目次

2.4 非臨床試験の概括評価 3
2.4.1 非臨床試験計画概略 4
2.4.1.1 薬理試験 4
2.4.1.2 薬物動態試験 4
2.4.1.3 毒性試験 4
2.4.2 薬理試験 5
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 5
2.4.2.1.1 ベルモスジルの in vitro ROCK 阻害活性評価 5
2.4.2.1.2 ベルモスジルの in vitro における T 細胞免疫応答の調整作用 5
2.4.2.1.3 ベルモスジルの in vitro 評価系における抗線維化作用 6
2.4.2.1.4 ベルモスジルのマウス cGVHD モデルにおける薬理学的作用 6
2.4.2.1.5 cGVHD 病態と関連する症状を呈するモデルマウスを用いた評価 8
2.4.2.2 副次的薬理試験 8
2.4.2.2.1 ベルモスジルの各種キナーゼ、細胞表面上の受容体及びイオンチャネルに対する作用 8
2.4.2.2.2 ベルモスジルの線維化シグナル伝達経路の阻害作用 8
2.4.2.3 安全性薬理試験 9
2.4.3 薬物動態試験 9
2.4.3.1 分析方法 9
2.4.3.2 吸収 9
2.4.3.3 分布 10
2.4.3.4 代謝 10
2.4.3.5 排泄 11
2.4.3.6 薬物間相互作用 11
2.4.4 毒性試験 11
2.4.4.1 単回投与毒性試験 11
2.4.4.1.1 ラット 12
2.4.4.1.2 イヌ 12
2.4.4.2 反復投与毒性試験 12
2.4.4.2.1 ラット 12
2.4.4.2.2 イヌ 14
2.4.4.3 遺伝毒性試験 16
2.4.4.4 生殖発生試験 16
2.4.4.5 光毒性試験 17
2.4.4.6 不純物の毒性試験 17
2.4.5 総括及び結論 17
2.4.5.1 総括 17
2.4.5.1.1 薬理試験 17
2.4.5.1.2 薬物動態試験 18
2.4.5.1.3 毒性試験 20
2.4.5.2 結論 23
2.4.6 参考文献一覧 23

略号一覧

略号	省略していない用語	備考
AUC	area under the plasma concentration-time curve	血漿中濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0-\infty}$	area under the plasma concentration-time curve from time 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
BCRP	breast cancer resistance protein	乳癌耐性蛋白質
BSEP	bile salt export pump	胆汁酸塩排出ポンプ
cGVHD	chronic graft versus host disease	慢性移植片対宿主病
CD	cluster of differentiation	分化抗原群
CIA	collagen induced arthritis	コラーゲン誘導関節炎
CK	casein kinase	カゼインキナーゼ
C_{max}	maximum observed plasma concentration	最高血漿中濃度
Col1α1	collagen type I alpha chain	I 型コラーゲン α1 鎖
CTGF	connective tissue growth factor	結合組織成長因子
CYP	cytochrome P450	チトクロム P450
IC_{50}	50% inhibition concentration	50%阻害濃度
IFN	interferon	インターフェロン
IL	interleukin	インターロイキン
IRF	interferon regulatory factor	インターフェロン調節因子
LC-MS/MS	liquid chromatography with tandem mass	液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析
MATE	multidrug and toxin extrusion protein	多剤及び毒物排出トランスポーター
mRNA	messenger ribonucleic acid	メッセンジャーRNA
mTOR	mammalian target of rapamycin	ラパマイシン標的タンパク質
OAT	organic anion transporter	有機アニオントランスポーター
OATP	organic anion transporting polypeptide	有機アニオン輸送ポリペプチド
OCT	organic cation transporter	有機カチオントランスポーター
PBPK	physiologically-based pharmacokinetic	生理学的薬物速度論
P-gp	P-glycoprotein	P 糖蛋白質
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
ROCK	Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase	Rho 結合コイルド・コイル領域含有タンパク質キナーゼ
ROR	retinoic acid receptor-related orphan receptor	レチノイン酸受容体関連オーファン受容体
SLE	systemic lupus erythematosus	全身性エリテマトーデス
STAT	signal transducer and activator of transcription	シグナル伝達兼転写活性化因子
t_{max}	time of maximum plasma concentration	最高血漿中濃度到達時間
TGF	transforming growth factor	トランスフォーミング増殖因子
Tfh	T follicular helper	濾胞性ヘルパーT
Th17	T helper17	ヘルパーT17
Treg	regulatory T	制御性 T
UGT	uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase	ウリジン 5'-ジホスホグルクロン酸転移酵素

2.4 非臨床試験の概括評価

ベルモスジルメシル酸塩（2-(3-{4-[(1*H*-インダゾール-5-イル)アミノ]キナゾリン-2-イル}フェノキシ)-*N*-(プロパン-2-イル)アセトアミド一メタンスルホン酸塩）の非臨床試験（薬理、薬物動態及び毒性）の概略を示すと共に、それらに関する概括的な評価を記載した。各試験に関する詳細な方法と結果については、モジュール 2.6 の項に概要文並びに概要表として記載した。各試験の最終報告書はモジュール 4 に添付した。

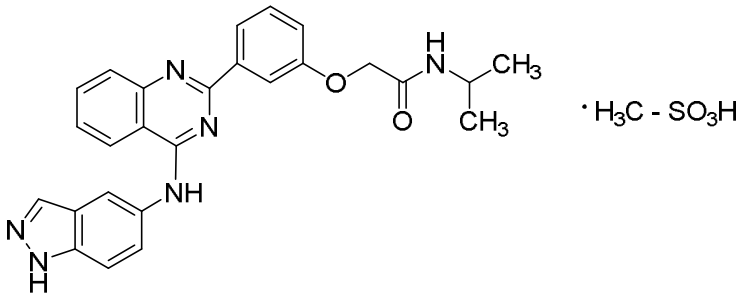


図 2.4.1-1 ベルモスジルメシル酸塩の化学構造式

2.4.1 非臨床試験計画概略

Rho 結合コイルド・コイル領域含有タンパク質キナーゼ（ROCK）2 は、Rho グアノシン三リン酸ホスファターゼシグナル伝達経路の下流に存在するエフェクター分子であり[1)]、T 細胞免疫応答のバランス調整及びエフェクターT 細胞の機能獲得などの免疫機能調整並びに組織線維化シグナル伝達経路の制御に関与する[2), 3)]。

ベルモスジルは ROCK2 に対する選択的かつ競合的阻害薬であり、既存治療で効果不十分な慢性移植片対宿主病（cGVHD）の治療薬として開発された。

ベルモスジルの薬理作用、薬物動態及び毒性について明らかにするために、in vitro 試験及びマウス、ラット、ウサギ並びにイヌを用いて in vivo 試験を実施した。

in vivo 試験の投与経路は臨床投与経路に従い経口投与とした。なお、特記しない限り 2.4 項における用量及び濃度はベルモスジル（遊離塩基）換算値として表記した。

重要な安全性薬理試験及び毒性試験は日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイドライン、並びに医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準拠して実施した。

2.4.1.1 薬理試験

ベルモスジルの cGVHD 治療薬としての特徴を明らかにするための薬理評価を実施した。ベルモスジルの薬理作用について in vitro 試験では、ROCK 阻害活性及び T 細胞免疫応答の調整作用並びに抗線維化作用を検討した。また効力を裏づける試験として、in vivo 試験では、細気管支閉塞及び皮膚症状を伴うマウス cGVHD モデルにおいて、肺機能改善作用、皮膚症状改善作用を検討した。また、cGVHD 症状の一つである肺線維化を発現するブレオマイシン誘発マウス肺線維症モデルにおいて、抗線維化作用を検討した。さらに、cGVHD 病態と関連する自己免疫性炎症反応を発現するマウス全身性エリテマトーデス（SLE）モデル、マウスコラーゲン誘導関節炎（CIA）モデルにおいて、T 細胞免疫応答の調整作用及び自己免疫炎症反応の抑制作用を検討した。

副次的薬理作用については、各種キナーゼ、細胞表面上の受容体及びイオンチャネルに対する作用並びに線維化シグナル伝達経路の阻害作用を検討した。安全性薬理については、中枢神経系評価、心血管系機能評価並びに呼吸器系機能評価を実施した。

2.4.1.2 薬物動態試験

ベルモスジルメシル酸塩の吸収、分布、代謝及び排泄を明らかにするため、[^{14}C]標識体又は非標識体を用い、in vivo 及び in vitro 試験を実施した。吸収についてはマウス、ラット、ウサギ及びイヌにおける血漿中濃度推移を検討した。分布については白色ラット及び有色ラットの組織内分布を検討した。また in vitro での血漿蛋白結合率及び血球移行性を検討した。代謝プロファイルについてはマウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒト肝ミクロソーム並びに肝細胞を用いた in vitro 代謝試験により検討した。さらにヒト試料を用いた in vitro 試験により代謝に関わる CYP の同定及び寄与率を検討した。排泄については、ラットにおける尿中及び糞中への排泄率を評価した。薬物間相互作用の観点から、代謝酵素阻害及び誘導並びに薬物トランスポーターに対する基質性及び阻害作用を検討した。

2.4.1.3 毒性試験

毒性試験として、ラット及びイヌを用いた単回及び反復投与毒性試験、in vitro 及び in vivo 遺伝毒性試験、ラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験を実施した。その他の毒性試験として、in vitro 光毒性試験を実施した。

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

2.4.2.1.1 ベルモスジルの in vitro ROCK 阻害活性評価

ROCK には ROCK1 と ROCK2 の 2 つのアイソフォームが存在する[4]。末梢血管平滑筋細胞由来 ROCK1 および ROCK2 を用いた酵素阻害活性評価において、ベルモスジルの ROCK1 に対する 50%阻害濃度（IC_{50}）は 3 µmol/L 以上であったのに対し、ROCK2 に対する IC_{50} 値は 0.081 µmol/L であったことから、ベルモスジルは ROCK2 選択的な阻害薬であることが示された。また、ROCK2 に対する阻害様式についてラット脳から抽出した ROCK2 を用いて in vitro 試験で検討した結果、ベルモスジルはアデノシン三リン酸競合的阻害薬であることが示された。さらに、ベルモスジル及びその代謝物（*N*-脱アルキル体の M1 及び加水分解体の M2）の末梢血管平滑筋細胞由来 ROCK2 に対する阻害活性を in vitro 試験で検討した結果、ベルモスジル、M1 及び M2 の Ki 値は、それぞれ 40、55 及び 338 nmol/L となり、ROCK2 に対するベルモスジル及び M1 の阻害活性は高く、M2 の阻害活性は低かった。

2.4.2.1.2 ベルモスジルの in vitro における T 細胞免疫応答の調整作用

ベルモスジルの炎症性サイトカイン産生抑制作用を検討するために、健康被験者から採取された末梢血単核球を用いて免疫応答を担うヘルパーT17（Th17）細胞によって産生されるインターロイキン（IL）-21、IL-17 を測定した。その結果、ベルモスジルは IL-21 及び IL-17 産生を有意に抑制した（図 2.4.2-1）[5]。以上の結果から、ベルモスジルは Th17 細胞が産生する炎症性サイトカイン産生を抑制することが示唆された。

