FDA 21 CFR Part 58）に従って実施した。

2. 薬理試験

2.1. 効力を裏付ける試験

リトレシチニブの臨床開発に際して複数の非臨床試験を実施した。非臨床薬理試験の一覧を Table 1 に示す。

Table 1.　効力を裏付ける非臨床薬理試験の要約

試験	用量および投与頻度	試験番号
In vitro 試験		
活性測定	NA	PF-06651600_[redacted]_184021
キナーゼ選択性	NA	PF-06651600_[redacted]_151236
PF-07034562（代謝物 M2）の活性測定	NA	PF-06651600_[redacted]_123643
JAK3 および各種キナーゼに対する共有結合による不活性化の反応速度	NA	PF-06651600_[redacted]_184157
ヒト血清アルブミンとの反応性	NA	PF-06651600_[redacted]_101033
ヒト PBMC におけるサイトカインによる STAT リン酸化の阻害	NA	PF-06651600_[redacted]_184605
ヒト全血におけるサイトカインによる STAT リン酸化の阻害	NA	PF-06651600_[redacted]_184417
ラットおよびイヌ全血におけるサイトカインによる STAT リン酸化の阻害	NA	PF-06651600_[redacted]_102317
ヒト単球由来マクロファージにおける LPS 誘発サイトカイン産生に及ぼす作用	NA	PF-06651600_[redacted]_185220
IL-27 処理ヒトマクロファージにおける TNFαおよび IL-1β シグナル伝達に及ぼす作用	NA	PF-06651600_[redacted]_185307
ヒト Th1，Th17 および B 細胞の分化に及ぼす作用	NA	PF-06651600_[redacted]_044630
B 細胞受容体および T 細胞受容体が関与する CD69 発現上昇に及ぼす作用	NA	PF-06651600_[redacted]_023747
ヒト PBMC 溶解物における JAK3 および TEC ファミリーの占有率	NA	PF-06651600_[redacted]_023828
ヒト NK 細胞および CD8 陽性 T 細胞の機能的活性に及ぼす作用	NA	PF-06651600_[redacted]_011358
血小板による TPO の消失に及ぼす影響	NA	CP-690550_[redacted]_033455
巨核球前駆細胞における TPO および IL-6 シグナル伝達ならびに細胞増殖に対する影響	NA	CP-690550_[redacted]_094745
細胞アッセイにおける IL-4，IL-13，IL-22 および IL-31 誘発性 STAT リン酸化の阻害	NA	PF-06700841_[redacted]_090414
In vivo 試験		
AIA ラットモデルにおける有効性	0.1～80 mg/kg QD	PF-06651600_[redacted]_090652
化学物質誘発性 IBD マウスモデルにおける有効性，バイオマーカーおよび標的調節	3～100 mg/kg BID	PF-06651600_[redacted]_181316
T 細胞移入 IBD マウスモデルにおける有効性	20，60 mg/kg BID	PF-06651600_[redacted]_100542
多発性硬化症の EAE マウスモデルにおける有効性	20，60 mg/kg BID（予防） 30，100 mg/kg BID（治療）	PF-06651600_[redacted]_085612

2.1.1. In vitro 薬効薬理試験

2.1.1.1. 各種キナーゼに対する活性および選択性

1 mmol/L の ATP 存在下でのリトレシチニブの JAK1，JAK2，JAK3 および TYK2 に対する IC_{50} はそれぞれ 9710 nmol/L 超，10,000 nmol/L 超，33.1 nmol/L および 10,000 nmol/L 超であったことから，リトレシチニブは JAK3 の強力な阻害薬であり，JAK3 に対して JAK1，JAK2 および TYK2 の 293 倍以上の選択性を有することが示された（Table 2）。また，K_m 値付近の ATP 濃度でも評価したところ，JAK1，JAK2，JAK3 および TYK2 に対する IC_{50} はそれぞれ 1640，1510，0.346 および 3780 nmol/L であった。さらに，[redacted] 社のキナーゼパネルを用いて，K_m 値付近の ATP 濃度下で 304 種類のキナーゼに対するリトレシチニブの選択性も検討したところ，リトレシチニブ（1 µmol/L）は JAK3 および TEC ファミリーキナーゼを高い選択性で阻害することが示された（PF-06651600_[redacted]_151236）。

リトレシチニブのヒト循環血中の主代謝物である PF-07034562（M2）の JAK1，JAK2，JAK3，TYK2 および TEC ファミリーキナーゼに対する阻害能を 1 mmol/L の ATP 存在下で評価した（PF-06651600_[redacted]_123643）。M2 の IC_{50} は 9890 nmol/L 超（JAK1）または 10,000 nmol/L 超（JAK2，JAK3，TYK2，BMX，BTK，ITK，TEC および TXK）といずれのキナーゼに対しても阻害活性を示さないことが示された（Table 2）。

Table 2.　リトレシチニブおよびヒト代謝物 M2 の in vitro 酵素阻害活性の比較

キナーゼ	IC_{50} (nmol/L)[a]	
	リトレシチニブ	M2
JAK1	>9710	>9,890
JAK2	>10,000	>10,000
JAK3	33.1	>10,000
TYK2	>10,000	>10,000
BMX	606	>10,000
BTK	608	>10,000
ITK	8510	>10,000
TEC	592	>10,000
TXK	194	>10,000

a. 1 mmol/L ATP 存在下で測定した IC_{50}

2.1.1.2. 各種キナーゼに対する共有結合による不活性化の反応速度

リトレシチニブによる JAK3 および他のキナーゼ（BTK，BLK，BMX，ITK，TEC，TXK，SLK，FGR および FLT3）に対する共有結合形成による不活性化の反応速度について検討した（PF-06651600_[redacted]_184157）。検討したキナーゼのうち，ATP 結合ポケットの H10 の位置にシステインを有するキナーゼである JAK3（システイン 909）および TEC ファミリーの数種類のみ，リトレシチニブとの共有結合形成により不活性化された。ATP 結合ポケット内の別の位置にシステインを有するキナーゼに対するリトレシチニブの阻害はやや弱く，共有結合による修飾は検出されなかった。リトレシチニブの効力は k_{inact}/K_i により求められる。k_{inact} および K_i の値を 3 種のキナーゼ（BMX，ITK および TXK）で求めた。この試験から，JAK3 に対するリトレシチニブの選択性は，全体的な不活性化反応の至適化によって反応速度的に得られることが示された。比較的小さい解離定数（K_i 値 6300 nmol/L 以上）にもかかわらず，非共有結合キナー

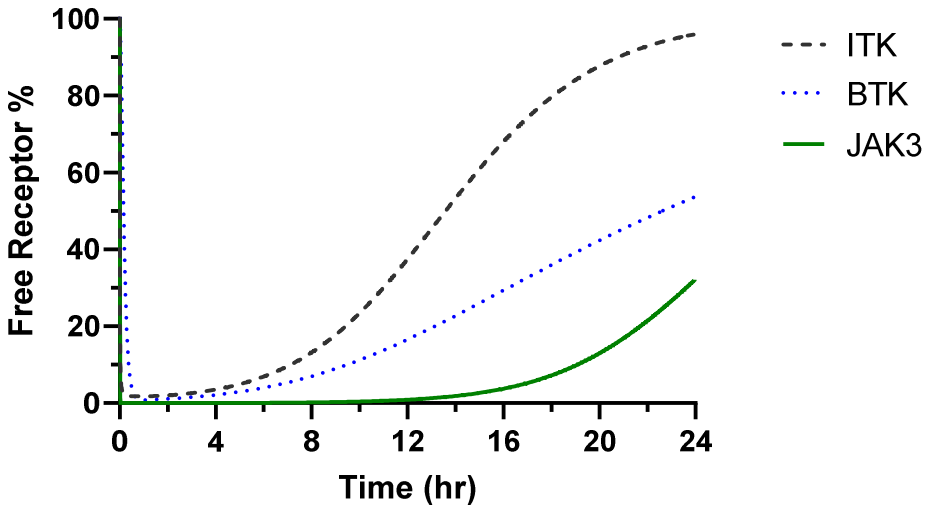
ゼ - 阻害薬複合体では相対的に大きい k_{inact} がリトレシチニブのアクリルアミド基と JAK3 のシステイン 909 チオール基の好ましい配置を反映している（Table 3）。

Table 3.　リトレシチニブの各種キナーゼに対する共有結合による不活性化

酵素	k_{inact} (s^{-1})	K_i (µmol/L)	k_{inact}/K_i ($M^{-1}\cdot s^{-1}$)
JAK3	2.32	6.31	3.68E + 05
BMX	0.00564	0.545	1.03E + 04
ITK	0.000144	0.0269	5.35E + 03
TXK	0.000487	0.131	3.79E + 03
TEC	0.00156	0.679	2.30E + 03
BTK	0.124	62.3	1.99E + 03
BLK	0.0278	32.4	8.58E + 02

得られた不活性化パラメータ（K_i および k_{inact}），リトレシチニブを円形脱毛症（AA）に 50 mg で投与時のポピュレーション PK（PMAR-1157）および酵素のターンオーバー（JAK3：3.5 時間[1]，BTK：12 時間[2]，ITK：1.8 時間[3]）に基づき，各キナーゼに対する阻害プロファイルを予測した。典型的な JAK の可逆的阻害剤でみられる阻害[4]とは異なり，リトレシチニブによる JAK3，BTK および ITK に対する阻害のプロファイルは，経時的に変化し，投与後 24 時間にわたり阻害が継続することが示された（Figure 1）。

Figure 1.　リトレシチニブを 50 mg で円形脱毛症患者に投与したときに予想される JAK3，BTK および ITK の遊離受容体（%）の経時変化



2.1.1.3. ヒト血清アルブミンとの反応性

リトレシチニブは HSA との反応傾向が低く，HSA 300 µmol/L とリトレシチニブ 320 µmol/L を 37°C で 3 時間インキュベートしたときに，付加体形成は検出されなかった。同じ条件下で 22 時間インキュベートしたときには，ごくわずかな付加体形成が検出された（PF-06651600_[redacted]_101033）。

2.1.1.4. ヒト末梢血単核球および CD34 陽性前駆細胞に対する活性

ヒト PBMC のフローサイトメトリーでゲートされたリンパ球では，リトレシチニブは IL-15 による JAK1/JAK3 依存性の STAT5 リン酸化を阻害し，IC_{50} 値は 51.7 nmol/L であった。一方，IFNαおよび IL-10 による JAK1/TYK2 依存性の STAT3 リン酸化の阻害については，IC_{50} 値がそれぞれ 12,100 nmol/L および 60,000 nmol/L 超であり，IL-27 による JAK1/JAK2/TYK2 依存性の STAT3 リン酸化の阻害については IC_{50} 値が 17,800 nmol/L であった（PF-06651600_[redacted]_184605）。CD34 陽性前駆細胞でリトレシチニブを 20,000 nmol/L まで評価したところ，EPO 依存性の STAT5 リン酸化の阻害は認められなかった。

2.1.1.5. ヒトならびにラットおよびイヌ全血細胞に対する活性

リトレシチニブは，ヒト全血のフローサイトメトリーでゲートされたリンパ球でそれぞれ IL-15 および IL-21 による JAK1/JAK3 依存性の STAT5 リン酸化および STAT3 リン酸化を阻害し，IC_{50} 値はそれぞれ 198 nmol/L および 362 nmol/L であった（PF-06651600_[redacted]_184417）。一方，リトレシチニブは，CD3 陽性リンパ球または単球では，IFNαおよび IL-10 による JAK1/TYK2 依存性の STAT3 リン酸化，IL-27 による JAK1/JAK2/TYK2 依存性の STAT3 リン酸化を阻害せず（IC_{50} 値 60,000 nmol/L 超），リンパ球，単球または CD34 陽性前駆細胞では，JAK2/TYK2 依存性の IL-23 による STAT3 リン酸化および IL-12 による STAT4 リン酸化，IFNγ による JAK1/2 依存性の STAT1 リン酸化，IL-6 による JAK1/JAK2/TYK2 依存性の STAT1 リン酸化および STAT3 リン酸化ならびに EPO 依存性の STAT5 リン酸化を阻害しなかった（IC_{50} 値 20,000 nmol/L 超）（Table 4）。

Table 4.　細胞レベルでの阻害活性

シグナル伝達ペア	サイトカイン	STATリン酸化	リンパ球	IC50[a] (nmol/L)	IC50 (ng/mL)
JAK1/TYK2	IFNα	STAT3	ヒトPBMC	12,100	3,450
			ヒト全血	>60,000	>17,100
	IL-10	STAT3	ヒトPBMC	>60,000	>17,100
			ヒト全血	>60,000	>17,100
JAK1/JAK2/TYK2	IL-27	STAT3	ヒトPBMC	17,800	5,080
			ヒト全血	>60,000	>17,100
	IL-6	STAT1/3	ヒト全血	>20,000	>5,710
JAK1/JAK2	IFNγ	STAT1	ヒト全血	>20,000	>5,710
JAK1/JAK3	IL-15	STAT5	ヒトPBMC	51.7	14.8
			ヒト全血	198	56.5
	IL-21	STAT3	ヒト全血	362	103
JAK2/TYK2	IL-23	STAT3	ヒト全血	>20,000	>5,710
	IL-12	STAT4	ヒト全血	>20,000	>5,710
JAK2/JAK2	EPO	STAT5	ヒトPBMC	>20,000	>5,710
			ヒト全血	>20,000	>5,710

a. IC_{50} が 10,000 nmol/L超の阻害は生理学的に意味がないと考えられる

また，ラットおよびイヌの全血を用いて JAK シグナル伝達経路に対するリトレシチニブの in vitro 阻害活性を測定し，薬理試験および毒性試験で用いた非臨床動物種で認められたリトレシチニブによる JAK3 阻害の外挿性を評価した（PF-06651600_[redacted]_102317）。全血中での活性

から，IL-15 および IL-21 のシグナル伝達については，サイトカインのシグナル伝達を阻害する相対的活性はヒト，ラットおよびイヌで同程度であることが示された（Table 5）。

Table 5.　ラット，イヌおよびヒト全血での阻害活性

シグナル伝達ペア	サイトカイン	STATリン酸化	IC_{50} (nmol/L，括弧内はng/mL)		
			ラット	イヌ	ヒト[a]
JAK1/JAK3	IL-15	STAT5	137 (39.1)	170 (48.5)	198 (56.5)
	IL-21	STAT3	302 (86.2)	212 (60.5)	362 (103)

a. 試験報告書PF-06651600_[redacted]_184417 より

2.1.1.6. ヒト単球由来マクロファージにおける LPS 誘発サイトカイン産生に及ぼす作用

初代培養ヒトマクロファージでは，リトレシチニブによる JAK3 の選択的阻害は，LPS で刺激したヒト単球由来マクロファージの in vitro モデルにおいて IL-10 の機能を阻害しなかった。これに対して，PF-02384554 による JAK1 の選択的阻害およびトファシチニブによる JAK1/JAK2/JAK3 の阻害はこのモデルで IL-10 の機能を阻害した（PF-06651600_[redacted]_185220）。リポ多糖にマクロファージが反応し，JAK1 選択的阻害薬または JAK1/JAK3 阻害薬の濃度の上昇とともに IL-1β，IL-6 および TNFαの濃度が上昇した。これに対して，リトレシチニブによる JAK3 の選択的阻害は，同じ条件下でこれらの炎症促進性サイトカイン濃度を変化させなかった。リトレシチニブ，PF-02384554 またはトファシチニブとの培養に抗 IL-10 中和抗体を加えたところ，いずれの場合も IL-1β，IL-6 および TNFαの濃度が顕著に上昇したことから，リポ多糖に反応して生じるこれらのサイトカイン産生の阻害は IL-10 に依存することが示された。

2.1.1.7. IL-27 処理ヒトマクロファージにおける TNFαおよび IL-1βシグナル伝達に及ぼす作用

リトレシチニブによる JAK3 の選択的阻害は，TNFαおよび IL-1β刺激ヒトマクロファージにおいて 20 µmol/L までの濃度では IL-27 の機能を阻害しなかったが，PF-02384554 による JAK1 の選択的阻害は，TNFαおよび IL-1β刺激ヒトマクロファージにおいて 10 µmol/L および 20 µmol/L の濃度で IL-27 の機能を阻害した（PF-06651600_[redacted]_185307）。IL-27 は SOCS1 の mRNA 濃度を上昇させながら，TNFαおよび IL-1βによる IL-8 転写を減衰させる。また，ヒトマクロファージを IL-27 で前処理すると，TNFα刺激後の PD-L1 の mRNA および表面発現が誘導される。IL-27 による IL-8 の転写減衰ならびに SOCS1 転写，PD-L1 転写または PD-L1 の表面発現の誘導は，リトレシチニブによる JAK3 の選択的阻害の影響を受けなかったが，JAK1 の選択的阻害によって抑制された。このデータは，IL-27 のシグナル伝達が JAK1/JAK2 または TYK2 の組み合わせによって媒介され，JAK3 に依存しないことと符合する。

2.1.1.8. ヒト Th1，Th17 および B 細胞の分化に及ぼす作用

リトレシチニブは Th1 細胞での IFNγおよび Th17 細胞での IL-17A の産生を強力に阻害し，IL-21 および CD40 リガンドで刺激した CD19 陽性 B 細胞での IgG の産生も阻害した（PF-06651600_[redacted]_044630）。

2.1.1.9. B 細胞受容体および T 細胞受容体が関与する CD69 発現上昇に及ぼす作用

B 細胞では BCR の架橋結合が，リトレシチニブにより阻害される TEC ファミリーメンバーである BTK に依存的な CD69 の発現を上昇させる細胞内シグナル伝達カスケードを開始させることが示されている。同様に，T 細胞では TCR 活性化が CD69 の発現を上昇させる[5]。そこで，単離ヒト白血球を用いて BCR および TCR の架橋結合による CD69 発現上昇を測定することにより，BCR および TCR シグナル伝達経路の重要なキナーゼである BTK および ITK（いずれも TEC ファミリーメンバー）に対するリトレシチニブの作用を細胞レベルで検討した。その結果，リトレシチニブによって BCR および TCR による CD69 の発現上昇が抑制されたことから（IC_{50} 値はそれぞれ 344 nmol/L および 380 nmol/L），リトレシチニブは細胞レベルで BTK および ITK を阻害することが示された（PF-06651600_[redacted]_023747）。

2.1.1.10. ヒト NK 細胞および CD8 陽性 T 細胞の機能に及ぼす作用

In vitro でのヒト PBMC による NK 細胞および CD8 陽性 T 細胞サブセットの細胞溶解活性に対するリトレシチニブの作用を，細胞傷害性顆粒タンパク質である CD107a の活性化依存的な細胞膜表出および IFNγの細胞内蓄積を測定するアッセイにより評価した（PF-06651600_[redacted]_011358）。刺激前に種々の濃度のリトレシチニブで PBMC を処理することにより，NK 細胞および CD8 陽性 T 細胞表面への CD107a の表出が阻害され，IC_{50} 値はそれぞれ 509 nmol/L および 210 nmol/L であった。また，細胞内の IFNγ産生も阻害し，IC_{50} 値はいずれの細胞でも 188 nmol/L であった。NK 細胞および CD8 陽性 T 細胞におけるこれらの作用は ITK 依存性と考えられる。

2.1.1.11. IL-4，IL-13，IL-22 および IL-31 誘発性 STAT リン酸化に対する作用

JAK ファミリー依存性サイトカインで刺激した種々の細胞を用いて，リトレシチニブの阻害作用を評価した（PF-06700841_[redacted]_090414）。IL-4 は，主に造血細胞に発現する JAK1/JAK3 依存性 I 型受容体または主に非造血細胞に発現する JAK1 依存性（JAK3 非依存性）II 型受容体のいずれかの受容体複合体を介してシグナル伝達を開始する[6]。I 型受容体または II 型受容体のいずれかが活性化されると，STAT6 がリン酸化される。ヒト全血中の T 細胞および B 細胞において，リトレシチニブは IL-4 による STAT6 リン酸化を阻害し，IC_{50} 値はそれぞれ 226 nmol/L および 1000 nmol/L であった。THP-1 細胞（IFNγで前処理したヒト単球細胞株）では，IL-31 による STAT3 リン酸化を阻害し，IC_{50} 値は 4400 nmol/L であった。評価した他の細胞である HT-29 細胞，初代ケラチノサイトおよび初代腸上皮細胞では，IC_{50} 値が 20,000 nmol/L 超であったことから，リトレシチニブは IL-4 および IL-13 による STAT6 リン酸化ならびに JAK1/TYK2 シグナル伝達を介した IL-22 による STAT3 リン酸化を阻害しないことが示された（Table 6）。

Table 6.　IL-4，IL-13，IL-22 およびIL-31 誘発性STATリン酸化に対する阻害活性

シグナル伝達ペア	サイトカイン	STATリン酸化	細胞種	IC_{50} (nmol/L)	IC_{50} (ng/mL)
JAK1/JAK3	IL-4	STAT6	B細胞	1,000	285
			T細胞	226	64.5
			単球	>20,000	>5,710
			HT-29 細胞	>20,000	>5,710
JAK1/JAK2/TYK2	IL-13		B細胞	>20,000	>5,710
			単球	>20,000	>5,710
			HT-29 細胞	>20,000	>5,710
JAK1/TYK2	IL-22	STAT3	ケラチノサイト	>20,000	>5,710
			腸管上皮細胞	>20,000	>5,710
JAK1/JAK2/TYK2	IL-31		THP-1 細胞	4400	1260

2.1.1.12. 溶解したヒト PBMC における JAK3 および TEC ファミリーに対する占有率

ヒト PBMC 溶解物を用いて，リトレシチニブによる JAK3 および TEC ファミリーキナーゼの占有率を定量的に測定した。リトレシチニブによる 50%占有率は，JAK3 に対しては 73 nmol/L，TEC ファミリーメンバーに対しては 58～176 nmol/L の濃度で達成されたことから，細胞を用いたこれらの実験条件下では，リトレシチニブは JAK3 および TEC ファミリーメンバーに対して同程度の共有結合活性を示すことが示唆された（PF-06651600_[redacted]_023828）。

2.1.1.13. JAK3 および TEC ファミリーキナーゼの触媒ドメインの配列相同性

ヒトの JAK3 および TEC ファミリーのタンパク質配列（TXK，ITK，BMX および BTK を含む）を，これらに対応するイヌおよびラットの相同タンパク質と比較した[7]。JAK3 キナーゼドメインの一致率は，ヒトとイヌで 94%であり，ヒトとラットで 87%であった。BTK および BMX キナーゼドメインの一致率は，それぞれヒトとイヌで 99%および 95%であり，ヒトとラットで 98%および 94%であった。ITK および TEC キナーゼドメインの一致率はいずれも，ヒトとイヌで 96%であり，ヒトとラットで 97%であった。TXK キナーゼドメインの一致率は，ヒトとイヌで 89%であり，ヒトとラットで 87%であった。このように JAK3 および TEC ファミリーキナーゼのアミノ酸配列がヒト，イヌおよびラットの間で高度に保存されていることから，結合特性は動物種間で高度に保存されていることが示唆される。

2.1.1.14. ヒト巨核球前駆細胞における TPO および IL-6 誘発性 STAT リン酸化に対する作用

ヒト巨核球前駆細胞では，TPO 誘導性 STAT5 リン酸化および IL-6 誘導性 STAT3 リン酸化（いずれも，血小板産生において重要であることが示されている JAK 依存性経路[8]）に対するリトレシチニブの阻害作用は弱く，IC_{50} 値は 20,000 nmol/L 超であった（CP-690550_[redacted]_094745）。また，リトレシチニブは IL-6 を介して巨核球前駆細胞へと分化する CD34 陽性前駆細胞の増殖を抑制しなかった（IC_{50} は 20,000 nmol/L 超）。この結果の臨床的意義は不明である。

2.1.1.15. ヒト血小板による TPO の消失に対する作用

リトレシチニブは，TPO 受容体である MPL と JAK2 との結合を介したヒト血小板による TPO の消失[9]に対してはほとんど活性を示さず，IC_{50} 値は 20,000 nmol/L 超であった（CP-690550_[redacted]_033455）。血小板を介した TPO の消失が阻害されなかったことは，JAK2 キナーゼ活性の阻害に対するリトレシチニブの IC_{50} 値が 10,000 nmol/L 超であったこと（PF-06651600_[redacted]_184021）と相関した。この実験で評価したより強力な JAK2 阻害薬（バリシチニブおよびトファシチニブ）による TPO の消失への影響は最大でも 10%であったことから，血小板への内在化による TPO の消失の 90%は JAK2 阻害の影響を受けないことが示唆された。

2.1.2. In vivo 薬効薬理試験

AIA，IBD，EAE および AA の炎症疾患の動物モデルを用いて，リトレシチニブの in vivo 薬理活性を評価した。これらのモデルによって，炎症疾患経過の個別の側面の機序が明らかになったが，これをヒトでの臨床有効性に外挿できるかどうかは不明である。

