# アリッサ配合錠
# に関する資料

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は富士製薬工業株式会社に帰属するものであり、当該情報を適正使用以外の営利目的に利用することはできません。

富士製薬工業株式会社

FSN-013

# 2.4　非臨床試験の概括評価

富士製薬工業株式会社

# 目次

2.4 非臨床試験の概括評価 ..... 5
2.4.1 非臨床試験計画概略 ..... 5
2.4.2 薬理試験 ..... 9
2.4.3 薬物動態試験 ..... 17
2.4.4 毒性試験 ..... 24
2.4.5 総括及び結論 ..... 36
2.4.6 参考文献一覧 ..... 43

## 略語・略号一覧

| 略語・略号 | 略していない表現（英語） | 略していない表現（日本語） |
|---|---|---|
| ABC | ATP-binding cassette | ATP 結合カセット |
| ADP | adenosine diphosphate | アデノシン二リン酸 |
| AngII | angiotensin II | アンジオテンシン II |
| AUC | area-under-the-concentration-versus-time-curve [up to the last measurable concentration (0-last) or up to 24 hr after dosing (0-24)] | 濃度-時間曲線下面積［濃度測定可能最終時点まで（0-last）、又は投与後 24 時間まで（0-24）］ |
| *bid* | bis in die | 1 日 2 回 |
| CAC | Carcinogenicity Assessment Committee | がん原性評価委員会 |
| cGMP | cyclic guanosine monophosphate | 環状グアノシン一リン酸 |
| $C_{max}$ | maximum plasma concentration | 最高血漿中濃度 |
| COC | combined oral contraceptive | 配合型経口避妊薬 |
| CTD | Common Technical Document | 国際共通化資料 |
| CYP | cytochrome P450 | チトクローム P450 |
| DMBA | dimethylbenz[a]anthracene | ジメチルベンズ[a]アントラセン |
| DNA | deoxyribonucleic acid | デオキシリボ核酸 |
| DRSP | drospirenone | ドロスピレノン |
| E2 | estradiol | エストラジオール |
| E4 | estetrol hydrate | エステトロール水和物［ただし、*in vitro* での添加濃度、動物での投与量及び生体試料中薬物濃度はエステトロールのフリー体（無水物）換算］ |
| (p)EC50 | (-log) median effective concentration | 50%有効濃度の負の対数 |
| ED50 | median effective dose | 50%有効量 |
| EE | ethinylestradiol | エチニルエストラジオール |
| eNOS | endothelial nitric oxide synthase | 内皮型一酸化窒素合成酵素 |
| EMA | European Medicines Agency | 欧州医薬品庁 |
| eq | equivalent | 当量 |
| EP | estrogen progestins | エストロゲン・プロゲスチン |
| ER | estrogen receptor | エストロゲン受容体 |
| ERE | estrogen responsive element | エストロゲン応答配列 |
| FDA | Food and Drug Administration | 米国食品医薬品局 |
| G | gestation day | 妊娠日齢 |
| [redacted]社 | [redacted] | － |
| GLP | Good Laboratory Practices | 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令 |
| HCC1500 | human breast cancer cell line | ヒト乳癌細胞株 |
| Hep89 | HepG2 cells overexpressing human ERα | ― |
| hERG | human ether-a-go-go-related gene | ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子 |

| | | |
|---|---|---|
| HGPRT | hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl-transferase | ヒポキサンチン-グアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ |
| HUVEC | human umbilical vein endothelial cells | ヒト臍帯静脈内皮細胞 |
| IC50 | 50% inhibitory concentration | 50%阻害濃度 |
| ICAM-1 | intercellular adhesion molecule-1 | 細胞間接着分子 1 |
| ICH | International Conference on Harmonization | 医薬品規制調和国際会議 |
| Ki | inhibitory constant | 阻害定数 |
| LC-MS/MS | liquid chromatography-tandem mass spectrometry | 液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析 |
| LDLr | low density lipoprotein receptor | 低比重リポ蛋白受容体 |
| LNG | levonorgestrel | レボノルゲストレル |
| MCF-7 | human breast cancer cell line | ヒト乳癌細胞株 |
| MCP-1 | monocyte attracting protein-1 | — |
| MISS | membrane-initiated steroid signaling | 膜開始ステロイドシグナル伝達 |
| MF | Master File | 原薬等登録原簿 |
| NO | nitric oxide | 一酸化窒素 |
| NO(A)EL | No-Observed-(Adverse-)Effect-Level | 無影響（毒性）量 |
| PAI-1 | plasminogen activator inhibitor-1 | プラスミノーゲンアクチベータインヒビター1 |
| PGRMC1 | progesterone receptor membrane component 1 | プロゲステロン受容体膜成分 1 |
| PR | progesterone receptor | プロゲステロン受容体 |
| ROS | reactive oxygen species | 活性酸素種 |
| SHBG | sex hormone-binding globulin | 性ホルモン結合グロブリン |
| [redacted]社 | [redacted] | — |
| SLC | solute carrier | 溶質キャリア |
| SULT | sulfotransferase | 硫酸転移酵素 |
| T47-D | ER- and PR-positive human breast cancer cell line | — |
| $T_{1/2}$ | half-life of elimination | 消失半減期 |
| $T_{max}$ | time of maximum plasma concentration | 最高血漿中濃度到達時間 |
| t-PA | tissue plasminogen activator | 組織プラスミノーゲン活性化因子 |
| TS | tabulated summary | 概要表 |
| UDP | uridine diphosphate | ウリジン二リン酸 |
| UGT | UDP-glucuronosyltransferase | UDP-グルクロン酸転移酵素 |
| u-PA | urokinase-type plasminogen activator | ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子 |
| UHPLC-MS/MS | ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry | 超高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析 |
| VCAM-1 | vascular cell adhesion molecule-1 | 血管細胞接着分子 1 |
| VTE | venous thromboembolism | 静脈血栓塞栓症 |
| WOCBP | women of childbearing potential | 妊娠可能な女性 |

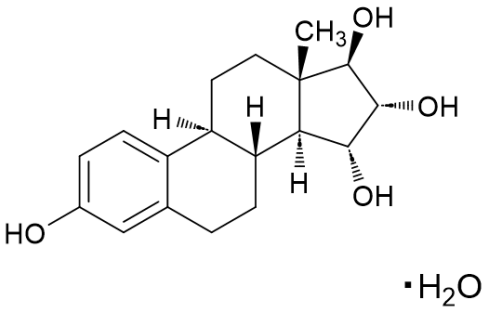
## 2.4 非臨床試験の概括評価

### 2.4.1 非臨床試験計画概略

#### 2.4.1.1 緒言

富士製薬工業株式会社が開発した月経困難症を効能・効果とした FSN-013 は、エストロゲンとしてエステトロール水和物（E4）15 mg とプロゲスチンのドロスピレノン（DRSP）3 mg を含有するエストロゲン・プロゲスチン配合剤（EP 配合剤）である。（図 2.4-1）。

エステトロール水和物




ドロスピレノン

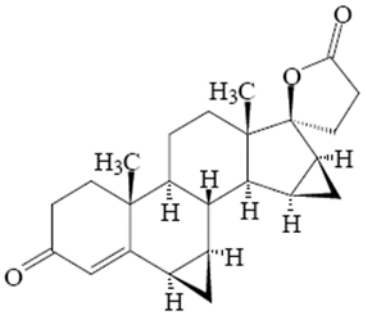



**図 2.4-1 エステトロール水和物及びドロスピレノンの化学構造**

E4（エストラ-1,3,5(10)-トリエン-3,15α,16α,17β-テトロール）は、ヒトの妊娠中に胎児の肝臓で産生される天然型のエストロゲンであり、1965 年に Diczfalusy らによって妊娠女性の尿中で発見された。E4 の初期開発はオランダの Pantarhei 社が担当しており、E4 の良好な薬物動態特性、薬理学的プロファイル及びヒトを対象とした臨床試験の安全性及び有効性の結果から、E4 がヒト用医薬品として適している可能性があることを示した（Visser, 2009）。さらに、Estetra SPRL 社（Estetra）は E4 による開発プログラムを完了した。

胎児及び母体の血漿中 E4 濃度は妊娠期間を通じて上昇し、妊娠終了時に最高濃度に達する（母体血漿中で約 1 ng/mL）（Tulchinsky, 1975、Coelingh Bennink F, 2008）。分娩時の胎児の血漿中濃度は母体の血漿中濃度の 10 倍を超えると報告されている（Coelingh Bennink F, 2008）。妊娠中の E4 の生理機能は不明である。

E4 の薬理学的プロファイルは、活性の弱いエストロゲンである。E4 は、ヒトエストロゲン受容体（ER）に対して高い選択性を示し、ERα 及び ERβ のいずれとも結合するが、ERα に対する親和性は ERβ に比べて 4～5 倍高い（Visser, 2008）。E4 の ERα に対する結合親和性は、エストラジオール（E2）と比較すると 25 分の 1 未満である。*In vivo* で観察される E4 のエストロゲン活性に関する効力は、エチニルエストラジオール（EE）の効力の約 1/10～1/20 で、E2 の効力よりも低い。

DRSP (6R,7R,8R,9S,10R,13S,14S,15S,16S,17S)-1,3',4',6,6a,7,8,9,10,11,12,13,14,15, 15a,16-ヘキサデカヒドロ-10,13-ジメチルスピロ-[17H-ジシクロプロパ[6,7:15,16]シクロペンタ[a]フェナントレン-17,2' (5'H)-フラン]-3,5'(2H)-ジオン)は、アルドステロン拮抗薬のスピロノラクトンと構造的に関連するプロゲスチンである（Krattenmacher, 2000）。DRSP はヒトプロゲステロン受容体に対して

プロゲステロン自体の親和性と同等の親和性を有する。DRSP は、抗鉱質コルチコイド特性及び抗アンドロゲン特性も示す（Muhn, 1995）。DRSP は、エチニルエストラジオール（EE）を含有するヤーズ®配合錠及びヤーズフレックス®配合錠としての使用が十分に確立されたプロゲスチンである。海外において、DRSP は、配合型経口避妊薬（COC）のプロゲスチン成分として配合されている（Yasmin®など）。

本邦での開発については、2.5.3.2.3.1 に示す通り、FSN-013（E4/DRSP 15 mg/3 mg）の「卵胞成熟－排卵－黄体形成」抑制に関わる薬力学的作用、中間期出血発現頻度及び安全性（FSN-013P-02 試験）、並びに薬物動態（MIT-Es0001-C109 試験）に関する成績から、海外第 III 相試験 2 試験（MIT-Es0001-C301 試験、MIT-Es0001-C302 試験）により検証された避妊を適応とする本剤の用法・用量を、日本人の月経困難症の用法・用量に外挿し、国内第 III 相試験を開始することは可能と判断した。