また、健康被験者由来の末梢血単核球を用いた in vitro 評価では、免疫応答を担う Th17 細胞、濾胞性ヘルパーT（Tfh）細胞及び免疫抑制を担う制御性 T（Treg）細胞の活性化に関与する転写因子に対するベルモスジルの発現調整作用を検討した。加えて、各 T 細胞（Tfh 細胞、Treg 細胞）に対する分化調整作用を検討した。その結果、ベルモスジルは Th17 細胞の活性化に必要なシグナル伝達兼転写活性化因子（STAT）3 のリン酸化及び Th17 特異的転写因子であるインターフェロン調節因子（IRF）4 並びにレチノイン酸受容体関連オーファン受容体（ROR）γt の発現を抑制し、さらに Tfh 細胞の分化を抑制した（図 2.4.2-2）[5), 6)]。同時に、ベルモスジルは Treg 細胞の活性化に必要な転写因子 STAT5 のリン酸化とそれに続く Treg 細胞分化を亢進し（図 2.4.2-3）、T 細胞増殖を抑制する Treg 細胞の免疫抑制機能を増強した[5]。

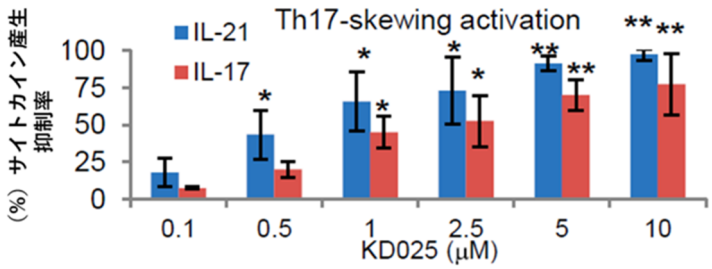


図 2.4.2-1 ベルモスジルの Th17 細胞における IL-21、IL-17 産生に対する作用

健康被験者由来の CD4 陽性 T 細胞に対し、ベルモスジルメシル酸塩、抗 CD3/28 抗体（5 µg/mL）、IL-1β（50 ng/mL）及び TGF-β（5 ng/mL）を反応させ、Th17 細胞への分化を誘導する条件下で培養後、ELISA 法により培養上清中の各種サイトカイン（IL-21, IL-17）産生量を測定した。* P < 0.05, ** P < 0.01, vs 媒体処理群（two-tailed Student's t-test）
KD025 = ベルモスジルメシル酸塩

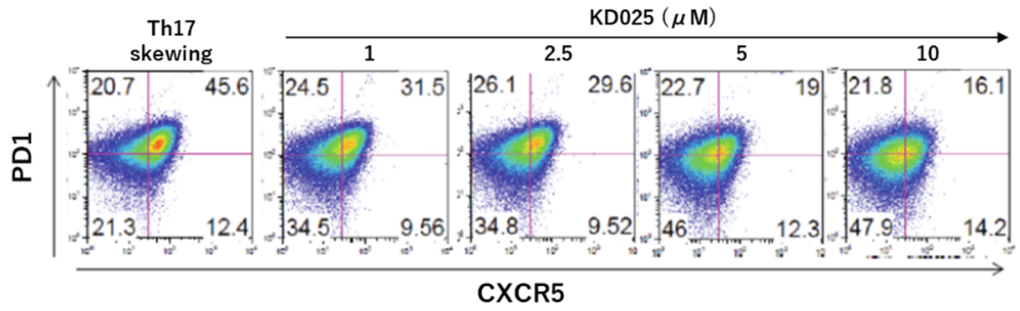


図 2.4.2-2 Tfh 細胞に対するベルモスジルの分化抑制作用

健康被験者由来の CD4 陽性 T 細胞に対し、ベルモスジルメシル酸塩を処理し、IL-21（0、5 又は 25 ng/mL）のみを反応させる条件（IL-21）、抗 CD3/28 抗体（5 μg/mL）、IL-1β（50 ng/mL）及び TGF-β（5 ng/mL）を反応させる条件（Th17）又は両培養条件を組み合わせた条件（Th17+IL-21）で 120 時間培養し、Th17 細胞及び Tfh 細胞への分化を誘導した。Tfh 細胞マーカーとして蛍光標識された抗 CD4 抗体、抗プログラム細胞死タンパク質 1（PD1）抗体、抗 CXC ケモカイン受容体（CXCR）5 抗体を染色し、フローサイトメトリーにより PD1 と CXCR5 が共陽性の CD4 陽性 T 細胞割合を測定した。独立した 3 試験のうちのフローサイトメトリー計測の代表例を示した。
KD025 = ベルモスジルメシル酸塩

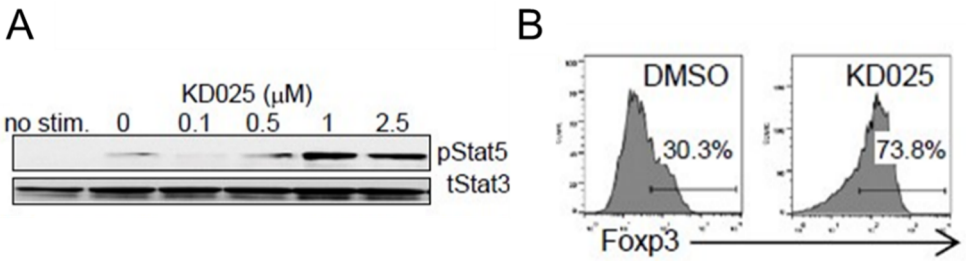


図 2.4.2-3 ベルモスジルの Treg 細胞活性化に必要な転写因子の発現亢進作用と Treg 細胞分化亢進作用

A; 健康被験者由来の CD4 陽性 T 細胞に対し、ベルモスジルメシル酸塩（0～2.5 μmol/L）、抗 CD3/28 抗体（5 μg/mL）、IL-1β（50 ng/mL）及び TGF-β（5 ng/mL）を反応させ、Th17 細胞及び Treg 細胞への分化を誘導する条件下で培養後、ウエスタンブロッティングにより細胞溶解液中のリン酸化 STAT5（pStat5）及び総 STAT3（tStat3）を検出した。
B; フローサイトメトリーにより Treg 細胞の分化や機能発現に必要なフォークヘッドボックス P3（Foxp3）転写因子を発現する Treg 割合を算出した。独立した 3 試験のうちのフローサイトメトリー計測のヒストグラムの代表例を示した。DMSO = ジメチルスルホキシド
KD025 = ベルモスジルメシル酸塩

2.4.2.1.3 ベルモスジルの in vitro 評価系における抗線維化作用

LL-24 ヒト肺線維芽細胞を用いたベルモスジルの抗線維化作用評価において、ベルモスジルは組織線維化に関与する線維性細胞外基質の主要構成成分である I 型コラーゲン α1 鎖（Col1α1）のメッセンジャーRNA （mRNA）発現及び Col1α1 の前駆体であるプロコラーゲン 1α の分泌を抑制した。さらに、ベルモスジルは組織線維化シグナル伝達経路を活性化させる結合組織成長因子（CTGF）の mRNA 発現を抑制した。ベルモスジルのプロコラーゲン 1α の分泌抑制作用、CTGF mRNA の発現抑制作用は、抗線維化薬であるニンテダニブやピルフェニドンよりも強力又は同等であった。

2.4.2.1.4 ベルモスジルのマウス cGVHD モデルにおける薬理学的作用

ベルモスジルの効力を裏づけることを目的として実施したマウス cGVHD モデルを用いた試験系と cGVHD において期待される薬理学的作用について以下の表にまとめた（表 2.4.2-1）。

表 2.4.2-1 各試験系と cGVHD において期待される薬理学的作用

試験系	薬理学的作用
細気管支閉塞を伴う マウス cGVHD モデル	肺機能改善作用 抗線維化作用 免疫応答調整作用
マウス強皮症様 cGVHD モデル	皮膚症状改善作用

骨髄移植により作製した細気管支閉塞を伴うマウス cGVHD モデルに対し、cGVHD 症状を発現する移植後 28 日目よりベルモスジルメシル酸塩を腹腔内投与し、移植後 56 日目に肺機能（抵抗性、弾性及びコンプライアンス）を測定した結果、ベルモスジル投与により肺機能低下の抑制が認められ、この効果はベルモスジルの投与用量依存的であった（図 2.4.2-4）[7]。また、肺組織における線維性コラーゲン及び抗体沈着の抑制作用を病理組織学的に評価したところ、ベルモスジル投与により肺のコラーゲン及び抗体沈着が減少した[7]。さらに、ベルモスジルは cGVHD の病態悪化に関与する B 細胞応答の指標である胚中心反応と免疫応答に関与する Tfh 細胞の分化を抑制した[7]。

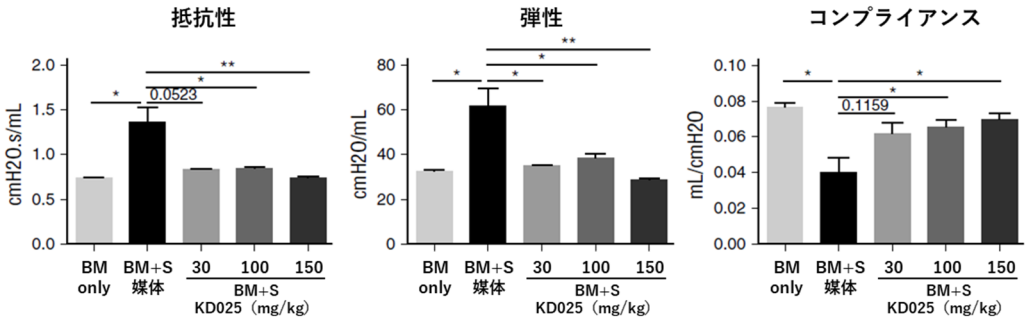


図 2.4.2-4 ベルモスジルのマウス cGVHD モデルにおける肺機能改善作用

B10.BR マウス（8 例/群）に移植 3 及び 2 日前にシクロホスファミド（120 mg/kg）を腹腔内投与及び放射線照射（8.5 Gy）を実施後、尾静脈より C57BL/6 の骨髄細胞（1×10^7 個）を単独又は脾細胞（1×10^6 個）と共に移植することにより細気管支閉塞を伴うマウス cGVHD モデルを作製した。cGVHD 症状を発現する移植後 28 日目より、媒体対照（0.4% メチルセルロース）又はベルモスジルメシル酸塩（30、100 又は 150 mg/kg/日）を腹腔内投与し、移植 56 日目に麻酔下でプレチスモグラフィーを用いて肺機能（抵抗性、弾性及びコンプライアンス）を測定した。
各群 8 例（独立した 4 試験を統合して解析），平均値±SEM, * P < 0.05, ** P < 0.01, vs BM + 媒体投与群（1-way analysis of variance），BM = 骨髄細胞移植, S = 脾細胞移植, KD025 = ベルモスジルメシル酸塩

骨髄移植により作製したマウス強皮症様 cGVHD モデルに対し、cGVHD 症状を発現する移植後 19 日目からベルモスジルメシル酸塩を腹腔内投与し、皮膚病態の進行を評価したところ、ベルモスジル投与により皮膚 GVHD 症状が改善した（図 2.4.2-5）[7]。