2.1.2.1. ラットアジュバント誘発関節炎（AIA）モデルにおける有効性

ラットの AIA モデルでは，トファシチニブによる JAK ファミリーキナーゼの阻害は疾患進行および病理学的変化を抑制することが示されたことから，このモデルを用いた評価は治療法の抗炎症作用を評価する信頼性の高い方法である[10]。ラットの AIA モデルでの評価に先立ち，無処置ラットにリトレシチニブを 6，15 および 80 mg/kg 投与後の全血を用いて用量を検討したところ，リトレシチニブはいずれの用量においても C_{max} で IL-21 刺激による STAT3 リン酸化を 80%超～100%阻害した。

完全フロイントアジュバントで免疫した雌 Lewis ラットにおいて，プレチスモグラフィーを用いた後肢容積により関節炎の発症を確認後，0.1～80 mg/kg/日のリトレシチニブまたは溶媒を 7 日間連日 QD または BID 経口投与した。リトレシチニブの QD 経口投与により，3 mg/kg 群および 10 mg/kg 群の肢容積が有意に減少した。また，QD 投与時と BID 投与時の有効性と比較したところ，いずれにおいても EC_{av50} は同程度であり，C_{av} が抗炎症反応を予測する PK パラメータとして適切であることが示された（PF-06651600_[redacted]_090652）。

2.1.2.2. 炎症性腸疾患（IBD）マウスモデルにおける有効性

一般的な DSS および TNBS によるマウスの 2 種の化学物質誘発性 IBD モデルを用いて，複数の用量のリトレシチニブを予防的に BID 経口投与して大腸炎の程度の軽減を評価した（PF-06651600_[redacted]_181316）。リトレシチニブを 10 mg/kg で BID 投与したところ，体重減少，疾患活動性，大腸の病理組織学的評価に基づく炎症程度およびバイオマーカーの大腸遺伝子発現の抑制がみられた。IHC 染色分析から，10 mg/kg または 30 mg/kg を投与したマウスの大腸で STAT3 および STAT5 リン酸化が減少したことが示された。これらの試験で採取した全血を用いたアッセイを実施したところ，リトレシチニブはすべての用量で共通γ鎖のサイトカイン IL-15 および IL-21 によって刺激された STAT リン酸化を抑制した一方，IBD において防御的な効果を有する IL-10 または IL-27 によって刺激される STAT のリン酸化には作用せず，リトレシチニブが JAK3 の選択的阻害によって有効性を示す作用機序が改めて裏付けられた。

大腸炎モデルマウスにリトレシチニブ 20 mg/kg および 60 mg/kg を BID 経口投与したところ，試験 27～31 日にマウスの疾患が改善し，体重，結腸の重量・長さまたは結腸の病理組織学的所見に変化は認められなかった（PF-0665100_[redacted]_100542）。リトレシチニブ 60 mg/kg を投与した動物の結腸組織サンプルにおける遺伝子発現は，cd127，cldn10，prf1，il2 および klrk1 の発現上昇ならびに foxp3 の発現低下を示したが，20 mg/kg 群では ltf，fizz1，il1b および foxp3 の発現低下が示された。腸間膜リンパ節の細胞数に差はみられなかったが，CD4 陽性および Foxp3 陽性制御性 T 細胞数はいずれの用量群でも減少した。

2.1.2.3. 多発性硬化症の EAE マウスモデルにおける有効性

マウスの多発性硬化症モデルである EAE は，ヒトの疾患との多くの類似性により，開発中の治療薬の評価に広く利用されている。臨床症状の 1 つである麻痺は中枢神経系の炎症および脱髄の病理組織学的病変と関連があり，ミエリン特異的 CD4 陽性 T 細胞によって誘発される。28 日間までの 20 mg/kg および 60 mg/kg の予防的連日投与は EAE の発症を遅らせ，平均最高スコア，終了時の平均臨床スコア，EAE 発症率，発症日の中央値，終了時の体重変化量ならびに脊髄の病理組織学的検査による神経炎症，神経変性および脱髄に基づく疾患の程度を用量依存的に低減した（PF-06651600_[redacted]_085612）。EAE の発症日から 14 日間，リトレシチニブを 30 mg/kg および 100 mg/kg の用量で治療的に投与したところ，疾患の程度の軽減に明確な効果が認められた。IHC 染色分析により，リトレシチニブを投与したマウスの脊髄で STAT1，STAT3 および STAT5 リン酸化の減少が認められ，リトレシチニブの作用機序が確認された。

2.1.2.4. AA マウスモデルにおける有効性

C3H/HeJ 系皮膚移植マウスにリトレシチニブを 30 mg/kg の用量で 4 週間，ALZET 浸透圧ポンプを用いて全身投与したところ，AA の発症が抑制され，12 週間の投与により，既存の AA が回復した。4 週間投与後の評価では，AA に関連した皮膚炎症の減少ならびに SDLN（T 細胞発生の主要な部位）内の CD8 陽性 $T_{E/M}$ および NKG2D 陽性 CD8 陽性 T 細胞の頻度および割合の減少が認められた。12 週間投与後の評価では，被毛の明確な再生が認められ，SDLN 内の CD8 陽性エフェクターメモリーT 細胞，CD8 陽性 NKG2D 陽性 T 細胞，IFNγ 産生 CD8 陽性 T 細胞の絶対数または頻度が対照群と比較して顕著に減少した。12 週間の局所塗布後では，リトレシチニブは被毛の再生を明確に回復させ，AA に関連する CD8 陽性細胞の浸潤と，皮膚内の CD45 陽性細胞の浸潤の頻度および CD8 陽性エフェクターT 細胞を顕著に減少させた。これらの結果から，リトレシチニブが共通γ鎖のサイトカインまたは TEC キナーゼのシグナル伝達を遮断することによって T 細胞の増殖および機能が抑制され，T 細胞の皮膚への浸潤が低下する結果として AA が回復することが示された。

2.2. 副次的薬理試験

リトレシチニブのオフターゲット薬理活性について，受容体，トランスポーター，イオンチャネルおよび酵素の広範なパネル（[redacted] 社の [redacted]）を用いたリガンド結合スクリーニング試験において初期濃度 10 µmol/L で評価した（100009194）。この濃度において，Abl キナーゼ，EGFR キナーゼおよび VEGFR2 キナーゼを除き，リトレシチニブの結合阻害または酵素活性阻害は 50%未満であり活性を示さなかった。50%以上の阻害がみられたこれらのキナーゼに対する阻害活性についてさらに検討したところ，IC_{50} はそれぞれ 2800 nmol/L，2200 nmol/L および 1300 nmol/L であった。

PAE-KDR を用いて VEGFR2 のリン酸化を調べる機能的アッセイをフォローアップとして実施した結果，リトレシチニブは 30 µmol/L（ヒトに 50 mg を投与したときの非結合型 C_{max} の 27 倍超）までの濃度で阻害活性を示さなかった（PF-06651600-00-0010 pVEGFR_[redacted]-20[redacted]）。単離した EGFR または Abl キナーゼに対する活性を 1 mmol/L の ATP 基質の存在下で評価したところ（PF-06651600_[redacted]_151236），リトレシチニブの IC_{50} 値はそれぞれ 50 µmol/L 超および 30 µmol/L 超であり，同条件での JAK3 に対する IC_{50} 値（33.1 nmol/L）の 1511 倍超および 906 倍超であった。

副次的薬理試験の結果の要約を Table 8 に示す。

2.3. 安全性薬理試験

Table 7 に示す安全性薬理試験でリトレシチニブを評価した。安全性薬理試験の結果の要約を Table 8 に示す。In vivo 試験では，臨床投与経路である経口投与を選択した。

Table 7.　リトレシチニブの安全性薬理試験の概要

試験	濃度または用量	試験番号	GLP 適用
In vitro 試験			
hERG パッチクランプ試験	1, 3, 10, 30 µmol/L	[redacted]GR206	非適用
hERG パッチクランプ試験	0, 30, 100, 300 µmol/L	180319.QHJ	適用
In vivo 試験			
肺機能 – ラット			
RR，TV，MV	0, 75, 175, 400 mg/kg[a]	[redacted]GR139	適用
神経機能 – ラット			
FOB，BT，LA	0, 75, 175, 400 mg/kg[a]	[redacted]GR139	適用
心血管系 – ラット			
HR，BT，BP，身体活動	0, 125 mg/kg[c]	[redacted]LJ074	非適用
心血管系 – 覚醒イヌ			
ECG，HR，BP，LVP，身体活動	0, 6, 20 mg/kg[b]	[redacted]GR078	非適用
ECG，HR，BP，LVP，身体活動	0, 3, 15, 45 mg/kg[a]	[redacted]GR140	適用

a. 単回投与
b. 2 回投与
c. 3 回投与

GLP 適用下でラットを用いて実施した単回投与による中枢神経系および呼吸系の評価（[redacted]GR139）では，高用量である 400 mg/kg（ヒトに 50 mg を投与したときの非結合型 C_{max} の 59 倍）まで，呼吸数，1 回換気量，分時換気量，体温，自発運動量および FOB への影響は認められなかった。また，ラットを用いた最長 6 ヵ月間までの反復投与毒性試験においても，中枢神経系に関連した一般状態の変化または呼吸困難の徴候は認められず，肺または脳の剖検所見もしくは病理組織学的所見も認められなかったことから，リトレシチニブは中枢神経系または呼吸系に影響を及ぼさないことが示された。

GLP 適用下で実施した遺伝子組換え HEK293 細胞を用いた in vitro hERG 試験（180319.QHJ）では，リトレシチニブは 100 µmol/L および 300 µmol/L の濃度で hERG 電流をそれぞれ 16.5%および 31.0%阻害した。これらの値は，溶媒対照値と比較して統計的に有意であった。リトレシチニ

ブの hERG カリウム電流に対する阻害作用の IC_{50} 値は 300 µmol/L 超であると判断され，ヒトに 50 mg を投与したときの非結合型 C_{max} の 273 倍以上であった。

リトレシチニブの in vivo 心血管系試験をラットおよびイヌを用いて実施した。一部の試験で，心拍数，血圧および QT 間隔に，比較的小さく一貫性のない，変化の方向が異なる（増加または減少）影響が認められたが，QTc 延長は認められなかった。認められた心電図（イヌでの RR 間隔および QT 間隔）の変化はすべて心拍数の変化によるものであった。

GLP 非適用下でラットを用いて実施した心血管系試験（[redacted]LJ074）では，雄ラットにリトレシチニブを 125 mg/kg の用量で 1 日 1 回 3 日間経口投与したとき，時間を一致させた溶媒対照群と比較して，試験 1 日に収縮期血圧，拡張期血圧および平均血圧が上昇し，試験 3 日に体温，収縮期血圧および平均血圧が低下した。125 mg/kg における曝露量比は，ヒトに 50 mg を投与したときの非結合型 C_{max} の 29 倍であった。

GLP 非適用下でイヌを用いて実施した心血管系試験（[redacted]GR078）では，リトレシチニブを 6 mg/kg および 20 mg/kg の用量で経口投与したとき，心拍数の減少，およびそれに対応する RR 間隔の延長が認められた。6 mg/kg 群および 20 mg/kg 群で，心拍数の減少に伴う QT 間隔延長も認められたが，QTc 間隔の変化は認められなかった。20 mg/kg 群では，収縮期血圧，拡張期血圧および平均血圧の低下ならびに左室拡張末期圧のわずかな低下も認められた。20 mg/kg における曝露量比は，ヒトに 50 mg を投与したときの非結合型 C_{max} の 22 倍であった。

GLP 適用下でイヌを用いて実施した心血管系試験（[redacted]GR140）では，リトレシチニブを 0，3，15 または 45 mg/kg の用量で投与したとき，一般状態の変化は認められず，3 mg/kg または 15 mg/kg の投与後ではいずれの心血管系パラメータにも変化は認められなかった。リトレシチニブ 45 mg/kg を投与したとき，心拍数の増加（+ 15 bpm）およびそれに伴う QT 間隔の短縮（-11 msec）が認められた。NOEL である 15 mg/kg における非結合型 C_{max} は，ヒトに 50 mg を投与したときの 13 倍であった［PK 評価は 45 mg/kg で実施したことから，曝露量比はイヌを用いた 8 週間投与毒性試験（[redacted]GR135）の 15 mg/kg 群での試験 1 日の非結合型 C_{max} の平均値（4190 ng/mL）を用いて算出した］。

イヌを用いた反復投与毒性試験のデザインに，心血管系の評価項目（心電図，血圧および心拍数）を組み入れた（**4.2.2** 項）。また，ラットおよびイヌを用いたほとんどの反復投与毒性試験に，心臓重量測定ならびに心臓の剖検および病理組織学的検査を組み入れた。ラットでは最長 6 ヵ月間，イヌでは最長 9 ヵ月間の反復投与毒性試験においてリトレシチニブによる心血管系への影響（臓器重量または剖検もしくは病理組織学的所見）は認められなかった。

Table 8.　副次的薬理試験および安全性薬理試験の要約

試験（試験番号）	濃度または投与量	所見
副次的薬理試験：in vitro 試験		
リガンド結合ならびに細胞および核受容体の機能，酵素および取り込み試験 （100009194）	10 µmol/L	IC_{50} 値 Abl キナーゼ：2800 nmol/L EGFR キナーゼ：2200 nmol/L VEGFR2 キナーゼ：1300 nmol/L
VEGFR2 リン酸化に対する機能的細胞試験 （PF-06651600-00-0010 pVEGFR_[redacted]-20[redacted]）	～30 µmol/L	阻害なし
キナーゼ選択性パネル試験 （PF-06651600_[redacted]_151236）	～50 µmol/L (1 mmol/L ATP)	EGFR 阻害に対する IC_{50}：50 µmol/L 超 Abl 阻害に対する IC_{50}：30 µmol/L 超
安全性薬理試験：in vitro 心血管系試験		
CHO 細胞を用いた hERG 試験 （[redacted]GR206）	1, 3, 10, 30 µmol/L	1，3，10 および 30 µmol/L で hERG 電流をそれぞれ-0.2%，2.2%，5%および 12.9%阻害した。 IC_{50}：30 µmol/L 超
HEK293 細胞を用いた hERG 試験 （180319.QHJ）	0, 30, 100, 300 µmol/L	30，100，300 µmol/L で hERG カリウム電流をそれぞれ 2.7%，16.5%および 31%阻害した。 IC_{50}：300 µmol/L 超
安全性薬理試験：in vivo 試験		
ラットを用いた中枢神経系・呼吸系への影響 （[redacted]GR139）	0, 75, 175, 400 mg/kg	なし
ラットを用いた心血管系への影響 （[redacted]LJ074）	0, 125 mg/kg （3 回投与）	試験 1 日：収縮期血圧↑，拡張期血圧↑，平均血圧↑ 試験 3 日：体温↓，収縮期血圧↓，平均血圧↓
イヌを用いた心血管系への影響 （[redacted]GR078）	0, 6, 20 mg/kg/日 （2 回投与）	6 mg/kg 以上：心拍数↓，RR 間隔↑，QT 間隔↑ 20 mg/kg：収縮期血圧↓，平均血圧↓，拡張期血圧↓，左室拡張末期圧↓
イヌを用いた心血管系への影響 （[redacted]GR140）	0, 3, 15, 45 mg/kg/日 （単回投与）	45 mg/kg：心拍数↑（15 bpm：投与後 0.5～3.5 時間），QT 間隔↓ (-11 msec：投与後 0.5～3.5 時間）

2.4. 薬力学的薬物相互作用

リトレシチニブの薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

3. 薬物動態試験

3.1. 分析法

In vitro および in vivo の薬物動態試験では，LC/MS/MS 法を用いて血漿中のリトレシチニブおよび M2 濃度を測定した。GLP 適用毒性試験で採取した血漿試料の分析に使用するためにリトレシチニブの定量法をバリデートし，ラットを用いた 7 日間反復投与薬物動態試験で使用するために M2 の定量法の適格性を確認した（Table 9）。

Table 9.　リトレシチニブおよび M2 の LC/MS/MS を用いた定量法のバリデーション

動物種・試料	分析対象物質	定量範囲	試験番号
マウス血漿	リトレシチニブ	1–1000 ng/mL	[redacted]0747VSMB_PGC
ラット血漿	リトレシチニブ	1–1000 ng/mL	[redacted]0248VSMB_PGC_R3
ウサギ血漿	リトレシチニブ	1–1000 ng/mL	[redacted]0207VSMB_PGC_R2
イヌ血漿	リトレシチニブ	1–1000 ng/mL	[redacted]0251VSMB_PGC_R2
ラット血漿 [a]	M2	1–1000 ng/mL	202346MQSMB_PGC

a. 適格性を確認

3.2. 吸収

In vitro で，リトレシチニブは P-gp および BCRP の基質となった（Table 10）。マウス，ラットおよびイヌを用いた単回投与による薬物動態試験で，これらの動物種ではリトレシチニブの吸収は速やかであることが示された。ラットにリトレシチニブを反復投与したときのリトレシチニブおよび M2 の曝露量は雌雄で同程度であった。

Table 10.　リトレシチニブの吸収および血漿中濃度推移に関する検討

試験	投与量または濃度	結果	試験番号
P-gp に対する基質性の検討	0.3, 1, 3 µmol/L	B-A/A-B efflux ratio：40 超	PF-06651600_[redacted]_063458
BCRP に対する基質性の検討	0.5 µmol/L および 2 µmol/L	B-A/A-B efflux ratio：10 超	18PFIZP1R1S1
マウスに単回経口および静脈内投与時の血漿中濃度推移	IV（3 mg/kg） PO（30 mg/kg）	IV： CL_{tot}：45 mL/min/kg V_{ss}：0.84 L/kg $t_{½}$：1.3 時間 AUC_{inf}：1120 ng•h/mL PO： C_{max}：10200 ng/mL T_{max}：0.25 時間 AUC_{inf}：6910 ng•h/mL %F：61	PF-06651600_[redacted]_145444
ラットに単回経口および静脈内投与時の血漿中濃度推移	IV（0.71 mg/kg） PO（3 mg/kg）	IV： CL_{tot}：69 mL/min/kg V_{ss}：1.4 L/kg $t_{½}$：0.33 時間 AUC_{inf}：174 ng•h/mL PO： C_{max}：173 ng/mL T_{max}：0.50 時間 AUC_{inf}：446 ng•h/mL %F：61	PF-06651600_[redacted]_152020
イヌに単回経口および静脈内投与時の血漿中濃度推移	IV（1 mg/kg） PO（3 mg/kg）	IV： CL_{tot}：13 mL/min/kg V_{ss}：1.1 L/kg $t_{½}$：1.1 時間 AUC_{inf}：1250 ng•h/mL PO： C_{max}：2420 ng/mL T_{max}：0.25 時間 AUC_{inf}：4100 ng•h/mL %F：100	PF-06651600_[redacted]_132012
ラットに反復経口投与時の血漿中濃度推移（試験 7 日）（未変化体および M2）	雌雄 （リトレシチニブ：PO 200 mg/kg）	雄の AUC_{24} (ng•h/mL)： 未変化体：126000 M2：70700 雌の AUC_{24} (ng•h/mL)： 未変化体：118000 M2：78500	JAK3-117-PK

GLP 適用下で実施したマウス，ラット，ウサギおよびイヌを用いた経口投与毒性試験で，反復投与時のリトレシチニブのトキシコキネティクスを評価した。

- これらの動物種では，リトレシチニブの C_{max} および AUC_{24} は，評価した用量範囲で用量の増加に伴って増加した。
- マウス，ラットおよびイヌでは，一貫した性差は認められなかった。
- ラットおよびイヌでは，投与期間を通じてリトレシチニブの蓄積は認められなかった。

ヒトにおける絶対的バイオアベイラビリティおよびマスバランス試験（B7981011 試験）では，リトレシチニブのバイオアベイラビリティは 64%であり，吸収率（Fa•Fg）は 0.89 と推定された（Figure 2）。

3.3. 分布

3.3.1. 血漿蛋白結合率および血球移行性

リトレシチニブの血漿蛋白結合率は低度から中程度で種差がみられた。M2 は検討したこれらの動物種の血漿蛋白質に有意な結合を示さなかった（Table 11）。

[^{14}C]リトレシチニブ（5 µmol/L）を用いて血漿中蛋白結合についてより詳細に検討したところ，リトレシチニブは主に HSA に結合し，血漿中の血小板，α_1-酸性糖蛋白質，HDL，フィブリノーゲンまたは γ-グロブリンには有意に結合しないことが示された（PF-06651600_[redacted]_103503）。

血液/血漿中濃度比から，リトレシチニブはある程度血球中へ分布するが，M2 は血漿中により多く分布することが示された（Table 11）。

Table 11.　リトレシチニブおよび M2 の血漿蛋白結合率（2 µmol/L）ならびに血液/血漿分布（1 µmol/L）

	マウス f_u	ラット f_u	ウサギ f_u	イヌ f_u	ヒト f_u	試験番号
リトレシチニブ	—	0.67	—	0.82	0.86	PF-06651600_[redacted]_154304
	0.22	—	0.29	—	—	YDP067/032
M2	1.12	1.11	1.07	1.21	0.95	YDP/067/368
	マウス C_b/C_p	ラット C_b/C_p	ウサギ C_b/C_p	イヌ C_b/C_p	ヒト C_b/C_p	
リトレシチニブ	—	0.99	—	1.57	1.62	YDP/067/018
M2	0.55	0.55	0.83	0.52	0.68	YDP/067/369

C_b/C_p：血液/血漿中濃度比

3.3.2. 組織分布

ラットを用いた組織分布試験およびイヌの脳組織抽出物を用いた代謝物検索試験を実施した（Table 12）。

ラットに経口投与したときのリトレシチニブの分布は広範かつ速やかであり，[^{14}C]リトレシチニブ由来の放射能は，副腎，大動脈，血液（心臓内），眼，心臓，水晶体，肝臓，肺，腎臓，

脾臓およびぶどう膜を除く大半の組織で，投与後 332 時間または 672 時間までに完全に消失した。

眼および皮膚のメラニンに対する親和性が認められたが，メラニンへの可逆的結合は脂溶性アミンまたは塩基性化合物で一般的にみられ，それ自体には毒性学的意義はないことが示されている[11]。ラットを用いた光毒性試験の結果により，リトレシチニブは眼または皮膚に対する光毒性を示さなかった（4.7.1 項）。

ラットを用いた組織分布試験では，[^{14}C]リトレシチニブの脳/血漿中の AUC 比は約 0.05 であったことから，リトレシチニブおよび代謝物の脳への分布はわずかであることが示された。イヌを用いて脳内への分布を検討した試験でも，リトレシチニブの脳への分布はわずかであり，イヌの脳中代謝物の検索では，脳組織からの抽出物中にリトレシチニブ，M2 およびその他の微量代謝物が認められたが，リトレシチニブの濃度は上オリーブ核，蝸牛神経核および海馬で同程度であったことから，脳の各領域におけるリトレシチニブの分布に差はないことが示された。

Table 12.　リトレシチニブの組織分布

試験	投与量	結果	試験番号
ラットを用いた組織分布試験	10 mg/kg [^{14}C]リトレシチニブ	[^{14}C]リトレシチニブの C_{max} 値が最も高かったのは大動脈，腎臓，胃壁，甲状腺およびぶどう膜であったが，血液脳関門での分布はわずかであった（脳/血漿中の AUC 比は約 0.05）。	15647
イヌを用いた代謝物検索	40 mg/kg/日で 3 日間	イヌの脳組織からの抽出物中には主としてリトレシチニブおよび M2 が検出された。システイン - グリシン抱合体および数種の水酸化代謝物が微量に検出された。	PF-06651600_[redacted]_092809

3.4. 代謝

In vitro のインキュベーションおよび in vivo の血漿試料を用いてリトレシチニブの代謝を評価した（Table 13）。

リトレシチニブの in vitro ならびにラット，イヌおよびヒトの血漿を用いた in vivo での代謝物検索では，いずれの動物種においてもグルタチオン抱合および酸化的代謝による類似するパターンが認められた。FIH 試験の治験参加者を対象とした臨床における遺伝子型の評価では，GST P1，M1 および T1 遺伝子型の変異は野生型と比較してリトレシチニブの C_{max} または AUC に大きな影響を及ぼさないことが示された（B7981001 試験）。