その後、月経困難症に対する有効性が検証（FSN-013P-03 試験）され、24 週長期投与時の忍容性が確認（FSN-013P-03 試験及び FSN-013P-04 試験の併合解析）された。

### 2.4.1.2 非臨床試験計画

申請用法・用量の条件下で以下に基づき行った DRSP と併用した場合の E4 の安全性に関する統合評価を示す。

- E4 を用いて実施した薬理、薬物動態及び毒性試験
- DRSP に関して公表されている薬理、薬物動態及び毒性データ
- 雌ザルを用いた E4/DRSP 併用の 13 週間反復投与毒性試験

DRSP の十分に確立された使用法及び既知の特性を考慮し（モジュール 2.7.2.1.2.2）、E4 15 mg/DRSP 3 mg の開発における非臨床試験計画として、E4 の特性を確立することに的を絞り、E4 の開発については、以下の目的を達成することを目指した。

- E4 のエストロゲン特性を確認し、その効力を基準物質 EE 又は E2 と比較する。
- E4 の安全性を評価し、その薬物動態特性を明らかにしてこれを裏付ける。
- E4 を DRSP と併用したときの安全性を補助的なトキシコキネティクスとともに評価する。

これらの目的に照らして、製造販売承認を裏付けるために、E4 の薬理、薬物動態及び毒性試験プログラムをデザインした。ほとんどの試験は Estetra 社や Pantarhei 社が実施した。臨床適応を考慮し、雌動物を用いて経口投与による *in vivo* 試験を実施した。*In vitro* 試験では、雌動物やヒト由来の試験系を使用した。完全を期すため、公表された情報源から得た一部の薬理データを含めた。

サルを用いた E4/DRSP 併用による 13 週間の試験を除き、DRSP を用いた試験は実施していない。DRSP のデータは、入手可能な公表情報に由来した。

E4 の薬物動態試験及び毒性試験のプログラムを確立するにあたって、ICH ガイダンス M3（R2）、FDA Guidance for Industry on nonclinical evaluation of drug or biologic combinations（2006）及び EMA Guideline on the nonclinical development of fixed combinations of medicinal products（EMEA/CHMP/SWP/258498/2005, 2008）を考慮した。また、個々の試験に適用可能なガイダンスを考慮した。

E4 の非臨床プログラムやこのプログラムの一部について、規制当局と複数回協議した。該当する場合及び関連する場合、プログラム及び試験デザインには規制当局からのフィードバックを考慮した。

なお、本概要中では *in vitro* での添加濃度、動物での投与量及び生体試料中薬物濃度は E4 のフリー体（無水物）換算で表記した。

薬理試験

一連の *in vitro* 及び *in vivo* の効力を裏付ける試験で、E4 のエストロゲン特性及び効力を評価した。これらの試験のほとんどで、E4 を基準物質の E2 や EE と比較した。

E4 の副次的薬力学試験には、*in vitro* の [redacted] スクリーニング試験（約 130 種類の標的）における潜在的なオフターゲット活性の評価、乳癌リスクに関する試験、凝固リスクに関する試験、血管作用に関する試験及び開発中のその他の適応症（閉経期（後）症状、関節炎、多発性硬化症）の動物モデルにおける試験が含まれた。

E4 の安全性薬理試験には、ICH S7 で定義されているコアバッテリー試験［中枢神経系（ラットを用いた機能観察総合評価）、心血管系（*in vitro* hERG 試験、テレメトリー装着サルを用いた心血管機能）及び呼吸器系（ラットを用いた全身プレチスモグラフィー）に対する潜在的有害作用の評価］を含めた。安全性薬理試験は、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令（GLP）を遵守して実施した。

薬物動態試験

E4 を用いて実施した薬物動態試験プログラムには、単回及び反復投与トキシコキネティクス試験（毒性試験動物種）、組織分布試験（ラット）、*in vitro* 血漿蛋白結合試験（毒性試験動物種及びヒト）、*in vitro* 血液分布試験（ヒト）、肝細胞における *in vitro* 代謝（毒性試験動物種及びヒト）及び *in vivo* 代謝／排泄試験（マウス、ラット、サル、種間比較）が含まれ、トキシコキネティクス試験は GLP を遵守して実施した。

*In vitro* でのヒトチトクロム P450（CYP）、UDP-グルクロン酸転移酵素（UGT）及び硫酸転移酵素（SULT）の表現型解析試験、ヒト CYP 誘導並びにヒト CYP 阻害及び UGT 阻害に関する *in vitro* 試験、並びに基質及び阻害薬としての取込み及び排出トランスポーターとの相互作用に関する *in vitro* 試験を実施した。これらの試験をモジュール 2.7.2 に示し、考察する。

毒性試験

固定用量配合剤の非臨床開発に関する FDA 及び EMA ガイダンスに従い、E4 を単独投与した一連の反復投与毒性試験及び E4 を DRSP と併用投与した 13 週間反復投与毒性試験で E4 の安全性を評価した。後者の試験は臨床用量比 5：1 で実施し、E4 単独群及び DRSP 単独群を設定した。E4 を LNG と併用投与する 13 週間反復投与毒性試験も実施した。

反復投与毒性試験（ラット、サル）の動物種の選択は、経口避妊薬の非臨床試験に関する推奨事項（Jordan, 1992）に従って行い、実施した試験の投与期間（ラットで最長 26 週間、サルで最長 39 週間）は、予定されている長期投与と一致するものであった［ICH M3(R2)］。

遺伝毒性試験については、ICH S2(R1)で定義されているコアバッテリー試験のオプション 1（*in vitro* エームス試験及びマウスリンフォーマ試験、*in vivo* ラット骨髄小核試験）を実施し

た。ネズミチフス菌 TA102 株を用いたエームス試験において E4 の変異原活性が弱陽性であり、明瞭な再現性が認められなかったことを考慮して、2 回目の *in vivo* 試験（ラットコメット試験）をプログラムに追加した。さらに、TA102 株における所見の背景にある機序を説明するため、E4 が活性酸素種の形成を誘導する可能性について *in vitro* 試験を実施した。

マウス及びラットを用いた 2 年間のがん原性試験は完了した。

生殖発生毒性試験として、ラットを用いた受胎能回復性試験、ラット及びウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験並びにラットを用いた出生前及び出生後の発生に関する試験を実施した。

重要試験及び一部の用量設定試験はいずれも GLP を遵守して実施した。

結論

現在までに実施した非臨床試験プログラムから適切なデータセットが得られ、「1 日 1 錠を毎日一定の時刻に定められた順に従って（ピンク色錠から開始する）28 日間連続経口投与する。以上 28 日間を投与 1 周期とし、出血が終わっているか続いているかにかかわらず、29 日目から次の周期の錠剤を投与し、以後同様に繰り返す。」という申請用法・用量で DRSP と併用する E4 の安全性を評価できると考える。

## 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 エステトロール

*エストロゲン特性及び選択性*

*In vitro* で、E4 はヒト ER の ERα 及び ERß（E2 と比較した場合の相対結合親和性はそれぞれ 4%及び 0.68%）のいずれに対してもエストロゲン活性を示したが、ERα の方が優先的であった（PR3019[1]）。E4 は、古典的エストロゲン応答配列（ERE）経路を介して遺伝子転写を活性化することができた（PR3046[2]、Abot, 2014）。E4 の効力は E2 又は EE の効力より低かった。E4 と結合した ERα リガンド結合ドメインの結晶構造は、E2 に結合したドメインと極めて類似しており、E4 が核内 ERα のリガンド結合ドメインの E2 と同様の立体構造変化を誘発したことを示している（Abot, 2014）。最近の探索的データから、E4 は E2 と極めて類似するパターンで ERα 共調節因子を動員するが、その効力は低いことが示された（[redacted] study report, 20[redacted][3]）。

E4 代謝物の E4-3-グルクロニド及び E4-16-グルクロニドは、ERα 及び ERβ のいずれに対しても弱いエストロゲン活性を示し、E4-3-グルクロニドの効力は E4-16-グルクロニドより低かった。これらの代謝物の効力は、E4 の効力の数百分の 1 であった（Es0001-NC-014[4]）。

*In vivo* で、E4 は以下を示した。

- 卵巣摘出 C57BL/6J マウスに 1 mg/kg/日又は 6 mg/kg/日を 3 週間投与した場合の膣重量、上皮の高さ、上皮の増殖及び潤滑性の用量依存的な増大。膣に対するこれらの作用は、完全に核内 ERα 活性化によって介在された（Benoit, 2017）。
- 卵巣摘出 C57Bl/6J マウスに対して 1 mg/kg を単回皮下投与したときの子宮肥大作用（管腔上皮高、間質高及び上皮増殖の増大）。子宮内で E2 標的遺伝子も E4 に反応し、ほとんどの上方制御遺伝子について 1/100 の効力差、ほとんどの下方制御遺伝子について 1/10 の効力差を示した（Abot, 2014）。
- 卵巣摘出幼若 C57Bl/6J マウスに対して 3 mg/kg/日を 6 日間又は 14 日間経口投与したときの乳腺上皮構造に対する成長刺激作用。上皮成長刺激は ERα を介し、E4 は E2 による成長刺激を部分的に拮抗した（Gérard, 2015a）。
- 卵巣摘出 CD ラットに 3 mg/kg/日までの用量で 7 日間強制経口投与したとき、膣上皮に対する用量依存的なエストロゲン作用（Allen-Doisy 変法試験）、最終体重の減少及び子宮重量の増加（PR3014[5]）。
- Sprague-Dawley ラットにおける排卵抑制。経口投与後の ED50 は約 0.2 mg/kg *bid* であった（PR3015[6]、PR3026）。
- ニュージーランドホワイトウサギにおける排卵抑制（経口 ED50 は 0.735 mg/kg *bid*）及び0.1 mg/kg *bid* 以上の投与量での着床の完全阻害（ES-T04）。

[1] 報告書 PR3019 の成績は Visser（2008）が発表した。
[2] 報告書 PR3046 の成績は Gérard（2023）が発表した。
[3] 報告書 [redacted] study report, 20[redacted] の成績は Gérard（2022）が発表した。
[4] 報告書 Es0001-NC-014 の成績は Gérard（2023）が発表した。
[5] 報告書 PR3014 の経口投与の成績は、Heegaard（2008）が発表した。
[6] 報告書 PR3015 の成績は、Coelingh Bennink HJ（2008a）が発表した。