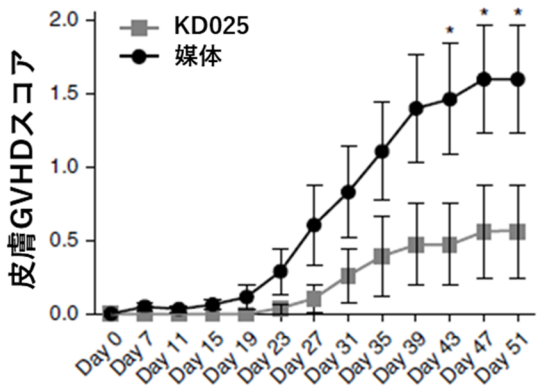


図 2.4.2-5 ベルモスジルのマウス強皮症様 cGVHD モデルにおける皮膚症状改善作用

BALB/c（H2d）マウス（8 例/群）に放射線照射（7.75 Gy）を実施後、尾静脈より B10.D2（H2d）マウスの骨髄細胞（1×10^7 個）を単独又は T 細胞を共に移植することにより、マウス強皮症様 cGVHD モデルを作製した。cGVHD 症状を発現する移植後 19 日目から 47 日目まで、媒体対照（0.4% メチルセルロース）又はベルモスジルメシル酸塩（150 mg/kg/日）を腹腔内投与し、マウスの脱毛面積に応じた皮膚潰瘍に基づいて算出された皮膚 GVHD スコアを経時的に算出した。
各群 8 例（独立した 2 試験を統合して解析），平均値±SEM, * $P < 0.05$ vs 媒体投与群（1-way analysis of variance）, KD025 = ベルモスジルメシル酸塩

2.4.2.1.5 cGVHD 病態と関連する症状を呈するモデルマウスを用いた評価

肺線維化や自己免疫性炎症反応などの cGVHD 病態と関連する症状を呈するマウス肺線維症モデル及びマウス SLE モデル並びにマウス CIA モデルにおいて、ベルモスジルの抗線維化作用及び臨床所見の改善作用並びに T 細胞免疫応答の調整作用を検討した。

ブレオマイシン誘発マウス肺線維症モデルに対し、ベルモスジルメシル酸塩を 14 日間経口投与した。その後、摘出した肺組織を用いて、肺線維化を病理組織学的に評価したところ、ベルモスジルは肺線維化を抑制した。

腎炎を生じるマウス SLE モデル MRL/MpJ-*Fas*^{lpr}/J に対し、ベルモスジルメシル酸塩を経口投与すると、自己免疫性腎傷害の指標であるタンパク尿の減少及び腎臓組織の病態進行の抑制並びに SLE 病態を反映する血漿中抗二本鎖 DNA 抗体濃度が減少した。また、関節炎を生じるマウス CIA モデルに対し、ベルモスジルメシル酸塩を腹腔内投与すると指や関節の腫脹、四肢の硬直などの関節炎症状が抑制された [5), 6)]。これらのマウス病態モデルにおいては、免疫応答を担う Th17 細胞の活性化に必要な転写因子 IRF4、RORγt 及びリン酸化 STAT3 量の減少と免疫抑制を担う Treg 細胞の活性化に必要なリン酸化 STAT5 量の増加などが認められ、ベルモスジルは T 細胞免疫応答を調整することによって、臨床所見としてみられる自己免疫性炎症反応を抑制することが示唆された [5), 6)]。

2.4.2.2 副次的薬理試験

2.4.2.2.1 ベルモスジルの各種キナーゼ、細胞表面上の受容体及びイオンチャネルに対する作用

in vitro キナーゼアッセイ及び放射性標識リガンド結合アッセイにより、ROCK2 以外の各種キナーゼ、細胞表面上の受容体及びイオンチャネルに対するベルモスジルのオフターゲット作用を評価した結果、カゼインキナーゼ（CK）2、アデノシン A_{2A} 受容体及びアデノシン A_3 受容体に対する結合親和性がみられ、その IC_{50} 値はそれぞれ 0.1、0.66 及び 0.13 µmol/L であった。CK2 の機能的影響は不明であり、アデノシン A_3 受容体の機能に対する影響は認められなかった（$IC_{50} > 10$ µmol/L）。ベルモスジルはアデノシン A_{2A} 受容体に対してアンタゴニスト活性を示し、その IC_{50} 値は 0.35 µmol/L であった。アデノシン A_{2A} 受容体は、大脳基底核のようなドパミンが豊富な領域にある神経細胞（γ-アミノ酪酸（GABA）を伝達物質とする中型の有棘細胞）に主に発現し、ドパミン作動性シグナルや運動機能調節に関与しているが [8)]、ベルモスジルの中枢移行性は非常に低く、自発運動量の増加等の当該受容体に関連すると考えられる影響はいずれの in vivo 試験においてもみられていないことから、アデノシン A_{2A} 受容体に対するオフターゲット作用が臨床上問題となる可能性は低いと考えられた。

2.4.2.2.2 ベルモスジルの線維化シグナル伝達経路の阻害作用

WI-38 ヒト肺線維芽細胞及び HT-1080 ヒト結合組織線維肉腫細胞株において、ベルモスジルはコラーゲン産生に関与するラパマイシン標的タンパク質（mTOR）シグナル伝達経路のエフェクターキナーゼであるリボソームタンパク質 S6 キナーゼの活性化を阻害した。また、NIH3T3 マウス線維芽

細胞の増殖を抑制した。以上の結果から、ベルモスジルは筋線維芽細胞のコラーゲン産生などに関与する mTOR シグナル伝達経路及び線維芽細胞の増殖を阻害し、cGVHD の病態において問題となる組織線維化を抑制することが示唆された。

2.4.2.3 安全性薬理試験

ラットを用いた中枢神経系への影響評価試験（0、50、175 及び 350 mg/kg）にてベルモスジルメシル酸塩を単回経口投与した結果、350 mg/kg 群の雄で自発活動量減少、同群雌で体温低下が一過性にみられた。これらの変化は一過性かつ軽度な変化であり、臨床上の懸念が生じる可能性は低いと考えられた。

心血管系に対する影響として、ベルモスジル及びその代謝物 M1 は human ether-à-go-go-related gene（hERG）チャネル電流の阻害作用を示し、その IC_{50} 値はそれぞれ 0.59 µmol/L（272 ng/mL）及び 1.46 µmol/L（616 ng/mL）であった。この濃度は、ヒトにベルモスジル 200 mg を 1 日 1 回投与したとき（臨床用量）のベルモスジルの最高血漿中非結合型濃度の約 11 倍であった。M1 については、ベルモスジルより阻害作用が弱く臨床では微量【2.7.2.3.1】であることから、影響する可能性は低いと考えられた。また、イヌを用いたテレメトリー試験（0、25、75 及び 150 mg/kg）にてベルモスジルメシル酸塩を単回経口投与した結果、QTc 間隔を含めて心電図に異常はみられなかった。さらに、イヌを用いた 4 週間反復経口投与毒性試験（0、25、75 及び 200/125 mg/kg/日）においても心電図異常はみられなかった。これら試験の最高用量におけるベルモスジル及び M1 の C_{max} は 2019～7330 ng/mL 及び 417～1590 ng/mL であり、臨床用量における C_{max} のそれぞれ 0.8～3.2 倍及び 7.9～30 倍であった。加えて、QT/QTc 間隔に及ぼす影響について評価した臨床試験【2.7.2.2.2.2.9】においてもベルモスジルの QTc 延長作用はみられなかった。これらのことから、ベルモスジルの QTc 延長リスクは低いと考えられた。その他の心血管系への影響として、150 mg/kg 群の雌で収縮期血圧、拡張期血圧及び平均動脈圧のわずかな低下がみられたが、軽度な変化であり、臨床上の懸念が生じる可能性は低いと考えられた。

ラットを用いた呼吸器系への影響評価試験（0、50、175 及び 350 mg/kg）にてベルモスジルメシル酸塩を単回経口投与した結果、初回試験では 175 mg/kg 以上の群で分時換気量の低下及び 350 mg/kg 群の雄で呼吸数及び一回換気量の低下がみられた。一方で、初回試験の再現性を確認するため同用量で実施した確認試験では、最高用量の 350 mg/kg までベルモスジルの影響は認められなかった。両試験で同程度の曝露量がみられており、呼吸器系への影響に再現性は認められなかったことから、ベルモスジルは呼吸器系に対する薬理作用を有さないと考えられた。

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 分析方法

生体試料中のベルモスジル、M1 及び M2 の測定は、高速液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析（LC-MS/MS）により行った。また[^{14}C]標識体を用いた試験における放射能濃度の測定は液体シンチレーションカウンターを用いて行った。

2.4.3.2 吸収

ベルモスジルの吸収を明らかにするため、マウス及びラットへのベルモスジルメシル酸塩の静脈内並びに経口単回投与試験を実施した。またラット、ウサギ及びイヌを用いて実施した反復投与毒性試験においてもベルモスジルの吸収を評価した。

マウス及びラットにベルモスジルメシル酸塩を単回経口投与したところ、ベルモスジルは速やかに吸収された（t_{max} は 100 mg/kg の経口投与で 30～120 分）。C_{max} 及び $AUC_{0-\infty}$については用量比を上回って増加する傾向が認められた。また投与量の増加に伴ってバイオアベイラビリティが高くなる傾向が認められた（15～85%）。

2.4.3.3 分布

ベルモスジルの分布を明らかにするため、ラットにおける組織分布、in vitro での血漿蛋白結合及び血球移行性を評価した。

[^{14}C]ベルモスジルメシル酸塩を雌雄白色ラット及び有色ラットに単回経口投与し組織における放射能濃度を測定したところ、白色ラットにおいては経口投与後の放射能は全身に速やかに分布し、投与 48 時間後には多くの組織で放射能濃度は定量下限付近あるいは検出限界未満となった。一方、有色ラットにおいては雌雄ともにメラニン含有組織（ぶどう膜及び有色皮膚）において高い放射能濃度が認められ、ベルモスジルあるいはその代謝物はメラニン親和性があることが示された。メラニン含有組織においても時間の経過とともに放射能濃度の低下が認められた。

ベルモスジルの in vitro 血漿蛋白結合率は濃度に依存せず、マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒトのすべての動物種において 99%以上であった。ベルモスジルのヒト血漿中における主な結合蛋白はヒト血清アルブミンと考えられた。M2 の in vitro 血漿蛋白結合率は濃度に依存せず、マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒトは 96%～99%以上であった。また、マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒトにおける血球移行率は、マウス、ラット、イヌ及びヒトでは低かったが、ウサギでは血球への移行が認められた。

2.4.3.4 代謝

ベルモスジルの代謝を明らかにするため、in vitro 代謝試験並びに代謝物探索、代謝酵素推定、ベルモスジル代謝における CYP 分子種の寄与率の推定及びラットにおける代謝物探索を実施した。

マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒト肝ミクロソーム並びに肝細胞を用いた in vitro 代謝試験において、いずれの動物種においてもベルモスジルの代謝は中程度～高い肝クリアランスを示した。またマウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒト肝ミクロソーム並びに肝細胞を用いベルモスジルの代謝物探索を行ったところ、合計 44 種類の代謝物が検出された。また主要な代謝物として M1（*N*-脱アルキル体）及び M2（加水分解体）がいずれの動物種でも認められた。ヒト試料中においては M2 とグルクロン酸抱合体の 2 種類の代謝物が 5%以上のピーク面積比で検出され、ヒト特異的な代謝物は検出されなかった。