Table 13.　リトレシチニブの代謝に関する検討

試験	投与量または濃度	結果	試験番号
ラット，イヌおよびヒトにおける in vitro 代謝および in vivo 代謝経路	In vitro： 10 µmol/L In vivo： ラット：3 mg/kg イヌ：75 mg/kg/日	主要代謝経路はグルタチオンに関連した抱合および酸化であり，動物種間で類似したプロファイルであった。肝細胞からの回収率は高かった。	PF-06651600_[redacted]_085839
ラット S9 を用いた in vitro 代謝	6.7 mmol/L	S9 を用いた細菌突然変異試験では，リトレシチニブと M2 が存在した。	PF-06651600_[redacted]_111222
イヌの代謝物検索（血漿および脳）	40 mg/kg/日	イヌの血漿中および脳中では M2 およびリトレシチニブが検出され，血漿中ではシステイン - グリシン抱合体も検出された。	PF-06651600_[redacted]_092809
マウス，ラットおよびヒトの代謝物検索	マウスおよびラット：200 mg/kg/日 ヒト：400 mg QD	血漿中の主要な薬物関連物質は，動物種間で一致していた。 ヒト特有の代謝物は検出されず，ヒト血漿中でのキラル反転は認められなかった。	PF-06651600_[redacted]_040703
[^{14}C]リトレシチニブ投与後のヒト血漿中および排泄物中の代謝物検索	200 mg リトレシチニブ および 30 µg [^{14}C]リトレシチニブ	血中放射能の主な成分は未変化体（30%）であり，M2（システイン抱合体，17%）が血中の主要な代謝物であった。	PF-06651600_[redacted]_085448
代謝に関与する GST 分子種の検討	1 µmol/L リトレシチニブ	サイトゾル画分（A1/3，M1/3/5，P1，S1，T2，Z1）およびミクロソーム画分（MGST 1/2/3）に存在する rhGST 分子種により代謝された。	PF-06651600_[redacted]_033226
代謝に関与する P450 分子種の検討	0.1–100 µmol/L リトレシチニブ（in vitro）または 200 mg [^{14}C]リトレシチニブ （hADME）	総 CYP f_m：0.47 CYP3A f_m：0.29 CYP2C8 f_m：0.09 CYP1A2 f_m：0.07 CYP2C9 f_m：0.02 グルタチオン関連代謝物 f_m：0.24	PF-06651600_[redacted]_011706

In vitro では CYP3A がリトレシチニブの酸化的代謝に関与する主な分子種（f_m：0.29）であったが，臨床試験ではイトラコナゾール併用による曝露量の増加はわずかであり（C_{max} 比：1.03，AUC_{inf} 比：1.15），リトレシチニブの代謝における CYP3A の寄与は低い（25%未満）と考えら

れた（B7981023 試験）。これらの結果に基づくと，リトレシチニブの消失全体の 25%以上に寄与する主要な代謝経路または消失機序は存在しない。

定性分析では，マウス，ラットおよびイヌの血中に最も多く認められた薬物関連物質は未変化体であった。ヒトに[^{14}C]リトレシチニブを単回投与したとき，血中に最も多く認められた成分は未変化体であり（総薬物関連物質の 30%），主要代謝物として 1 種（システイン抱合体である M2，PF-07034562，17%）が同定された。ヒト特有の代謝物は検出されず，ヒトの血漿試料中でのキラル反転は認められなかった。

3.4.1. 各動物種の代謝物プロファイル

マウス，ラット，イヌおよびヒトにおけるリトレシチニブおよびその主要代謝物 M2 の代謝物プロファイルを以下に要約する（Table 14）。

Table 14.　ヒト，マウス，ラットおよびイヌの血漿中ならびに排泄物中における未変化体と主要代謝物 M2

代謝物	m/z	ヒト [a]			マウス [b]		ラット [c]		イヌ [d]	
		血漿 [e]	尿 [f]	糞便 [f]	血漿	尿	血漿	尿	血漿	尿
未変化体	286	30.4	2.7	0.2	√	√	√	√	√	√
M2	407	16.5	4.6	0.0	√	√	√	√	√	√

√：検出された
a. B7981011 試験（PF-06651600_[redacted]_085448）において，ヒトマスバランス試験では 200 mg を QD 投与した。
b. CB6F1/Jic-TgrasH2 マウスに 200 mg/kg/日を 3 日間 QD 投与した（PF-06651600_[redacted]_040703）。
c. Wistar Han ラットに 200 mg/kg/日を 3 日間 QD 経口投与した（PF-06651600_[redacted]_040703）。
d. ビーグル犬に [redacted]LJ111 試験の試験 15 日に 75 mg/kg/日を投与した（PF-06651600_[redacted]_085839）。
e. 総[^{14}C]量に対する割合（%）
f. [^{14}C]投与量に対する割合（%）

雌雄ラットに NOAEL（200 mg/kg/日）での定常状態におけるリトレシチニブおよび M2 の PK を評価し（20070067），ヒトに 200 mg を QD 投与したときの PK と比較した。このブリッジング評価の結果を用いて，ラットの反復投与毒性試験，がん原性試験および胚・胎児発生に関する試験における各用量での M2 の曝露量比を推定した（Table 15）。代謝物の安全性試験のガイダンスに従い，これらの重要な毒性試験の NOAEL において，ヒトの代謝物 M2 の十分な曝露量（AUC_{24} のラット/ヒト比が 1 超）が得られていることを確認した。

Table 15.　ラットとヒトの未変化体および M2 の曝露比

用量	未変化体		M2	
(mg/kg/日) / 性	AUC_{24} (ng•h/mL)	曝露比 [a]	AUC_{24} (ng•h/mL)	曝露比 [a]
ヒト (B7981054 試験)				
200 mg	3830	--	3090	--
7 日間反復投与 PK 試験（ブリッジング試験，報告書番号 JAK3-117-PK）				
200 /雄	126000	33	70700	23
200 /雌	118000	31	78500	25
8 週間反復投与毒性試験（報告書番号 [redacted]GR132）				
75 /雄	27100	7.1	--	8.6
175 /雄	90800	24	--	20
400 /雄	215000	56	--	46
75 /雌	24200	6.3	--	9.4
175 /雌	67800	18	--	22
400 /雌	195000	51	--	50
6 ヵ月間反復投与毒性試験（報告書番号 20070067）				
50 /雄	14900	3.9	--	5.8
100 /雄	31000	8.1	--	12
200 /雄	82300	21	--	23
50 /雌	15900	4.2	--	6.3
100 /雌	32800	8.6	--	13
200 /雌	77900	20	--	25
2 年間がん原性試験（報告書番号 8384525）				
10 /雄	2630	0.7	--	1.2
30 /雄	8960	2.3	--	3.5
100 /雄	44700	12	--	12
10 /雌	3350	0.9	--	1.3
30 /雌	11200	2.9	--	3.8
100 /雌	49200	13	--	13
受胎能および初期胚発生に関する試験（報告書番号 00655209）				
20 /雄	5010	1.3	--	2.3
60 /雄	22000	5.7	--	6.9
200 /雄	87500	23	--	23
胚・胎児発生に関する試験（報告書番号 20075271）				
75 /雌	25300	6.6	--	9.4
175 /雌	79000	21	--	22
325 /雌	162000	42	--	41
PPND 試験（報告書番号 00655232）				
25 /雌	6310	1.6	--	3.1
75 /雌	23000	6.0	--	9.4
175 /雌	65700	17	--	22

注：ラットを用いたブリッジング試験（報告書番号 JAK3-117-PK）では，ラットの 6 ヵ月間投与試験（報告書番号 20070067）の NOAEL（200 mg/kg/日）の用量で 7 日間反復投与した（3.2 項）。ラットにおける M2 の曝露量は用量に比例すると仮定し，ブリッジング試験でのヒトとの曝露比を各試験に外挿した。

a. ヒトにリトレシチニブ 200 mg を反復投与したときの定常状態における未変化体および M2 の曝露量（B7981054 試験）との比。非結合型分率はラットとヒトで大きな差はみられなかったことから（3.3.1 項），総濃度に基づきラットとヒトの曝露比を算出した。

3.5. 排泄

マウス，ラット，イヌおよびヒトの排泄物を用いて，リトレシチニブおよびその代謝物の排泄を評価した（Table 16）。

ラットおよびイヌでは未変化体の尿中排泄は限定的であり，ラットでは胆汁中排泄もわずかであった。

ラットを用いた乳汁中排泄試験で認められた乳汁中のリトレシチニブの濃度は血漿中濃度よりも高く，8 時間後まで定量可能であった（乳汁：血漿中 AUC_8 の比は 2.2）。

ヒトでは，投与後 240 時間までの[^{14}C]リトレシチニブの総回収率は 86%であり，尿中から約 66%，糞便中から約 20%が回収された。

リトレシチニブの酸化代謝物および抱合代謝物の尿中への排泄が主要な排泄経路であり，未変化体の尿中および糞便中への排泄はわずかであった。

Table 16.　リトレシチニブおよび M2 の排泄の要約

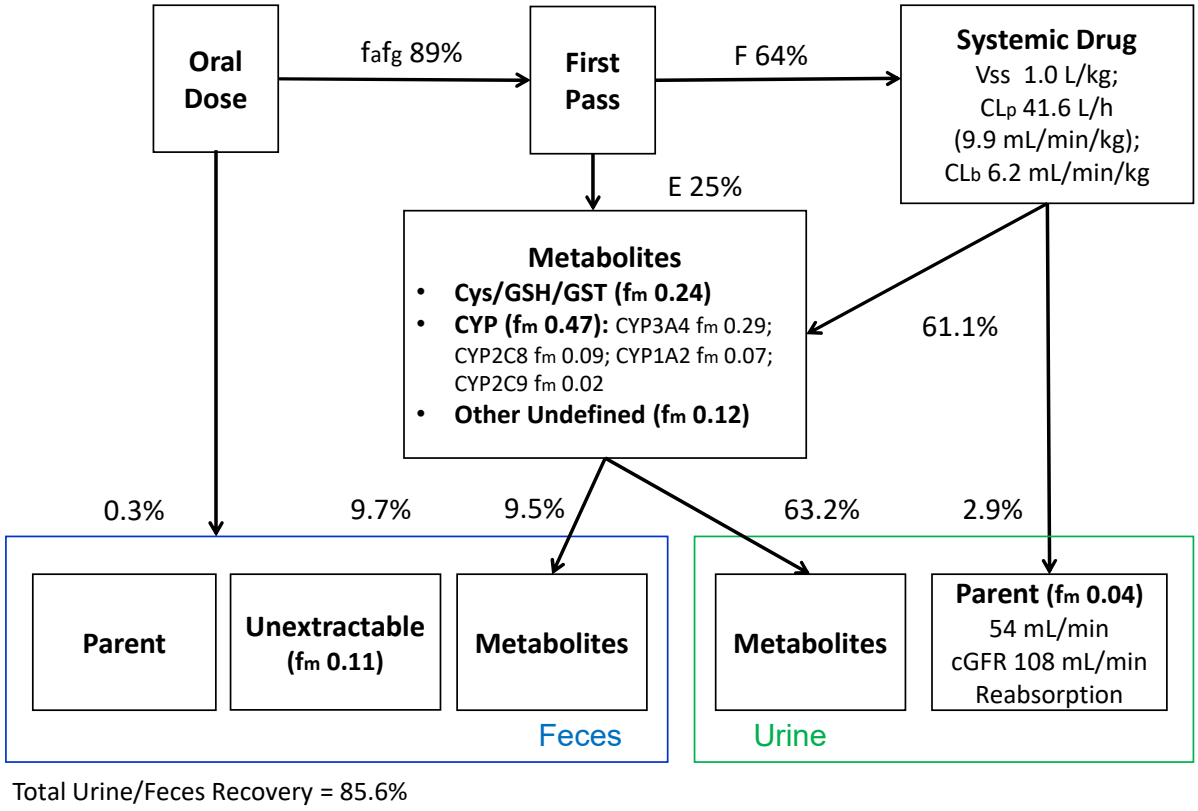
試験	投与量	結果	試験番号
ラットに単回静脈内投与時の尿中および胆汁中排泄	IV（1 mg/kg または 1.5 mg/kg）	尿：1%未満排泄 胆汁：1%未満排泄	PF-06651600_[redacted]_152020
イヌに単回静脈内投与時の尿中排泄	IV（1 mg/kg）	尿：3%排泄	PF-06651600_[redacted]_132012
マウスおよびラットを用いた代謝物検索	マウスおよびラット：200 mg/kg/日	マウスおよびラットの尿中では主に N-アセチルシステイン抱合体（M3）が検出された。 ラット胆汁中では主に M3 およびグルタチオン抱合体が検出された。	PF-06651600_[redacted]_040703
ラットを用いた乳汁中排泄試験	PO（30 mg/kg）	AUC_t の乳汁/血漿比は 2 倍	8448335
ヒトマスバランス試験	PO（200 mg/kg）	Figure 2 を参照	PF-06651600_[redacted]_085448

3.5.1. ヒトにおける体内動態の考察

200 mg を経口投与したときのヒトにおけるリトレシチニブの体内動態の全体像を Figure 2 に示す。排泄物からの総回収率は 86%であった。経口吸収率は 89%であり，経口バイオアベイラビリティは 64%であった。リトレシチニブの分布容積は 1.0 L/kg と，その物性（弱塩基性/中性）に符合していた。血漿ベースの全身クリアランスは 9.9 mL/min/kg であり，リトレシチニブの消失はグルタチオン抱合（f_m：0.24）と酸化的代謝（f_m：0.47）の組み合わせによるものであった。In vitro では CYP3A4 が消失全体の 29%に寄与すると推定されたが，イトラコナゾールを用

いた臨床薬物相互作用試験の結果からは，CYP3A の代謝寄与率は 25%未満であることが示された。リトレシチニブの酸化代謝物および抱合代謝物は主に尿中へ排泄され，未変化体の尿中および糞便中への排泄はわずかであった。

Figure 2.　リトレシチニブのマスバランスおよび消失機序の要約



cGRF：補正した糸球体濾過量，CL_b：全血ベースの全身クリアランス，CL_p：血漿ベースの全身クリアランス

3.6. 薬物動態学的薬物相互作用

主要代謝酵素に対する可逆的阻害，時間依存的阻害および誘導による薬物相互作用の相対リスクを in vitro で評価した。また，FDA（2020 年）[12]および EMA（2012 年）[13]の薬物相互作用ガイダンスに従い，消化管，肝臓，腎臓の主要な排出および取り込みトランスポーターの阻害による薬物相互作用のリスクを in vitro で評価した。

薬物相互作用リスクは，AA 患者に臨床最大用量の 50 mg QD を投与したときの定常状態におけるリトレシチニブの非結合型 C_{max} である 1.1 µmol/L（318 ng/mL）に基づいて評価した（PMAR-1157 試験）。理論上の消化管濃度は 0.2 mg/mL（50 mg/250 mL または 0.70 mmol/L）であると見積もった。理論上の肝流入部濃度は 8 µmol/L であると推定された［吸収率を 0.89（B7981011 試験），吸収速度定数を 0.132 min^{-1}（PMAR-1157 試験），肝血流量を 1.6 L/min と仮定］。

主要代謝物である M2 については，健康被験者にリトレシチニブを臨床最大用量である 200 mg で QD 投与したときの M2 の C_{max} は 1.5 µmol/L であった（B7981054 試験）。200 mg QD 投与時のリトレシチニブ/M2 の C_{max} 比が 2.6 であったこと，および 50 mg QD 投与時のリトレシチニブ

の C_{max} が 344 ng/mL であったこと（PMAR-1157 試験）に基づき，定常状態における M2 の非結合型 C_{max} 値として 0.31 µmol/L を用いて M2 の薬物相互作用リスクを評価した。

3.6.1. P450 を介した相互作用

ヒト肝ミクロソームおよびヒト肝細胞を用いて，主要な P450 分子種に対するリトレシチニブおよび M2 の阻害作用ならびに誘導作用を評価した（Table 17）。

リトレシチニブによる CYP3A4/5（プローブ基質：テストステロン）の阻害が認められたことを除き，リトレシチニブおよび M2 は主要な P450 分子種に対して明確な可逆的阻害を示さなかった。リトレシチニブは CYP3A および CYP1A2 に対して時間依存的阻害を示した。

リトレシチニブは CYP3A4，CYP2B6，CYP1A2，CYP2C8，CYP2C9 および CYP2C19 に対して誘導能を示したが，M2 はいずれの P450 分子種も誘導しなかった。

臨床試験（B7981017 試験）で，リトレシチニブを併用投与したとき，CYP3A4/5 の基質であるミダゾラムの AUC_{inf} および C_{max} がそれぞれ 2.7 倍および 1.8 倍増加したが，リトレシチニブは CYP2B6 の基質であるエファビレンツの曝露量には影響を及ぼさなかった。これらのデータにより，リトレシチニブは，CYP3A4 の基質と中程度の相互作用を引き起こすが，CYP2B6 は誘導しないことが示された。

臨床試験（B7981054 試験）で，リトレシチニブを併用投与したとき，CYP1A2 の基質であるカフェインの AUC_{inf} および C_{max} がそれぞれ 2.7 倍および 1.1 倍増加した。これらのデータにより，リトレシチニブは，CYP1A2 の基質と中程度の相互作用を引き起こすことが示された。

リトレシチニブの検証済み生理学的薬物速度論モデルを用いた解析により，リトレシチニブによる CYP3A4，CYP2B6，CYP1A2，CYP2C8，CYP2C9 および CYP2C19 の誘導に起因する薬物間相互作用は臨床的に意味のあるものではないことが示された（PF-06651600_[redacted]_032218）。

Table 17.　リトレシチニブおよび M2 の P450 に対する in vitro 薬物相互作用試験の要約

試験	濃度	結果	試験番号
リトレシチニブによる P450 の阻害	0.1–100 µmol/L	1A2，2B6，2C8，2C9，2C19，2D6，3A4/5[a] に対する可逆的阻害の IC_{50} 値：100 µmol/L 超	XT[redacted]5092
M2 による P450 の阻害	0.01–100 µmol/L または 0.00965–96.5 µmol/L	1A2，2B6，2C8，2C9，2C19，2D6，3A4/5 に対する可逆的阻害の IC_{50} 値：96.5 µmol/L 以上	PF-07034562_[redacted]_111635
リトレシチニブによる CYP3A4/5 の時間依存的阻害（ミダゾラム）	3–200 µmol/L	k_{inact}/K_I：0.871 mL•min^{-1}•µmol^{-1}	PF-06651600_[redacted]_121415
リトレシチニブによる CYP1A2 の時間依存的阻害（フェナセチン）	30–600 µmol/L	K_I：327 µmol/L k_{inact}：0.0917 min^{-1} k_{inact}/K_I：0.280 mL•min^{-1}•µmol^{-1}	PF-06651600_[redacted]_123341
リトレシチニブによる P450 の誘導	0.5–100 µmol/L	mRNA の誘導が 2 倍超：3A4（5 µmol/L 以上），2B6（50 µmol/L 以上）	XT[redacted]3107
リトレシチニブによる P450 の誘導	0.3–100 µmol/L	mRNA の誘導が 2 倍超：3A4（6 µmol/L 以上），1A2（3 µmol/L 以上），2C8（3 µmol/L 以上），2C9（10 µmol/L 以上），2C19（30 µmol/L 以上）	PF-06651600_[redacted]_022301
M2 による P450 の誘導	0.3–250 µmol/L	3A4，2B6 または 1A2 の誘導は認められなかった。	PF-06651600_[redacted]_090107

a. CYP3A4/5（プローブ基質：テストステロン）に対する IC_{50} 値は 90 µmol/L であった。

3.6.2. UGT，GST および SULT を介した相互作用

ヒト肝ミクロソーム中で，リトレシチニブは，2% BSA の非存在下で UGT1A1 および UGT1A4 を，2% BSA の存在下では UGT1A4 を阻害した。M2 は主要な UGT 分子種に対して可逆的阻害を示さなかった（Table 18）。GST 阻害の予備的な評価では，リトレシチニブは rhGST に対する競合的または時間依存的阻害を評価するためのいずれの条件下でも CDNB に対して有意な影響を及ぼさなかった。ヒト肝サイトゾル中で，リトレシチニブは主要な SULT 分子種に対して可逆的阻害を示さなかった。

臨床試験［B7981018 試験（リトレシチニブ 200 mg）および B7981035 試験（リトレシチニブ 50 mg）］では，リトレシチニブと併用投与したときエチニルエストラジオールおよびレボノルゲストレルの曝露量が変化したことから（AUC_{inf} または C_{max} の 20%以下の変化），臨床で想定

されるリトレシチニブの用量において，複数の消失機序（UGT1A1，SULT1E1 および CYP3A）を持つ経口避妊薬との相互作用が起こる可能性が示された[14]。

Table 18.　リトレシチニブおよび M2 の UGT，GST および SULT に対する In vitro 薬物相互作用試験の要約

試験	濃度	特記すべき結果	試験番号
リトレシチニブによる UGT の阻害	1–100 µmol/L	（2% BSA なし）可逆的阻害の IC_{50} 値：1A1（54 µmol/L），1A4（81 µmol/L），1A6，1A9，2B7（100 µmol/L 超） （2% BSA あり）可逆的阻害の非結合型 IC_{50} 値：1A4（82 µmol/L），総 IC_{50} 値：1A1，1A6，1A9，2B7（100 µmol/L 超）	PF-06651600_[redacted]_135124
M2 による UGT の阻害	0.967–96.5 µmol/L	1A1，1A4，1A6，1A9，2B7，2B15 に対する可逆的阻害の IC_{50} 値：2% BSA の有無にかかわらず 96.5 µmol/L 超	PF-07034562_[redacted]_034526
リトレシチニブによる GST の阻害（予備的試験）	300 µmol/L	いずれの GST 分子種に対する競合阻害も 25%未満，GST に対する時間依存的阻害は 4%～37%	PF-06651600_[redacted]_094951
リトレシチニブによる SULT の阻害	0.1–100 µmol/L	1E1，1A1，2A1 に対する可逆的阻害の IC_{50} 値：100 µmol/L 超	PF-06651600_[redacted]_111809

3.6.3. トランスポーターを介した相互作用

リトレシチニブおよび M2 が種々のトランスポーターの基質および阻害物質となる可能性を in vitro で評価した（Table 19）。

リトレシチニブは P-gp および BCRP の双方の基質となることが示された。しかし，B7981011 試験で測定された吸収率（Fa•Fg）は 89%であったことから，経口吸収に対する消化管における排出の影響はごくわずかであると考えられる。また，用量で補正したリトレシチニブの C_{max} は 5～800 mg の用量範囲でほぼ一定であったことから（B7981001 試験），これらの消化管の排出トランスポーターは吸収に対して有意な影響を及ぼさないことが示された。リトレシチニブは OATP1B1 および OATP1B3 の基質とはならなかった。リトレシチニブは P-gp または BSEP を阻害しなかったが，さまざまな程度で BCRP，OAT1，OAT3，OATP1B1，OATP1B3，OCT1，OCT2，MATE1 および MATE2K を阻害した。主要代謝物である M2 は，BCRP，P-gp，OATP1B1，OATP1B3 および OCT1 を阻害した。EMA による薬物相互作用の基準（C_{max}/IC_{50} = 0.055）に基づくと，AA 患者にリトレシチニブを 50 mg で QD 投与するとき，P-gp の全身阻害が起こるリスクがある。

臨床試験（B7981024 試験および B7981025 試験）で，リトレシチニブ（または M2）はロスバスタチン（BCRP，OATP1B1/OATP1B3，OAT1/OAT3 のプローブ基質）の曝露量に臨床的に意義のある影響を及ぼさないことが示された。しかし，リトレシチニブ（または M2）はスマトリプタン（OCT1 のプローブ基質）の曝露量を増加させた。内在性バイオマーカーを用いた評価では，リトレシチニブ（または M2）は，N^1-メチルニコチンアミドもしくはクレアチニンクリアランス（OCT2/MATE のバイオマーカー），コプロポルフィリン I（OATP1B1/OATP1B3 のバイオマーカー）またはピリドキシン酸（OAT1/OAT3 のバイオマーカー）に影響を及ぼさないことが示された。これらのバイオマーカーの結果から，リトレシチニブ（または M2）とこれらのトランスポーター（OCT2，MATE1/MATE2K，OATP1B1/OATP1B3 および OAT1/OAT3）との間に臨床的に重大な薬物相互作用は予測されないことが示された。コプロポルフィリン I およびピリドキシン酸の結果への影響が認められなかったことは，ロスバスタチンとの間に臨床的に意味のある薬物相互作用が認められなかったことと符合する。イソブチリルカルニチン（OCT1 のバイオマーカー）で認められた変化は，臨床試験で認められたスマトリプタンの曝露量の増加と符合する。