これらの *in vivo* 試験で、E4 は基準物質である EE 及び E2（含まれる場合）と同様のエストロゲン作用を示した。しかし、E4 の効力は概して EE の効力の 1/10～1/20 で、E2 の効力よりも低かった。

総合すると、*in vitro* 及び *in vivo* の効力を裏付ける試験データから、E4 は弱い選択的エストロゲンであり、EP 配合剤におけるエストロゲン成分として有効である可能性が示された。

#### 2.4.2.1.2 ドロスピレノン

*プロゲスチン特性*

*In vitro* で DRSP はプロゲステロンと同程度のヒト PR に対する親和性を示した（Pollow, 1992）。トランス活性化試験では、ヒト PR における DRSP のアゴニスト活性はジエノゲストより高く、LNG、酢酸ノメゲストロール又はプロゲステロンより低かった（van Diepen, 2011）。

DRSP のプロゲスチン活性は以下によって示された。

- 1～100 nM の DRSP 単独投与又は E2（10 nM）との併用投与に 8 日間曝露させたときのヒト子宮内膜間質細胞の脱落膜化（紡錘状形態、プロラクチン分泌）（Miyashita, 2015）。
- 卵巣摘出 NMRI マウスにおける妊娠維持。皮下投与時の ED50 は 25.8 mg/kg/日であった（Otto, 2008）。
- 卵巣摘出 Wistar ラットにおける妊娠維持率は、交尾後 8～11 日目に 0.5 mg1 日 6 回経口投与で 82.9%、10 mg/日皮下投与で 95.7%であった（Muhn, 1995）。
- 雌 Wistar ラットにおける排卵抑制。経口投与後の ED50 値は 1 mg/日で、皮下投与後の ED50 値は 0.3～1 mg/日であった（Muhn, 1995）。
- 0.3 mg/日で 5 日間皮下又は経口投与した幼若な卵巣摘出ニュージーランドホワイトウサギにおいて顕著な子宮内膜の変化（McPhail スコア）（Muhn, 1995）。

### 2.4.2.2 副次的薬理試験

#### 2.4.2.2.1 エステトロール

*オフターゲット受容体相互作用試験*

10 µM の濃度で、E4 は、その主要標的である ERα 及び ERβ を除いた 130 種類の薬物標的［受容体（PR を含む）、トランスポーター、イオンチャネル］との相互作用を示さなかった（PR3019[7]）。

*乳癌リスクに関連する試験*

*In vitro* で、E4 は、1 µM 以下の濃度で 72 又は 96 時間曝露させたとき、正常なヒト乳腺細胞及び乳癌細胞 MCF-7 の増殖を促進した。正常乳腺細胞の増殖に対する E4 の効力は、E2 の効力の 1%であった（PR3032[8]）。エストロゲン誘発性乳腺細胞成長の機序には、核内 ERα 活性化（転写活性化）及び膜開始ステロイドシグナル伝達（MISS）のいずれもが関与することが明らかにされている（Gérard, 2015b）。

[7] 報告書 PR3019 の成績は Visser（2008）が発表した。
[8] 報告書 PR3032 の正常ヒト乳腺細胞を用いた実験は Gérard（2015a）が発表した。

E4（100 nM を 24 時間又は 48 時間）は、乳癌細胞 T47-D の遊走及び浸潤を促進したが、その効力は E2 よりも低かった。T47-D 細胞の遊走及び浸潤に対する E4 と E2 との効力の違いは、細胞の運動能に関連するアクチン細胞骨格のリモデリング（仮足及び波状構造の形成）及びアクチン制御タンパク質モエシンのリン酸化に対する作用においても認められた（PR3101[9]）。

乳腺細胞の増殖及び遊走に対する E4 の作用は、ER アンタゴニスト ICI 182 780 や抗エストロゲン薬タモキシフェンによって阻害された。E2 によって惹起された乳腺細胞の増殖、遊走、浸潤に対する作用を E4 は減弱させた（PR3032[10]、PR3101）。細胞骨格のリアレンジメント及び細胞運動のプロセスは、ERα 依存的な核外シグナル伝達の結果であり（Sanchez, 2010）、E4 の E2 に対するアンタゴニスト活性は核外レベルで生じることが示された。E2 によって誘導される核内 ERα の活性化に対する阻害は認められなかった（Gérard, 2015b）。Abot（2014）は、MCF-7 細胞において、ERα-ERE 依存的な遺伝子発現の E2 誘導性上方制御に E4（1 μM）が影響を及ぼさないことを明らかにした。しかし、E4 は、ERα とチロシンキナーゼ Src との間の E2 誘導性相互作用を完全に阻害した。

*In vivo* で、乳癌細胞 MCF-7 を皮下移植した卵巣摘出免疫不全マウスにおいて、E4（1～10 mg/kg/日、5 週間強制経口投与）は腫瘍の成長を刺激したが、その効力は E2 よりも低かった。E4 は E2 によって誘導される腫瘍の成長に一部、拮抗した（Gérard, 2015b）。雌性 Sprague-Dawley ラットに DMBA を用いて化学的に惹起した乳腺腫瘍モデルにおいて、E4 を 1 mg/kg/日以上の用量で経口投与したとき、腫瘍の発生が抑制された。3 mg/kg/日の投与量では腫瘍は形成されず、腫瘍のイニシエーションを予防する作用において、E4 は卵巣摘出及び抗エストロゲン薬のタモキシフェンと同等に有効であった。EE は、E4 の 1/20 の投与量（同等の効力を示す投与量）で、腫瘍のイニシエーションに対する予防作用を示さなかった。また、10 mg/kg/日の E4 は、DMBA モデルの既存の腫瘍を退縮させた（PR3028、PR3049、PR3066）[11]。

以上、*in vitro* 及び *in vivo* で E4 は乳癌細胞の増殖、遊走及び浸潤の刺激に対して E2 よりも効力が低く、E2 に対してアンタゴニスト作用を示す。これらの特性から、E4 は、EE 及び E2 と比較して、乳癌リスクに対して好ましいプロファイルを有する可能性が示唆される。

*凝固線溶系リスクに関連する試験*

性ホルモン結合グロブリン（SHBG）の血漿中濃度に対する経口避妊薬の作用（濃度上昇の程度）は、肝臓におけるエストロゲン作用の高感度マーカーであり、稀ではあるが COC 使用者でみられる重篤な有害事象である静脈血栓塞栓症（VTE）リスクの予測マーカーである（Odlind, 2002、van Vliet, 2005、Stegeman, 2013）。ERα を発現する Hep89 細胞に 1 μM までの濃度で 72 時間曝露させたとき、E4 は、EE 及び E2 とは異なり、SHBG 産生を誘導しなかった（PR3060[12]）。また、競合的リガンド結合アッセイにおいて、E4 はヒト SHBG に対する親和性も示さなかった

[9] 報告書 PR3101 の成績は Giretti（2014）が発表した。
[10] 報告書 PR3032 の正常ヒト乳腺細胞を用いた実験は Gérard（2015a）が発表した。
[11] 報告書 PR3028、PR3049 及び PR 3066 の成績は、Coelingh Bennink HJ（2008c）及び Visser（2012）が発表した。
[12] 報告書 PR3060 の成績は Hammond（2008）が発表した。

（PR3025[13]、TS 表 2.6.5.6.B）。SHBG 誘導に対する *in vitro* 作用が認められないことから、E4 は、EE 及び E2 と比較して良好な VTE リスクプロファイルを有する可能性が示唆された。

ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）において、0.1～10 nM の濃度範囲の E4 及び E2 はいずれも、組織プラスミノーゲン活性化因子（t-PA）、ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子（u-PA）及びプラスミノーゲンアクチベータインヒビター1（PAI-1）の発現を用量依存的に増加させた。t-PA、u-PA 及び PAI-1 に対する E4 の作用は、転写因子 c-Fos 及び c-Jun の誘導を介していた。また、E4 及び E2 は、HUVEC 細胞の遊走も誘発した。E4 の効力は E2 より低く、E4 は高濃度の E2 で誘発される作用に拮抗したが、低濃度の E2 で誘発される作用を損なうことはなかった（Montt-Guevara, 2017）。これらのデータは線維素溶解の調節における E4 の役割を裏付けるものであるが、その *in vivo* での意義は不明である。

*In vivo* で、卵巣摘出マウス（6 mg/kg/日の E4 を放出する浸透圧性ミニポンプを 3 週間皮下に移植）では、E4 の長期投与後、尾出血時間が延長し、動脈及び静脈の血栓症から防御された。さらに、E4 投与は、*ex vivo* の動脈血流条件下でコラーゲンによって生じる血栓の成長を低下させた。血栓塞栓症モデルに対する E4 の予防作用には、造血細胞における核内 ERα 活性化が関与した（Valéra, 2018）。

*血管作用に関連する試験*

*In vitro* で、E4（0.1～10 ng/mL）は、HUVEC 細胞からの急速な一酸化窒素（NO）の放出並びに内皮型一酸化窒素合成酵素（eNOS）の活性化（30 分の曝露時）及び発現（48 時間の曝露時）を誘導した。E4 は E2 より効力が弱く、その作用は ICI 182 780 によって阻害された。E4 は、特に高濃度の E2 の存在下で、E2 誘導性の NO 合成を減弱させた（PR3102[14]）。マウス大動脈の *ex vivo* モデルにおいて、E4（1 µM を 30 分間、314 ng/mL に相当）は eNOS 活性化又は NO 産生を誘導しなかったが、本モデルでは E2 の作用を阻害することができた（Abot, 2014）。

E4（pEC50 3.71～4.43）は、ラット動脈の血管緊張低下を誘発し、その効力は E2（pEC50 4.93～5.77）よりも低かった。血管緊張低下に対する E4 の作用は、内皮依存性（ER が関与する）cGMP 介在性の機序と、平滑筋細胞 $Ca^{2+}$の流入及び収縮の阻害を伴う内皮非依存性の機序の両者によって介在された。プロスタグランジン、過分極又は一酸化窒素合成酵素の関与は認められなかった（PR3093[15]）。

E4（0.6 又は 6 mg/kg/日の 12 週間混餌投与）は、卵巣摘出した $ERα^{+/+}$/$LDLr^{-/-}$マウスの大動脈洞におけるアテローム沈着を最大で約 80%減少させたが、卵巣摘出した $ERα^{-/-}$/$LDLr^{-/-}$マウスでは、動脈硬化に対する保護的な作用は認められなかった。このことは、本作用が ERα に依存していることを示すものであった（Abot, 2014）。卵巣摘出 C57BL/6J マウスにおいて、E4（1 又は 6 mg/kg/日、2 週間皮下投与）は、頸動脈に電気的傷害を与えた後の内皮治癒に影響を及ぼさなかったが、E2 により誘導される加速化された修復を無効化した（Abot, 2014）。