ベルモスジルの主な初発代謝は *N*-脱アルキル体（M1）、加水分解体（M2）、酸化体、脱水素体、*O*-脱アルキル体及びグルクロン酸抱合体と推定された。ベルモスジルの代謝には種差が認められ、ラットでは、*O*-脱アルキル化及びそれに続く抱合体（グルクロン酸及び硫酸）生成、M1 生成、M2 生成及び脱水素体生成が代謝経路として推定された。ヒトでは、M2 生成、モノヒドロキシ体生成、ジヒドロキシ体生成、*O*-脱アルキル生成に続く *O*-脱アルキル硫酸抱合体生成及びグルクロン酸抱合体生成が代謝経路として推定された。

ヒト CYP 発現系ミクロソーム及びヒト肝ミクロソームを用いた in vitro での検討から、ベルモスジルの代謝には主に CYP3A4 が関与し、寄与は小さいものの CYP2C8 及び CYP2D6 の関与が示された。また、ヒト UGT 発現系ミクロソームを用いた検討により、ベルモスジルの代謝には UGT1A9 の関与が示された。

2.4.3.5 排泄

ラットに[^{14}C]ベルモスジルメシル酸塩を単回経口投与し、ベルモスジルの排泄経路を検討した。その結果、雌雄ともに投与量全体の約 90%の放射能が糞中に排泄され、尿中へはほとんど排泄されなかった。また排泄率に明らかな性差は認められなかった。投与 120 時間後における放射能の体内残存率は投与量全体の 0.5%未満であり、呼気中への排泄も認められなかった。これらの結果よりラットにおけるベルモスジル及びその代謝物の主排泄経路は糞中排泄であると考えられた。

2.4.3.6 薬物間相互作用

ヒト肝ミクロソームを用いてベルモスジルによる CYP 分子種（CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4/5）に対する阻害作用を検討した結果、CYP2C8 及び CYP2C9 に対する可逆的阻害が認められた（IC_{50} 値はそれぞれ 0.45 及び 0.74 μmol/L）。また CYP1A2、CYP2C19 及び CYP3A4/5 に対する代謝依存的な阻害も認められた。M2 による CYP 分子種に対する阻害作用についても検討した結果、CYP1A2、CYP2C8、CYP2C9 及び CYP3A4/5（テストステロン）に対する可逆的阻害（IC_{50} 値はそれぞれ 4.9、1.1、26 及び 86 μmol/L）並びに CYP3A4/5 に対する代謝依存的な阻害作用が認められた。

ヒト UGT 発現系ミクロソームを用いてベルモスジルによる UGT 分子種（UGT1A1、UGT1A3、UGT1A4、UGT1A6、UGT1A9、UGT2B7、UGT2B15 及び UGT2B17）に対する阻害作用を検討したところ、UGT1A1 及び UGT1A9 に対する阻害が認められた（IC_{50} 値はそれぞれ 0.0609 及び 0.861 μmol/L）。また M2 の UGT 分子種に対する阻害作用についても検討したところ UGT1A1 に対する阻害作用が認められた（IC_{50} 値は 0.629 μmol/L）。

ヒト凍結肝細胞を用いてベルモスジルの CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4 に対する誘導作用を検討したところ、ベルモスジルはこれらの CYP 分子種の mRNA レベルを 2 倍以上増加させた。しかしその増加は陽性対照であるオメプラゾール、フェノバルビタール及びリファンピシンの増加の 20%未満であったことから、臨床的意義は低いと考えられた。一方、M2 はいずれの CYP 分子種の mRNA レベルに対しても誘導作用を示さなかった。

ベルモスジル及び M2 の各種トランスポーター（P-gp、BCRP、BSEP、OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT2、MATE1 及び MATE2-K）に対する基質性を検討したところ、ベルモスジルは P-gp、M2 は BSEP、OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3 及び MATE2-K の基質であることが示された。さらにベルモスジル及び M2 の各種トランスポーターに対する阻害作用を検討したところ、ベルモスジルは P-gp、BCRP、OATP1B1、MATE1 及び MATE2-K に対して阻害作用を示した（IC_{50} 値はそれぞれ 0.198、0.0310、0.235、0.397 及び 0.224 μmol/L）。また M2 は BCRP、BSEP、OATP1B1、OATP1B3、OAT3、MATE1 及び MATE2-K に対する阻害作用を示した（IC_{50} 値はそれぞれ 7.73、48.2、0.390、1.55、15.9、70.8 及び 13.2 μmol/L）。

2.4.4 毒性試験

2.4.4.1 単回投与毒性試験

ベルモスジルを単回投与したときの毒性をラット及びイヌを用いて評価した。

2.4.4.1.1 ラット

ラットを用いた単回経口投与毒性試験（100、200、300、400 及び 600 mg/kg）では、600 mg/kg 群で 3 例の死亡がみられ、雄 1 例が投与 2 日目、雌各 1 例が投与 1 日目及び 5 日目に死亡した。死亡例では、喘ぎ呼吸、呼吸困難及び／又は脱水がみられ、剖検では胃の膨満（ガス又は被験物質様物質）、腸管の膨満（ガス）及び／又は副腎の肥大がみられた。同群の生存例においても同様の一般状態変化及び剖検所見がみられ、加えて肺の赤色斑がみられた。以上、ラットに単回経口投与したときの最小致死量は 600 mg/kg であった。

2.4.4.1.2 イヌ

イヌを用いた単回経口投与毒性試験（50、200、400、300 及び 250 mg/kg の順に 2～6 日間隔で漸増）では、400 mg/kg まで死亡はみられなかった。200 mg/kg 以上の雌、250 mg/kg 以上の雄で嘔吐がみられ、250 mg/kg 以上では水様性便もみられた。以上、イヌに単回経口投与したとき、250 mg/kg 以上で水様性便がみられたことから最大耐量は 200 mg/kg と考えられた。

2.4.4.2 反復投与毒性試験

ベルモスジルの反復投与による毒性を、ラットを用いた 4 週間及び 13／26 週間反復経口投与毒性試験、イヌを用いた 1 週間、4 週間、13 週間及び 13／39 週間反復経口投与毒性試験により評価した。重要な反復投与毒性試験の無毒性量及びヒトにベルモスジル 200 mg を 1 日 1 回投与したときの曝露量（臨床曝露量）との比を表 2.4.4-1 に示す。

表 2.4.4-1 重要な反復投与毒性試験の無毒性量及び臨床有効用量における曝露量比

試験種（試験番号）	動物種	用量 (mg/kg/日)	性	無毒性量 (mg/kg/日)	C_{max}[a] (ng/mL)	$AUC_{0\text{-}24h}$[a] (ng·hr/mL)	曝露量比[b]	
							C_{max}	$AUC_{0\text{-}24h}$
4 週間経口反復（1173-028）	ラット	0、50、150、375	雄	150	5750	68500	2.4	3.0
			雌	150	9640	98000	4.0	4.3
13／26 週間経口反復（029502）	ラット	0、50、125、275	雄	275	10600	112000	4.4	4.9
			雌	125	14900	167000	6.2	7.4
4 週間経口反復（1173-028）	イヌ	0、25、75、200/125	雌雄	75	5790	41200	2.4	1.8
13 週間経口反復（029281）	イヌ	0、35、70、125	雄	35	4910	25200	2.1	1.1
			雌	35	4620	23300	1.9	1.0
13／39 週間経口反復（8289750）	イヌ	0、5、20、40	雄	40	2060	15500	0.9	0.7
			雌	40	3220	22500	1.3	1.0

a 投与期間終了時の曝露量

b 曝露量比は、cGVHD 患者にベルモスジル 200 mg を 1 日 1 回投与したときの PPK 解析（NPS3067-PKPD001）により得られた定常状態の曝露量（C_{max}：2390 ng/mL、$AUC_{0\text{-}24h}$：22700 ng·hr/mL）に基づき算出した。

2.4.4.2.1 ラット

ラットを用いた 4 週間反復投与毒性試験（0、50、150 及び 375 mg/kg/日）では、375 mg/kg/日群の雌 1 例が投与 11 日に死亡し、他の雌 1 例が投与 21 日に瀕死となり安楽死させた。これらの動物では、自発運動低下、円背位、体温低下（触診）、皮膚の蒼白及び／又は削痩がみられ、摂餌量及び体重の減少がみられた。病理組織学的検査において、胸腺で中等度のリンパ球枯渇及び／又は骨髄で極軽度の細胞数減少がみられたが、死亡及び瀕死の原因は不明であった。

生存例では、375 mg/kg/日群の雌で活動性低下、円背位、皮膚の蒼白及び腹部膨満がみられた。375 mg/kg/日群では投与後 1 週間までに著しい摂餌量減少及び体重減少がみられ、その後も、摂餌量減少

と体重増加抑制が雌で継続し、雄では摂餌量減少が投与後 3 週間までみられた。休薬期間中に摂餌量の増加がみられ、雌では体重の回復傾向が認められた。

血液学的検査において、150 mg/kg/日群の雌及び 375 mg/kg/日群で、赤血球数の減少、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の低下、網状赤血球の数及び／又は比率の上昇がみられ、375 mg/kg/日群の雌では血小板数の増加もみられた。150 mg/kg/日群の雌及び 375 mg/kg/日群では、病理組織学的検査にて骨髄に赤芽球性又は混在性の過形成が軽度にみられた。このように赤血球数の低下等がみられたが、骨髄及び末梢血に造血反応が認められ、休薬後の回復又は回復傾向もみられたことから毒性学的意義は低いと考えられた。

血液生化学検査において、150 mg/kg/日群の雌及び 375 mg/kg/日群で、GGT、ALP、トリグリセリド、総コレステロール及び／又は HDL コレステロールの増加がみられた。肝臓では、50 mg/kg/日の雌及び 150 mg/kg/日以上の群で肝重量（絶対及び相対）の増加がみられ、同群の病理組織学的検査において、びまん性の肝細胞肥大が極軽度から重度に認められた。これらは肝代謝酵素誘導に起因する変化と考えられ、細胞傷害性変化は認められなかったことから毒性学的意義は低いと考えられた。これらの変化は休薬後の回復又は回復傾向が認められた。また、375 mg/kg/日群では、BUN 及びクレアチニンの軽度な増加、尿検査では、50 mg/kg/日以上の群で尿量の増加及び比重の低下がみられたが、腎臓に病理組織学的変化は認められなかったことから毒性学的意義は低いと考えられた。

病理検査において、375 mg/kg/日群の雌で卵巣、子宮及び下垂体の重量（絶対及び／又は相対）の減少がみられ、同群雄では精巣に軽度から中等度の精細管変性／萎縮及び精巣上体に軽度の精子減少／精子細胞残渣がみられた。さらに、375 mg/kg/日群の雌では胸腺に重量（絶対及び相対）の減少を伴う極軽度から軽度のリンパ球枯渇及び軽度のアポトーシスがみられた。これらの変化は摂餌量の減少、体重減少及び体重増加抑制並びにこれに伴うストレスによる二次的な影響と考えられた。