Table 19.　リトレシチニブおよび M2 の薬物トランスポーターに関する in vitro 試験の要約

	トランスポーター（発現細胞）	評価濃度 (µmol/L)	基質性	阻害能 IC_{50} (µmol/L)[a]	報告書番号
リトレシチニブ	P-gp (MDCK)	0.3 - 3	Yes	--	PF-06651600_[redacted]_063458
	BCRP (MDCK)	0.5 - 2	Yes	--	18PFIZP1R1S1
	OATP1B1 (HEK293)	0.1 - 10	No	--	PF-06651600_[redacted]_090524
	OATP1B3 (HEK293)	0.1 - 10	No	--	
	P-gp (MDCKII)	50 - 300	--	>300 (21%)	PF-06651600_[redacted]_103701
	OCT2 (HEK293)	0.07 - 300	--	55.2 (89%)	
	MATE1 (HEK293)	0.07 - 300	--	51.4 (77%)	
	MATE2K (HEK293)	0.07 - 300	--	48.3 (74%)	
	OATP1B1 (HEK293)	0.01 - 300	--	>300 (28%)	
	OATP1B3 (HEK293)	0.01 - 300	--	>300 (7%)	
	BCRP (HEK293)	0.061 - 1000	--	27.0 (97%)	PF-06651600_[redacted]_101345
	OAT1 (HEK293)	0.061 - 1000	--	156 (85%)	
	OAT3 (HEK293)	0.018 - 300	--	41.3 (84%)	
	OATP1B1 (HEK293)	0.018 - 1000	--	312 (74%)	
	OATP1B3 (HEK293)	0.018 - 1000	--	934 (55%)	
	OCT1 (HEK293)	0.018 - 1000	--	3.74 (100%)	
	BSEP (HEK293)	0.82 - 200	--	>200 (19%)	Pfizer-76-[redacted]20[redacted]
M2	P-gp (HEK293)	0.018 - 300	--	44.1 (90%)	PF-07034562_[redacted]_073254
	BCRP (HEK293)	0.018 - 300	--	5.6 (96%)	
	OATP1B1 (HEK293)	0.018 - 300	--	2.0 (100%)	
	OATP1B3 (HEK293)	0.018 - 300	--	8.4 (100%)	
	OCT1 (HEK293)	0.018 - 300	--	0.86 (99%)	
	OAT1 (HEK293)	0.018 - 300	--	>300 (40%)	
	OAT3 (HEK293)	0.018 - 300	--	>300 (43%)	
	OCT2 (HEK293)	0.018 - 300	--	>300 (45%)	
	MATE1 (HEK293)	0.018 - 300	--	>300 (7%)	
	MATE2K (HEK293)	0.018 - 300	--	>300 (8%)	

--：評価せず，Yes：基質となる，No：基質とならない
a. 括弧内は最大阻害率を示す。
基質性の評価では，P-gp および BCRP の阻害剤として，PCS833 および Ko143 を用いた。
阻害能の評価では，各分子種の基質として以下の化合物を用いた。P-gp：ジゴキシン，BCRP：ロスバスタチン，BSEP：[^{3}H]タウロコール酸，OATP1B1：ロスバスタチン，OATP1B3：ロスバスタチン，OCT1：[^{14}C]メトホルミン，OAT1：[^{3}H]パラアミノ馬尿酸，OAT3：[^{3}H]エストロン-3-硫酸，OCT2：[^{14}C]メトホルミン，MATE1：[^{14}C]メトホルミン，MATE2K：[^{14}C]メトホルミン

4. 毒性試験

Table 20 に示した一連の非臨床試験でリトレシチニブの毒性を評価した。これらの試験の投与経路には，臨床投与経路である経口投与を選択した。

Table 20.　毒性試験の概要

試験	試験番号 (参照番号)	濃度または用量	GLP 適合/非適合	概要表
単回投与毒性試験				
雄ラットを用いた経口投与 TK 試験	[redacted]MA012	0，250，500，1000 mg/kg	非適合	2.6.7.5
雄ラットを用いた経口投与 TK 試験	[redacted]MA133	25，75，200 mg/kg	非適合	2.6.7.5
イヌを用いた経口投与 TK 試験	[redacted]LJ078	20，90，300 mg/kg	非適合	2.6.7.5
イヌを用いた放出制御カプセル経口投与 TK 試験	[redacted]GR208	65 mg/投与	非適合	2.6.7.5
反復投与毒性試験				
雄ラットを用いた14日間経口投与試験	[redacted]MA039	0，125，300，500 mg/kg/日	非適合	2.6.7.6
ラットを用いた8週間経口投与試験	[redacted]GR132	0，75，175，400 mg/kg/日	適合	2.6.7.7A
ラットを用いた6ヵ月間経口投与および3ヵ月間回復性試験	20070067 ([redacted]MA142)	0，50，100，200 mg/kg/日	適合	2.6.7.7B
イヌを用いた15日間経口投与試験	[redacted]LJ111	0，15，45，75 mg/kg/日	非適合	2.6.7.6
イヌを用いた8週間経口投与試験	[redacted]GR135	0，5，15，45 mg/kg/日	適合	2.6.7.7C
イヌを用いた9ヵ月間経口投与および3ヵ月間回復性試験	20070068 ([redacted]MA143)	0，5，20，40 mg/kg/日	適合	2.6.7.7D
イヌを用いた9ヵ月間経口投与および6ヵ月間回復性試験	20099163 ([redacted]MA106)	0，10，20 (QD)，20 (10BID)，40 mg/kg/日	適合	2.6.7.7E
遺伝毒性試験				
In vitro 試験				
細菌を用いる復帰突然変異試験	WIL-655100 ([redacted]GR129)	25～5000 µg/プレート	適合	2.6.7.8A
TK6細胞（ヒトリンパ芽球細胞株）を用いた小核試験	WIL-655099 ([redacted]GR130)	169～1000 µM	適合	2.6.7.8B
4時間処理-代謝活性化系非存在下		205～285 µg/mL		
4時間処理-代謝活性化系存在下		205～285 µg/mL		
27時間処理-代謝活性化系非存在下		48.3～125 µg/mL		
Mechanistic Follow-Up Testing For In Vitro Micronucleus Test Results	[redacted]GTX10	90.8～736 µM	非適合	2.6.7.8C
In vivo 試験				
ラットを用いた骨髄小核試験	[redacted]GR132	0，75，175，400 mg/kg/日	適合	2.6.7.9
がん原性試験				
マウスを用いた2週間経口投与忍容性および TK 試験	8390402 ([redacted]GR117)	0，30，100，300，1000 mg/kg/日	非適合	2.6.7.10A
マウスを用いた1ヵ月間経口投与用量設定試験	8392586 ([redacted]GR173)	0，75，225，450 mg/kg/日	適合	2.6.7.10B
Tg.rasH2（tg/wt）マウスを用いた6ヵ月間経口投与がん原性試験	8400625 ([redacted]GR034)	0，30，100，300 mg/kg/日	適合	2.6.7.10C
ラットを用いた104週間経口投与がん原性試験	8384525 ([redacted]MA002)	0，10，30，100 mg/kg/日	適合	2.6.7.10D

Table 20.　毒性試験の概要

試験	試験番号 (参照番号)	濃度または用量	GLP 適合/非適合	概要表
生殖発生毒性試験				
受胎能および初期胚発生に関する試験				
ラットを用いた受胎能および着床までの初期胚発生に関する試験	00655209 (GR019)	0，20，60，200 mg/kg/日	適合	2.6.7.12
胚・胎児発生に関する試験				
雌ラットを用いた経口投与用量設定試験	20069224 (GR573)	0，75，175，325 mg/kg/日	非適合	2.6.7.11
雌ラットを用いた経口投与試験	20075271 (GR148)	0，75，175，325 mg/kg/日	適合	2.6.7.13A
雌ウサギを用いた経口投与用量設定試験	20069228 (GR574)	0，10，75，175，325 mg/kg/日	非適合	2.6.7.11
雌ウサギを用いた経口投与試験	20075272 (GR149)	0，5，25，75 mg/kg/日	適合	2.6.7.13B
ラットを用いた出生前および出生後の発生ならびに母体の機能に関する試験				
ラットを用いた出生前および出生後の発生に関する経口投与試験	00655232 (GR230)	0，25，75，175 mg/kg/日	適合	2.6.7.14
局所刺激性試験				
実施していない				
その他の毒性試験				
光毒性試験				
雌有色ラットを用いた3日間経口投与光毒性試験	20075773 (MA032)	0，50，100，200 mg/kg/日	適合	2.6.7.17
免疫毒性試験				
マウスアレルギーモデル	GR446	0，1，10，100 mg/kg/日	非適合	2.6.7.17
機序に関する試験				
イヌを用いた3日間経口投与試験	GR131	0，40 mg/kg/日	非適合	2.6.7.17
イヌの脳幹における各種キナーゼまたは酸化ストレス関連の遺伝子発現プロファイリング	GR142	NA	非適合	2.6.7.17
イヌの脳中におけるリトレシチニブのオフターゲットタンパク質の同定	GR193	10 μM	非適合	2.6.7.17
過剰発現細胞株におけるリトレシチニブによるヒト，イヌおよびラットの MAP2K7結合親和性の比較	GR372	0.12～30 μM	非適合	2.6.7.17
小脳における DOCK10発現の種差	GR164	NA	非適合	2.6.7.17

4.1. 単回投与毒性試験

ラットおよびイヌにリトレシチニブを単回経口投与したとき，すべての用量で忍容性が認められ，その後の反復投与毒性試験で用いる用量を選択するための曝露情報が得られた。ラットおよびイヌではともに，曝露量は用量の増加に伴って増加した。

雄ラットでは，リトレシチニブの遊離塩基を 1000 mg/kg までの用量で投与した試験（[redacted]MA012）でも，トシル酸塩を 200 mg/kg までの用量で用いた試験（[redacted]MA133）でも，リトレシチニブの投与に関連した影響は認められなかった。

イヌでは，遊離塩基を用いた単回投与試験（[redacted]LJ078）で高用量の 300 mg/kg まですべての用量で忍容性が認められ，臨床でのカプセル剤の使用を検討するためにこれと同じ放出調節カプセル剤として製剤化したリトレシチニブ（トシル酸塩）65 mg の投与時（[redacted]GR208）にも忍容性が認められた。

4.2. 反復投与毒性試験

ラットを用いて実施したリトレシチニブの試験は，2 週間反復経口投与による探索的毒性試験ならびに GLP 適用下で実施した 8 週間および 6 ヵ月間反復経口投与毒性試験であった。イヌを用いた試験は，2 週間反復経口投与による探索的毒性試験ならびに GLP 適用下で実施した 8 週間および 9 ヵ月間（2 試験）反復経口投与毒性試験であった。

反復投与毒性試験（ラットで 6 ヵ月間，イヌで 9 ヵ月間）における NOAEL は，ラットおよびイヌでそれぞれ 200 mg/kg/日および 10 mg/kg/日であった。

4.2.1. ラットを用いた反復投与毒性試験

重要な試験以外の試験では雄ラット（5 匹/群）に 0，125，300 または 500 mg/kg/日の用量で 14 日間（[redacted]MA039），重要な GLP 適用試験では 8 週間投与試験（[redacted]GR132）で雌雄ラット（雌雄各 10 匹/群）に 0，75，175 または 400 mg/kg/日の用量，6 ヵ月間投与試験（20070067）で雌雄ラット（雌雄各 15 匹または 20 匹/群）に 0，50，100 または 200 mg/kg/日の用量で，リトレシチニブを 1 日 1 回経口投与した。6 ヵ月間試験の投与期間終了後，0 mg/kg/日群および 200 mg/kg/日群の一部の動物を 3 ヵ月間の休薬期間に移行させ，リトレシチニブに関連した影響の回復性を評価した。反復投与毒性試験に用いたラットの投与開始時の週齢は約 7 週齢であった。

ラットを用いたいずれの反復投与毒性試験でも，曝露量（C_{max} および AUC_{24}）は用量の増加に伴って増加し，性差および反復投与による蓄積は認められなかった。

免疫系およびリンパ造血系の所見が，すべての試験の全用量群で認められた。血中白血球，リンパ系器官（胸腺，脾臓，リンパ節，GALT）および骨髄へのこれらの影響は JAK3 および TEC に対するリトレシチニブの薬理活性と符合しており[15,16,17]，概して用量依存的かつ可逆的で，臨床的に意味のある免疫抑制（すなわち，感染）を示唆する一般状態の変化，剖検所見または病理組織学的所見は認められなかったことから，毒性学的意義の乏しい変化であると判断した。

血中白血球への影響は，白血球数，リンパ球数，単球数，好酸球数または好塩基球数の減少ならびに好中球数の増加であった。リンパ球数の減少に関連する所見として，胸腺重量および脾臓重量の減少ならびに胸腺，脾臓，GALT，腸間膜リンパ節および鼠径リンパ節におけるリンパ組織の細胞充実性の低下が認められた。

骨髄（胸骨）の細胞充実性の低下（すべての細胞系統）は，程度が軽微であったこと，すべての骨髄構成要素が存在していたこと，毒性変化を示す臨床病理所見が認められなかったことおよび骨髄毒性を示唆する毒性所見（すなわち，出血，壊死または炎症）が認められなかったことから，毒性学的意義の乏しい変化であると判断した。

14 日間投与試験では，血中の好酸球数減少および好中球数増加（125 mg/kg/日以上の用量群），骨髄の細胞充実性の軽微な減少（300 mg/kg/日以上の用量群），軽微～軽度の肝細胞の細胞質空胞化（グリコーゲン増加），赤脾髄の萎縮（500 mg/kg/日群）など薬理作用とは明らかな関連のない所見が認められた。

8 週間投与試験では，高用量である 400 mg/kg 日の忍容性が不良であり，試験 32 日にこの用量群全体の投与を早期中止したが，剖検，病理組織学的検査および血液学的検査の所見からは原因は特定できなかった。この 8 週間投与試験の NOAEL は 175 mg/kg/日であった。

臨床病理検査で，赤血球の病理組織学的異常（変形赤血球増加，eccentrocytes および pyknocytes），赤血球分布幅および網状赤血球数の増加，平均血小板容積の増加，平均血清カリウムおよびコレステロールの低下，尿量増加などが認められたが，いずれも JAK3/TEC 阻害との関連は明確ではなく，毒性学的意義の乏しい所見であった。また，肺の好酸球浸潤の発現頻度の低下がすべての用量群で認められ，血中の好酸球数減少と関連していた。肺の好酸球浸潤の欠如は，組織損傷の徴候が認められなかったこと，および対照群の一部の動物でも同様の所見が認められたことから，毒性変化ではないと判断した。

副腎の空胞化が 8 週間投与毒性試験で認められたが，6 ヵ月間投与試験では同様の所見が認められなかったことから，副腎の空胞化は一過性の影響であったことが示された。同様に，14 日間投与試験および 8 週間投与試験で肝細胞の空胞化または小葉中心性肥大が認められたが，6 ヵ月間投与試験では認められなかった。

6 ヵ月間投与試験では，いずれの用量においても死亡または毒性変化は認められず，NOAEL は高用量の 200 mg/kg/日であった。より短期間の試験では認められず，本試験で認められた所見は，毒性学的意義の乏しい用量依存的な近位尿細管上皮細胞の硝子滴（リポフスチンおよび α2μ-グロブリン）蓄積の発現頻度または程度の上昇のみであり，この所見は 3 ヵ月間の休薬期間後に完全に回復していた。近位尿細管上皮細胞の硝子滴蓄積は腎機能にほとんど影響を及ぼさず，臨床的意味はほとんどないと考えられる[18]。

対照群と比較してリトレシチニブ群で認められ，完全に回復したその他の毒性学的意義の乏しい所見は，赤血球パラメータの減少，平均赤血球容積および赤血球分布幅の増加，網状赤血球絶対数の軽微な増加，1+～2+の変形赤血球増加および低色素性赤血球，1+の変形赤血球増加などであった。また，リトレシチニブ群では，対照群と比較して，平均血小板容積の増加ならびに AST，カリウム，トリグリセリドおよびグルコース濃度の低下も認められた。平均血小板容積の軽微な増加と変形赤血球増加および網状赤血球数の増加は，酸化的損傷による軽微な赤血球数減少と，エリスロポエチンの増加に伴う赤血球再生反応および血小板産生の増加と符合するものである[19,20]。

4.2.2. イヌを用いた反復投与毒性試験

重要な試験以外の探索的毒性試験（[redacted]LJ111）で 0，15，45 または 75 mg/kg/日の用量（雌雄各 1 匹または 2 匹/群）で 15 日間，重要な GLP 適用試験（[redacted]GR135）で 0，5，15 または 45 mg/kg/日の用量（雌雄各 3 匹/群）で 8 週間，イヌにリトレシチニブを 1 日 1 回経口投与した。2 回の 9 ヵ月間投与毒性試験では，0，5，10，20（QD），20（10 BID）または 40 mg/kg/日の用量を用いて実施した（20070068 および 20099163）。2 回目の 9 ヵ月間投与試験では，中用量の 20 mg/kg/日を 1 日 1 回（20 mg/kg QD）または 1 日 2 回（10 mg/kg BID）で投与することにより，C_{max} および AUC_{24} に対する感受性を評価した。

イヌを用いたすべての重要な毒性試験で，末梢血中リンパ球サブセットの免疫表現型検査を実施した。心血管系の評価は，重要な試験以外の 15 日間投与試験では体外ジャケット式テレメトリーにより，重要な試験である 8 週間投与試験および 1 回目の 9 ヵ月間投与試験では心電図計測により実施した。すべての試験で全動物からトキシコキネティクス評価用の試料を採取した。

イヌを用いたいずれの試験でも，曝露量（C_{max} および AUC_{24}）は用量の増加に伴って増加し，性差は認められなかった。また，イヌでは，投与期間を通じてリトレシチニブの蓄積はほとんど認められなかった。

イヌでは，リトレシチニブの反復投与後に，中枢神経系および末梢神経系への影響（軸索ジストロフィー），薬理作用である JAK3 または TEC の阻害に関連した所見（免疫抑制），心血管系（一貫性がなくばらつきのある変化）および副腎へのその他の影響，嘔吐および糞便異常が認められた。9 ヵ月間投与試験での NOAEL は 10 mg/kg/日であり，この NOAEL は 2 回目の試験で，20 mg/kg/日以上の用量群で毒性所見として過剰な免疫抑制ならびに中枢神経系および末梢神経系の軸索ジストロフィーが認められ，高用量の 40 mg/kg/日でこれに伴う聴覚の機能障害（BAEP 検査による評価）が認められたことに基づいて決定された。

20 mg/kg/日以上の用量を 9 ヵ月間投与した雌雄のイヌの中枢神経系（脳幹，小脳，脊髄およびその他の脳領域）ならびに末梢神経系（坐骨神経，迷走神経，自律神経，アウエルバッハ神経叢およびマイスネル神経叢）に軸索ジストロフィーが認められた。より短期間の試験では，より高い用量においても軸索ジストロフィーは認められなかった。

軸索ジストロフィーは，中心部が顆粒状ないしガラス状を呈する円形または卵円形の好酸性構造（スフェロイド）の存在を特徴としている。一部のイヌから得た上オリーブ核および蝸牛神経核の試料について透過電子顕微鏡検査を実施したところ，上オリーブ核に軸索終末の腫大が認められたが，これらの腫大部とこれに隣接する神経細胞体との間のシナプスに形態学的変化は認められなかった。腫大した軸索終末ではミトコンドリアが広い間隔で存在しており，超微細構造所見はニューロフィラメントに一致していた。蝸牛神経核の超微細構造に異常所見は認められず，神経細胞体との間のシナプスは形態学的に正常であった。イヌでリトレシチニブの長期投与後に認められた軸索ジストロフィーには，神経細胞壊死，軸索変性，神経細胞脱落，浮腫または炎症などの，より重度の神経細胞変化を伴う変性過程は認められなかった。

脳幹では 20 mg/kg/日以上の用量群の雌雄で軸索ジストロフィーの用量依存的な発現頻度または程度の上昇が認められた。20 mg/kg/日以上の用量群で外側上オリーブ核複合体に軽微～中等度

の軸索ジストロフィーが認められ，最も重度のケースではこの所見が両側性であった。20 mg/kg/日以上の用量群では雌雄ともに外側毛帯の線維束または外側毛帯腹側核にも軽微～軽度の軸索ジストロフィーが認められた。

小脳白質では 10 mg/kg/日以上の用量群の雌雄で軽微～中等度の軸索ジストロフィーが認められ，程度および発現頻度に用量依存性は認められなかった。この所見は小脳虫部の吻側内側面に認められた。

20 mg/kg/日以上の用量群の雌雄で脊髄の灰白質および白質の複数の部位に軽微～軽度の軸索ジストロフィーが認められた。この所見は高齢イヌにみられる背景所見の増悪と考えられた。また，軸索ジストロフィーは脳の他の領域にも散発的に認められたが，その大部分は対照群で発生し，程度は軽微であり，用量反応性が認められなかったことから，これらの所見は自然発生的に発現したものと考えられた。

末梢神経系においても軽微な軸索ジストロフィーが 20 mg/kg/日以上の用量群の雌雄で，複数の内臓器官（胃，十二指腸，結腸，膵臓，心臓，大動脈，脾臓，腸間膜リンパ節，腎臓，膀胱，膣）に分布する迷走神経の枝，アウエルバッハ神経叢（筋層間神経叢）またはマイスネル神経叢（粘膜下神経叢）に認められ，40 mg/kg/日群では副腎に分布する自律神経にも同様の所見が認められた。この所見は微細顆粒状好塩基性物質を含む単一の軸索の腫脹を特徴とするものであった。また，軽微な（限局性～多巣性）軸索ジストロフィーが，複数の内臓器官のアウエルバッハ神経叢およびこれより発現頻度は低いがマイスネル神経叢にも認められた。20 mg/kg/日以上の用量群の雌雄では坐骨神経にも軽微な軸索ジストロフィーが散発的に認められた。この変化は発現頻度または程度に用量依存性は認められず，ランダムに分布し，程度は極めて軽微であった（1～2 箇所の限局性軸索スフェロイド）。

軸索ジストロフィーが聴覚経路の一部である上オリーブ核に認められたことから，BAEP 検査を実施した。40 mg/kg/日群の雌 1 例および雄 1 例で，光学顕微鏡下で脳幹（上オリーブ核，外側毛帯）に認められた軸索ジストロフィーに関連して，軽度の聴覚閾値上昇（投与前値の 40 dB から 58 dB に上昇）ならびに IV 波および V 波の不明瞭化が認められた。これらの BAEP の変化は投与開始の 7～9 ヵ月後に認められ，これより早い時点（投与開始の 2 ヵ月後および 4 ヵ月後）では BAEP の変化は認められなかった。9 ヵ月間の投与期間終了時に光学顕微鏡検査用に処理した雌イヌの脳では，外側上オリーブ核に中等度の軸索ジストロフィーが認められた。9 ヵ月間の投与期間終了時に雄イヌで認められた聴覚障害（58 dB）は，休薬期間 3 ヵ月目の評価では 70 dB まで増悪していた。しかし，休薬期間 6 ヵ月目の評価では聴覚障害は投与前値（40 dB）にまで完全に回復しており，6 ヵ月間の休薬期間終了時の光学顕微鏡検査では同個体に軸索ジストロフィーは認められなかった。これらの BAEP の変化のほかには，いずれの試験でも，いずれの用量においても，神経に関する一般状態の変化は認められなかった。

中枢神経系に認められた軸索ジストロフィーは，40 mg/kg/群では機能的変化を伴う中等度の所見であり，上オリーブ核における中等度の所見およびこれに対応する BAEP の異常な波形変化は，聴覚中枢に対する影響と符合する変化であった。20 mg/kg/日群で認められた軸索ジストロフィーはこれより程度が低く，BAEP の波形変化を伴わなかった。10 mg/kg/日群の小脳で認められた軸索ジストロフィーは，小脳内の非常に特殊な解剖学的領域（虫部吻側部）に限局して認められたこと（1 箇所のみ），程度が低かったこと（軽微～軽度），炎症または壊死などの付

随する細胞応答が認められなかったことおよびこの用量で付随する機能的変化が認められなかったことから，毒性学的意義の乏しい所見であると判断した。

20 mg/kg/日以下の用量群では中枢神経系および末梢神経系の病理所見はすべて休薬 6 ヵ月後までに完全な可逆性を示したが，40 mg/kg/日群での小脳虫部の変化は完全には回復しなかった。

リトレシチニブを 1 日 1 回（20 mg/kg QD）または 1 日 2 回（10 mg/kg BID）投与したとき，軸索ジストロフィーに明確な差は認められなかったことから，軸索ジストロフィーはリトレシチニブの 1 日の総曝露量（AUC_{24}）と関連しており，各投与後に到達する血漿中 C_{max} とは関連しないことが示唆された。