[13] 報告書 PR3025 の成績は Hammond（2008）が発表した。
[14] 報告書 PR3102 の成績は Montt-Guevara（2015）が発表した。
[15] 報告書 PR3093 の成績は Hilgers（2012）が発表した。

大腿動脈傷害の実験モデルにおいて、E4 は新生内膜過形成を抑制した。本作用は、内皮細胞への作用を介することなく、血管平滑筋細胞の増殖及び遊走に対する直接的な阻害作用によって発現した（Smirnova, 2015）。

卵巣摘出した野生型マウスにおいて、卵巣摘出の 2 週間後に、アンジオテンシン II （AngII）及び E4 を同時に送達する浸透圧性ミニポンプ（1 箇月）を移植して、AngII 投与に対する E4 の作用を評価した。溶媒又は E4 を 2 週間長期投与した卵巣摘出マウスから腸間膜動脈を採取し、これを用いて血流依存性リモデリングを評価した（Guivarc'h, 2018）。核内 ER α の選択的活性化後に E4 の血管保護作用が認められ、それによって AngII 誘発性高血圧が予防され、血流依存性の細動脈リモデリングが回復した。

総合すると、以上のデータは、E2 より程度は低いが、E4 の潜在的な血管調節特性を示唆している。

*その他の適応疾患のモデルを用いた試験*

閉経期（後）症状（ホットフラッシュ及び骨粗鬆症）の 2 つのラットモデル、並びに関節炎のマウスモデル及び多発性硬化症のマウスモデルを用いて、その他の適応症における E4 の潜在的有効性を評価した。これらのモデルで、E4 は以下の所見を示した。

- オピエート退薬によって誘発したラットホットフラッシュモデルにおいて、0.3 mg/kg/日以上を 8 日間経口投与したとき、皮膚温上昇が用量依存的に抑制された（PR3018[16]）。
- 卵巣摘出誘発性のラット骨粗鬆症モデルにおいて、2.5 mg/kg/日を 4 週間経口投与したとき、骨量減少及び骨強度低下に対して保護的な作用を示した（PR3004[17]）。
- コラーゲン誘発マウス関節炎モデルにおいて、3 mg/kg/日の経口投与によって関節炎の発生及び重症度が抑制された（PR3065）。
- マウス多発性硬化症モデルにおいて、1 mg/kg/日以上の投与量で経口投与したとき、実験的自己免疫性脳脊髄炎が抑制された（PR3064）。
-

<u>E4 の全般的な薬理学的プロファイル</u>

E4 の全般的な薬理学的プロファイルは、ER に対して高い結合選択性を示し、E2 及び EE と比較して弱いエストロゲン作用を示した。E4 は EP 配合剤のエストロゲン成分として有効であることが期待でき、エストロゲン関連リスクの点で EE 及び E2 と比較して望ましいプロファイル有することが示された。

### 2.4.2.2.2 ドロスピレノン

*副次的なホルモン特性*

*In vitro* で、DRSP は抗鉱質コルチコイド活性及び抗アンドロゲン活性を示したが、アンドロゲン活性、グルココルチコイド活性及び抗グルココルチコイド活性を示さなかった。その受容体相互作用プロファイルは、プロゲステロンの弱い抗グルココルチコイド活性を除き、プロゲステロ

[16] 報告書 PR3018 の成績は Holinka（2008a）が発表した。
[17] 報告書 PR3004 の成績は、Coelingh Bennink HJ（2008b）が発表した。

ンと同様であった。いずれの化合物もヒト ER に対して親和性を示さなかった（Krattenmacher, 2000、Fuhrmann, 1996、Louw-du Toit, 2017）。

*In vivo* において、DRSP の抗アンドロゲン活性及び抗鉱質コルチコイド活性は以下の所見から示された。

- 去勢 Wistar ラットに 0.1～10 mg/日で 7 日間皮下投与したとき、精嚢及び前立腺のテストステロン刺激による成長が用量依存的に阻害された（Muhn, 1995）。
- 妊娠 Wistar ラットに 0.1～10 mg/日の DRSP を交尾後 17～20 日目に皮下投与したとき、抗アンドロゲン活性が認められ、3 及び 10 mg/日を皮下投与した妊娠 Wistar ラットでは雄胎児の雌性化が認められた（Muhn, 1995）。
- グルココルチコイドの補充及びアルドステロンの投与を行った副腎摘出 Wistar ラットに、13.3 mg/kg の皮下投与又は最大 6.7 mg/kg までの経口投与を行ったとき、尿中 $Na^+/K^+$比の上昇が認められた（Losert, 1985）。
- 卵巣摘出 Wistar ラットに 10 mg/日までの用量で 20 日間皮下投与したとき、尿中 $Na^+/K^+$比が上昇した（Muhn, 1995）。
- 4 mg/kg/日を 2 又は 3 日に 1 回投与した雄カニクイザルでは、血清中テストステロン濃度及び黄体形成ホルモン濃度の顕著な低下が認められた（Muhn, 1995）。

以下の所見により、アンドロゲン活性、グルココルチコイド及び抗グルココルチコイド活性、並びにエストロゲン活性がないことを確認した。

- 去勢 Wistar ラットに 10 mg/日を 2 週間皮下投与したとき、副生殖器重量に対する作用は認められなかった（Muhn, 1995）。
- 無処置 Wistar ラットに 5 mg の用量で 6 週間以内に 36 日間、皮下又は経口投与したところ、副腎重量に対する作用は認められなかった（Muhn, 1995）。
- デキサメタゾン併用の有無に関わらず、副腎摘出 Wistar ラットに 10 mg/日を 4 日間皮下投与したところ、胸腺重量に対する作用は認められなかった（Muhn, 1995）。
- 卵巣摘出 Wistar ラットに 10 mg を単回皮下投与したところ、膣上皮及び子宮重量に対する作用は認められなかった（Muhn, 1995）。
-

*乳癌リスクに関連する試験*

DRSP（1 及び 10 μM）は、正常なヒト乳腺細胞の成長因子誘導性の増殖並びに ER 陽性及び PR 陽性の乳癌細胞 HCC1500 及び T47-D の E2 誘導性の増殖を阻害した（Seeger, 2011）。

DRSP（1 μM を 5 日間）は、乳癌細胞 MCF-7 の増殖を 18%促進し、PGRMC1[18]を安定的に導入した MCF-7 細胞の増殖を 156%促進した。MCF-7 細胞の増殖は、5 μM の PGRMC1 阻害薬 AG205 により顕著に低下したが、完全には低下しなかった（Ruan, 2012）。

DRSP（100 nM）は、T47-D 細胞の遊走をわずかに（32%）促進し、浸潤指数を E2（5.42）と比較してかなり低い程度で（3.49）促進した。E2 と DRSP を併用投与したところ、E2 単独投与と比較して、細胞遊走に対する相加作用は認められず、浸潤指数は低下した。PR アンタゴニストの Org 31710 は、E2 の非存在下及び存在下のいずれにおいても、DRSP に起因する細胞遊走を

[18] PGRMC1：プロゲステロン受容体膜成分 1 は核外のプロゲスチン活性を媒介する。

阻害した。また、Org 31710 は、細胞の運動に関連する DRSP 誘導性アクチン細胞骨格リモデリング及びアクチン制御タンパク質モエシンのリン酸化も阻害した（Fu, 2008）。

卵巣摘出マウスにおいて、DRSP は、E2 誘導性の乳腺上皮細胞増殖を刺激する効力（ED50 50.5 mg/kg/日）と比較して、E2 誘導性の子宮上皮細胞増殖を阻害することにおいてより強い効力（ID100 17.5 mg/kg/日）を示した（Otto, 2008）。

総合すると、DRSP は乳癌細胞の増殖、遊走及び浸潤に対してごくわずかしか作用せず、E2 より効力は極めて低いことが示された。

*凝固線溶系リスクに関連する試験*

DRSP は SHBG 及びコルチコステロイド結合グロブリンと結合しない（Krattenmacher, 2000）。

DRSP（360 ng/mL）は、ヒト乏血小板血漿において、凝固パラメータのプロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間、トロンビン時間、フィブリノーゲンに直接的な影響を及ぼさなかった。DRSP（60 ng/mL）が血小板凝集を引き起こすことはなく、コラーゲン、ADP、トロンビン、U46619 及びアドレナリンによって誘導される血小板凝集に影響を及ぼすことはなかった。DRSP（60 ng/mL 又は 300 ng/mL）は、ボトロセチン／von Willebrand 因子誘発性の血小板凝集を促進したが、この凝集は PGRMC1 阻害薬 AG205 との共培養により軽減した（Fan, 2015）。

DRSP は、卵巣摘出 Sprague-Dawley ラットに卵巣摘出術後 11 日～13 日目から、10 mg/kg/日までの用量で 3 日間又は 7 日間経口投与したとき、抗凝固因子である組織因子経路インヒビター及びアンチトロンビンの血漿中濃度に影響を及ぼさなかった（Shirk, 2005）。

*血管作用に関連する試験*

DRSP（100 nM を 30 分間）は、HUVEC 細胞において、eNOS 発現亢進がない状況で、NO 合成及び eNOS 活性化を迅速に誘導した。DRSP（0.1 nM～1 μM を 48 時間）は、HUVEC 細胞における NO 合成、eNOS 活性及び eNOS 発現を濃度依存的に増加させた。DRSP は E2 の迅速な増強作用を促進したが、E2 刺激性の eNOS 発現には影響しなかった。DRSP は、アルドステロン誘導性の急速な作用には影響を及ぼさなかったが、鉱質コルチコイド受容体媒介性のアルドステロンによる eNOS 発現減少を阻害した（Simoncini, 2007）。

内皮細胞への単球接着は、アテローム性動脈硬化症発症の初期段階の 1 つである。DRSP（100 nM）単独投与、若しくは E2（1 nM）又は EE（0.1 nM）との併用投与は、HUVEC 細胞における接着分子（E-セレクチン、P-セレクチン、ICAM-1、VCAM-1）の産生に影響を及ぼさず、HUVEC 細胞に対する U937 単球様細胞の接着数を増加させなかった（Ito, 2016）。DRSP（0.1 μM 又は 10 μM）は、女性の大動脈内皮細胞における E-セレクチン、MCP-1 及び PAI-1 の産生を低下させ、アルドステロンによるこれらの分子の増加を阻害した（Seeger, 2009）。これらのデータから、アテローム性動脈硬化症のリスクに関する懸念は示されていない。