以上、ラットに 4 週間反復経口投与したとき、375 mg/kg/日群で死亡及び体重減少がみられたことから、無毒性量は 150 mg/kg/日と考えられた。

ラットを用いた 13／26 週間反復投与毒性試験（0、50、125 及び 275 mg/kg/日）では、275 mg/kg/日群の雌 2 例が死亡した。1 例は投与 85 日目に死亡し、一般状態に異常はみられず、剖検において肝臓の腫大、胸腺の赤色化、卵巣の赤褐色化がみられた。病理組織学的検査では、肝臓の小葉中心及び中間帯に中等度の肝細胞肥大、胸腺に極軽度のうっ血及び軽度の皮質リンパ球枯渇、副腎皮質に軽度の肥大、腎臓皮質外帯の近位尿細管に極軽度の褐色色素沈着が認められたが死因は不明であった。他の 1 例は投与 159 日に死亡し、死亡日に自発運動減少及び皮膚の蒼白がみられ、剖検では胸水がみられた。病理組織学的検査では、肝臓の小葉中心及び中間帯に軽度の肝細胞肥大、腎臓皮質外帯の近位尿細管に中等度の上皮細胞壊死及び極軽度の褐色色素沈着、脾臓に軽度のマントル層リンパ球増加、副腎皮質に軽度の肥大、胸腺皮質に軽度のリンパ球枯渇、甲状腺に中等度のコロイド減少及び軽度の濾胞上皮細胞肥大、子宮の発育不全がみられた。死因は腎臓皮質外帯の近位尿細管にみられた上皮細胞壊死の可能性が考えられた。

生存例では、すべての投与群において摂餌量の減少及び体重増加抑制が投与初期からみられたが、投与期間中に体重増加量の回復がみられていることから毒性学的意義は低いと考えられた。

血液学的検査では、投与 13 週及び 26 週に 50 mg/kg/日群の雌及び 125 mg/kg/日以上の群において、赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値が低下し、125 mg/kg/日群の雌及び 275 mg/kg/日群では MCV 及び MCH が上昇した。125 mg/kg/日以上の群では網状赤血球数の増加もみられた。これらの変化はいずれも休薬による回復又は回復傾向が認められ、適応の範囲内の変化であり、毒性学的意義は低いと考えられた。

血液生化学検査では、投与 13 週及び 26 週にすべての投与群で総タンパク質及び／又はアルブミンが増加し、125 mg/kg/日以上の群の雄及び／又は雌でコレステロールが増加した。さらに、275 mg/kg/日群の雄及び／又は雌では ALP、GGT 及び総ビリルビンの上昇がみられ、投与 26 週の 275 mg/kg/日群の雌ではトリグリセリドの上昇もみられた。肝臓では、投与 13 週及び 26 週にすべての投与群で重量（絶対及び／又は相対）が増加し、投与 13 週の 50 mg/kg/日群の雌及び 125 mg/kg/日以上の群並びに投与 26 週のすべての投与群で小葉中心及び中間帯にびまん性の肝細胞肥大が極軽度から中等度にみられた。これらの変化は肝薬物代謝酵素誘導に伴う変化であり、肝臓に傷害性の変化はないことから毒性学的意義は低いと考えられた。

病理検査では、腎臓に投与 13 週の 125 mg/kg/日以上の群で極軽度から中等度の細胞内タンパク性硝子滴の増加、275 mg/kg/日群の雌で尿細管に極軽度の好塩基性変化及び近位尿細管上皮に極軽度の褐色色素沈着がみられた。投与 26 週ではすべての投与群の雄で極軽度から中等度の細胞内タンパク性硝子滴の増加、125 mg/kg/日以上の群で尿細管に極軽度から軽度の好塩基性変化及び近位尿細管上皮に極軽度の褐色色素沈着がみられ、275 mg/kg/日群で尿細管に極軽度から軽度の拡張がみられた。いずれの投与期間も 125 mg/kg/日群の雄又は雌並びに 275 mg/kg/日群で腎重量（絶対及び／又は相対）の増加がみられた。休薬群では投与 13 週後の休薬時で腎重量の増加がみられたが、その他は回復性が認められた。腎臓の変化は再生性又は適応性の変化と考えられた。

生殖器に関して、雌では投与 13 週及び 26 週に 125 mg/kg/日以上の群で子宮重量（絶対及び／又は相対）の減少、275 mg/kg/日群で子宮／子宮頸部の発育不全が軽度から中等度にみられ、同群の投与 13 週では卵巣の卵胞発達低下が軽度から中等度にみられた。投与 26 週後の休薬群で卵巣重量（相対）の増加がみられ、その他は回復又は回復傾向が認められた。雄では投与 13 週に 125 mg/kg/日以上の群、投与 26 週に 50 mg/kg/日以上の群で精巣に極軽度から軽度の精細管精細胞変性がみられ、いずれの投与期間も 275 mg/kg/日群で精巣上体に極軽度の輸出管精子変性がみられた。雄性生殖器の組織学的変化は休薬後もみられ、投与 13 週後の休薬群で精巣上体重量（絶対）の減少、投与 26 週後の休薬群では精巣の小型化が 1 例みられた。これらの生殖器における変化は、体重増加抑制による二次的な影響と考えられた。

脾臓では、投与 13 週及び 26 週に 50 mg/kg/日群の雌及び／又は 125 mg/kg/日以上の群で脾臓重量（絶対及び／又は相対）の増加並びに軽度のマントル層リンパ球の増加がみられた。投与 26 週後の休薬群も軽度のマントル層リンパ球増加はみられたが、その他は回復が認められた。傷害性の変化がみられないことから毒性学的意義は低いと考えられた。

以上、ラットに 26 週間反復経口投与したとき、275 mg/kg/日群の雌で死亡がみられたことから、無毒性量は雌で 125 mg/kg/日、雄で 275 mg/kg/日であると考えられた。

2.4.4.2.2 イヌ

イヌを用いた 4 週間反復投与毒性試験（0、25、75 及び 200/125 mg/kg/日）では、いずれの群においても死亡はみられなかった。200/125 mg/kg/日群では、200 mg/kg/日の投与により摂餌量及び体重の減少がみられ、投与 8 日目以降に補食等の処置を施したが、体重減少が継続したことから投与 15 日から 4 日間休薬し、投与 19 日から 125 mg/kg/日に減量して投与を再開した。減量後も摂餌量及び体重の減少は継続した。これらの変化は休薬により回復又は回復傾向が認められた。また、200/125 mg/kg/日群では、嘔吐、削痩、流涙及び皮膚の蒼白がみられ、雌 1 例では皮膚の弾性消失、自発運動低下及び虚脱もみられた。

血液学的検査において、200/125 mg/kg/日群で赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の軽度な低下、MCV、血小板数及び網状赤血球の数及び比率の軽度な増加がみられた。骨髄塗沫標

本観察では、赤芽球の増加がみられた。これらの変化は休薬による回復性が認められ、適応の範囲内の変化であり、毒性学的意義は低いと考えられた。

血液生化学検査において、200/125 mg/kg/日群の雌雄各 1 例で ALP、GGT 及び／又は総ビリルビンの増加がみられた。同群では、肝重量（絶対及び／又は相対）の増加がみられ、極軽度から軽度の胆汁うっ滞、肝細胞の空胞化及びクッパー細胞の色素沈着がみられ、雄 1 例で極軽度の胆管過形成もみられた。これらの変化は休薬による回復又は回復傾向が認められた。

その他、200/125 mg/kg/日群では剖検で胸腺の小型化がみられ病理組織学的検査において軽度から中等度のリンパ球枯渇がみられた。これらの肉眼及び組織学的変化は休薬による回復が認められた。

以上、イヌに 4 週間反復経口投与したとき、200/125 mg/kg/日群で全身状態の悪化を伴う体重減少及び胆汁うっ滞がみられたことから無毒性量は 75 mg/kg/日と考えられた。

イヌを用いた 13 週間反復投与毒性試験（0、35、70 及び 125 mg/kg/日）では、125 mg/kg/日群の雄 2 例が投与 21 日に瀕死となり安楽死させた。瀕死例では、削痩、餌又は被験物質様物質を含む嘔吐及び糞量の減少がみられ、摂餌量及び体重の減少が継続的にみられた。安楽死時点の体重は投与開始前日の 28.2 又は 35.8%まで低下していた。剖検では、黒色内容物が胃、盲腸又は空腸にみられ、空腸には暗赤色又は褐色斑がみられた。病理組織学的検査において、空腸の粘膜固有層に極軽度のうっ血、骨髄に中等度の細胞数減少、腎臓に極軽度の梗塞、腎髄質及び腎乳頭の尿細管に細胞性円柱及び近位尿細管上皮細胞の壊死、肝臓に小葉中心性の胆汁うっ滞が軽度にみられ、腸間膜リンパ節及び脾臓の動脈周囲リンパ鞘にリンパ球枯渇が軽度から中等度にみられた。なお、胸腺については採材した組織中に胸腺組織が確認されず評価できなかった。同群の生存例でも一般状態、摂餌量及び体重に瀕死例と同様の変化がみられたが、休薬により回復がみられ、病理組織学的検査では、胸腺の皮質及び脾臓の動脈周囲リンパ鞘に軽度から中等度のリンパ球枯渇、肝臓に極軽度から軽度の小葉中心性の胆汁うっ滞がみられた。

70 mg/kg/日群において、摂餌量減少が投与 3～4 週間まで、体重減少が投与 2 週間までみられ、その後体重増加抑制がみられた。体重への影響は雄の方が顕著に認められた。休薬期間中、摂餌量の増加がみられ、体重の回復又は回復傾向が認められた。

血液学的検査において、35 mg/kg/日群の雌及び 70 mg/kg/日群で、赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の低下及び血小板数の増加がみられた。これらの変化は休薬により回復性が認められ、軽度であることから毒性学的意義は低いと考えられた。

病理検査において、70 mg/kg/日群で肝臓に極軽度から軽度の小葉中心性の胆汁うっ滞及び単核細胞浸潤、中等度の小葉中心性の肝細胞萎縮、肝重量（絶対及び相対）の増加がみられた。また、70 mg/kg/日群で腎臓の近位尿細管上皮に極軽度から軽度の褐色色素沈着がみられたが、傷害性の変化がみられないことから毒性学的意義は低いと考えられた。これらの肝臓及び腎臓の変化は休薬による回復又は回復傾向が認められた。

その他に、35 mg/kg/日以上の群で、精巣上体に軽度の精子変性、精巣に極軽度から軽度の精細胞変性及び極軽度の多核性精子細胞胸腺皮質及び脾臓動脈周囲リンパ鞘に軽度から重度のリンパ球枯渇がみられ、70 mg/kg/日群では胸腺及び脾臓の重量低下（絶対及び／又は相対）もみられた。これらの変化は休薬による回復性が認められ、摂餌量減少、体重減少及び体重増加抑制並びにそのストレスによる二次的な影響と考えられた。

以上、イヌに 13 週間反復経口投与したとき、70 mg/kg/日以上で顕著な体重減少及び肝臓に胆汁うっ滞等がみられたことから、無毒性量は 35 mg/kg/日と考えられた。

イヌを用いた 13／39 週間反復投与毒性試験（0、5、20 及び 40 mg/kg/日）では、いずれの群においても死亡はみられなかった。20 mg/kg/日以上の群で嘔吐、流涎過多及び／又は餌及び黄色物質を含む嘔吐物が散発的にみられ、40 mg/kg/日群では摂餌量の減少傾向及び体重増加抑制がみられた。これらは軽度な影響で全身状態の悪化はみられなかったことから毒性学的意義は低いと考えられた。

血液生化学検査において、20 mg/kg/日群の雌及び 40 mg/kg/日群で散発的な ALT の増加が投与 13 週及び 39 週にみられ、同群の投与 13 週時点のみ、肝臓に極軽度から中等度の単核球浸潤及び極軽度から軽度の肝細胞変性／壊死がみられたが、投与 39 週及び両期間の回復群では肝臓に病理組織学的変化はみられなかった。これらの変化は、投与期間中の消失及び休薬後の回復性が認められたことから毒性学的意義は低いと考えられた。