リトレシチニブの投与に起因するその他の影響は，1 回目と 2 回目の 9 ヵ月間投与試験で概して一致しており，主として薬理作用である JAK3 または TEC の阻害に関連した変化であった。リトレシチニブ投与後に認められたリンパ組織の所見は，胸腺（20 mg/kg/日以上の群），脾臓，腋窩リンパ節，腸間膜リンパ節および GALT（全用量群）における軽微～中等度のリンパ組織の細胞充実性低下ならびに骨髄におけるすべての細胞種の軽微な細胞充実性低下（20 mg/kg/日以上の群の雄および 40 mg/kg/日群の雌）であり，ほぼすべてのパラメータにおける完全な回復が認められた。リンパ組織の細胞充実性低下に関連して，毒性学的意義の乏しいリンパ球，総 T 細胞，ヘルパーT 細胞，細胞傷害性 T 細胞および NK 細胞の可逆的な減少が全用量群で認められた。リンパ組織の細胞充実性低下はリトレシチニブの薬理作用に関連するものであり，20 mg/kg/日以上の群では，過剰な免疫抑制（皮膚感染症）がみられたことに基づき，胸腺，脾臓，腋窩リンパ節，腸間膜リンパ節および GALT における毒性変化であると判断した。

20 mg/kg/日以上でリトレシチニブを 9 ヵ月間投与したところ，全身性の発赤，被毛の菲薄化，皮膚の痂皮・丘疹・小結節および趾間嚢胞からなる皮膚の炎症を示す毒性変化が認められた。これに伴う軽度または重度の表皮過形成およびパピローマウイルスを示唆する核内ウイルス封入体が 20 mg/kg/日以上の群で認められ，小結節または腫瘤と関連していた。20 mg/kg/日以上の用量群で，ニキビダニの有無を問わず，局所的に広範囲に及ぶ中等度の毛包炎が認められた。これらの所見は重症化し，治療を要する全身性の発赤，被毛の菲薄化，皮膚剥離，趾間嚢胞および耳感染症によって，過剰な免疫抑制による毒性変化であることが確認された。

リンパ組織にみられた変化はすべて，6 ヵ月間の休薬期間後に回復した。皮膚の一般状態の変化および趾間嚢胞は，20 mg/kg/日群で完全に回復したが，40 mg/kg/日群では完全には回復しなかった。

用量依存的な赤血球数，ヘモグロビンおよびヘマトクリットの減少（20 mg/kg/日以上），網状赤血球数減少（5 mg/kg/日以上），血小板数増加（20 mg/kg/日以上）およびフィブリノーゲン増加（10 mg/kg/日以上）が認められたが，血液学的機能障害または全身性感染症を示す剖検所見ならびに病理組織学的所見は認められなかったことから毒性学的意義の乏しい変化と考えた。

2 回の 9 ヵ月間投与試験の一方または双方で，投与期間中に消化管への影響（嘔吐，糞便異常）および体重または摂餌量の変化が認められたが，変化の程度から毒性学的意義は乏しいと考えられ，これらは休薬期間中に回復した。

血液生化学検査では，グロブリンの増加ならびにアルブミン，アルブミン/グロブリン比，リン，カルシウム，総コレステロールおよび血清クレアチニンの減少が認められたが，変化の程度から毒性学的意義は乏しいと考えられた。血液生化学検査パラメータにおける変化はすべて，6 ヵ月間の休薬期間終了時に完全に回復した。

8 週間投与試験では 45 mg/kg/日群で心拍数増加ならびにそれに伴う PR 間隔および QT 間隔の短縮が認められたが，変化の程度は小さく，QTc には変化は認められなかった。心電図により心血管系を評価した 9 ヵ月間投与試験では心血管系の変化は認められなかった。

4.3. 遺伝毒性試験

細菌を用いる in vitro 復帰突然変異試験，ヒトリンパ芽球 TK6 細胞を用いた in vitro 小核試験およびラットの in vivo 小核試験からなる一連の遺伝毒性試験（重要な試験以外の試験および重要な試験）でリトレシチニブを評価した（Table 21）。In vivo 小核試験はラットの 8 週間投与毒性試験で実施した。In vitro 試験はすべて，細胞毒性が生じるまでまたは溶解性による限界までの濃度で代謝活性化系の存在下および非存在下で実施した。

Table 21.　遺伝毒性試験の要約

試験系	投与量または濃度	結果
細菌を用いる復帰突然変異試験（WIL-655100）：GLP 適用		
Salmonella typhimurium および *Escherichia coli*	25–5000 µg/プレート	陰性
In vitro 小核試験（WIL-655099）：GLP 適用		
TK6 リンパ芽球細胞		
代謝活性化系の非存在下で 4 時間処理	205–285 µg/mL	陰性
代謝活性化系の存在下で 4 時間処理	205–285 µg/mL	陰性
代謝活性化系の非存在下で 27 時間処理	48.3–125 µg/mL	陽性
In vivo 小核試験（[redacted]GR132）：GLP 適用		
ラット骨髄細胞（in vivo）	0, 75, 175, 400 mg/kg/日	陰性
フォローアップとして実施した機序に関する試験（[redacted]GTX10）：GLP 非適用		
TK6 リンパ芽球細胞		
代謝活性化系の非存在下で 27 時間処理	90.8–736 µmol/L	異数性誘発性

リトレシチニブは細菌を用いる復帰突然変異試験および in vivo 小核試験で遺伝毒性を示さなかったが，TK6 細胞を用いた in vitro 小核試験では，27 時間処理の結果が陽性であった。

フォローアップとして実施した試験では，フローサイトメトリーによる異数性の評価で低 2 倍体，高 2 倍体および多倍数体の増加が認められた（[redacted]GTX10）。また，構造的染色体異常を検討した試験で陰性であったことから，リトレシチニブは染色体異常誘発性を示さないことが示唆された。これらの試験の結果から，リトレシチニブの異数性誘発の作用機序が確認され，in vitro でのリトレシチニブに対する小核の反応には閾値メカニズムが関与していると考えられた。キナーゼ阻害薬が染色体異常誘発性を伴わない in vitro での異数性誘発性を示すことは一般的に知られており，高濃度では細胞分裂に関与するオフターゲット作用が生じた可能性が高いと考えられる[21,22]。異数性誘発は in vitro 試験の高濃度（125 µg/mL）でのみ認められた[22]。

リトレシチニブは，検討した最高用量の 400 mg/kg/日で，ラットの末梢血（4 日間投与後に採取）中の多染性網状赤血球に小核を誘発しなかった。これらの結果から，リトレシチニブは

in vitro で異数性誘発能を示したが，ヒトに 50 mg を投与したときの非結合型 C_{max} 値の 81 倍の曝露量までは in vivo で小核を誘発しないことが示された。

4.4. がん原性試験

4.4.1. マウス

rasH2 トランスジェニック（tg/wt）マウスを用いた 6 ヵ月間経口投与がん原性試験の用量は，C57BL/6NTac マウスを用いた 2 週間経口投与試験および rasH2（wt/wt）マウスを用いた 1 ヵ月間経口投与試験の結果に基づき設定した。

C57BL/6NTac マウスを用いた 2 週間投与忍容性および毒性試験（8390402）では，300 mg/kg/日以上の用量群の雄および 100 mg/kg/日以上の用量群の雌で死亡が認められたことから，耐用量は，雌で 30 mg/kg/日，雄では 100 mg/kg/日以下であった。曝露量は雌雄で同程度であった。

rasH2（wt/wt）マウスを用いた 1 ヵ月間投与用量設定試験（8392586）では，リトレシチニブを 450 mg/kg/日までの用量で 28 日間連日経口投与したとき，すべての用量で忍容性が得られ，毒性変化は認められなかったが，75 mg/kg 以上の用量群で一般状態および病理組織学的パラメータに，薬理作用による影響が認められたが，毒性学的意義の乏しい所見と考えられた。NOAEL は 450 mg/kg/日であった。

6 ヵ月間投与がん原性試験（8400625）では，rasH2 トランスジェニック（tg/wt）マウスにリトレシチニブを 0，30，100 または 300 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回 26 週間経口投与したところ，いずれの用量においても腫瘍は認められなかった。陽性対照動物で認められた腫瘍は，試験動物における rasH2 導入遺伝子の存在を確認したこのマウスモデルで予測される MNU の作用と一致する明らかな発がん性反応を示した。また，死亡率または生存率に対するリトレシチニブの影響は認められなかった。

腫瘍以外の所見として，鼠径リンパ節におけるリンパ球密度の低下および肝臓における自然発生性の混合型細胞浸潤の発現頻度の低下が認められた。これらはリトレシチニブの薬理作用に関連する所見であり，毒性学的意義は乏しいと判断した。300 mg/kg/日群の雌では試験 1 日から試験 182 日まで体重変化量の減少（対照群の 0.64 倍）が認められ，これは摂餌量の減少と関連していた。以上のことから，がん原性に関する NOEL およびすべての影響に関する NOAEL は 300 mg/kg/日と考えられた。

4.4.2. ラット

2 年間投与がん原性試験（8384525）では，Wistar Han ラットにリトレシチニブを 0，10，30 または 100 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回，最長 104 週間にわたって経口投与し，サテライト群のラットを用いて 25 週間投与後のトキシコキネティクスを検討した。用量はラットを用いた 6 ヵ月間投与毒性試験（20070067）の結果に基づき設定した。

100 mg/kg/日群で雌の胸腺（胸腺腫）および雄の甲状腺（濾胞細胞腺腫）における良性腫瘍および過形成の発現頻度の上昇が認められた。リトレシチニブの投与による生存率への影響は認められなかった。

100 mg/kg/日を投与された高用量群の雌では，良性胸腺腫および胸腺過形成の発現頻度の上昇が認められ，これに対応して胸腺の剖検所見（胸腺の形態異常，胸腺肥大および胸腺腫瘤）の発現頻度が上昇した。

100 mg/kg/日を投与された高用量群の雄では，統計的に有意な甲状腺濾胞細胞腺腫の増加および甲状腺濾胞細胞過形成の程度の上昇が認められ，これに対応して甲状腺の剖検所見（甲状腺肥大および甲状腺腫瘤）の発現頻度が上昇した。

リンパ組織（胸腺，脾臓および腸間膜リンパ節），肝臓および腎臓に，薬理作用に関連した非腫瘍性の病理組織学的所見が認められたが，毒性学的意義の乏しい所見と考えられた。

肝臓では 30 mg/kg/日以上の用量群の雌で多核肝細胞数の増加（対照群との比較）が認められた。多核肝細胞の増加は一般に適応反応であると考えられており，がん原性の可能性を示すものではない[23,24]。多核肝細胞は高齢ラットで自然に出現する可能性があることから，30 mg/kg/日以上の用量群の雌でこの所見がより顕著であったことは，このような背景所見の増悪を示すものであり毒性学的意義の乏しい変化であると判断した[25]。

腎臓では 100 mg/kg/日群の雌雄の腎尿細管上皮細胞に，色素沈着の発現頻度ならびに程度（および所見別の平均程度）の上昇（対照群との比較）が認められたが，毒性学的意義の乏しい所見と考えられた。

30 mg/kg/日以上の用量群の雄および 10 mg/kg/日以上の用量群の雌で体重増加抑制が認められた。すべての用量群の雌で削痩の発現頻度が上昇し，100 mg/kg/日群の雌では概してこれに対応する体重増加抑制が認められ，多くの個体で早期中止時付近に，これに伴う一般状態の変化が認められた。

曝露量（C_{max} および AUC_{24}）は，全用量群を通じて雌雄で同程度であり，用量にほぼ比例して増加した。

4.5. 生殖発生毒性試験

4.5.1. 受胎能および着床までの初期胚発生に関する試験

受胎能および着床までの初期胚発生に関する試験（重要な試験，00655209）で，ラットにリトレシチニブを 20，60 または 200 mg/kg/日の用量で交配前および交配期間中に投与し，雌では着床まで，雄では精子形成期間にわたって投与を継続した。

高用量の 200 mg/kg/日を交配前に 28 日間投与した雄と交配した無処置雌で着床前胚損失率の上昇が認められ，着床数と生存胚数が減少した。対照群および 200 mg/kg/日群の雄を別の無処置雌と交配した 2 回目の交配でも，同様の影響が認められた。雄には継続してリトレシチニブを投与したにもかかわらず，2 回の交配期間中に同一個体の雄ラットが必ずしも影響を受けなかったことから，当該所見は長期間の投与により進行せず，回復性を示す可能性が示唆された。リトレシチニブを投与した雄と交配したとき着床胚数が減少したことから，これは雄の授胎能への影響と考えられた。精子形成（精巣および精巣上体尾部での精子の数，産生率，運動性および形態）への影響は認められなかった。

200 mg/kg/日群の雄で体重増加抑制および体重増加量の減少がリトレシチニブの投与期間を通じて認められた。200 mg/kg/日群の雌では，多数の動物に性周期の異常が認められたため性周期が延長したが，交尾までの期間，交配，妊孕性および受胎能には影響が認められなかったことから，毒性学的意義の乏しい変化と判断した。

雄の授胎能に関する NOAEL は 60 mg/kg/日であった。200 mg/kg/日で雄に認められた体重増加抑制および体重増加量の減少に基づき，本試験における雄の全身毒性に関する NOAEL は 60 mg/kg/日と判断した。雌では毒性変化が認められなかったことから，全身毒性，受胎能および初期胚発生に関する NOAEL は高用量の 200 mg/kg/日と判断した。

4.5.2. 胚・胎児発生に関する試験

4.5.2.1. ラット

妊娠ラットを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験（20069224）でリトレシチニブを 0，75，175 または 325 mg/kg/日の用量で経口投与したところ，325 mg/kg/日群で対照群と比較して胎児体重が減少したことにより母動物の平均体重および体重増加量が減少した。胚・胎児発生に関する試験の本試験の用量として，75，175 および 325 mg/kg/日を選択した。

妊娠ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験の本試験（20075271）では，リトレシチニブを 75，175 または 325 mg/kg/日の用量で妊娠 6～17 日に経口投与したところ，175 mg/kg/日以上の用量群で胎児骨格の奇形および変異ならびに胎児および妊娠子宮重量の減少が認められた。骨格の奇形および変異として，椎骨および肋骨の奇形ならびに指，椎骨（頸椎，胸椎および腰椎），肋骨および胸骨の発生における変異が認められた。175 mg/kg/日以上の用量群では平均胎児体重または妊娠子宮重量の減少も認められた。母動物の体重増加量および摂餌量の減少は高用量でのみ認められた。母体に関する NOAEL は 175 mg/kg/日であり，発生に関する NOAEL は 75 mg/kg/日であった。

4.5.2.2. ウサギ

妊娠 New Zealand White ウサギを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験（20069228）でリトレシチニブを 10，75，175 または 325 mg/kg/日の用量で経口投与したところ，175 mg/kg/日群および 325 mg/kg/日群ではすべてのウサギが死亡または過度の毒性（一般状態，母動物の体重減少および摂餌量減少）による早期安楽殺に至り，予定された安楽殺時まで生存した動物はいなかった。75 mg/kg/日群では，対照群と比較して後期胎児死亡の発現頻度上昇およびそれに伴う着床後胚損失率の上昇，胎児数の減少，胎児体重の減少（対照群平均値の 0.93 倍）ならびに二次的な妊娠子宮重量の減少が認められた。

妊娠ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験の本試験（20075272）では，リトレシチニブを 5，25 または 75 mg/kg/日の用量で妊娠 7～19 日に投与したところ，75 mg/kg/日群で内臓奇形（腎奇形），骨格奇形（胸骨および椎骨の奇形）および骨格の変異（発育遅延ならびに頭蓋骨および椎骨の発生の変異によると考えられる骨化遅延）の発現頻度の上昇が認められた。75 mg/kg/日以上の用量群では胎児体重が対照群よりも低値であり（対照群平均値の 0.88 倍），これに伴う妊娠子宮重量の変化も認められた。さらに，75 mg/kg/日群では着床後胚損失率が対照群よりも高値であった。以上より，母体に関する NOAEL は，検討した最高用量の

75 mg/kg/日，発生に関する NOAEL は，75 mg/kg/日で認められた胎児体重の減少ならびに内臓および骨格の奇形ならびに骨格の変異の発現頻度上昇に基づき，25 mg/kg/日と判断した。

ラットおよびウサギで認められた骨格異常（胎児の骨格の奇形および変異）は，胎児の骨格発生への影響を示すものである。妊娠終了時に認められた骨化遅延は発育遅延によるものと考えられ，このような影響は出生後に回復することが示されている[26]。

4.5.3. 出生前および出生後の発生ならびに母体の機能に関する試験

妊娠ラットを用いた出生前および出生後の発生に関する試験（00655232）では，リトレシチニブを 25，75 または 175 mg/kg/日の用量で妊娠 6 日から授乳 20 日まで投与した。F0 母動物への影響は認められなかった。F1 世代では高用量でのみ毒性変化が認められ，発生に関する NOAEL は 75 mg/kg/日であった。

高用量の 175 mg/kg/日群で出生後の生存率低下が認められた。また，75 mg/kg/日以上の用量群で F1 雌雄の体重および体重増加量に影響が認められ，175 mg/kg/日群では毒性変化と判断した。175 mg/kg/日群では，F1 出生児の出生時体重は対照群と比較して雄で 0.82 倍および雌で 0.80 倍であり，離乳前の期間を通じて体重増加量の減少が認められ，離乳後の期間も持続し，離乳前および離乳後の F1 雌雄出生児の体重増加抑制がみられた。

175 mg/kg/日では性成熟の遅延（対照群と比較して包皮分離および膣の開口の遅延）が認められ，体重増加抑制/成長遅延による影響と判断した。

F1 世代の交配した雌では黄体数の減少が認められ（母動物あたり 12.6 個，対照群では 14.2 個），その結果として母動物あたりの着床数および生存胚数が対照群と比較して減少した。

試験 12 日の投与 1 時間後に測定したリトレシチニブの平均血漿中濃度は雌雄で同程度であり（2 倍以内），用量依存的に上昇した。この試験で認められた濃度は他の試験で認められた濃度と同様であった。

4.6. 局所刺激性試験

リトレシチニブはヒトに経口投与するため，リトレシチニブの局所刺激性試験は実施していない。

4.7. その他の毒性試験

4.7.1. 光毒性試験

リトレシチニブを 200 mg/kg/日までの用量で 3 日間連日 QD 経口投与したところ，皮膚および眼の光毒性を示す所見は認められなかった（20075773）。

4.7.2. 抗原性試験

リトレシチニブの抗原性試験は実施していない。反復投与毒性試験で，標準的な評価項目に加えてリトレシチニブの免疫毒性プロファイルの評価を実施している。

4.7.3. 免疫毒性試験

ICH S8（2006）[27]に従い，すべての重要な毒性試験で標準的および追加の免疫毒性パラメータ（血液学的検査，リンパ系器官重量，病理組織学的検査または免疫表現型検査）を評価した（4.2 項）。

また，リトレシチニブがその共有結合能に関連して過敏反応を誘発する可能性をマウスアレルギーモデル（MAM）で評価した。すなわち，リトレシチニブは JAK3 依存性サイトカイン反応を調節することを意図しているため，その免疫調節作用によって自身（タンパク質に共有結合するリトレシチニブ）に対する免疫反応の誘発能が抑制されるか否かを，改変 MAM を用いて検討した。

MAM を用いた試験では，雌 C57BL/6 マウスにリトレシチニブを 0，1，10 または 100 mg/kg/日の用量で 3 日間連日 1 日 1 回皮下投与した（[redacted]GR446）。リトレシチニブ群の総リンパ節細胞数の平均値は溶媒対照群の平均値と同程度であった。この結果から，リトレシチニブがヒトで過敏反応を誘発する可能性は低いことが示唆された。このことは，リトレシチニブのタンパク質に対する結合特異性と符合する［リトレシチニブのアルブミンおよび肝細胞への結合はごくわずか（3.3 項，3.4 項）］。

改変 MAM を用いた試験では，リトレシチニブを 0，1，10 または 100 mg/kg/日の用量で 5 日間連日 1 日 1 回経口投与するとともに，オフロキサシン 100 mg/kg/日を 3 日間連日皮下投与した。10 mg/kg/日または 100 mg/kg/日のリトレシチニブを併用したマウスは，溶媒とオフロキサシンを併用したマウスに比べてリンパ節の総細胞数が少なかった。

MAM の結果から，リトレシチニブが過敏反応を誘発する可能性は低いことが示唆され，改変 MAM の結果から，過敏反応が生じた場合でもリトレシチニブはその免疫調節作用により過敏反応の発現を抑制すると予測された。

4.7.4. イヌを用いた中枢神経系・末梢神経系に対する毒性発現の機序に関する試験

リトレシチニブ長期投与後のイヌの軸索ジストロフィーの発現頻度の上昇を検討し，発症機序を解明するため，GLP 非適用下でリトレシチニブの毒性発現の機序に関する in vivo および in vitro 試験を実施した。これらの試験により，軸索ジストロフィーはオフターゲット作用による影響であることおよびヒトがこの作用に対してイヌよりも高い感受性を示す可能性は低いことが示唆された。

リトレシチニブの脳内分布の差によって脳領域特異的な軸索ジストロフィーの発生を説明し得るか検討するため，イヌを用いて 3 日間経口投与試験を実施した（[redacted]GR131）。また，イヌの脳組織ホモジネート中でのリトレシチニブのオフターゲットへの結合の有無を確認するため in vitro 試験を実施し，正常な無処置イヌの脳のさまざまな領域で，選択した一部のキナーゼ（JAK3 および TEC キナーゼを含む）および酸化ストレス遺伝子の mRNA 相対発現量を測定した（[redacted]GR142）。さらに，正常なビーグル犬の脳組織ホモジネートを用いてリトレシチニブと結合するオフターゲット候補を検討し，軸索ジストロフィーが認められた脳領域（小脳虫部吻側部）と認められなかった脳領域（海馬）とを比較した（[redacted]GR193）。この試験の結果に基づき，ヒト，イヌ，ラットおよびマウスの脳内の DOCK10 発現量の比較を評価し（[redacted]GR164），

さらに，非臨床毒性試験に用いた動物種の MAP2K7 のリトレシチニブによる結合親和性がヒト MAP2K7 と異なるかを検討した（[redacted]GR372）。

これらの毒性発現の機序に関する試験と反復投与毒性試験の結果から，軸索ジストロフィーはオフターゲット作用によること，高曝露量においてのみ毒性変化が認められることおよびヒトがこの作用に対してイヌよりも高い感受性を示す可能性は低いことが示された。

- リトレシチニブ投与後の JAK3/TEC の発現量またはリトレシチニブの組織中曝露量には軸索ジストロフィーが認められた脳領域（上オリーブ核）と認められなかった脳領域（海馬）とで差は認められなかった。

- イヌの脳では，JAK アイソフォーム（JAK1，JAK2 および JAK3）の転写発現に差異があり，JAK3 転写物の発現は低く，3 種の JAK アイソフォームの中で最も少なかった。各アイソフォームの発現パターンは，検討した各脳領域（上オリーブ核，蝸牛核および海馬）を通じて定性的には同様であった。

- 脳領域全体（上オリーブ核，蝸牛核および海馬）を通じて酸化防御遺伝子の発現量には差がなく，酸化ストレスに対する感受性の差が神経系の軸索ジストロフィーへの感受性に関与する可能性は低いと考えられた。ビタミン E 欠乏症などの酸化ストレス条件下で認められる軸索ジストロフィーとは異なり[28]，眼の病理所見（網膜または視神経の組織像，眼科学的検査所見など）は，イヌを用いたいずれの反復投与毒性試験でも認められなかった。

- イヌの代謝物プロファイリングにより，軸索ジストロフィーが認められなかった神経系の他の領域と比較して軸索ジストロフィーが認められた神経系の領域（上オリーブ核）に特有の代謝物は検出されず，検出された代謝物はすべてイヌの体循環系に認められる代謝物と一致することが示された。

- In vitro および in vivo の代謝試験から，リトレシチニブの消失機序はグルタチオン抱合および P450 による酸化であることが示された。イヌの代謝物プロファイルと比較して，ヒト特有の代謝物は臨床試験では認められなかった。酸化代謝物は概して，ヒトと非臨床動物種とで定性的に類似していた。

- リトレシチニブは P-gp および BCRP 双方の基質となることが示されていることから，ヒトも非臨床動物種も同様に，リトレシチニブの神経系への分布濃度は血漿中濃度に比べて低いと考えられる。イヌの神経組織中のリトレシチニブ濃度の分析により，リトレシチニブは上オリーブ核とその他の脳領域とに等しく分布することが示された。また，リトレシチニブの脳中濃度は血漿中濃度の約 10 分の 1 であった。

- イヌの脳ではリトレシチニブは DOCK10 および MAP2K7 と強力に結合するが，JAK3 には結合しないことが示された。DOCK10 および MAP2K7 は神経系で役割を担っており，特に，アクチンのダイナミクスおよび軸索の形態に関与する[29,30]。

- イヌの脳では DOCK10 転写物がヒトの脳に比べて高度に発現していることが確認されたが，タンパク質の相対レベルは明らかにされていない。また，MAP2K7 の結合親和性は，ヒトと比較してイヌでわずかに高いことが示された。正確な機序は不明であるが，これらの