DRSP の全般的な薬理学的プロファイル

DRSP は、天然ホルモンのプロゲステロンと同様の薬理学的プロファイルを有し、プロゲスチン活性、抗鉱質コルチコイド活性及び抗アンドロゲン活性を示す。

### 2.4.2.3 安全性薬理試験

#### 2.4.2.3.1 エステトロール水和物

ICH S7 に従って、安全性薬理コアバッテリー試験において、中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に対する E4 の潜在的作用を評価した。

雌の覚醒 Sprague-Dawley ラットの機能観察総合評価において、E4 は 15 mg/kg までの単回経口投与で影響を及ぼすことはなかった。150 mg/kg で投与後 1 時間及び 2 時間目に直腸温のわずかな低下が認められたが、対照群におけるこれらの時点の直腸温のわずかな上昇によって説明ができると考えられた（ES-T25、TS 表 2.6.3.4）。

ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子（hERG）を発現させた HEK-293 細胞において、28.17 μM 濃度の E4 では、hERG テール電流の振幅がわずか 7.1%低下したが、陽性対照 E-4031 では hERG テール電流の振幅が 83.6%低下した（ES-T30、TS 表 2.6.3.4）。

E4 は、テレメーターを装着した雌の覚醒カニクイザルにおいて、検討した最高用量である 100 mg/kg（ES-T23）までの単回経口投与で、心拍数、血圧又は心電図パラメータに影響を及ぼさず、不整脈を誘発しなかった（ES-T23、TS 表 2.6.3.4）。

E4 は、検討した最高用量である 150 mg/kg（ES-T24）までの単回経口投与で、雌の覚醒 Sprague-Dawley ラットの呼吸器系パラメータに影響を及ぼすことはなかった（ES-T24、TS 表 2.6.3.4）。

以上のデータから、中枢神経系、心血管系又は呼吸器系機能に対する E4 の潜在的有害作用に関する懸念の原因となるものは示唆されていない。

#### 2.4.2.3.2 ドロスピレノン

カニクイザルを用いた DRSP 及び E4 の 13 週間反復経口投与毒性試験では、6(4)[19] mg/kg/日の DRSP 単独投与群で、中枢神経系又は呼吸器系への影響を示唆する特記すべき臨床徴候は認められなかった。DRSP は、心電図パラメータ、心拍数及び血圧に影響を及ぼさなかった（0030-NC-002、モジュール 2.6.6.3.2）。

雌の覚醒 Wistar ラットに DRSP 10 mg/日を 21 日間皮下投与したところ、心拍数及び拡張期血圧に影響はなく、Day 6～10 以降に収縮期血圧のわずかな低下（4 mmHg）を誘発した（Krattenmacher, 1996）。

自然発症高血圧ラットに 10 mg/日を 27 日間皮下投与したとき、DRSP は細胞外液量及び血漿中 $Na^+$濃度を減少させ、収縮期血圧を低下させる傾向を示した（Berger, 1992）。

以上のデータから、中枢神経系、心血管系又は呼吸器系機能に対する DRSP の潜在的有害作用に関する懸念の原因となるものは示唆されていない。

[19] Day 50 以降、E4/DRSP 併用の高用量群の投与量を減量した。Day 53 に、E4 単独群及び DRSP 単独群の投与量を適宜減量した。

#### 2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験

##### 2.4.2.4.1 エステトロール

薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。E4 の高い選択性、E2 及び EE と比較して弱いエストロゲン作用並びに COC における後者の化合物の十分に確立された臨床プロファイルを考慮すると、薬力学的薬物相互作用に関連する試験は必要ないと考えられた。

##### 2.4.2.4.2 ドロスピレノン

薬力学的薬物相互作用に関する非臨床試験の公表文献は確認されていない。

### 2.4.3 薬物動態試験

#### 2.4.3.1 分析方法

##### 2.4.3.1.1 エステトロール

トキシコキネティクス試験における生体試料中薬物濃度測定は、定量下限を 25 又は 40 pg/mL とするバリデートされた液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析（LC-MS/MS）法又は超高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析（UHPLC-MS/MS）法を用いて実施した（ES-T07、ES-T08、ES-T14、ES-T28、0030-NC-015、0030-NC-016、0031-NC-021、0031-NC-024、0031-NC-025）。*In vitro* 血漿蛋白結合試験におけるリン酸緩衝生理食塩水中の E4 の薬物濃度測定は、定量下限を 50 pg/mL とするバリデートされた LC-MS/MS 法を用いて実施した（ES-T33）。バリデーションは GLP を遵守して実施した。

ヒト血漿を用いた測定法は、適切な選択性及び感度並びに許容可能な真度及び精度を示した。これらの測定法における定量下限値及び定量上限値は、それぞれ 25 pg/mL 及び 10,000 pg/mL であった（PR3053、モジュール 2.7.1）。

##### 2.4.3.1.2 ドロスピレノン

トキシコキネティクス試験における生体試料中薬物濃度測定は、定量下限を 1 ng/mL とするバリデートされた UHPLC-MS/MS 法を用いて実施した（0030-NC-014）。本分析法のバリデーションは GLP を遵守して実施した。

#### 2.4.3.2 吸収

##### 2.4.3.2.1 エステトロール

雌性 CD-1 マウス又は雌性 Sprague-Dawley ラットに 15 mg/kg の[$^{14}$C]-E4 を単回経口投与したとき、血液及び血漿のいずれにおいても、投与後 0.5 時間に最高濃度（$C_{max}$）の放射能が認められた（0031-NC-022、0031-NC-023、TS 表 2.6.5.3.A）。

雌性 Sprague-Dawley ラットを用いた予備試験において、皮下投与経路を対照とした E4 の経口バイオアベイラビリティは 70%以上と推定された（PR3002、TS 表 2.6.5.3.B）。

雌性カニクイザルに E4 を 1、100 又は 1000 mg/kg の用量で単回経口投与したとき、$T_{max}$（最高血漿中濃度到達時間）は用量の増加に伴って延長し、$C_{max}$ の増加は吸収相の遅延と一致して用量比例性を下回った（ES-T05、TS 表 2.6.5.3.B）。

反復経口投与トキシコキネティクス試験では、雌動物を用い、CD-1 マウスでは 30 mg/kg/日まで、Sprague-Dawley ラットでは 150 mg/kg/日まで、Wistar ラットでは 6 mg/kg/日まで、カニクイザルでは 50 mg/kg/日までの用量で E4 を評価した。

$T_{max}$ は雌マウス及び雌ラットで 0.5 時間、雌サルで 0.5 から 1.5 時間であり、速やかな吸収と一致した。$C_{max}$ 及び $AUC_{0\text{-}last}$（濃度測定可能最終時点までの濃度-時間曲線下面積）はいずれも用量の増加に伴って増加した。同じ動物種内の試験間で若干のばらつきが認められたが、E4 の全身曝露量は、マウスで 30 mg/kg/日、ラットで 50 mg/kg/日、サルで 30 mg/kg/日の投与量まで、用量比例性からの大きな逸脱を示さなかった。

血漿中消失半減期（$T_{1/2}$）はマウスで 1.4〜3 時間、ラットで 2〜6 時間であった。これらの数値と一致して、マウス及びラットに 1 日 1 回反復経口投与したとき、E4 の蓄積は認められなかった。単回及び反復投与後の $AUC_{0\text{-}last}$ は、マウスでは 10 mg/kg/日及びラットでは 15 mg/kg/日までの用量で同程度であった。いずれの動物種においても、高用量で反復投与後の $AUC_{0\text{-}last}$ は初回投与後よりもわずかに低値であった。同程度の用量で 13 週間投与したところ、Wistar ラットにおける E4 の全身曝露量（AUC に関して）は、Sprague-Dawley ラットよりもわずかに低い傾向が認められた。

サルでは、E4 の $T_{1/2}$ は 10〜19 時間であった。個体別の血漿中濃度-時間曲線から第 2 のピークの徴候が認められ、エストロゲンの既知の特性である腸肝循環が示唆された（Loose, 2006）。$AUC_{0\text{-}last}$ は、1 日 1 回反復投与後の方が初回投与後よりもやや高い傾向が認められた（ES-T31、ES-T34、ES-T40、0031-NC-004、ES-T10、ES-T18、ES-T39、0031-NC-003、ES-T11、ES-T15、ES-T20、TS 表 2.6.5.4.A.1〜2.6.5.4.A.5）。

交配済み／妊娠 Wistar ラット及び妊娠ニュージーランドホワイトウサギにおける $T_{max}$ は、それぞれ 0.5 時間及び 0.5〜3.0 時間であった。E4 に対する曝露量は、ラットでは 10 mg/kg/日まで、ウサギでは 0.45 mg/kg/日まで実質的に用量に比例した。ラットでは 10 mg/kg/日以上、ウサギでは 0.45 mg/kg/日の用量で、$C_{max}$ は初回投与後より反復投与後の方が低かった。これらの用量で、反復投与後の $AUC_{0\text{-}last}$ はラットでは初回投与後と比較して低かったが、ウサギでは初回投与後と比較してわずかに高かった（ES-T01、ES-T02、ES-T04、ES-T04-BR1031、ES-T19、TS 表 2.6.5.4.A.6）。

#### 2.4.3.2.2 ドロスピレノン

雌カニクイザルに DRSP を 6（4）[20] mg/kg/日の用量で 13 週間経口投与したところ、血漿中 DRSP 濃度は投与後 3.0 時間以内に $C_{max}$ に達し、これは中等度に速い吸収と一致するものであった。 DRSP に対する曝露量は、Day 1 と比較して Week 13 の方が低かったが、これは用量を減量したことでは部分的にのみ説明できた。$T_{1/2}$ は約 4〜7 時間であった（0030-NC-002、TS 表 2.6.5.4.B.1）。

女性における DRSP の経口バイオアベイラビリティは約 76%である。$T_{max}$ は経口投与後 1〜2 時間である。単回投与時の曝露量は用量 10 mg まで用量に比例して増加する。血漿中濃度は約 1 週間以内に定常状態に達し、反復投与時の曝露量はわずかな蓄積（2〜3 倍）を示す。$T_{1/2}$ は 25〜

[20] E4/DRSP を併用投与した高用量群の投与量は、一般状態の不良や早期屠殺のため、Day 50 以降に減量した。Day 53 に、E4 単独群及び DRSP 単独群の投与量を適宜減量した。