以上、イヌに 39 週間反復経口投与したときの無毒性量は 40 mg/kg/日と考えられた。

2.4.4.3 遺伝毒性試験

細菌を用いた復帰突然変異試験、ヒト末梢血リンパ球を用いた in vitro 染色体異常試験及びラットを用いた in vivo 骨髄小核試験において、ベルモスジルは遺伝毒性を示さなかった。

2.4.4.4 生殖発生試験

ベルモスジルの生殖に対する影響を、ラットを用いた授胎能及び初期胚発生に関する試験、ラット及びウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験にて評価した。重要な生殖発生毒性試験の無毒性量及び臨床用量における曝露量との比を表 2.4.4-2 に示す。

表 2.4.4-2 重要な生殖発生毒性試験の無毒性量及び臨床有効用量における曝露量比

試験種（試験番号）	動物種	用量 (mg/kg/日)	性	無毒性量 (mg/kg/日)	C_{max}[a] (ng/mL)	$AUC_{0\text{-}24h}$[a] (ng·hr/mL)	曝露量比[b] C_{max}	曝露量比[b] $AUC_{0\text{-}24h}$
受胎能及び初期胚発生（2420-008）	ラット	0、50、150、275	雄	親動物：50	2480	21600	1.0	1.0
				受胎能：150	10100	70100	4.2	3.1
				胚発生：150	10100	70100	4.2	3.1
			雌	親動物：50	3200	26200	1.3	1.2
				受胎能：275	14900	209000	6.2	9.2
				胚発生：150	9860	99500	4.1	4.4
胚・胎児発生（2420-006）	ラット	0、15、50、150	雌	母動物：15	1320	11900	0.6	0.5
				胚胎児：50	4360	33300	1.8	1.5
胚・胎児発生（2420-007）	ウサギ	0、50、125、225	雌	母動物：50	437	1590	0.2	0.07
				胚胎児：50	437	1590	0.2	0.07

a 投与期間終了時の曝露量

b 曝露量比は、cGVHD 患者にベルモスジル 200 mg を 1 日 1 回投与したときの PPK 解析（NPS3067-PKPD001）により得られた定常状態の曝露量（C_{max}：2390 ng/mL、$AUC_{0\text{-}24h}$：22700 ng·hr/mL）に基づき算出した。

ラットを用いた受胎能及び初期胚発生に関する試験（0、50、150 及び 275 mg/kg/日）において、275 mg/kg/日を投与した雄で授胎能の低下、精子異常（運動能低下、精子数／濃度の減少、形態異常精子数の増加）及び雄性生殖器の変化（精巣及び精巣上体の重量低下を伴う小型化、精巣の萎縮、精巣上体内腔の細胞残屑）がみられた。授胎能の低下及び関連する精子並びに生殖器の変化は休薬による回復性が認められた。275 mg/kg/日まで雌の受胎能に影響はみられず、ラット受胎能に対する無毒性量は雄で 150 mg/kg/日、雌で 275 mg/kg/日と考えられた。

ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験（0、15、50 及び 150 mg/kg/日）において、50 及び 150 mg/kg/日群において母動物の摂餌量減少及び体重増加抑制がみられ、150 mg/kg/日群では胎児体重の低値が

みられた。ラットの母動物に対する無毒性量は 15 mg/kg/日、ラット胚・胎児発生に対する無毒性量は 50 mg/kg/日と考えられた。

ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験（0、50、125 及び 225 mg/kg/日）では、225 mg/kg/日群の 1 例で死亡、125 及び 225 mg/kg/日群の各 1 例で流産がみられた。母動物では、125 mg/kg/日以上の群で摂餌量減少及び体重減少がみられ、225 mg/kg/日群の 2 例で全胚吸収がみられた。また、125 mg/kg/日以上の群で着床後胚損失率の上昇、生存胎児数の減少、生存同腹仔数の減少、225 mg/kg/日群では平均胎児体重の低値及び催奇形性（尾の欠損、肋骨の分岐、癒合又は形態異常、胸骨分節の癒合並びに神経弓の癒合、配列異常及び形態異常）も認められたことから、ウサギの母動物及び胚・胎児発生に対する無毒性量はいずれも 50 mg/kg/日と考えられた。

2.4.4.5 光毒性試験

3T3 細胞を用いた in vitro 光毒性試験において陽性の結果が得られたが、臨床試験においてベルモスジルの光毒性を示唆する症候は報告されていない。

2.4.4.6 不純物の毒性試験

規格管理される原薬の不純物に関しては ICH Q3A ガイドラインに従い安全性確認の閾値以下で管理し【2.3.S.4.5】、原薬及び製剤中の潜在的な変異原性不純物については ICH M7 ガイドラインに従いハザード評価し、適切な管理措置を講じている（【2.3.S.3.2.2】、【2.3.P.5.5】）。

2.4.5 総括及び結論

2.4.5.1 総括

2.4.5.1.1 薬理試験

in vitro ROCK 阻害活性試験から、ベルモスジルは ROCK2 への選択性が高く、競合的阻害作用を有することが示された。オフターゲットとしてベルモスジルは CK2、アデノシン A_{2A} 受容体及びアデノシン A_3 受容体に対して結合親和性を示したが、CK2 の機能的影響は不明であり、アデノシン A_3 受容体の機能に対する影響は認められなかった。アデノシン A_{2A} 受容体に対してはアンタゴニスト活性を示した。アデノシン A_{2A} 受容体は、大脳基底核のようなドパミンが豊富な領域にある神経細胞に主に発現し、ドパミン作動性シグナルや運動機能調節に関与しているが、ベルモスジルの中枢移行性は非常に低く、自発運動量の増加等の当該受容体に関連すると考えられる影響はいずれの in vivo 試験においてもみられていないことから、アデノシン A_{2A} 受容体に対するオフターゲット作用が臨床上問題となる可能性は低いと考えられた。健康被験者由来の末梢血単核球を用いた in vitro 試験において、ベルモスジルは cGVHD の病態形成に関与するナイーブ T 細胞の Th17 細胞及び Tfh 細胞への分化とそれに続く炎症性サイトカイン分泌を抑制すると同時に、免疫抑制を担う Treg 細胞への分化を亢進することにより T 細胞免疫応答の調整作用を示した。またヒト肺線維芽細胞を用いた in vitro 試験において、ベルモスジルは線維性細胞外基質の主要構成成分であるコラーゲンの異常産生及び線維化促進シグナル伝達を阻害し、抗線維化作用を示し、その効果は抗線維化薬であるニンテダニブやピルフェニドンよりも強力又は同等であった。

細気管支閉塞を伴うマウス cGVHD モデルを用いた検討では、ベルモスジル投与により cGVHD の病態悪化に関与する胚中心反応と Tfh 細胞分化の抑制に伴い、肺機能の改善や肺線維化が抑制された。また、マウス強皮症様 cGVHD モデルを用いた検討では、ベルモスジル投与により皮膚 GVHD 症状が改善した。

cGVHD 病態と関連する症状を呈するブレオマイシン誘発マウス肺線維症モデルを用いた検討では、ベルモスジル投与により肺線維化が抑制された。さらに、自己免疫性炎症反応を生じるマウス SLE モデルやマウス CIA モデルにおいて、ベルモスジルは免疫応答を担う Th17 細胞の活性化に必要な転写因子 IRF4、RORγt 及びリン酸化 STAT3 の発現抑制と免疫抑制を担う Treg 細胞の活性化に必要な転写因子 STAT5 のリン酸化の亢進に伴い、臨床所見としてみられる自己免疫性炎症反応を抑制することが示唆された。また、ベルモスジルは総リンパ球数を維持しながら免疫抑制に働く Treg 細胞分化を誘導することで免疫抑制作用を発揮することから、骨髄抑制のリスクが低い可能性が考えられた。

以上の結果から、ベルモスジルは ROCK2 を選択的に阻害することにより、「Th17 細胞への分化及び Th17 細胞が産生する炎症性サイトカインの分泌」の抑制、「Tfh 細胞への分化及び Tfh 細胞を介した胚中心反応」の抑制と「Treg 細胞への分化及び Treg 細胞機能」の亢進を同時に制御する T 細胞免疫応答の調整作用を示し、さらに cGVHD で問題となる組織線維化に対しても抗線維化作用を示すことで cGVHD 治療効果を発揮すると考えられた。

安全性薬理試験として、中枢神経系、心血管系及び呼吸系に対するベルモスジルの影響を評価した。

中枢神経系に対する影響評価において、ラットに 350 mg/kg の用量までベルモスジルメシル酸塩を単回経口投与した結果、350 mg/kg 群の雄で自発活動量の低下、同群の雌で体温低下がいずれも一過性にみられた。これらの変化は一過性かつ軽度な変化であり臨床上問題となる可能性は低いと考えられた。

心血管系に対する影響評価において、ベルモスジル及び M1 は hERG チャネル電流の阻害作用を示し、その IC_{50} 値はそれぞれ 0.6 μmol/L（272 ng/mL）及び 1.5 μmol/L（616 ng/mL）であった。この濃度は、臨床用量におけるベルモスジルの最高血漿中非結合型濃度 26 ng/mL と比較して約 11 倍であった。また、イヌを用いたテレメトリー試験の最高用量 150 mg/kg まで QTc 間隔を含めた心電図パラメータに異常はみられなかった。さらに、イヌを用いた 4 週間反復投与毒性試験の中で実施された心電図検査においても、最高用量 200/125 mg/kg/日まで心電図パラメータに異常はみられなかった。これら試験の最高用量におけるベルモスジル及び M1 の C_{max} は臨床用量における C_{max} のそれぞれ 0.8～3.2 倍及び 7.9～30 倍であった。加えて、QT/QTc 間隔に及ぼす影響について評価した臨床試験【2.7.2.2.2.2.9】においても QTc 延長作用は認められなかった。これらのことから、ベルモスジルの QTc 延長リスクは低いと考えられた。その他の心血管系に対する作用として、イヌを用いたテレメトリー試験において、150 mg/kg 群の雌で収縮期血圧、拡張期血圧及び平均動脈圧のわずかな低下がみられたが、軽度な変化であり臨床上の懸念が生じる可能性は低いと考えられた。

呼吸系への影響を評価するため、ラットにベルモスジルメシル酸塩を 50、175 及び 350 mg/kg を単回経口投与した結果、初回試験では 175 mg/kg 以上の群で分時換気量の低下及び 350 mg/kg 群の雄で呼吸数及び一回換気量の低下がみられた。一方で、初回試験の再現性を確認するため同用量で実施した確認試験では、最高用量の 350 mg/kg までベルモスジルの影響は認められなかった。両試験で同程度の曝露量がみられており、呼吸系への影響に再現性は認められなかったことから、ベルモスジルは呼吸系に対する薬理作用を有さないと考えられた。

2.4.5.1.2 薬物動態試験

マウス及びラットにベルモスジルメシル酸塩を単回経口投与したとき、ベルモスジルは速やかに吸収された（t_{max} は 100 mg/kg の経口投与で 30～120 分）。C_{max} 及び $AUC_{0-\infty}$については用量比を上回って増加する傾向が認められ、バイオアベイラビリティについては投与量の増加に伴って高くなる傾向が認められた（15～85%）。ラット及びイヌにベルモスジルメシル酸塩を反復経口投与したところ、ラットにおいてベルモスジルの累積は雄に比べ雌の方が高い傾向が見られた一方、イヌではこのよう