データにより，特定されたオフターゲット相互作用に対して，ヒトがイヌよりも高い感受性を示す可能性は低いことが示唆される。

4.7.5. 依存性試験

データを総合すると乱用の可能性のリスクは示唆されないため，リトレシチニブの依存性試験は実施していない。主な作用機序は，既知の乱用経路とは関連していない。また，副次的薬理活性の評価では，乱用の可能性に関連する受容体，トランスポーターまたはイオン依存性チャネル（ドパミン，セロトニン，γ-アミノ酪酸，オピオイド，カンナビノイド，グルタミン酸，アデノシンなどのシグナル伝達に関連するものを含むが，これらに限定されない）に対する結合または機能活性は認められなかった。

リトレシチニブは P-gp および BCRP の双方の基質となることが示されていることから，ヒトも非臨床動物種も同様に，リトレシチニブの神経系への分布濃度は血漿中濃度に比べて低いと考えられる。ラットを用いた組織分布試験では，[^{14}C]リトレシチニブの脳/血漿中の AUC 比は約 0.05 であったことから，リトレシチニブ関連物質の脳への分布はわずかであることが示された。

ラットの FOB または定量的な自発運動評価で影響は認められず，ラットおよびイヌを用いた心血管系試験でのテレメトリーを用いた活動性に関する影響は認められなかった。ラットおよびイヌを用いた毒性試験では中枢神経系への影響を示唆する一般状態の変化は認められていない。リトレシチニブに関連して認められた中枢神経系への影響は，イヌに 7 ヵ月間反復投与したときにみられた BAEP の変化であり，この変化は軸索構造の物理的変化（軸索腫脹）に伴うもので，乱用または依存のリスクを示すものではない。

4.7.6. 代謝物の毒性試験

ヒトの血中主要代謝物として PF-07034562（M2）が同定され，この代謝物の安全性は ICH M3(R2)に従って適切に評価されている。

- M2 は第 2 相反応代謝物（システイン抱合体）であり，概して毒性学的な懸念はない。
- M2 は，JAK1，JAK2，JAK3，TYK2 または TEC ファミリーキナーゼのいずれも阻害しないことから，薬理学的に不活性である（2.1.1.1 項）。
- 中枢神経系への分布はわずかで（脳/血漿中の AUC 比は 0.1 未満），半減期は短いことから，M2 またはその他の薬物関連分子は脳内に蓄積しないことが示唆された。
- ラットでは，ヒトと比較して十分な曝露量比が得られている（AUC_{24} 比が 1 超）。
- M2 は 2 つの補完的な in silico モデル（[redacted] および [redacted]）において，いずれも変異原性を示さないと予測された。

4.7.7. 不純物の毒性試験

すべての不純物は，ICH 品質ガイドライン［ICH Q3A (R2)，Q3B (R2)および ICH M7 (R1)］および工程に関する知識に基づき安全性が確認されているか，適切に管理されている[31,32]。

4.7.7.1. 細菌を用いる復帰突然変異試験

以下に示すリトレシチニブに混在する可能性のある不純物について，細菌を用いる in vitro 変異原性試験を実施した。

Table 22.　不純物：細菌を用いる in vitro 変異原性試験

不純物		試験番号	GLP
*不純物N		1149304	適用
*不純物L		[redacted]GR556	非適用
*不純物I		[redacted]GR004	非適用
*不純物O		[redacted]GR162	非適用
*不純物B		[redacted]GR139	非適用
*不純物P		[redacted]GR140	非適用
*不純物Q		[redacted]GR189	非適用
*不純物R		[redacted]GR190	非適用
*不純物S		[redacted]GR191	非適用
*不純物T		[redacted]GR192	非適用
*不純物U	異性体	[redacted]GR280	非適用
*不純物C		20232598	適用
*不純物V		20232562	適用
*不純物A		[redacted]GR240	非適用

試験デザインおよびパラメータは ICH，OECD ガイドラインおよび各国の規制（米国，英国，オランダ，ドイツ）に概説されている一般に認められた原則および慣例に適合した。GLP 適用試験はデータ相互受け入れ制度に参加する OECD 加盟国で FDA の GLP 規則に従って実施した。

代謝活性化系の非存在下または存在下で 5 mg/プレートまたは溶解の限界までの濃度で検討したとき，　*不純物B　および　*不純物A　を除くすべての不純物が *Salmonella typhimurium* の試験菌株（TA 98，TA 100，TA 1535，TA 1537）および *Escherichia coli* 株 WP2 uvrA pKM101 のいずれに対しても in vitro で復帰突然変異を誘発しなかった。

　*不純物B　は細菌を用いる変異原性試験（[redacted]GR139）で弱い変異原性を示したことから，ICH M7 の許容 1 日量で管理する。　*不純物B　では，すべてのプレートあたりの平均復帰コロニー数が同時陰性対照と同程度であり，S9 存在下で処理した TA 1535 で復帰コロニー数が再現性を持って用量依存的にわずかに増加（最大で 2.8 倍）したことを除き，用量反応は認められなかった。S9 存在下で処理した TA 1535 では 3 倍の基準には達しなかったが，3 回の独立した試験を通じて用量依存性の増加が認められたことから，　*不純物B　の変異原性は弱いものの陽性と判断した。

　*不純物A　は理論的なニトロソアミン不純物であり，細菌を用いる変異原性試験（[redacted]GR240）で TA1535 の復帰突然変異コロニー数を代謝活性化系の非存在下および存在下で，また，ハムスターの肝 S9 を用いた代謝活性化系の存在下では TA100 の復帰突然変異コロニー数も増加させたが，溶液中では生成しないことが実験的に確認されている。

4.7.7.2. 不純物試験

ICH Q3A(R2)（2006 年）に示された不純物の安全性の確認に関する原則に従い[31]，非変異原性不純物については，ラットを用いた 13 週間経口投与不純物試験でリトレシチニブ 200 mg/kg/日または不純物を添加したリトレシチニブ 200 mg/kg/日を 1 日 1 回 13 週間経口投与することにより，安全性を確認した（8413430）。

この試験では，不純物の添加の有無にかかわらずリトレシチニブを 200 mg/kg/日の用量で投与後に毒性所見は認められず，所見の質，発現頻度，程度および程度は概して同様であった。

用量はラットを用いた 6 ヵ月間投与毒性試験（20070067）の NOAEL（200 mg/kg/日）に基づき設定した。添加した不純物は，　*不純物C ，　*不純物D ，　*不純物E ，　*不純物F ，*不純物G，　*不純物H ，　*不純物I ，　*不純物J ，　*不純物K ，　*不純物L　および*不純物M であった。

4.8. 所見と薬物動態の関係

マウス，ラット，ウサギおよびイヌでのリトレシチニブの曝露量（C_{max} および AUC_{24}）は，評価した用量範囲で用量の増加に伴い増加した。マウス，ラットおよびイヌでは曝露量の性差や蓄積は認めらなかった。リトレシチニブの C_{max} および AUC_{24} は，遊離塩基を用いた試験とマロン酸塩またはトシル酸塩を用いた試験とで同程度であった。

血漿蛋白結合率の種差（マウス 0.22，ラット 0.67，イヌ 0.82，ウサギ 0.29，ヒト 0.86）を考慮し，曝露量比はヒトに 50 mg および 200 mg を投与したときの非結合型 C_{max} および AUC_{24} に対する非臨床動物種での非結合型 C_{max} および AUC_{24} の比として算出した。血漿中リトレシチニブ濃度および曝露量比を Table 23 に示す。

AA 患者にヒト用量を投与したときの非結合型 C_{max} および AUC_{24} は，50 mg 投与時にそれぞれ 318 ng/mL および 1070 ng•h/mL，200 mg 投与時にはそれぞれ 1430 ng/mL および 5310 ng•h/mL である。

Table 23.　PK と臨床曝露量（非結合型）の関係

動物種/試験 試験番号	投与量 (mg/kg/日)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{24} (ng•h/mL)	曝露量比 (50 mg)		曝露量比 (200 mg)	
				C_{max}	AUC_{24}	C_{max}	AUC_{24}
安全性薬理試験							
ラット/神経肺試験	75	5880	16600	18[a]	16[a]	4.1[a]	3.1[a]
[redacted]GR139	175	13400	45000	42[a]	42[a]	9.4[a]	8.5[a]
	400	19400	157000	61[a]	147[a]	14[a]	30[a]
ラット/心血管系試験	125	9110	26700	29	25	6.4	5.0
[redacted]LJ074							
イヌ/心血管系試験	3	NA[b]	NA[b]	NA[b]	NA[b]	NA[b]	NA[b]
[redacted]GR140	15 (NOEL)	NA[b]	NA[b]	13[b]	NA[b]	2.9[b]	NA[b]
	45	10500	52600	33	49	7.3	9.9
反復投与試験							
ラット/8 週間投与試験	75	7710	17200	24	16	5.4	3.2
[redacted]GR132	175 (NOAEL)	16200	53100	51	50	11	10
	400 （小核に関する NOEL）	25600	139000	81	130	18	26
ラット/6 ヵ月間投与試験	50	4910	10300	15	9.6	3.4	1.9
20070067	100	8980	21400	28	20	6.3	4.0
	200 (NOAEL)	16800	53700	53	50	12	10
イヌ/8 週間投与試験	5	1510	3780	4.7	3.5	1.1	<1
[redacted]GR135	15	4720	10900	15	10	3.3	2.1
	45 (NOAEL)	12000	44100	38	41	8.4	8.3
イヌ/9 ヵ月間投与試験	5 (NOAEL)	1120	4020	3.5	3.8	<1	<1
20070068	20	3800	18000	12	17	2.7	3.4
	40	8940	36900	28	34	6.3	6.9
イヌ/9 ヵ月間投与試験	10 (NOAEL)	1910	7940	6.0	7.4	1.3	1.5
20099163	20 (QD)	3450	14500	11	14	2.4	2.7
	20 (10 BID)	2560	16900	8.1	16	1.8	3.2
	40	8690	35200	27	33	6.1	6.6

Table 23.　PK と臨床曝露量（非結合型）の関係

動物種/試験 試験番号	投与量 (mg/kg/日)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{24} (ng•h/mL)	曝露量比 (50 mg)		曝露量比 (200 mg)	
				C_{max}	AUC_{24}	C_{max}	AUC_{24}
がん原性試験							
マウス/6 ヵ月間投与試験	30	321	605	1.0	<1	<1	<1
8400625	100	1540	3230	4.8	3.0	1.1	<1
	300 (NOEL)	4400	12100	14	11	3.1	2.3
ラット/104 週間投与試験	10	931	2000	2.9	1.9	<1	<1
8384525	30 (NOEL)	3230	6770	10	6.3	2.3	1.3
	100	12900	31500	41	29	9.0	5.9
生殖発生毒性試験							
ラット/受胎能および着床までの初期胚発生に関する試験	20	1870	3360	5.9	3.1	1.3	<1
00655209	60 （NOAEL，雄）	7240	14700	23	14	5.1	2.8
	200 （NOAEL，雌）	17800	58600	56	55	12	11
ラット/胚・胎児発生に関する試験	75 （発生に関する NOAEL）	7770	17000	24	16	5.4	3.2
20075271	175 （母体に関する NOAEL）	13700	52900	43	49	9.6	10
	325	25000	109000	79	102	17	21
ウサギ/胚・胎児発生に関する試験	5	661	1780	2.1	1.7	<1	<1
20075272	25 （発生に関する NOAEL）	4470	13200	14	12	3.1	2.5
	75 （母体に関する NOAEL）	14900	58600	47	55	10	11
ラット/出生前および出生後の発生に関する試験	25	2060	4230	6.5	4.0	1.4	<1
00655232	75 （発生に関する NOAEL）	7910	15400	25	14	5.5	2.9
	175 （母体に関する NOAEL）	16100	44000	51	41	11	8.3

Table 23.　PK と臨床曝露量（非結合型）の関係

動物種/試験 試験番号	投与量 (mg/kg/日)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{24} (ng•h/mL)	曝露量比 (50 mg)		曝露量比 (200 mg)	
				C_{max}	AUC_{24}	C_{max}	AUC_{24}
その他の試験							
ラット/3 日間光毒性試験 20075773	50	4490	17400	14	16	3.1	3.3
	100	11300	36700	36	34	7.9	6.9
	200 (NOEL)	9920	59800	31	56	6.9	11

a. トキシコキネティクス試験は実施しなかった。ラットの 8 週間投与毒性試験（[redacted]GR132）における試験 1 日の雄の非結合型 C_{max} および AUC_{24} を示す。
b. トキシコキネティクス試験は実施しなかった。PK プロファイルは 45 mg/kg のみで実施したことから，イヌの 8 週間投与毒性試験（[redacted]GR135）における 15 mg/kg の試験 1 日の非結合型 C_{max} の平均値である 4190 ng/mL を用いて曝露量比を算出した。

4.9. 標的臓器毒性・主な所見

特定された標的臓器および主な所見は，死亡発生（ラットおよびウサギ），中枢神経系および末梢神経系（イヌ），免疫系およびリンパ造血系（ラットおよびイヌ），胸腺および甲状腺（ラット），精子形成への影響を伴わない雄の授胎能への影響（ラット），胚・胎児発生への影響（ラットおよびウサギ）ならびに出生前および出生後の発生への影響（ラット）であった。その他の所見は，軽微かつ一貫性のない心血管系への影響（ラットおよびイヌ），腎臓および肝臓への影響（ラット），副腎への影響（ラットおよびイヌ），ならびに嘔吐および糞便異常（イヌ）であった。

リトレシチニブ投与による死亡はラットを用いた 8 週間投与毒性試験および妊娠ウサギを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験で，ヒトに 50 mg を投与したときの非結合型 AUC_{24} の 50 倍を超える曝露量において認められた。

骨髄，免疫系およびリンパ造血系への影響は，JAK および TEC の阻害による既知の薬理作用に符合するものであったが，ラットを用いたがん原性試験で認められた胸腺の増殖性変化にはリトレシチニブの免疫抑制作用が一部関与した。

標的臓器は試験間で概して一致していたが，中枢神経系・末梢神経系の軸索ジストロフィーおよび感染を引き起こす過剰な免疫抑制の病理組織学的所見は，2 回のイヌを用いた 9 ヵ月間投与毒性試験でのみ認められた。中枢神経系および末梢神経系では，軸索腫脹（ジストロフィー）の病理組織学的所見がイヌを用いた 9 ヵ月間投与毒性試験でのみ認められた（種特異的な変化と考えられる）がモニター可能（BAEP 検査および一般状態観察）であり，回復傾向が認められた。軸索ジストロフィーの発現機序に関する検討から，ヒトでより高い感受性を示す可能性は低いと考えられたが，この所見のヒトへの外挿性については臨床試験において検討した。

標的臓器および主な所見に関連する非結合型曝露量比を Table 24 に示す。

Table 24.　標的臓器・主な所見，関連する NOAEL および曝露量比

標的臓器・主な所見	動物種	NOAEL（mg/kg/日）	曝露量比 50 mg		曝露量比 200 mg	
			C_{max}	AUC_{24}	C_{max}	AUC_{24}
死亡	ラット	200	53	50	12	10
	ウサギ（妊娠雌）	75	47	55	10	11
中枢神経系・末梢神経系						
軸索ジストロフィー（腫脹）	イヌ	10	6	7.4	1.3	1.5
免疫系およびリンパ造血系						
免疫抑制（リンパ系組織および骨髄の細胞充実性↓，白血球数・リンパ球数↓）血液学的検査（赤血球数↓および形態変化）	イヌ	10	6	7.4	1.3	1.5
	ラット	200	53	50	12	10
がん原性						
胸腺および甲状腺	ラット	30 (NOEL)	10	6.3	2.3	1.3
良性胸腺腫・甲状腺濾胞細胞腺腫，胸腺過形成および甲状腺濾胞細胞過形成						
なし	マウス	300 (NOEL)	14	11	3.1	2.3
雄の授胎能						
リトレシチニブを投与した雄と交配した未処置の雌における着床前胚損失。精子形成に影響なし。	ラット	60	23	14	5.1	2.8
胚・胎児発生						
骨格奇形および変異，胎児体重の低下，内臓奇形（ウサギ）	ラット	75	24	16	5.4	3.2
	ウサギ	25	14	12	3.1	2.5
出生前および出生後の発生						
出生後生存率↓，体重↓，性成熟への影響（F1 雌雄），黄体↓，着床痕↓，F1 雌の生存胚↓	ラット	75	25	14	5.5	2.9

4.9.1. 中枢神経系および末梢神経系

イヌを用いた 2 回の 9 ヵ月間投与毒性試験のみで，中枢神経系および末梢神経系に可逆的な軸索腫脹（ジストロフィー）の発現頻度および程度の上昇が認められた。この所見は，イヌを用いたより短期間の試験（8 週間以内）でも，ラット（6 ヵ月間～2 年間）またはマウス（6 ヵ月間）を用いた反復投与毒性試験およびがん原性試験でも認められなかった。

リトレシチニブ投与後のイヌの軸索ジストロフィーを光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いて評価したところ，光学顕微鏡では軸索ジストロフィーに関連した軸索変性，軸索貪食，神経細胞壊死，浮腫，炎症・グリオーシスなどの毒性変化は認められず，電子顕微鏡では軸索ジストロフィーはニューロフィラメントの蓄積に伴うシナプス前部の腫脹と関連があり，シナプスには

異常が認められないことが示された。一方，軸索に対する神経毒性物質による変化には軸索の変性または萎縮が伴い，このような所見は高用量では短期間のうち（1～3 ヵ月間）に認められ，複数の動物種を通じて認められる[33,34,35]。したがって，Table 25 に示すように，光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いて評価した軸索ジストロフィーの組織形態学的特徴および性質は変性過程を示すものではなく，軸索に対する神経毒性物質による所見とは異なっている[34,35]。

Table 25.　リトレシチニブ投与による軸索ジストロフィーと軸索変性の相違

組織形態学的特徴	リトレシチニブ投与による軸索ジストロフィー	軸索変性
軸索腫脹	√	-
軸索の完全性	√	-
ワーラー変性	-	√
dying-back 型軸索変性	-	√
ミエリン喪失・変性	-	√
グリオーシス	-	√
神経貪食	-	√

√：認められる，-：認められず

公表された報告によると，自発的軸索スフェロイドは，加齢に関連する背景所見として動物およびヒトで発現する可能性があり，これは中枢神経系で最も高頻度に発現するとされているが，脊髄の軸索終末および末梢神経系の一部の領域（例：自律神経節）でも発現するとされている[35,36,37,38,39,40,41,42,43]。しかし，2 回目の 9 ヵ月間投与試験で NOAEL（10 mg/kg/日）において軸索ジストロフィーが認められた唯一の組織であるイヌの小脳虫部吻側部は，毒性試験では通常採取しない組織であるため，イヌの小脳虫部吻側部に軸索ジストロフィーが加齢に伴う背景所見として発生するかは不明であった。背景データにおける小脳虫部吻側部の軸索ジストロフィーの発現頻度を明らかにするため，95 例の対照動物（この試験とは無関係の同年齢以上のイヌ）を用いて同所見の自然発生について病理組織学的検査により評価した。この詳細な評価から，軸索ジストロフィーの発現頻度の背景データとして，約 25%のイヌで加齢に伴うスフェロイド数の増加がみられた（20099163）。

軸索ジストロフィーが聴覚経路の一部である上オリーブ核に認められたことから，BAEP 検査を実施した。聴覚系は聴覚末梢系および聴覚中枢系で構成されている。聴覚末梢系は外耳，中耳および内耳で構成され，蝸牛神経の頭蓋外の部分が含まれるのに対し，聴覚中枢系には蝸牛神経の頭蓋内の部分と上オリーブ核を含む蝸牛核から聴覚皮質までの聴覚構造が含まれる[44]。

典型的な聴覚毒性薬物は聴覚経路の末梢部分を特異的に標的とすることが知られており，この場合は，BAEP 波形の早期成分に機能的変化が認められる[45,46,47]。したがって，リトレシチニブを 40 mg/kg/日の用量で 7 ヵ月間以上投与したとき，BAEP 波形の早期成分には影響がみられず，IV 波および V 波が不明瞭となったことは，中枢を介した障害であることを示すものであり，聴覚末梢系によるものではないと考えられた。

BAEP の経時的データによると，4 ヵ月時点ではこの所見に関連する BAEP の変化が認められなかったことから，軸索ジストロフィーは投与 4 ヵ月以降に発現する可能性が高いことが示され

た。また，イヌを用いた短期間の試験（8 週間以内）では，イヌに 9 ヵ月間投与したときよりも高い用量および曝露量比でも軸索ジストロフィーは認められなかった。

中枢神経系に認められた軸索ジストロフィーは，40 mg/kg/日群では機能的変化を伴う中等度の所見であり，上オリーブ核における中等度の所見およびこれに対応する BAEP の異常な波形変化は，聴覚中枢に対する毒性と符合する変化であった。20 mg/kg/日群で認められた軸索ジストロフィーは，これより程度が低く，機能的変化を伴わなかった。10 mg/kg/日群で小脳に認められた軸索ジストロフィーは，小脳内の非常に特殊な解剖学的領域（虫部吻側部）に限局して認められたこと（1 箇所のみ），程度が低かったこと（軽微～軽度），炎症または壊死などの付随する細胞応答が認められなかったことおよび関連する機能障害（BAEP ならびに自発運動への影響およびバランスなどの一般状態）が認められなかったことを総合して，毒性学的意義の乏しい所見であると判断した。10 mg/kg/日での曝露量比は，ヒトに 50 mg を投与したときの非結合型 AUC_{24} の 7.4 倍であった。

末梢神経系では軽微で可逆的な軸索ジストロフィーが神経系の病理組織学的検査のためにより広範なトリミング/サンプリングを実施した 2 回目の 9 ヵ月間投与試験の 20 mg/kg/日以上で認められたが，10 mg/kg/日では認められず，用量の増加に伴う所見の程度の上昇はみられなかった。末梢神経系の軸索ジストロフィー発現の NOAEL は 10 mg/kg/日であり，このときの曝露量比は，ヒトに 50 mg を投与したときの非結合型 AUC_{24} の 7.4 倍であった。

末梢神経系における軸索ジストロフィーの背景発生率に関する公表された報告は限定的であるが，未処置の幼若および高齢イヌの神経系における自然発生性の軸索ジストロフィーを評価した報告 [41] では，中枢神経系の種々の領域における軸索ジストロフィーの背景発生率は，幼若イヌ（2 回目の 9 ヵ月間投与試験と同じ年齢）では 0%～85%の範囲であり，自然発生性の軸索ジストロフィーの発生率に大きなばらつきがあることが示されている。末梢神経系は限定的な組織の評価ではあったが，この報告では末梢神経系に軸索ジストロフィーは認められなかった。リトレシチニブを用いた 2 回目の 9 ヵ月間投与試験でより広範なサンプリング手順で採取された末梢神経系組織でランダムに認められた軸索ジストロフィーの程度が軽微であったことも考慮すると，イヌの長期投与毒性試験での末梢神経系における軸索ジストロフィーの背景発生率に関する公表文献があまりないことは，限定的な末梢神経系組織しか評価されておらず，軸索ジストロフィーがランダムにみられ，変化の程度も軽微であることに関連している可能性が考えられる。

上記の報告では，より重度の軸索ジストロフィーにおいても，固有受容感覚の障害（種々の身体部分の位置および運動の認識の変化）を示す生理学的な一般状態への影響は認められなかった。未処置のイヌにおけるこのような所見は，関連する組織損傷は伴っておらず，生理学的な影響が認められなかったリトレシチニブの長期投与後にみられた軸索ジストロフィーと一致している。また，リトレシチニブを長期投与したイヌにおいても，末梢神経系に認められた軸索ジストロフィーに起因した可能性のある，痛み，運動障害またはバランスの変化といった生理学的な影響または一般状態の変化は認められなかった。

6 ヵ月間の休薬期間終了後には 20 mg/kg/日の中枢神経系および末梢神経系の病理所見はすべて完全に回復し，40 mg/kg/日群では 6 例中 1 例で小脳虫部の変化が完全には回復しなかったことを除き，BAEP およびすべての部位の軸索ジストロフィーは完全に回復した。

ラットおよびトランスジェニックマウスでは，イヌで軸索ジストロフィーが認められた最小用量と同等以上の曝露量でリトレシチニブをそれぞれ 2 年間および 6 ヵ月間投与しても，軸索ジストロフィーは認められなかった。公表文献において，ラットおよびイヌではそれぞれ生後約 5 ヵ月および 18 ヵ月という早い時期に軸索ジストロフィーが背景所見として発現することが示されている[38,41,48]。ラットとイヌの双方で，背景所見の軸索ジストロフィーの発現が報告されている週齢・月齢の期間にリトレシチニブを投与したが，全身曝露量はラットで所見のみられたイヌの約 4 倍，脳内の曝露量はラットとイヌで同程度に低かったにもかかわらず，イヌのみで軸索ジストロフィーの増悪が認められた。