33 時間である。EE の併用投与は、DRSP の曝露量に対して意味のある影響を及ぼさない（Krattenmacher, 2000、Blode, 2012、Blode, 2000）。

#### 2.4.3.2.3 エステトロールとドロスピレノンの併用

雌カニクイザルに E4 と DRSP を 30/6（20/4）[21] mg/kg/日までの用量で 13 週間投与したとき、DRSP を併用投与することによって、E4 に対する全身曝露量が増加したが、E4 を併用投与しても DRSP の曝露量に影響は認められなかった。反復投与後、曝露量の増加は E4 ではほぼ用量比例性であり、DRSP では用量比例性を下回った。反復投与後の E4 に対する曝露量は初回投与後と同程度であったが、DRSP に対する曝露量は減少した。DRSP の $T_{1/2}$ は約 4〜7 時間、E4 の $T_{1/2}$ は 9 時間〜22 時間であった（0030-NC-002、TS 表 2.6.5.4.B.1）。

#### 2.4.3.2.4 エステトロールとレボノルゲストレルの併用

雌カニクイザルに E4 と LNG を 30/0.225（20/0.150）[22] mg/kg/日までの用量で 13 週間投与したとき、初回投与後では E4 に対する全身曝露量は LNG 併用投与の影響を受けず、E4 を併用投与しても LNG に対する曝露量に影響は認められなかった。反復投与後では、E4 は LNG に対する曝露量を増加させた[23]。初回投与後及び反復投与後のいずれにおいても、曝露量の増加は E4 ではほぼ用量に比例したが、LNG では用量比例性を下回った。反復投与後の E4 に対する曝露量は初回投与後と同程度であったが、LNG に対する曝露量は減少した。LNG の $T_{1/2}$ は約 4〜7 時間であり、E4 の $T_{1/2}$ は 10〜22 時間であった（0031-NC-018、TS 表 2.6.5.4.C.1）。

### 2.4.3.3 分布

#### 2.4.3.3.1 エステトロール

雌のアルビノ Sprague-Dawley ラット及び部分的有色の雌の Lister Hooded ラットにおいて、15 mg/kg の[$^{14}$C]-E4 の単回経口投与後、E4 やその代謝物の広範な組織分布が認められた。投与後の全ての時点で、肝臓で最も高い放射能濃度が認められた。アルビノラットでは投与後 48 時間（最終測定時点）まで、部分的有色ラットでは投与後 7 日までに、肝臓及び甲状腺（アルビノのみ）を除く全組織で放射能濃度は定量限界未満となった。光に曝露される組織（皮膚、眼など）における放射能は速やかに消失し、アルビノラットでは 24 時間以内に、部分的有色のラットでは 7 日までに定量限界未満となった。メラニン含有組織における長期滞留の徴候は認められなかった（0031-NC-022、TS 表 2.6.5.5）。

雌マウス（CD-1）、ラット（Sprague-Dawley）、サル（カニクイザル）及びヒト血漿中で、E4 は中等度の蛋白結合（45%〜67%）を示した。動物の血漿では 937.8 ng/mL まで、ヒト血漿では 46.9 ng/mL まで、種差や濃度依存性は認められなかった（ES-T33、TS 表 2.6.5.6.A）。

---

[21] Day 50 に一般状態不良や早期屠殺のため、30/6 mg/kg/日の用量を 20/4 mg/kg/日に減量した。Day 53 に E4 単独群及び DRSP 単独群の用量を減量した。

[22] Day 51 に一般状態不良や早期屠殺のため、30/0.225 mg/kg/日の用量を 20/0.150 mg/kg/日に減量した。同日に E4 単独投与群及び LNG 単独投与群の用量を減量した。

[23] E4 単独投与群では血漿検体に LNG の混入が認められたため、Week 13 の E4 曝露量に対する LNG の影響は評価できなかった。

[$^3$H]-ジヒドロテストステロン又は[$^3$H]-E2 をリガンドとする競合的結合アッセイにおいて、E4 はヒト SHBG に結合しなかった（PR3025、TS 表 2.6.5.6.B）。

*In vitro* で、1 μM までの E4 はヒト血液中で血漿と血球に均等に分布した（0031-104、TS 表 2.6.5.8.A、モジュール 2.7.2）。

E4 やその代謝物の胎盤通過性に関する試験は実施していない。しかし、E4 は妊娠期間中にヒト胎児の肝臓で産生される天然型エストロゲンであり（Holinka, 2008b）、妊娠女性の血漿・血清及び尿中にも妊娠の進展とともに胎児由来の E4 が認められること（Coelingh Bennink F, 2008、Heikkilä, 1971）から、E4 がヒトにおいて胎盤を通過することは既知であると考えられる。

E4 やその代謝物の乳汁中への排泄に関する試験は実施していない。しかし、E4 と同じくステロイド骨格を有する他のエストロゲン（Wijmenga, 1969、Nilsson, 1978a 及び 1978b）やプロゲスチン（Van der Molen, 1969、Nilsson, 1977a 及び 1977b）はヒトで乳汁中に移行することが報告されており、E4 も同様に乳汁中に移行する可能性はあると考えられる。

#### 2.4.3.3.2 ドロスピレノン

ヒトにおける DRSP のみかけの分布容積は平均で 3.7 L/kg である（Blode, 2002）。

DRSP のヒト血清蛋白結合率は 95%～97%である。DRSP は SHBG 及びコルチコステロイド結合グロブリンと結合しない（Krattenmacher, 2000）。

DRSP やその代謝物の胎盤通過性に関する公表文献は確認されていない。ヒト乳汁中への DRSP の移行率（24 時間）は、投与量の約 0.02%であった（Blode, 2001）。

### 2.4.3.4 代謝

#### 2.4.3.4.1 エステトロール

*In vitro* で、E4 はマウス（CD-1）、ラット（Sprague-Dawley）、ウサギ（ニュージーランドホワイト）、サル（カニクイザル）及びヒト肝細胞によって広範に代謝された（表 2.4-1、 図 2.4-2）。

代謝経路は、直接グルクロン酸抱合及び硫酸抱合、水酸化＋硫酸抱合、水酸化＋メチル化並びに水酸化＋メチル化＋グルクロン酸抱合／硫酸抱合であった。E4-3-グルクロニド（A 環、代謝物 M1）を除き、代謝物の正確な構造は同定できなかった。

グルクロン酸抱合及び硫酸抱合は、すべての動物種の肝細胞における主たる反応であった。ヒト肝細胞では、D-環の直接グルクロン酸抱合及び未確認部位の直接硫酸抱合により生成された 2 つの代謝物のみが認められた。これらの代謝物は他の動物種、特にラット及びサルでも生成された。ラット肝細胞における重要な代謝経路はメチル化反応であった。3 種類のマウス系統（CD-1、B6C3F1 及び C57BL/6）由来の肝細胞は、E4 の代謝において系統差を示さなかった（PR3041、ES-T06、ES-T32、TS 表 2.6.5.10.A～2.6.5.10.C）。

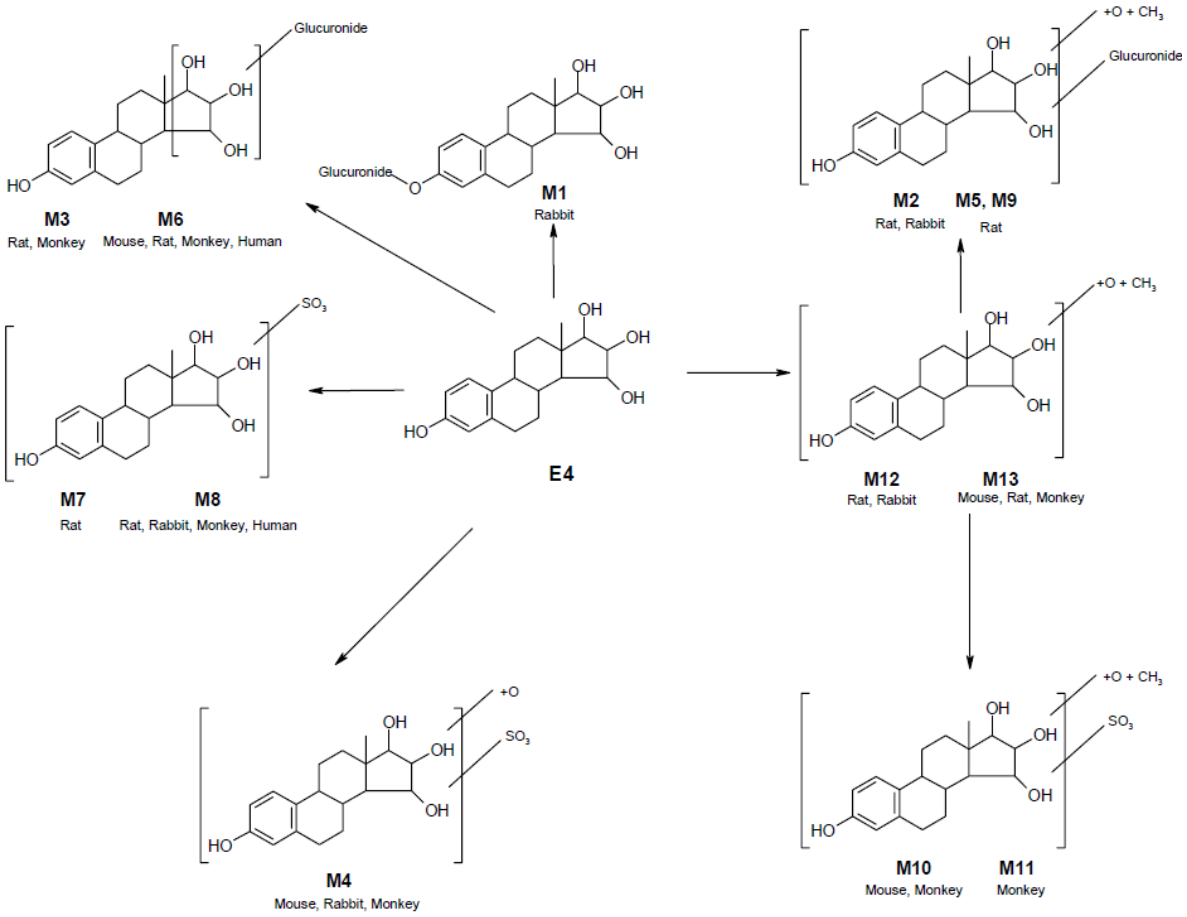



図 2.4-2 複数の動物種の肝細胞における推定代謝経路（ES-T06）

表 2.4-1 複数の動物種の肝細胞における代謝物（ES-T06）

| Species | Metabolites Observed[1] | Main Metabolic Pathways |
|---|---|---|
| Mouse | M4, M6, M10, M13 | Hydroxylation + sulfation (M4) |
| Rat | M2, M3, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11, M12, M13 | Hydroxylation + methylation + glucuronidation (M2, M5)<br>Glucuronidation (D-ring) (M6)<br>Sulfation (M8) |
| Rabbit | M1, M2, M4, M8, M12 | Glucuronidation of 3-OH (A-ring) (M1) |
| Monkey | M3, M4, M6, M8, M10, M11, M13 | Glucuronidation of D-ring (M3, M6)<br>Sulfation (M8) |
| Human | M6, M8 | Glucuronidation of D-ring (M6)<br>Sulfation (M8) |