な累積の性差は認められず、雌雄共に累積率は 2 倍以内であった。これはベルモスジルの代謝に性差があることが原因と考えられた。

[^{14}C]ベルモスジルメシル酸塩を雌雄白色ラット及び有色ラットに単回経口投与し組織中放射能濃度を測定したところ、白色ラットにおいては経口投与 48 時間後には多くの組織で放射能濃度は定量下限付近あるいは検出限界未満となった。一方、有色ラットにおいては雌雄ともにメラニン含有組織（ぶどう膜及び有色皮膚）において高い放射能濃度が認められたものの時間の経過とともに消失した。ベルモスジルの血漿蛋白結合率は濃度に依存せず、マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒトのすべての動物種において 99%以上であった。またベルモスジルは主にヒト血清アルブミンに結合していることが示唆された。M2 の in vitro 血漿蛋白結合率は濃度に依存せず、マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒトは 96%～99%以上であった。マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒト血液を用いてベルモスジルの血球移行性を評価したところ、ウサギは血球への移行が認められたが、それ以外の動物種では血球移行性は低かった。

マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒト肝ミクロソーム並びに肝細胞を用いた in vitro 代謝試験においてベルモスジルの代謝プロファイルを検討したところ、合計で 44 種類の代謝物が認められ、主要な代謝物として *N*-脱アルキル体の M1 及び *N*-脱アルキルに続くアミド結合の加水分解体の M2 がいずれの動物種でも認められた。ヒト特異的な代謝物は検出されなかった。ベルモスジルの主な初発代謝は M1、M2、酸化体、脱水素体、*O*-脱アルキル体及びグルクロン酸抱合体と推定された。ベルモスジルの代謝には種差が認められ、ラットでは、*O*-脱アルキル化及びそれに続く抱合体（グルクロン酸及び硫酸）、M1、M2 及び脱水素体の生成が代謝経路として推定された。ヒトでは、M2、モノヒドロキシ体、ジヒドロキシ体、*O*-脱アルキルに続く *O*-脱アルキル硫酸抱合体及びグルクロン酸抱合体の生成が代謝経路として推定された。

ヒト CYP 発現系ミクロソーム及びヒト肝ミクロソームを用いた in vitro での検討から、ベルモスジルの代謝には主に CYP3A4 が関与し、寄与は小さいものの CYP2C8 及び CYP2D6 の関与が示された。また、ヒト UGT 発現系ミクロソームを用いた検討により、ベルモスジルの代謝には UGT1A9 が、M2 の代謝には UGT1A1 の関与が示された。

ラットに[^{14}C]ベルモスジルメシル酸塩を単回経口投与し尿中及び糞中への排泄率を評価したところ、雌雄ともに投与量全体の約 90%の放射能が糞中に排泄され、尿中への排泄率は 1%未満であったことから、ラットにおけるベルモスジル及びその代謝物の主排泄経路は糞中排泄であると考えられた。

ベルモスジルのヒト CYP 分子種（CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4/5）に対する阻害作用を検討したところ、CYP2C8 及び CYP2C9 に対する可逆的阻害が認められた。また CYP1A2、CYP2C19 及び CYP3A4/5 に対する代謝依存的な阻害も認められた。ベルモスジルのヒト UGT 分子種（UGT1A1、UGT1A3、UGT1A4、UGT1A6、UGT1A9、UGT2B7、UGT2B15 及び UGT2B17）に対する阻害作用についても検討したところ、UGT1A1 及び UGT1A9 に対する IC_{50} 値が 1 μmol/L 未満であった。ベルモスジルの CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4 に対する誘導作用を検討したところ、ベルモスジルはこれらの CYP 分子種の mRNA レベルを 2 倍以上増加させた。しかしこの増加は陽性対照の増加の 20%未満であったことから臨床的意義は低いと考えられた。さらにベルモスジルの各種トランスポーター（P-gp、BCRP、BSEP、OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT2、MATE1 及び MATE2-K）に対する基質性について検討したところ、ベルモスジルは P-gp の基質であることが示された。またベルモスジルのこれらのトランスポーターに対する阻害作用についても検討したところ、P-gp、BCRP、OATP1B1、MATE1 及び MATE2-K に対する阻害作用が認められた。

臨床において薬物相互作用の影響が懸念される薬物代謝酵素及びトランスポーターについては2.7.2 にて R 値を算出した。またそれぞれの基質及び阻害剤とベルモスジルを併用した際の影響を、PBPK モデルを用いて検討した。CYP3A4 阻害剤であるフルコナゾール、エリスロマイシン及び CYP3A4 誘導剤のエファビレンツがベルモスジルの PK に及ぼす影響についてシミュレーションした結果、フルコナゾールの併用によりベルモスジルの C_{max} 及び AUC はそれぞれ 1.09 及び 1.22 倍、エリスロマイシンを併用した場合は 1.10 及び 1.25 倍になると計算された。またエファビレンツを併用した場合のベルモスジルの C_{max} 及び AUC はそれぞれ 0.81 及び 0.65 倍になると計算された【2.7.2.3.4】。次に CYP1A2、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19 及び CYP3A4 の典型的基質であるカフェイン、レパグリニド、S-ワーファリン、オメプラゾール及びミダゾラムをベルモスジル（200 mg QD）と併用したときの各典型基質の PK をシミュレーションしたところ、各基質薬物の C_{max} は単独投与時と比較して、それぞれ、1.08、1.04、1.00、1.08 及び 1.32 倍、AUC はそれぞれ 1.58、1.06、1.00、1.11 及び 1.64 倍の上昇であった【2.7.2.3.6.1】。さらに P-gp、BCRP、OATP1B1 及び MATE1/MATEs の典型的基質であるダビガトラン、スルファサラジン、プラバスタチン及びメトホルミンをベルモスジルと併用したときの各典型基質の PK をシミュレーションした結果、ベルモスジル併用により各典型基質の C_{max} 及び AUC はぞれぞれ最大 1.64 及び 1.60 倍と計算された【2.7.2.3.6.3】。

2.4.5.1.3 毒性試験

ラット及びイヌを用いた単回投与毒性試験の結果、ラットの最小致死量は 600 mg/kg であった。イヌでは最高用量の 400 mg/kg まで死亡はみられなかったが、250 mg/kg 以上で水様性軟便がみられことから、最大耐量は 200 mg/kg であると考えられた。

ラット及びイヌを用いた反復経口投与毒性試験の結果、摂餌量及び体重、造血系、肝臓、腎臓、免疫系、生殖器が標的となる可能性が考えられた。

ラット及びイヌで、摂餌量減少並びに体重減少及び／又は体重増加抑制が用量依存的にみられた。ラットでは、4 週試験の 375 mg/kg/日群で投与初期に著しい摂餌量減少及び体重減少がみられ、26 週試験では、すべての投与群で投与初期から摂餌量減少及び体重増加抑制がみられたが、投与期間中に体重増加量の回復又は回復傾向がみられた。イヌでは、4 週及び 13 週試験の 125 mg/kg/日以上の群で投与継続が困難な摂餌量及び体重の減少がみられた。13 週試験の 70 mg/kg/日群では、摂餌量減少が投与 3～4 週間まで、体重減少が投与 2 週間までみられ、その後投与期間を通じて体重増加抑制がみられた。休薬時に摂餌量が増加し、体重の回復又は回復傾向を示した。ラットでの著しい摂餌量減少及び体重減少、イヌでの摂餌量減少並びに体重減少及び／又は体重増加抑制がみられた用量における $AUC_{0\text{-}24h}$ は、臨床曝露量と比較してラットで約 9.6～16 倍、イヌで約 2.0～2.2 倍であった。

造血系に関連し、ラット及びイヌで、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の低下が用量依存的にみられ、網状赤血球数が増加した。ラット 4 週間試験では骨髄に赤芽球性又は混在性の過形成がみられ、イヌ 4 週間試験では骨髄塗沫標本観察において赤芽球（好塩基性赤芽球、多染性赤芽球、正染性赤芽球）の数及び割合が増加した。このように、赤血球数の低下等がみられたが、骨髄及び末梢血に造血反応が認められ、また、いずれも休薬による回復性が認められた。造血反応を伴う赤血球数等の低下は、ラットでは 125 mg/kg/日以上、イヌでは 200/125 mg/kg/日の群でみられ、これら用量における $AUC_{0\text{-}24h}$ は、臨床曝露量と比較してラットで約 2.7～7.4 倍、イヌで約 2.6 倍であった。

肝臓に関連し、ラットでは、4 週間及び 13／26 週間試験において、50 mg/kg/日以上の群で肝重量の増加並びに肝細胞肥大が小葉中心及び／又は中間帯にびまん性にみられ、150 mg/kg/日以上の群では、GGT、ALP、トリグリセリド、総コレステロール及び／又は HDL コレステロールの増加がみられた。これらは肝薬物代謝酵素誘導に起因した変化と考えられ、細胞に傷害性変化は認められなかっ

たことから毒性学的意義は低いと考えられた。また、休薬による回復又は回復傾向が認められた。その他に、150 mg/kg/日群の雄及び／又は 375mg/kg/日群でプロトロンビン時間の延長及び総ビリルビンの増加がみられたが、軽度で回復がみられることから毒性学的意義は低いと考えられた。イヌでは、4 週間試験の 200/125 mg/kg/日群において肝重量の増加、極軽度から軽度の胆汁うっ滞及び肝細胞の空胞化、極軽度の胆管過形成及び／又は極軽度から軽度のクッパー細胞の色素沈着がみられ、ALP、GGT 及び／又は総ビリルビンの増加がみられた。13 週間試験では 35 mg/kg/日以上の群で肝重量の増加がみられ、70 mg/kg/日群では小葉中心性の胆汁うっ滞及び単核球浸潤が極軽度から軽度に、肝細胞萎縮が中等度にみられた。これらの変化は休薬による回復又は回復傾向が認められた。肝臓に病理組織学的変化がみられた最低用量における $AUC_{0\text{-}24h}$ は、臨床曝露量と比較してラットで約 0.6～3.2 倍、イヌで約 2.0～2.2 倍であった。

腎臓に関連し、ラットでは、4 週間試験の 375 mg/kg/日群において、BUN 及びクレアチニンの増加が軽度にみられたが腎臓に関連する病理組織学的変化は認められなかった。26 週間試験では、死亡例（275 mg/kg/日群の雌 1 例）で腎臓皮質外帯の近位尿細管に中等度の上皮細胞壊死及び極軽度の褐色色素沈着がみられた。死亡がみられた群の雌の $AUC_{0\text{-}24h}$ は臨床曝露量と比較して約 21 倍であった。生存例では、50 mg/kg/日群の雄及び 125 mg/kg/日以上の群で極軽度から中等度の細胞内タンパク性硝子滴の増加みられ、125 mg/kg/日以上の群では尿細管に極軽度から軽度の好塩基性変化及び近位尿細管上皮に極軽度の褐色色素沈着、275 mg/kg/日群で尿細管に極軽度から軽度の拡張がみられた。また、125 mg/kg/日以上の群で腎重量の増加がみられた。これらは、再生性又は適応性の変化であり毒性学的意義は低いと考えられた。イヌでは、13 週間試験の瀕死例（125 mg/kg/日群の雄）において、腎臓に極軽度の梗塞、腎髄質及び腎乳頭の尿細管に細胞性円柱及び近位尿細管に上皮細胞の壊死がみられた。同試験の 70 mg/kg/日群では、近位尿細管上皮に極軽度から軽度の褐色色素沈着が認められた。腎臓にこれらの病理組織学的変化がみられた最低用量における $AUC_{0\text{-}24h}$ は、臨床曝露量と比較してラットで約 1.1 倍、イヌで約 2.0～2.2 倍であった。