ラットおよびイヌともにリトレシチニブの中枢神経系への分布はわずかであり，ラットを用いた組織分布試験で放射能濃度の半減期が短かったことから（3.3.2 項），軸索ジストロフィーは中枢神経系におけるリトレシチニブまたはその代謝物の蓄積とは符合しないと考えられた。

リトレシチニブのイヌへの長期投与後に認められた軸索ジストロフィーの発現頻度上昇の機序について検討するために実施した試験の結果から，特定されたオフターゲット相互作用に対して，ヒトがイヌよりも高い感受性を示す可能性は低いことが示唆された。

動物を用いた毒性試験および毒性発現の機序に関する試験で得られた成績に基づくと，以下の理由により，リトレシチニブに関連した軸索ジストロフィーの臨床的意義は低いと考えられる。

- イヌで認められた軸索ジストロフィーには，軸索変性，軸索貪食またはグリオーシスなど，神経組織の損傷を示す所見を伴っていなかった。
- 軸索ジストロフィーに関連した機能障害は高曝露量でのみ認められた。
- イヌで認められた軸索ジストロフィーおよびそれに関連した機能障害は可逆的であった。
- 髄鞘形成またはシナプス形成への影響を示す病理組織学的所見は認められなかった。
- イヌで毒性変化と判断された軸索ジストロフィーは，リトレシチニブの薬理作用および臨床予定用量での全身曝露量において認められなかった。
- 毒性発現の機序に関する試験により，軸索ジストロフィーはイヌを用いた毒性試験でリトレシチニブの高用量群のみに認められたオフターゲット作用である可能性が示唆された。
- ラットおよびマウスでは，全身曝露量が高く試験期間が長い場合でも軸索ジストロフィーは認められなかったことから，イヌでみられた軸索ジストロフィーの発現頻度の上昇は種特異的な変化であると考えられた。

4.9.2. 免疫系およびリンパ造血系

ラットおよびイヌで，リンパ球数ならびにリンパ組織（胸腺，脾臓，リンパ節および GALT）および骨髄の変化が認められた。これらの変化は JAK3/TEC に対するリトレシチニブの薬理活性と符合していた[15,16,17]。薬理活性に起因するこれらの変化は，イヌおよびラットを用いたすべての反復投与毒性試験ならびにラットおよびトランスジェニックマウスを用いたがん原性試験の全用量群で認められ，概して用量依存的で，3～6 ヵ月の休薬後には完全に回復し，日和見感

染に至る過剰な免疫抑制（ヒトに 50 mg を投与したときの非結合型 AUC_{24} の 14 倍以上）の場合を除き，毒性学的意義の乏しい変化であった。ラットを用いた 2 年間投与がん原性試験で認められた良性胸腺腫および胸腺過形成の発現頻度の上昇はリトレシチニブの免疫抑制作用と一部関連した変化であり，これについては 4.9.3 項に詳述する。

ラットの 6 ヵ月間投与毒性試験では，すべての用量で白血球数，リンパ球数，単球数，好酸球数および好塩基球数の減少が認められた。同様に，イヌの 8 週間投与試験および 9 ヵ月間投与試験のすべての用量でリンパ球数の減少が認められた。イヌの 8 週間投与試験および 9 ヵ月間投与試験で実施した免疫表現型検査から，同用量で全 T 細胞数，ヘルパーT 細胞数，細胞傷害性 T 細胞数および NK 細胞数の減少が示された。B 細胞数の減少も，8 週間投与試験では 45 mg/kg/日で認められ，9 ヵ月間投与毒性試験では 1 回目の試験でのみすべての用量で認められた。

ラットおよびイヌのいずれでも，リンパ球数の減少はリンパ組織（胸腺，脾臓，リンパ節および GALT）の細胞充実性低下と関連していた。イヌを用いた 2 回目の 9 ヵ月間投与毒性試験を除いて，脾臓重量の減少および胸腺の小型化もこれらの変化と関連していた。

ラットおよびイヌの重要な毒性試験（ラットおよびイヌの 8 週間投与試験，ラットの 6 ヵ月間投与試験およびイヌの 9 ヵ月間投与試験）で骨髄の細胞充実性低下が認められた。ラットおよびイヌの試験で認められた骨髄の細胞充実性低下は用量依存的であり，ラットでは軽微（75 mg/kg/日以上）～重度（400 mg/kg/日）の変化が認められた。

ラットの 8 週間投与試験では，肺の好酸球浸潤の発現頻度の低下がすべての用量で認められ，これは好酸球数の減少と関連していた。ラットのリンパ球数，リンパ組織および骨髄の変化は，3 ヵ月間の休薬期間終了時に回復した。イヌを用いた 1 回目の 9 ヵ月間投与試験では，3 ヵ月間の休薬期間終了時にリンパ球数および T 細胞数の回復傾向ならびにリンパ組織および骨髄の回復が認められ，イヌを用いた 2 回目の 9 ヵ月間投与試験では，6 ヵ月間の休薬期間終了時にこれらの変化はいずれも回復した。

白血球数およびリンパ組織の細胞充実性の変化の毒性学的意義は乏しいと判断したが，イヌを用いたいずれの 9 ヵ月間投与毒性試験でもこれらの所見と関連する免疫抑制の徴候（皮膚の炎症および肺の限局性炎症）が認められ，皮膚の炎症については毒性変化と判断した。イヌを用いた 2 回の 9 ヵ月間投与毒性試験では，投与期間終了時までにそれぞれ 40 mg/kg/日および 20 mg/kg/日以上で皮膚の限局性炎症が認められ，リンパ球数の減少と関連しており毒性所見と考えた。

トランスジェニックマウスを用いたがん原性試験ではすべての用量で，ラットを用いた 2 年間投与がん原性試験では 100 mg/kg/日の用量で，リンパ節の細胞充実性低下が認められたが，毒性学的意義の乏しい変化と考えた。

反復投与毒性試験でラットおよびイヌの赤血球パラメータならびにラットの赤血球形態への影響が認められたが，薬理作用との明らかな関連はなかった。赤血球分布幅および網状赤血球数の増加は軽度の赤血球再生と符合しており，赤血球の形態異常は酸化的損傷と符合する。赤血球数，ヘモグロビン量およびヘマトクリット値の変化は休薬期間終了時には回復していた。

ラットの 8 週間投与毒性試験および 6 ヵ月間投与毒性試験で平均血小板容積の増加が認められ，イヌの 9 ヵ月間投与毒性試験では 20 mg/kg/日以上で血小板数，10 mg/kg/日以上でフィブリノーゲンの増加が認められたが，血小板数およびフィブリノーゲンの変化は休薬後に回復した。変化の程度が小さく，他の血小板パラメータの変化や血液凝固に対する機能的影響を示す所見がなかったことから，これらの所見の毒性学的意義は乏しいと考えた。

4.9.3. 胸腺および甲状腺

ラットを用いたがん原性試験でリトレシチニブを 2 年間投与したとき，ヒトに 50 mg を投与したときの非結合型 AUC_{24} の 29 倍の曝露量で良性胸腺腫および胸腺過形成（雌のみ）ならびに良性の甲状腺濾胞細胞腺腫および甲状腺濾胞細胞過形成（雄のみ）が認められた。ヒトに 50 mg を投与したときの非結合型 AUC_{24} の 6.3 倍以下の曝露量では腫瘍性変化は認められなかった。トランスジェニックマウスを用いた 6 ヵ月間投与試験または最長 9 ヵ月間まで投与したイヌの試験では過形成または腫瘍性変化は認められなかった。

ラットで認められた胸腺上皮細胞の過形成および腫瘍は複数の要因による変化であり，リトレシチニブの免疫調節作用に加え，年齢，性別（雌のみ），動物の系統（Wistar Han）とも関連していた。

雌の Wistar Han ラットにみられたリトレシチニブによる胸腺腫発現頻度の増加の正確な原因および機序は解明されていないが，リトレシチニブは遺伝毒性を示さないことから，遺伝毒性以外の機序に関連している。ラットを用いた反復投与毒性試験で胸腺リンパ組織の細胞充実性低下および血中リンパ球の減少が認められたことにより示されたように，リトレシチニブは胸腺での JAK/STAT シグナル伝達を阻害することから，ラットを用いたがん原性試験で雌の Wistar Han ラットにみられた胸腺腫の形成はリトレシチニブの免疫抑制作用に関連した変化と考えられた。

JAK/STAT シグナル伝達阻害が単独で胸腺上皮細胞由来の腫瘍細胞の増殖を促進することを示唆するノックアウトマウスを用いた研究は報告されていない。胸腺腫の発現には他の要因も関与しており，最も重要な点として，高齢の雌 Wistar Han ラットは他の一般的に用いられる系統のラット（Sprague-Dawley ラットなど）に比べて胸腺腫を自然発症しやすい傾向があることが示されている。同時対照，試験実施施設の既存対照データベースおよび文献報告により，雌の Wistar Han ラットは多くみられる自然発生腫瘍として良性胸腺腫を発現しやすいことが示された。また，雌の Wistar Han ラットでは胸腺腫の自然発生率が高いとの報告があり[49]，無処置の雌 Wistar Han ラットは高頻度で胸腺腫を自然発症することが複数の文献で報告されている[50,51,52]。

リトレシチニブの免疫抑制作用により，加齢に伴って自然に生じる胸腺リンパ系細胞の減少が増悪し，その結果として，100 mg/kg/日群の雌 Wistar Han ラットで胸腺腫形成の発現頻度が上昇したと考えられた。トファシチニブなどの他の JAK 阻害薬は胸腺のリンパ組織の細胞充実性の変化と胸腺腫の形成が生じるが，Wistar 系ラットに比べて胸腺腫の自然発生率が低い Sprague-Dawley 系のラットを用いたがん原性試験では，より高い用量および曝露量においても胸腺腫の発生頻度上昇は認められない。以上のように，雌の Wistar ラットでは胸腺の生物学的特徴に系統特異的な相違がみられ，他の系統のラットに比べて高い頻度で胸腺腫が加齢に伴い自然発生する。他の免疫抑制薬の投与後にこの影響が増悪することが示されている。

甲状腺濾胞細胞腺腫もラットによくみられる自然発生腫瘍であり，系統および性別によってその発生率が異なる。自然発生率は雌ラットよりも雄ラットで高く，また，Wistar Han 系ラットは Sprague-Dawley 系ラットよりも甲状腺濾胞細胞腺腫の自然発生率も高い[52,53]。リトレシチニブ投与で甲状腺の濾胞細胞過形成および濾胞腺腫の程度が上昇する正確な機序は不明である。

市販されている JAK または TEC 阻害薬では甲状腺は雄ラットの標的臓器として報告されていないことから[54,55,56]，リトレシチニブによる甲状腺腫瘍の誘発がリトレシチニブの薬理作用に関連している可能性は低いと考えられる。

要約すると，以下の理由により，リトレシチニブを投与された Wistar Han ラットで認められた良性胸腺腫（雌）および甲状腺腺腫（雄）の発現頻度の上昇がリトレシチニブを投与されたヒトに対してリスクをもたらす可能性は極めて低いと考えられる。

- リトレシチニブは遺伝毒性を示さない。
- 雌および雄の Wistar Han ラットは特にそれぞれ胸腺腫および甲状腺腺腫を加齢に伴い自然発症しやすい。
- 雄または雌の Wistar Han ラットではいずれの用量（ヒトに 50 mg を投与したときの非結合型 AUC_{24} の 29 倍までの曝露量）においても，それぞれ胸腺腫または甲状腺腺腫は認められなかった。
- リトレシチニブ（ヒトに 50 mg を投与したときの非結合型 AUC_{24} の 34 倍までの曝露量）を最長 9 ヵ月間投与されたげっ歯類以外の動物種（ビーグル犬）では，胸腺腫またはその他の腫瘍は認められなかった。
- げっ歯類の甲状腺腫瘍のヒトへの外挿性は低いことから[57]，リトレシチニブを投与された雄ラットで認められた良性腫瘍は，臨床的に意味のある曝露量ではヒトの安全性に重大なリスクをもたらさない。

4.9.4. 受胎能，発生および生殖に関する所見

リトレシチニブの投与による，雄の授胎能，胚・胎児発生ならびに出生前および出生後の発生への影響が確認された。

ラットを用いた受胎能および着床までの初期胚発生に関する試験では，雌の受胎能への影響は認められなかった。雄では高用量群（200 mg/kg/日）のみで体重増加抑制および授胎能への影響が認められ，リトレシチニブを 200 mg/kg/日の用量で投与した雄と交配した無処置雌で着床前胚損失率の上昇のみが認められた。精子形成への影響は認められなかった。雄ラットの授胎能および全身毒性に関する NOAEL である 60 mg/kg/日での曝露量比はヒトに 50 mg を投与したときの非結合型 AUC_{24} の 14 倍であり，雌ラットの受胎能および全身毒性に関する NOAEL である 200 mg/kg/日での曝露量比はヒトに 50 mg を投与したときの非結合型 AUC_{24} の 55 倍であった。

本試験では回復性を直接評価しなかったが，剖検所見および臓器重量の変化や，授胎能のその他の評価項目および精子形成への影響がなかったことから，200 mg/kg/日の雄に認められた影響は回復性を示すと予測される。また，ラットおよびイヌにそれぞれ最長 6 ヵ月間および 9 ヵ月

間投与したときに，雌雄の生殖器にリトレシチニブの影響は認められなかった。さらに，ラットの受胎能および着床までの初期胚発生に関する試験では，雄には継続してリトレシチニブを投与したにもかかわらず，2 回の交配期間中に同一個体の雄ラットが必ずしも影響を受けなかったことから，当該所見は長期間の投与により進行せず，回復性を示す可能性が示唆された。

妊娠ラットおよび妊娠ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験では，胚・胎児発生に関する NOAEL はウサギの方がラットよりも低く，その曝露量比はヒトに 50 mg を投与したときの非結合型 AUC_{24} の 12 倍であった。母体に関する NOAEL は胚・胎児発生に関する NOAEL よりも高かった（4.5.2 項）。いずれの動物種でも骨格の奇形および変異ならびに胎児体重の減少が認められた。また，ウサギでは内臓奇形の発現頻度も高かった。これらは，リトレシチニブの毒性試験全体を通じて認められた唯一の骨の所見であった。非妊娠動物を用いた毒性試験（イヌで最長 9 ヵ月間，マウスで最長 6 ヵ月間，ラットで最長 6 ヵ月間の反復投与試験，ラットを用いた 2 年間投与がん原性試験を含む）では，試験開始時にラットが幼若（約 7 週齢，成長板閉鎖前で長骨が成長している時期）であったにもかかわらず，剖検および病理組織学的検査で骨への影響は認められなかった。また，TEC ファミリーキナーゼの BTK の阻害薬である zanubrutinib では，ラットおよびイヌを用いた反復投与毒性試験ならびにラットおよびウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験のいずれにおいても骨に対する影響は認められておらず[58]，BTK の阻害は骨への影響に関与しないことが示唆された。

ラットを用いた出生前および出生後の発生に関する試験では，高用量（ヒトに 50 mg を投与したときの非結合型 AUC_{24} の 41 倍）でのみ，F1 雌雄出生児に出生後の生存率の低下，体重増加抑制ならびに離乳前および離乳後の体重増加量減少，性成熟に対する影響（発育遅延によるものと考えられた），F1 雌の生殖に対する影響（黄体数，着床数および生存胚数の減少）など，毒性変化が認められた。発生毒性に関する NOAEL である 75 mg/kg/日での曝露量比は，ヒトに 50 mg を投与したときの非結合型 AUC_{24} の 14 倍であった。

4.9.5. その他の所見

4.9.5.1. 腎臓

ラットを用いた 6 ヵ月間投与毒性試験で用量依存的かつ可逆的な近位尿細管上皮細胞の硝子滴蓄積が認められた。この変化は腎機能にほとんど影響を及ぼさず，臨床的意味はほとんどないことから，毒性学的意義の乏しい変化と考えた。イヌおよびマウスでは，ラットと同程度以上の曝露量でも腎臓の変化は認められなかった。

硝子滴の組織化学染色の特徴および形態学的特徴は，髄質内では主としてリポフスチン（ヘモグロビンや鉄ではない）であり，皮質内では α2μ-グロブリンに一致した。リポフスチンは正常なラットの近位尿細管上皮細胞の細胞質に認められ，加齢とともに増加する消耗性色素であり，腎機能への影響や臨床的意味はほとんどない[18,59,60,61]。尿細管腔内の円柱，壊死または炎症反応は認められなかった。雄ラットで皮質の近位尿細管上皮に認められた細胞質内硝子滴は，α2μ-グロブリン蓄積の増悪と符合する変化であった[18]。α2μ-グロブリンの蓄積は雄ラットにみられる種特異的な所見であり，ヒトへの外挿性はない[18,59,62,63,64]。

50 mg/kg/日以上の群の雄で尿タンパクの増加が認められ，この変化は高用量群を除くすべての用量群で投与期間中に一過性に生じ，高用量群では休薬期間後に回復傾向が認められたことから，毒性学的意義の乏しい変化と考えられた。

ラットを用いた 2 年間投与がん原性試験では 100 mg/kg/日群の雌雄の腎尿細管上皮細胞に毒性学的意義の乏しいと考えられた色素沈着の発現頻度および程度の上昇が認められたが，このがん原性試験の結果から，硝子滴蓄積はより長期間の投与によっても進行しないことが示された。

4.9.5.2. 肝臓

ラットを用いた 14 日間投与試験および 8 週間投与試験のみで，肝細胞の空胞化および小葉中心性肥大が認められたが，毒性学的意義の乏しい変化と考えられた。

2 年間投与がん原性試験では 30 mg/kg/日以上の雌ラットで非腫瘍性の多核肝細胞数の増加（対照群との比較）が認められた。多核肝細胞数の増加は一般に適応反応であると考えられており，がん原性の可能性を示すものではない[23,24]。多核肝細胞は加齢ラットで自然に出現する可能性があることから，30 mg/kg/日以上の雌でこの所見がより顕著であったことは，背景所見の増悪を示すものであり毒性学的意義の乏しい変化であると判断した[25]。

4.9.5.3. 副腎

ラットおよびイヌを用いた 8 週間投与毒性試験で，一過性かつ用量依存的な副腎の変化が認められた。ラットで副腎重量の減少（雄）および副腎皮質の空胞化の増加が認められ，イヌでは雄の球状帯に副腎皮質細胞の空胞化の発現頻度または程度の上昇が認められた。しかし，副腎への影響は，重要な試験であるラットを用いた 6 ヵ月間投与試験またはイヌを用いた 2 回の 9 ヵ月間投与試験のいずれにおいても，8 週間投与試験で影響が認められた最小用量と同等以上の用量および曝露量で認められなかったことから，一過性の変化と考えられた。JAK または TEC 阻害薬の薬理作用に基づくと，副腎または副腎機能への影響は予測されない。副腎の所見は変性変化，壊死，炎症または電解質の毒性変化を伴わなかった。また，副腎皮質細胞の空胞化はイヌでは一般的な背景所見である[65]。以上のことから，上記の所見は毒性学的意義の乏しい変化と考えられた。

4.9.5.4. 心血管系

In vitro および in vivo 試験の結果により，リトレシチニブがヒトで QTc 延長を誘発する可能性は極めて低いことが示唆される。リトレシチニブの hERG カリウム電流に対する IC_{50} 値はヒトに 50 mg を投与したときの非結合型 C_{max} の 273 倍超であり，イヌを用いた心血管系の安全性薬理試験または反復投与毒性試験のいずれにおいてもリトレシチニブの投与後に QTc 延長は認められなかった。

種々の安全性薬理試験および毒性試験で，比較的わずかで一貫性がなく，T_{max} に関連しない心拍数および血圧の変化が認められた。変化の方向に差異（増加または減少）がみられた理由は不明である。心臓の病理組織学的変化はいずれの毒性試験でも認められなかった。ラットおよびイヌを用いたそれぞれ最長 6 ヵ月間および 9 ヵ月間の反復投与毒性試験で，血栓，塞栓または凝固パラメータの変化は認められなかった。

4.9.5.5. 嘔吐および糞便異常

イヌを用いたリトレシチニブの重要な試験以外の試験ならびに重要な試験で嘔吐および糞便異常（軟便，水様便，粘液便，赤色便）が認められたが，消化管の剖検所見または病理組織学的所見はなく，毒性学的意義の乏しい変化と考えられた。免疫抑制と消化管所見との関連性は明確には示されなかった。

5. 総括及び結論

実施した各種の薬効薬理試験および副次的薬理試験の成績から，リトレシチニブは JAK3 および TEC ファミリーキナーゼに対して高い選択性を有することが示され，JAK3 に依存する IL-2，IL-4，IL-7，IL-9，IL-15 および IL-21 の共通γ鎖受容体のシグナル伝達を阻害する。細胞を用いた検討においてこれらのキナーゼに依存するシグナル伝達や機能を阻害した。リトレシチニブはヒト全血中で IL-15 および IL-21 の共通γ鎖受容体のシグナル伝達を阻害したが，IL-10，IFNα，INFγ，IL-6，IL-27，IL-12，IL-23 などの JAK3 に依存しないサイトカインのシグナル伝達は阻害せず，CD34 陽性前駆細胞でのエリスロポエチン（EPO）のシグナル伝達も，巨核球および血小板におけるトロンボポエチン（TPO）のシグナル伝達および消失も阻害しなかった。リトレシチニブは TEC ファミリーのキナーゼも阻害するため，JAK3 に依存するサイトカインと TEC ファミリーに依存する免疫受容体のシグナル伝達を阻害することにより，AA の病態生理に関与すると考えられる。リトレシチニブは，ATP 結合ポケットの H10 の位置にシステインを有するキナーゼと共有結合することにより不可逆的に阻害し，JAK3 および TEC ファミリーキナーゼに対してほぼ同程度の共有結合活性を示すことが示唆された。リトレシチニブは ATP 結合ポケット内の別の位置にシステインを有するキナーゼには共有結合せず，それらに対する阻害活性も弱かった。

リトレシチニブは，ラットの AIA モデルならびにマウスの化学物質誘発性 IBD モデル，T 細胞移入大腸炎モデルおよび EAE モデルといったげっ歯類の炎症性疾患モデルにおいて，炎症の抑制や疾患マーカーの改善，サイトカイン依存性の STAT リン酸化に対する阻害など in vivo での有効性を示した。また，リトレシチニブはマウスの AA モデルにおいて，全身投与により皮膚の炎症を改善し，発毛を回復させることが報告されている[66]。

リトレシチニブは副次的薬理試験において，Abl キナーゼ，EGFR キナーゼおよび VEGFR2 キナーゼを除く広範な受容体，トランスポーター，イオンチャネルおよび酵素に対する作用を示さなかった。フォローアップとして実施した試験では，これらのキナーゼに対する IC_{50} は 30 µmol/L 超（ヒトに臨床用量である 50 mg を投与したときの非結合型 C_{max} の 27 倍以上に相当）であったことから，臨床で想定される濃度では阻害しないことが示された。

リトレシチニブは GLP 適用下で実施した hERG イオンチャネルに対する影響を評価した試験において，hERG 電流の振幅を 30，100 および 300 µmol/L の濃度でそれぞれ 2.7%，16.5%および 31.0%阻害しており，IC_{10} および IC_{50} はそれぞれ 30 µmol/L 超および 300 µmol/L 超であった。300 µmol/L 超はヒトに臨床用量である 50 mg を投与したときの非結合型 C_{max} の 273 倍以上に相当する。また，心血管系に対する影響を評価した安全性薬理試験および反復投与毒性試験のいずれにおいても，リトレシチニブによる QT の直接的な変化や QTc の延長はみられなかった。

これらの in vitro および in vivo の安全性薬理試験の成績から，リトレシチニブは臨床で想定される濃度では QTc に対する影響を示さないことが示唆された。

In vivo の安全性薬理試験および反復投与毒性試験において，HR と BP に一貫性のない逆方向の変化が認められた。この原因については不明であるが，HR と BP への影響は軽微～軽度であり，いずれの毒性試験においても心臓や循環器系に病理組織学的な変化は認められなかった。

リトレシチニブのヒト循環血中の主代謝物である PF-07034562（M2）は，JAK1，JAK2，JAK3，TYK2 および TEC ファミリーキナーゼに対する阻害能を示さず，リトレシチニブの薬理活性に寄与しないことが示された。また，M2 はラットおよびイヌの血漿中にも認められたことから（3.4.1 項），実施した in vivo の安全性薬理試験ではこの代謝物についても評価されていると考えられる。

マウス，ラットおよびイヌにおける単回投与後のリトレシチニブの血漿中濃度推移から，吸収は速やかでありバイオアベイラビリティは良好であることが示された。ラットおよびイヌを用いた毒性試験では，リトレシチニブの曝露量は用量の増加に伴い増加し，明確な性差または蓄積性は認められなかった。