[1] Metabolites representing ≥10% of total peak area at t=4 hours are underlined

雌 CD-1 マウスに[$^{14}$C]-E4 を 15 mg/kg の用量で単回経口投与したとき、尿中の主要代謝物はヒドロキシ-E4-硫酸であり、糞中の主要化合物はヒドロキシ-E4-硫酸及びヒドロキシ-E4-ケトンであった。雌 Sprague-Dawley ラットに[$^{14}$C]-E4 を 15 mg/kg の用量で単回経口投与したとき、糞中の主要代謝物はヒドロキシ-E4 であり、胆汁中では E4-グルクロニドであった。正確な置換基の付加位置は確定されなかった。予備試験で、ラットの尿中代謝物として 2-ヒドロキシ-3-メトキ

シ-E4 が同定された（ES-T35、0031-NC-022、0031-NC-023、TS 表 2.6.5.9.A 及び B、2.6.5.11、2.6.5.13）。

種間比較試験において、ヒトの血漿及び尿中に認められた 2 つの主要なグルクロニドは、合成標準物質とのコクロマトグラフィーにより E4-3-グルクロニド及び E4-16-グルクロニドと同定された。E4-16-グルクロニドが量的に最も重要であり、$T_{max}$ におけるヒト血漿中 E4-3-グルクロニド及び E4-16-グルクロニドの濃度は、それぞれ約 35 及び 142 ng eq/mL であった。E4-3-グルクロニド及び E4-16-グルクロニドの 0～120 時間の尿中排泄率は、それぞれ投与量の 15.9%及び 46.0%であった（MIT-Es0001-C105 臨床試験のデータ、モジュール 2.7.2）。ヒト血漿中のその他の代謝物は E4-グルクロニド-硫酸抱合体（約 25 ng eq/mL）であった。硫酸置換基の位置は C3 であり、グルクロニド置換基の位置は C16 の可能性が高いと考えられた。

E4-3-グルクロニドはマウス及びラット血漿中においても重要な代謝物であり、15 mg/kg 単回経口投与後の $T_{max}$ における濃度はそれぞれ 507 及び 309 ng eq/g であった。また、この代謝物はマウス尿中及びラット胆汁中でも認められた。

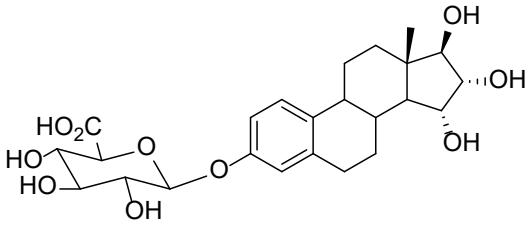
E4-16-グルクロニドはマウス検体又はラット血漿中では有意な量では認められなかったが、0～24 時間のラット尿中（投与量の 1.5%）及びラット胆汁中（投与量の 13.0%）では重要な代謝物であった。データからこの動物種では、投与された E4 の 14.5%以上が C16-グルクロニドに変換されることが示された。

E4-グルクロニド-硫酸抱合体はラット胆汁中にごくわずかに認められた。

同定されたヒトのグルクロニドに加えて、E4-15-グルクロニドが複数のマウス及びラット検体で認められた［Es0001-NC-012、Es0001-NC-010、MIT-Es0001-C105（モジュール 2.7.2）、TS 表 2.6.5.9.D］。

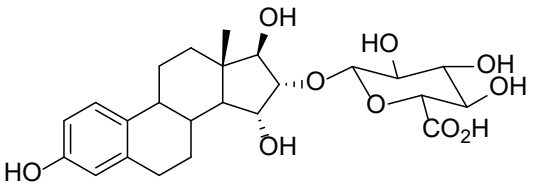
マウスやラットで同定されたヒト代謝物を図 2.4-3 に示す。

**estetrol-3-glucuronide**




Observed in: mouse plasma, rat plasma, mouse urine, rat bile

**estetrol-16-glucuronide**




Observed in: rat urine, rat bile

図 2.4-3 マウスやラットで同定されたヒト代謝物（Es0001-NC-012）

E4 のヒト血漿中主代謝物である E4-3-グルクロニド及び E4-16-グルクロニドは、サルの血漿中にも認められた（Es0001-NC-016、TS 表 2.6.5.9.C）。

総合して、ヒトに特異的な代謝物を示唆するものはなかった。マウス、ラット及びサルを用いた反復投与毒性試験でそれぞれ 30 mg/kg/日、150 mg/kg/日及び 50 mg/kg/日までの用量が投与されたことを考慮すると、ヒトの主要なグルクロニド 2 種の潜在的毒性は適切に評価されたと考え

られる［Es0001-NC-012、Es0001-NC-010、MIT-Es0001-C105（モジュール 2.7.2）、TS 表 2.6.5.9.C］。

ヒト CYP（PR3100, 0031-102）、UGT（0031-106, Es0001-NC-011）及び SULT（PR3099）が E4 の酸化的代謝及び抱合に果たす役割を評価する試験を実施した。これらの試験はモジュール 2.7.2 に示し、詳細に考察する。

これらの試験の結論は以下のとおりであった。

- ヒト CYP は E4 の *in vitro* 肝代謝に主要な役割を果たしていないと考えられる。
- UGT2B7 は *in vitro* で E4-16-グルクロニドの生成を触媒する主要な UGT アイソフォームである。
- SULT1E1 は、*in vitro* で直接硫酸抱合体（E4-3-硫酸と思われる）の生成を触媒する主要な SULT アイソフォームである。

#### 2.4.3.4.2 ドロスピレノン

ヒト肝細胞により生成される主要代謝物は、ラクトンの還元／硫酸化及び開環によって生成される（Wiesinger, 2015）。

ヒト血漿中の主要代謝物は DRSP の酸性型及び 4,5-ジヒドロドロスピレン-3-硫酸である。尿及び糞中に検出される DRSP は微量であり、代謝物の大部分はグルクロン酸抱合体及び硫酸抱合体である（Krattenmacher, 2000）。

### 2.4.3.5 排泄

#### 2.4.3.5.1 エステトロール

雌性 CD-1 マウス及び雌性 Sprague-Dawley ラットに 15 mg/kg の[$^{14}$C]-E4 を単回経口投与したとき、投与後 7 日までに排泄は完了し、投与量の大部分は糞中に回収された（マウスで 67%、ラットで 87%）（0031-NC-022、0031-NC-023、TS 表 2.6.5.13）。投与した放射能の大部分は最初の 24 時間以内に排泄された。

#### 2.4.3.5.2 ドロスピレノン

女性における DRSP 及びその代謝物の排泄は投与後 10 日以内にほぼ完了し、未変化体としての尿及び糞中への排泄はごくわずかである（Krattenmacher, 2000、Blode, 2002）。

### 2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用

#### 2.4.3.6.1 エステトロール

ヒト CYP 酵素に対する E4 の誘導能（0031-100、Es0001-NC-019）、ヒト CYP 酵素（PR3038、0031-101）又は UGT（0031-105）に対する E4 の阻害能、及びヒト CYP 酵素に対する E4 代謝物の阻害能（Es0001-NC-017）を評価する試験を実施した。

また、ヒト Caco-2 細胞における双方向輸送（0031-NC-017）、基質又は阻害薬としての E4 と ABC 排出トランスポーター（0031-103、Es0001-NC-013）又は SLC 取込み及び排出トランスポーター（0031-107、Es0001-NC-020、Es0001-NC-021）との相互作用、並びに E4 代謝物と ABC 及び SLC トランスポーターとの相互作用（Es0001-NC-018）を検討する試験も実施した。

これらの試験をモジュール 2.7.2 に示し、詳細に考察する。

#### 2.4.3.6.2 ドロスピレノン

DRSP と CYP 酵素及びトランスポーターとの相互作用の可能性に関して公表されているデータをモジュール 2.7.2 に示す。

### 2.4.4 毒性試験

#### 2.4.4.1 単回及び反復投与毒性試験

##### 2.4.4.1.1 エステトロール

E4 は単回経口投与毒性試験で低毒性を示した。1000 mg/kg の単回経口投与は、雌 Sprague-Dawley ラット及び雌カニクイザルにおいて忍容性は良好であった（ES-T09、ES-T05、TS 表 2.6.7.5）。

E4 の反復経口投与毒性試験は、雌 Sprague-Dawley ラットで最長 26 週間、雌カニクイザルで最長 39 週間実施した。同一動物種及び系統におけるがん原性試験の適切な用量を確立するため、雌 CD-1 マウス及び雌 Wistar Han ラットを用いて最長 13 週間の試験を実施した。E4 を 30 mg/kg/日までの用量で雌マウスに、150 mg/kg/日（Sprague-Dawley）又は 6 mg/kg/日（Wistar Han）までの用量で雌ラットに、50 mg/kg/日までの用量で雌サルに投与した（ES-T31、ES-T34、ES-T40、ES-T09、ES-T10、ES-T18、ES-T39、ES-T11、ES-T15、ES-T20、TS 表 2.6.7.6 及び 2.6.7.7.A.1～2.6.7.7.A.8）。

投与に関連した死亡は認められなかった。マウスでは用量依存的な体重増加量の増大、ラット及びサルでは用量依存的な体重増加量の減少又は体重減少が認められた。体重増加量の変化は摂餌量の変化を伴っていた。体重増加量の減少は、ラット及びサルにおいて一般にエストロゲンの投与に伴って認められ、マウスでも報告されているが、マウスでは初期に体重増加量が増大する可能性がある（Heywood, 1980、Hart, 1990）。ラットでは、エストロゲンが食物摂取を大きく阻害することが知られており、肥満の治療として提唱されている（Santollo, 2008、Geary, 1999）。ラット及びマウスの体重変化に関与するいくつかのメカニズム（摂餌量及びエネルギー恒常性に関与する遺伝子の発現など）は、種特異的であると報告されている（Witte, 2010、Kim, 2010）。さらに、マウスの体重増加量に対する E4 の他とは異なる作用の原因は、種特異的なエストロゲン誘発性の尿閉に関連する可能性がある（Kuroda, 1985、Buhl, 1985、Pearse, 2009）。