免疫系に関連し、ラットでは、4 週間試験の 375 mg/kg/日群の雌において、胸腺重量の減少を伴う極軽度から中等度のリンパ球枯渇及び軽度のアポトーシスがみられた。26 週間試験では、50 mg/kg/日以上の群で胸腺重量の減少を伴う極軽度から重度の皮質リンパ球枯渇がみられ、同用量では副腎相対重量増加を伴う副腎皮質の肥大が極軽度から軽度にみられた。また、脾臓重量の増加及びマントル層リンパ球の軽度の増加がみられた。イヌでは、13 週間試験の 70 mg/kg/日以上の群で胸腺及び脾臓の重量低下がみられ、35 mg/kg/日以上の群で軽度から重度の胸腺皮質リンパ球枯渇並びに脾臓動脈周囲リンパ鞘の軽度から中等度のリンパ球枯渇がみられ、体重減少及び／又は体重増加抑制が顕著であった雄でより重篤に認められた。一方、13 週間試験における 35 mg/kg/日群と同程度の曝露量でより長期間投与した 39 週間試験の 40 mg/kg/日群（35 mg/kg/日：23300～25200 ng·hr/mL、40 mg/kg/日：15500～22500 ng·hr/mL）では、胸腺及び脾臓に変化は認められなかった。ラットにおける胸腺及び副腎並びにイヌにおける胸腺及び脾臓の変化は、摂餌量減少、体重減少及び／又は体重増加抑制並びにそれに伴うストレスによる二次的な影響と考えられた。なお、ラットでは脾臓リンパ球の軽度の増加がみられたが、傷害性の変化は認められなかったことから毒性学的意義は低いと考えられた。

生殖器に関連し、雌性生殖器について、ラットでは、4 週間試験の 375 mg/kg/日群並びに 26 週間試験の 125 mg/kg/日以上の群で子宮及び／又は卵巣の重量減少がみられ、26 週間試験の 275 mg/kg/日群で卵巣に軽度から中等度の卵胞発達低下及び子宮／子宮頸部に軽度から中等度の発育不全が認められた。これらの変化は摂餌量の減少に伴う体重減少及び／又は体重増加抑制による二次的な影響と考えられ、イヌではいずれの試験でも雌性生殖器への影響は認められなかった。また、ラットを用

いた受胎能及び初期胚発生に関する試験において、275 mg/kg/日まで投与された雌性ラットで受胎能に影響はなかった。

雄性生殖器について、ラットでは、4 週間試験の 375 mg/kg/日群で精巣に軽度から中等度の精細管変性／萎縮及び精巣上体に軽度の精子減少／精子細胞残渣がみられた。26 週間試験では、13 週及び／又は 26 週で 50 mg/kg/日以上の群で精巣に精細管精細胞変性、275 mg/kg/日群の精巣上体に輸出管精子変性がみられ、これらの変化は 4 週間の休薬後も認められた。また、ラットを用いた受胎能及び初期胚発生に関する試験では、275 mg/kg/日を投与された雄性ラットで同様の雄性生殖器の変化及び授胎能の低下がみられたが、77 日間の休薬により回復性が認められた。イヌでは、13 週間試験の 35 mg/kg/日以上の群で精巣上体に軽度の精子変性、精巣に極軽度から軽度の精細管精細胞変性及び極軽度の多核性精子細胞がみられた。一方で、これらの変化は 35 mg/kg/日と同程度の曝露量でより長期間投与した 39 週間試験の 40 mg/kg/日群（35 mg/kg/日：23300～25200 ng·hr/mL、40 mg/kg/日：15500～22500 ng·hr/mL）では認められなかった。ラット及びイヌのいずれの試験においても、摂餌量減少、体重減少及び／又は体重増加抑制が認められる用量でみられていることから、生殖器の変化は摂餌量減少、体重減少及び／又は体重増加抑制による二次的な影響と考えられた。

細菌を用いた復帰突然変異試験、ヒト末梢血リンパ球を用いた in vitro 染色体異常試験及びラットを用いた in vivo 骨髄小核試験において、ベルモスジルは遺伝毒性を示さなかった。

ラットを用いた受胎能及び初期胚発生に関する試験では、最高用量の 275 mg/kg/日まで雌性ラットの受胎能に影響はみられなかったが、雄性ラットでは 275 mg/kg/日で授胎能の低下（授胎率及び妊娠率の低下）、精子の異常（運動能低下、精子数／濃度の減少、形態異常精子数の増加）、並びに雄性生殖器の肉眼的及び組織学的変化（精巣及び精巣上体の重量低下を伴う小型化、精巣の萎縮、精巣上体内腔の細胞残屑）がみられた。当該用量における $AUC_{0\text{-}24h}$ は、臨床曝露量の約 8.4 倍であった。また、授胎能の低下及び精子／雄性生殖器の変化は 77 日間の休薬により回復性が認められた。

胚・胎児発生に関する試験において、妊娠ラットの器官形成期に投与した結果、50 及び 150 mg/kg/日の用量で母動物に摂餌量の減少及び体重増加抑制がみられ、150 mg/kg/日群では平均胎児体重の減少がみられた。ラットで胚・胎児毒性が認められた用量における $AUC_{0\text{-}24h}$ は、臨床曝露量の約 3.9 倍であった。妊娠ウサギの器官形成期に投与した試験では、225 mg/kg/日の母動物 1 例が死亡し、125 mg/kg/日以上で摂餌量減少並びに体重減少及び／又は体重増加抑制、これに関連すると考えられる流産が 125 及び 225 mg/kg/日で各 1 例みられた。子宮検査では、225 mg/kg/日群の 2 例で全胚吸収、125 mg/kg/日以上で着床後胚損失率の上昇、生存胎児数の減少、生存同腹仔数の減少がみられ、225 mg/kg/日で平均胎児重量の減少及び催奇形性が認められた。ウサギで胚・胎児毒性及び催奇形性がみられた用量における $AUC_{0\text{-}24h}$ は、臨床曝露量のそれぞれ約 0.41 倍及び約 1.0 倍であった。ROCK2 受容体のノックアウトマウスでは胎盤機能不全、胚発達遅延及び胎児死亡が報告されており [9), 10)]、胚・胎児毒性及び催奇形性は本薬の薬理作用に関連する可能性が考えられた。臨床曝露量付近で胚・胎児毒性及び催奇形性が認められたことから、妊婦又は妊娠している可能性のある女性には「投与しないこと」、妊娠する可能性のある女性には「本剤投与中及び最終投与後 1 週間において避妊する必要性及び適切な避妊法について説明すること」と添付文書に記載する。

3T3 細胞を用いた in vitro 光毒性試験において、ベルモスジルの光毒性が示唆された。in vivo 光毒性試験は実施していないが、これまでに実施した健康成人又は患者の臨床試験の中で行った標準的な眼及び皮膚の検査において光毒性は評価されている。いずれの臨床試験においても光防護措置は行っておらず、外来で反復服薬していた試験では日常的に日光に晒される条件であった。また、臨床用量（200 mg/日）を超えて最大 1000 mg/日まで投与されたが、臨床試験においてベルモスジルの光毒性を示唆する症候は報告されていない。さらに、本剤既承認の諸外国における実臨床において光毒性に

関連する重篤な副作用は報告されていない。これらのことから、ベルモスジルが臨床使用において光毒性を示す可能性は低いと考えられた。

2.4.5.2 結論

以上、非臨床薬理試験の結果から、ベルモスジルは自己免疫性及び線維性病態を含む cGVHD に対して、ROCK2 を選択的に阻害することにより、T 細胞免疫応答の調整作用及び抗線維化作用を示すことで治療効果を発揮することが示唆された。薬物動態試験の結果から、ヒト肝細胞や肝ミクロソームで検出された主要な代謝物は安全性試験を実施したマウス、ラット、ウサギ及びイヌでも認められ、代謝物の安全性が評価できていると考えられた。

毒性試験において、催奇形性を含む胚・胎児発生への影響が臨床曝露量付近でみられていることから、妊婦又は妊娠している可能性のある女性、妊娠可能な女性への使用については制限が必要なものの、その他特記すべき毒性は見出されていない。また、他の免疫抑制剤でみられる白血球数の減少や骨髄抑制はみられておらず、薬物動態学的にも大きな問題はないことから、ベルモスジルは安全で使いやすい薬剤であると考えられる。

2.4.6 参考文献一覧

1) 【4.3-01】Tybulewicz VLJ, Henderson RB. Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(9):630-644. doi:10.1038/nri2606
2) 【4.3-05】Zanin-Zhorov A, Blazar BR. ROCK2, a critical regulator of immune modulation and fibrosis has emerged as a therapeutic target in chronic graft-versus-host disease. *Clin Immunol*. 2021;230:108823. doi:10.1016/j.clim.2021.108823
3) 【4.3-06】Zhou Y, Huang X, Hecker L, et al. Inhibition of mechanosensitive signaling in myofibroblasts ameliorates experimental pulmonary fibrosis. *J Clin Invest.* 2013;123(3):1096-1108. doi:10.1172/JCI66700
4) 【4.3-02】Julian L, Olson MF. Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): structure, regulation, and functions. *Small GTPases*. 2014;5:e29846. doi:10.4161/sgtp.29846
5) 【4.3-15】Zanin-Zhorov A, Weiss JM, Nyuydzefe MS, et al. Selective oral ROCK2 inhibitor down-regulates IL-21 and IL-17 secretion in human T cells via STAT3-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(47):16814-16819. doi:10.1073/pnas.1414189111
6) 【4.3-16】Weiss JM, Chen W, Nyuydzefe MS, et al. ROCK2 signaling is required to induce a subset of T follicular helper cells through opposing effects on STATs in autoimmune settings. *Sci Signal*. 2016;9(437):ra73. doi:10.1126/scisignal.aad8953
7) 【4.3-19】Flynn R, Paz K, Du J, et al. Targeted Rho-associated kinase 2 inhibition suppresses murine and human chronic GVHD through a Stat3-dependent mechanism. *Blood*. 2016;127(17):2144-2154. doi:10.1182/blood-2015-10-678706
8) 【4.3-20】Torvinen M, Marcellino D, Canals M, et al. Adenosine A2A receptor and dopamine D3 receptor interactions: evidence of functional A2A/D3 heteromeric complexes. *Mol Pharmacol*. 2005;67(2):400-407. doi:10.1124/mol.104.003376
9) 【4.3-03】Pelosi M, Marampon F, Zani BM, et al. ROCK2 and its alternatively spliced isoform ROCK2m positively control the maturation of the myogenic program. *Mol Cell Biol*. 2007;27(17):6163-6176. doi:10.1128/MCB.01735-06

10) 【4.3-30】Thumkeo D, Keel J, Ishizaki T, et al. Targeted disruption of the mouse rho-associated kinase 2 gene results in intrauterine growth retardation and fetal death. *Mol Cell Biol*. 2003;23(14):5043-5055. doi:10.1128/MCB.23.14.5043-5055.2003