In vitro 試験の結果から，リトレシチニブは消化管の主要な排出トランスポーターである P-gp および BCRP の基質となることが示されたが，ヒトにおける消化管吸収は極めて良好（90%程度）と考えられたことから，これらの排出トランスポーターによる消化管吸収への影響はごくわずかであると考えられた。このことは，臨床試験において 5 mg～800 mg の範囲で用量で補正した C_{max} はほぼ一定であったこと（2.7.2.2.2.1.1 項）と符合する。これらのことから，P-gp または BCRP の阻害薬を用いた臨床薬物相互作用試験を実施する必要はないと判断した。

リトレシチニブの血漿蛋白結合率は低度から中等度であり，種差がみられた。有色ラットを用いた組織分布試験では，[^{14}C]リトレシチニブを経口投与したとき，放射能は全身に広く分布し，ぶどう膜，腎臓，血液および肺で血漿中よりも高い放射能が認められたが，脳/血漿中の比は 0.05 未満であり，脳への分布がわずかであった。このことはリトレシチニブが P-gp および BCRP の基質となることと符合した。リトレシチニブは眼および有色皮膚のメラニン色素への親和性を示したが，脂溶性アミンや塩基性化合物はメラニンと可逆的に結合するものの，一般的に毒性学的意義は乏しいことが明らかにされている [11]。このことは，有色ラットを用いたリトレシチニブの in vivo 光毒性試験（4.7.1 項）において，眼毒性が認められなかったことからも裏付けられた。

リトレシチニブは HSA と結合することが示されたが，HSA の遊離のシステイン残基（Cys34）との反応性によるものと推察される。循環血中における抗酸化チオールプールは，HSA が最も多く[67]血漿中に 700 µmol/mL 程度存在し，次いでシステイン（30～50 µmol/mL），グルタチオン（5 µmol/mL 程度）の順となっている。[^{14}C]リトレシチニブをヒトに投与した B7981011 試験における終末相の血漿中放射能濃度は 4.678 mBq/mL であり，総血漿容量（3000 mL）と間質液容量（11000 mL）から HSA プールの容量を 14000 mL とすると，HSA と結合した放射能は投与量（290 nCi）の 0.6%程度と推定される。この低い HSA との結合は，リトレシチニブと HSA の反応性について検討した薬理試験（2.1.1.3 項）においてリトレシチニブは最大でも 2%しか結合しなかったことと符合した。リトレシチニブは JAK3 の ATP 結合ドメインの遊離のシステイン残

基（Cys909）に結合するようデザインされており，HSA の Cys34 に結合することも予想されるが，1）他の血漿蛋白質とは有意な結合を示さないこと（3.3.1 項），2）[^{14}C]リトレシチニブをヒト肝細胞と 4 時間インキュベート後の回収率は 98.4%と良好であったこと（2.6.4.5.1.1 項），および 3）ヒトにおけるマスバランス試験で放射能の回収率は 86%と良好であったことから，生体内の蛋白質に対して無差別的に結合する可能性は低いと考えられる。このことは，マウスのアレルギーモデルを用いた免疫毒性試験（4.7.3 項）の結果からリトレシチニブが過敏性反応を引き起こす可能性は低いと考えられたことと符合する。

In vitro および in vivo 代謝試験の結果から，リトレシチニブの主要な消失機序は P450 を介した酸化およびグルタチオン抱合であることが示された。マスバランス試験により求められた寄与率はそれぞれ 47%および 24%であり，in vitro 試験の結果から主たる CYP 分子種である CYP3A4 の f_m は 0.29 と見積もられたが，CYP3A4 の強い阻害薬であるイトラコナゾールと併用した臨床薬物相互作用試験では，併用によるリトレシチニブの曝露量の増加はわずか（C_{max} 比 1.03，AUC_{inf} 比 1.15）であった。

ヒトの血漿中に検出された主要な薬物関連物質は未変化体であり，主代謝物として M2 が同定されたが，薬理試験の結果からこの代謝物はリトレシチニブの薬理作用には寄与しないことが示された（2.1.1.1 項）。リトレシチニブの臨床試験で得られた生体試料中の代謝物を検索したところ，マウス，ラットおよびイヌの代謝物プロファイルとの比較から，ヒト特有の代謝物は認められなかった。反復投与毒性試験，がん原性試験および生殖発生毒性試験に用いられた動物種であるラットにおいて，M2 は安全性評価に十分な曝露量が得られたことから，M2 はリトレシチニブを投与した毒性試験において適切に評価されており，M2 のさらなる毒性試験は不要と考えられた。

リトレシチニブは CYP1A2 および CYP3A に対しては時間依存的阻害を示す可能性が示された。また，リトレシチニブは臨床において OCT1 を阻害する可能性はあるものの，その他の薬物トランスポーターを介した臨床的に意味のある薬物相互作用を引き起こす可能性は低いと考えられた。

リトレシチニブの毒性プロファイルを評価するために，ラットおよびイヌを用いた単回投与毒性試験，ラット（最長 6 ヵ月間）およびイヌ（最長 9 ヵ月間）を用いた反復投与毒性試験，in vitro および in vivo の遺伝毒性試験，Tg rasH2 ヘミ接合体（tg/wt）マウスおよびラットを用いたがん原性試験，ラットを用いた受胎能および着床までの初期胚発生に関する試験，ラットおよびウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験，ラットを用いた出生前および出生後の発生ならびに母体の機能に関する試験を実施した。また，その他の毒性試験として，ラットを用いた光毒性試験，ラットを用いた免疫毒性試験，ラットを用いた不純物評価試験，イヌでみられた軸索ジストロフィーの発現機序に関する探索的 in vitro および in vivo 試験を実施した。

ラットおよびイヌを用いた反復投与毒性試験における投与開始時期はそれぞれ約 7 週齢および 9～12 ヵ月齢であり，ヒトでは 12 歳以上に相当する年齢であった。

特定された標的臓器および重要な所見は，死亡発生（ラットおよびウサギ），中枢神経系および末梢神経系（イヌ），免疫系およびリンパ造血系（ラットおよびイヌ），胸腺および甲状腺（ラット），精子形成への影響を伴わない雄授胎能への影響（ラット），胚・胎児発生への影

響（ラットおよびウサギ），ならびに出生前および出生後の発生への影響（ラット）であった。その他の所見として，軽微かつ一貫性のない心血管系への影響（ラットおよびイヌ），腎臓および肝臓への影響（ラット），副腎への影響（ラットおよびイヌ），ならびに嘔吐および糞便異常（イヌ）であった。

ラットの 6 ヵ月間およびイヌの 9 ヵ月間反復投与毒性試験における NOAEL はそれぞれ 200 mg/kg/日および 10 mg/kg/日（非結合型 AUC_{24} はそれぞれ 53,700 ng•h/mL および 7940 ng•h/mL であり，ヒトに臨床用量である 50 mg を投与したときの非結合型 AUC_{24} のそれぞれ 50 倍および 7.4 倍）であった。

リトレシチニブは in vitro の遺伝毒性試験において変異原性および染色体異常誘発性は示さなかったが，臨床での曝露量を大きく上回る濃度で異数性誘発性を示した。異数性誘発性には閾値があり，閾値以下の濃度では染色体の損傷は誘発しないと考えられる[68,69]。リトレシチニブは in vivo 小核試験ではヒトに 50 mg を投与したときの非結合型 C_{max} および AUC_{24} のそれぞれ 81 倍および 130 倍の曝露量でも小核を誘発しなかった。

リトレシチニブ投与による死亡はラットを用いた 8 週間投与毒性試験および妊娠ウサギを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験で認められた。

中枢神経系および末梢神経系では軸索腫大（ジストロフィー）がイヌを用いた 9 ヵ月間投与毒性試験でのみ認められたが（種特異的な変化と考えられる），休薬によりほぼ回復した。軸索変性，軸索貪食，神経細胞壊死または炎症・グリオーシスは認められなかった。軸索ジストロフィーに関連する所見として聴覚機能（BAEP）への可逆的な影響が認められた。

リトレシチニブの免疫系に対する影響の評価は ICH S8（2006）に準拠して実施した。ラットおよびイヌで免疫系およびリンパ造血系への影響（白血球数の減少ならびに胸腺，脾臓，リンパ節，GALT および骨髄の細胞充実性の低下）が認められた。これらの変化は JAK3/TEC に対するリトレシチニブの薬理活性と符合していた。薬理活性に起因するこれらの変化はイヌを用いた 9 ヵ月投与試験の 20 mg/kg/日以上でみられた過度の免疫抑制（感染症など）を伴うものを除き毒性学的意義の乏しい変化と考えられ，休薬により完全に回復した。JAK3/TEC 阻害との明確な関連はない変化として赤血球パラメータへの影響および赤血球の形態異常が認められた。

リトレシチニブのラットを用いた 104 週間投与がん原性試験において良性胸腺腫および胸腺過形成（雌）ならびに甲状腺濾胞細胞の良性腺腫および過形成（雄）がヒトに 50 mg を投与したときの非結合型 AUC_{24} の 29 倍の曝露量で認められた。Tg rasH2 ヘミ接合体（tg/wt）マウスを用いた 26 週間投与試験ではがん原性は認められず，イヌを用いた 9 ヵ月投与試験でも過形成は認められなかった。

リトレシチニブを投与した雄と交配した未処置の雌で着床前胚損失率の上昇が認められた（ヒトに 50 mg を投与したときの非結合型 AUC_{24} の 55 倍）ことから，雄の授胎能に関する NOAEL は 60 mg/kg/日（ヒトに 50 mg を投与したときの非結合型 AUC_{24} の 14 倍）と考えられた。その他の受胎能および生殖能への影響はみられなかった。雌の全身毒性，受胎能および初期胚発生に関する NOAEL はいずれも 200 mg/kg/日（ヒトに 50 mg を投与したときの非結合型 AUC_{24} の 55 倍）であった。

胎児の発達への影響（ラットおよびウサギにおける胎児体重の減少ならびに骨格奇形および変異，ウサギにおける内臓奇形）がヒトに 50 mg を投与したときの非結合型 AUC_{24} の 49 倍以上の曝露量で認められた。ラットおよびウサギにおける胚・胎児発生に関する NOAEL はそれぞれ 75 mg/kg/日および 25 mg/kg/日（ヒトに 50 mg を投与したときの非結合型 AUC_{24} のそれぞれ 16 倍および 12 倍）であり，母動物に関する NOAEL はいずれの試験においても胚・胎児発生に関する NOAEL より高かった。

生殖発生毒性試験においてラットおよびウサギ胎児で骨格への影響がみられたが，非妊娠動物を用いた試験（ラットの最長 6 ヵ月間およびイヌの最長 9 ヵ月間反復投与毒性試験，マウスの 6 ヵ月間がん原性試験ならびにラットの 2 年間がん原性試験）ではリトレシチニブによる骨への影響は認められなかった。なお，ラットおよびイヌを用いた反復投与毒性試験における投与開始時期はヒトでは 12 歳以上に相当する年齢であった。

リトレシチニブによる F1 への影響（離乳前の生存率低下，体重増加抑制，性成熟への影響および雌の黄体数減少）が評価した最高用量の 175 mg/kg/日（ヒトに 50 mg を投与したときの非結合型 AUC_{24} の 41 倍）でのみ認められた。F0 に対する毒性所見は認められなかった。F1 の発生に関する NOAEL および F0 母動物に関する NOAEL はそれぞれ 75 mg/kg/日および 175 mg/kg/日（ヒトに 50 mg を投与したときの非結合型 AUC_{24} のそれぞれ 14 倍および 41 倍）であった。

リトレシチニブは[^{14}C]標識体を用いたラットの組織分布試験で眼および皮膚のメラニンに対する親和性を示したが，有色ラットを用いた光毒性試験において眼および皮膚に光毒性を示す所見は認められなかった。

リトレシチニブは JAK3 および TEC に対する共有結合型の阻害剤であるが，過敏反応または非特異的毒性反応を誘発する可能性についての複数の検討結果から，リトレシチニブが過敏反応を引き起こす可能性が低いことが示唆された。

以上のように，非臨床薬理，薬物動態および毒性については十分に評価されており，その成績は 12 歳以上の患者へのリトレシチニブ投与の妥当性を裏付けているものと考える。

6. 参考文献

1 Telliez JB, Dowty ME, Wang L, et al. Discovery of a JAK3-selective inhibitor: Functional differentiation of JAK3-selective inhibition over pan-JAK or JAK1-selective inhibition. ACS Chem Biol 2016;11(12):3442-51.

2 Saffran DC, Parolini O, Fitch-Hilgenberg ME, et al. Brief report: a point mutation in the SH2 domain of Bruton's tyrosine kinase in atypical x-linked agammaglobulinemia. NEJM 1994;330(21):1488-91.

3 Harling JD, Deakin AM, Campos S, et al. Discovery of novel irreversible inhibitors of interleukin (IL)-2-inducible tyrosine kinase (ITK) by targeting cysteine 442 in the ATP pocket. J Biol Chem 2013;288(39):28195-206.

4 Dowty ME, Jesson MI, Ghosh S, et al. Preclinical to clinical translation of tofacitinib, a Janus kinase inhibitor, in rheumatoid arthritis. J Pharmacol Exp Ther 2014;348(1):165-73.

5 Ziegler SF, Ramsdell F, Alderson MR. The activation antigen CD69. Stem Cells 1994;12(5):456-65.

6 Keegan AD, Johnston JA, Tortolani PJ, et al. Similarities and differences in signal transduction by interleukin 4 and interleukin 13: Analysis of Janus kinase activation. Proc Natl Acad Sci USA. 1995; 92(17): 7681-5.

7 Telliez, JB. White Paper: Analysis of Human Versus Dog and Human Versus Rat Sequence Homology of the Catalytic Domains of JAK3 and the TEC Kinase Family. Pfizer Inc., 2018.

8 Kaser A, Brandacher G, Steurer W, et al. Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. Blood. 2001;98(9):2720-5.

9 Drachman JG, Griffin JD, Kaushansky K. The c-Mpl ligand (thrombopoietin) stimulates tyrosine phosphorylation of Jak2, Shc, and c-Mpl. J Biol Chem 1995; 270(10):4979-82.

10 LaBranche TP, Jesson MI, Radi ZA, et al. JAK inhibition with tofacitinib suppresses arthritic joint structural damage through decreased RANKL production. Arthritis Rheum 2012;64(11):3531-42.

11 Leblanc B, Jezequel S, Davies T et al. Binding of drugs to eye melanin is not predictive of ocular toxicity. Regul Toxicol Pharmacol 1998;28(2):124-32.

12 In Vitro Drug Interaction Studies. Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-mediated Drug Interactions. In: Guidance for Industry. Silver Spring, MD: Food and Drug Administration; 2020: 46 pages.

13 Guideline on the investigation of drug interactions. In: European Medicines Agency. Committee for Human Medicinal Products (CHMP). CPMP/EWP/560/95/Rev. 1 Corr. 2, 21 June 2012: 59 pages.

14 Zhang N, Shon J, Kim MJ et al. Role of CYP3A in oral contraceptives clearance. Clin Transl Sci 2018; 11:251-60.

15 Leonard WJ, Spolski R. Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. Nat Rev Immunol 2005;5(9):688-98.

16 Ma A, Koka R, Burkett P, et al. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. Annu Rev Immunol 2006;24:657-79.

17 Leonard WJ, Lin JX, O'Shea JJ. The γc family of cytokines: basic biology to therapeutic ramifications. Immunity 2019;50:832-50.

18 Hard GC. Some aids to histological recognition of hyaline droplet nephropathy in ninety-day toxicity studies. Toxicol Pathol 2008;36:1014-7.

19 Stohlawetz PJ, Dzirlo L, Hergovich N, et al. Effects of erythropoietin on platelet reactivity and thrombopoiesis in humans. Blood 2000;95(9):2983-9.

20 Stockham SL, Scott MA. Erythrocytes. In: Stockham SL, Scott MA, editors. Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology. Ames, IA: Iowa State Press;2002:103-4;131-2.

21 Sasaki JC, Allemang A, Bryce SM, et al. Application of the adverse outcome pathway framework to genotoxic modes of action. Environ Mol Mutagen 2020;61(1):114-34.

22 Olaharski AJ, Gonzaludo N, Bitter H, et al. Identification of a kinase profile that predicts chromosome damage induced by small molecule kinase inhibitors. PLoS Comput Biol 2009; 5(7):e1000446.

23 Cattley RC, Popp JA, Vonderfecht SL. Liver, gallbladder and exocrine pancreas. In: Sahota PS, Popp JA, Hardisty JF, Gopinath C, eds. Toxicologic pathology: nonclinical safety assessment. 2nd ed. CRC Press; 2018:451-513.

24 McInnes EF. Wistar and Sprague-Dawley rats. In: McInnes EF, ed. Background lesions in laboratory animals: a color atlas. 1st ed. Saunders Elsevier; 2012:17-36.

25 Thoolen B, Maronpot RR, Harada T, et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system. Toxicol Pathol 2010;38:5S-81S.

26 Carney EW, Kimmel CA. Interpretation of skeletal variations for human risk assessment: delayed ossification and wavy ribs. Birth Defects Res (Pt B) 2007;80:473-96.

27 ICH S8. Immunotoxicity studies for human pharmaceuticals. 15 Sep 2005.

28 McLellan GJ, Cappello R, Mayhew IG, et al. Clinical and pathological observations in English cocker spaniels with primary metabolic vitamin E deficiency and retinal pigment epithelial dystrophy. Vet Rec 2003;153(10):287-92.

29 Yamasaki T, Kawasaki H, Arakawa S, et al. Stress-activated protein kinase MKK7 regulates axon elongation in the developing cerebral cortex. J Neurosci 2011;31(46):16872-83.

30 Jaudon F, Raynaud F, Wehrle R, et al. The RhoGEF DOCK10 is essential for dendritic spine morphogenesis. Mol Biol Cell 2015;26(11):2112-27.

31 ICH Q3A(R2). Impurities in new drug substances. 25 Oct 2006.

32 ICH Q3B(R2). Impurities in new drug products. 02 Jun 2006.

33 Dixit R, Husain R, Mukhtar H, et al. Effect of acrylamide on biogenic amine levels, monoamine oxidase, and cathepsin D activity of rat brain. Environ Res 1981;26(1):168-73.

34 Graham DG, Amarnath V, Valentine WM, et al. Pathogenetic studies of hexane and carbon disulfide neurotoxicity. Crit Rev Toxicol 1995;25(2):91-112.

35 Kaufmann W, Bolon B, Bradley A, et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse central and peripheral nervous systems. Toxicol Pathol 2012;40(4 Suppl):87S-157S.

36 Borras D, Ferrer I, Pumarola M, et al. Age-related changes in the brain of the dog. Vet Pathol 1999;36(3):202-11.

37 Slayter MV, Summers BA, Meade RP, et al. Axonal spheroids in the cochlear nucleus of normal beagle dogs. Vet Pathol 1998;35(2):150-3.

38 Suzuki Y, Suu S. Spheroids (axonal dystrophy) in the central nervous system of the dog. I. Light microscopic observations. Nippon Juigaku Zasshi 1978;40(3):325-34.

39 Youssef SA, Capucchio MT, Rofina JE, et al. Pathology of the aging brain in domestic and laboratory animals, and animal models of human neurodegenerative diseases. Vet Pathol 2016;53(2):327-48.

40 Summers BA, Cummings JF, de Lahunta A, et al. Neuropathology of aging. In: Veterinary Neuropathology. New York:Mosby;1995:49-55.

41 Pardo ID, Otis D, Ritenour HN, et al. Spontaneous axonal dystrophy in the brain and spinal cord in naive beagle dogs. Toxicol Pathol 2020;48(5):694-701.

42 Cantile C, Youssef S. Nervous system. In: Jubb, Kennedy, and Palmer's, Pathology of Domestic Animals. 6th ed. Vol 1. Saunders Elsevier; 2016:257-8.

43 Schmidt RE, Chae HY, Parvin CA, et al. Neuroaxonal dystrophy in aging human sympathetic ganglia. Am J Pathol 1990;136(6):1327-38.

44 Pickles, JO. Chapter 1 - Auditory pathways: anatomy and physiology. Handbook of Clinical Neurology. Elsevier 2015;129:3-25.

45 Otto WC, Brown RD, Gage-White L, et al. Effects of cisplatin and thiosulfate upon auditory brainstem responses of guinea pigs. Hear Res 1988;35(1):79-85.

46 Yamamoto M, Kurata Y, Chiba S. Effects of aminoglycoside antibiotics on the auditory brainstem response and post rotatory nystagmus in rats. Fundamental Appl Toxicol 1992;18(4):499-503.

47 Pickrell JA, Oehme FW, Cash WC, et al. Ototoxicity in dogs and cats. Semin Vet Med Surg (Small Anim) 1993;8(1):42-9.

48 Fujisawa K, Shiraki H. Study of axonal dystrophy. I. Pathology of the neuropil of the gracile and the cuneate nuclei in ageing and old rats: a stereological study. Neuropathol App Neurobiol 1978;4:1-20.

49 Iwata H, Weber K, Gaehle S, et al. Spontaneous thymoma observed in Wistar Han rats. In: 29th Annual Meeting of the Japanese Society of Toxicologic Pathology; 31 Jan - 1 Feb 2013; Ibaraki, Japan. 2013:39.

50 Blankenship B, Eighmy JJ, Hoffmann G, et al. Findings in historical control Harlan RCCHan™: WIST rats from 104-week oral gavage studies. Toxicol Pathol 2016;44(7):947-61.

51 Tomonari Y, Sato J, Kurotaki T, et al. Thymomas and associated hyperplastic lesions in Wistar Hannover rats. Toxicol Pathol 2019;47(2):129-37.

52 Taylor I, Mowat V. Comparison of longevity and common tumor profiles between Sprague Dawley and Han Wistar rats. J Toxicol Pathol 2020;33:189-96.

53 Isobe K, Mukaratirwa S, Petterino C, et al. Historical control background incidence of spontaneous thyroid and parathyroid glands lesions of rats and CD-1 mice used in 104 week carcinogenicity studies. J Toxicol Pathol 2016:201–6.

54 Imbruvica® (ibrutinib). United States Prescribing Information. Pharmacyclics LLC. Apr 2020. Available:

https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2020/205552s030,210563s006lbl PI.pdf.

55 RINVOQ™ (upadacitanib). United States Prescribing Information. Sligo, Ireland: AbbVie Inc; August 2019. Available: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/211675s000lbl.pdf. Accessed: 13 April 2020.

56 Olumiant® (baricitinib). United States Prescribing Information. Indianapolis, IN: Lilly LLC; Revised October 2019. Available: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/207924s001lbl.pdf. Accessed: 13 April 2020.

57 Wu KM, Farrelly JG. Preclinical development of new drugs that enhance thyroid hormone metabolism and clearance: inadequacy of using rats as an animal model for predicting human risks in an IND and NDA. Am J Ther 2006;13(2):141-4.

58 Zhang C, Tian B. Nonclinical Safety Assessment of Zanubrutinib: A novel irreversible BTK inhibitor. Int J Toxicol 2020;39(3):232-40.

59 Radi ZA. Kidney pathophysiology, toxicology, and drug-induced injury in drug development. Int J Toxicol 2019;38(3):215-27.

60 Brunk UT, Terman A. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. Free Radical Biol and Med 2002;33(5):611-9.

61 Kikuqawa K, Beppu M, Kato T, et al. Accumulation of autofluorescent yellow lipofuscin in rat tissues estimated by sodium dodecylsulfate extraction. Mech Ageing Dev 1994;74(1-2):135-48.

62 Montgomery CA, Seely JC. Kidney. In: GA Boorman et al, eds. Pathology of the Fischer rat: reference and atlas. 2nd ed. Academic Press; 1990:127-53.

63 Short BG, Burnett VL, and Swenberg JM. Elevated proliferation of proximal tubule cells and localization of accumulated α2u-globulin in F344 rats during exposure to unleaded gasoline or 2,2,4-trimethylpentane. Toxicol Appl Pharmacol 1989;101(3):414-31.

64 Swenberg JM, Short B, Borghoff S, et al. The comparative pathobiology of α2u-globulin nephropathy. Toxicol Appl Pharmacol 1989;97:35-46.

65 Sato J, Doi T, Wako Y, et al. Histopathology of incidental findings in beagles used in toxicity studies. J Toxicol Pathol 2012;25(1):103-34.

66 Dai Z, Chen J, Chang Y, et al. Selective inhibition of JAK3 signaling is sufficient to reverse alopecia areata. JCI Insight 2021;6(7):1-13.

67 Oettl K, Stauber RE. Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. Br J Pharmacol 2007;151:580-90.

68 Elhajouji A, Van Hummelen P, Kirsch-Volders M. Indications for a threshold of chemically-induced aneuploidy in vitro in human lymphocytes. Environ Mol Mutagen 1995;26(4):292-304.

69 Parry JM, Parry EM, Bourner R, et al. The detection and evaluation of aneugenic chemicals. Mutat Res 1996;353(1-2):11-46.