ラット及びサルで認められた投与に関連した臨床徴候は、脱毛及び削痩などであった。病理組織学的検査では、毛包の萎縮や空の毛包が両動物種の皮膚に認められた。エストロゲンは毛包周期を阻害することが知られており（Hu, 2012、Schardein, 1980、Ohnemus, 2006、Kroeker, 2014）、この所見は毒性とはみなされなかった。

1 mg/kg/日以上の用量で E4 を投与したカニクイザルでは、投与開始後 1 箇月以内に性周期が停止した。1.5 mg/kg/日以上を 26 週間投与したラットの大多数及び 1 mg/kg/日以上を 13 週間投与したマウスの大多数では、発情周期段階を判定することができなかった。これらの所見は、E4 の薬理学的特性と一致している。

評価したすべての動物種で、一般に肉眼的所見や病理組織学的所見を伴う生殖組織重量の変化が認められた。卵巣、卵管、子宮、腟、乳腺及び下垂体には、E4 の薬理活性を反映する病理組織学的変化が認められたが（Hart, 1990）、毒性とは判断しなかった。

評価したすべての動物種で、赤血球パラメータの軽微から中等度の減少が認められた。ラットでは、白血球パラメータ（リンパ球、好酸球）の用量依存的な減少も認められた。ラット及びサルを用いた一部の試験では、骨髄における細胞充実性の軽微から軽度の減少が認められた。この所見は E4 のエストロゲン特性（Hart, 1990）と一致しており、毒性ではないと判断された。

ラットで褐色色素沈着の増加（ヘモジデリンと推定）、マウス及びラットの脾臓で造血亢進が認められた。これらの所見は、観察された赤血球パラメータの減少と関連している可能性が高かった。

胸腺重量はすべての動物種で減少し、軽微から重度のリンパ萎縮を伴っていた。ラット及びサルの脾臓でも軽微から中等度のリンパ萎縮が認められ、サルでは胚中心の発達がわずかに低下した。胸腺萎縮はエストロゲンの既知の作用である（Hart, 1990、Pearse, 2006）。二次感染が認められなかったことから、これらの所見は毒性ではないと判断された。

ラットでは、凝固時間（特にプロトロンビン時間）に軽微から中等度の延長が認められた。いくつかの血液生化学的検査パラメータでは、投与に関連した軽微から中等度の変化が認められた。これらの変化は、総蛋白及びアルブミン（ラットで増加、サルで減少）、総コレステロール（ラットで減少、サルで増加）、トリグリセリド（全動物種で増加）、アルカリホスファターゼ（マウス及びラットで増加、サルで減少）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（サルで増加）並びにγ-グルタミルトランスフェラーゼ（サルで減少）などであった。マウス及びラットで肝臓重量の増加が認められた。肝臓の病理組織学的変化として、マウス及びラットで軽微から中等度の肝細胞肥大、ラットで軽微から中等度の肝細胞微小空胞化、サルでグリコーゲン量の減少が認められた。エストロゲン投与に伴い、肝病理組織学的検査パラメータ、血清生化学検査パラメータ及び凝固パラメータに対する様々な作用が報告されている（Hart, 1990、Maier, 2001、Heywood, 1980）。病理組織学的な変性変化が認められなかったことから、これらの所見は毒性ではないと判断された。

その他、投与に関連した軽微～中等度の変化を示す血清生化学的パラメータは、無機リン（マウス及びラットで増加）、尿素（マウスで減少）及びクレアチニン（マウス及びラットで減少）であった。ラットの腎臓では、軽微から中等度の褐色色素沈着（リポフスチン又はヘモジデリン）及び軽微から軽度の尿細管拡張や尿細管細胞空胞化が認められた。腎臓における褐色色素の沈着はエストロゲン曝露の結果として報告されている（Monserrat, 1978、Harris, 1966）。エストロゲンは、NaPi-II トランスポーターを上方制御及び下方制御することにより、それぞれ無機リン酸塩の腸吸収を促進し（Xu, 2003）、また近位尿細管における無機リン酸塩の再吸収を抑制すると報告されている（Uemura, 2000、Webster, 2016）。病理組織学的検査で腎臓の変性変化が認められなかったことから、これらの所見は毒性ではないと考えられた。

副腎では、マウスにおける紡錘形細胞過形成及び X 帯変性、ラットにおけるびまん性皮質肥大、カニクイザルにおける網状層萎縮を伴う束状層肥大などの変化が認められた。紡錘形細胞過形成はマウス副腎で一般的な加齢に伴う所見であり、性腺摘出により増強される（Greaves, 2007）。ラット及びサルにおける副腎皮質の変化は、E4 のエストロゲン特性と一致し（Hart, 1990）、毒性ではないと判断された。

マウス及びラットで大腿骨の骨梁の増加が認められたが、これは E4 のエストロゲン特性と一致しており（Tobias, 1991）、毒性ではないと判断された。

すべての変化は投与中止後に可逆性を示したが、投与後の期間終了時に、必ずしも対照値まで完全に回復しなかった。

反復投与毒性試験で観察された作用は、E4 の薬理学的特性によって説明できるもので、NOAEL の決定は主に体重（増加量）の減少に基づくものであった。長期反復投与試験における NOAEL は、ラットで 5 mg/kg/日、サルで 3 mg/kg/日であった。これらの用量における投与終了時の $AUC_{0\text{-last}}$ 及び $C_{max}$ は、ラットで 736 ng·hr/mL 及び 238 ng/mL、サルで 328 ng·hr/mL 及び 97.2 ng/mL であった。

#### 2.4.4.1.2 ドロスピレノン

ICH M3（R2）に従い、DRSP の単回投与毒性データは不要である。カニクイザルを用いた 13 週間反復併用投与毒性試験の DRSP の単独投与群における 6(4)[24] mg/kg/日での曝露量は、E4 15 mg/DRSP 3 mg を投与した妊娠可能な女性（WOCBP）における Day 1 又は定常状態での臨床曝露量の 6〜28 倍であり、忍容性は良好であった（0030-NC-002、TS 表 2.6.7.7.B.1）。

カニクイザルを用いた 13 週間反復併用投与毒性試験で用量 6(4)mg/kg/日における DRSP の注目すべき所見は以下に限られた：

- インスリン濃度のわずかな増加
- 性周期の停止、生殖組織及び乳腺の重量変化や病理組織学的所見
- 血清アルドステロンの上昇、軽微から軽度の球状層肥大を伴う副腎重量の増加
- 肝臓グリコーゲン含有量のわずかな低値

これらの所見は DRSP の薬理学的特性（プロゲスチン特性及び抗鉱質コルチコイド特性）を反映するものであった。毒性とみなされた所見は認められなかった（0030-NC-002、TS 表 2.6.7.7.B.1）。

#### 2.4.4.1.3 エステトロールとドロスピレノンの併用

雌カニクイザルを用いた 13 週間毒性試験で、E4 30 mg/kg/日/DRSP 6 mg/kg/日までの投与量で DRSP と併用した場合の E4 を評価した（0030-NC-002、TS 表 2.6.7.7.B.1）。

30/6 mg/kg/日を投与した雌 3 例は、重度の高血糖及び関連する変化のため、Day 45 又は 47 に早期屠殺した。Day 50 に 20/4 mg/kg/日に減量した後も高血糖が発現し、20/4 mg/kg/日投与群の雌 1 例及び 10/2 mg/kg/日投与群の雌 1 例では 2 日間の休薬を要した。経口避妊薬は糖代謝障害と関連する。耐糖能低下、末梢インスリン抵抗性及び関連する高血糖は、エストロゲン／プロゲスチン配合剤の既知のリスクである（[redacted], 20[redacted]、De Oliveira, 2019）。プロゲスチンはインスリン抵抗性を誘発する可能性がある。エストロゲンはコルチゾール濃度を上昇させることによりこの作用を増強する可能性がある。コルチゾールはインスリンの活性及びその代謝作用に拮抗する。さらに、コルチゾールはトリプトファンの代謝に影響を及ぼしてキサンツレン酸を蓄積させると考えられ、その結果、キサンツレン酸はインスリンと複合体を形成してその活性を低下させると思われる（[redacted], 20[redacted]）。E4 を単独又は DRSP と併用投与したサルでは、コルチゾール濃度が

[24] E4/DRSP を併用投与した高用量群の投与量は、臨床状態不良や早期屠殺の理由により、Day 50 以降に減量した。Day 53 に、DRSP 単独群の投与量を減量した。

上昇したが、個々の動物ではグルコース濃度との相関は認められなかった。高血糖は毒性とみなされる。

生存動物における臨床所見は、30/6（減量後 20/4） mg/kg/日で認められた一過性の低体温及び歯肉の蒼白化のみであった。E4/DRSP に体重に対する影響は認められなかった。

生殖組織の変化は、E4 及び DRSP の薬理活性を反映しており、主にプロゲステロン作用である卵管、子宮及び腟の所見並びに両化合物に起因する卵巣、乳腺及び下垂体への影響が認められた。雌ではすべての用量（≥3/0.6 mg/kg/日）で投与開始後に性周期が停止した。

血液学的検査及び血液生化学検査パラメータの変化の重症度は軽微から中等度であり、血糖値の上昇（≥10/2 mg/kg/日の投与量での併用投与時のみに認められた）及びアルドステロン値の上昇（DRSP の抗鉱質コルチコイド活性による）を除き、ほとんどが E4 単独投与によって誘発された変化と同等であった。

リンパ組織での所見（リンパ萎縮や胸腺及び脾臓の重量減少を伴う胚中心の発達の欠如又は低下）は E4 に起因するものであり、二次感染がないことからは毒性ではなかった。

E4 単独投与では肝臓におけるグリコーゲン含量の軽度から中等度の減少も認められたが、病理組織学的な変性変化がないことから、毒性ではないと考えられた。

副腎における所見は、球状層の軽微～軽度の肥大及び網状層の中等度の萎縮からなり、それぞれ E4 及び DRSP（抗鉱質コルチコイド活性）に起因すると考えられた。これらの変化は毒性ではないと判断した。

皮膚の病理組織学的変化（毛包の萎縮）は E4 に起因するものであるが、毒性ではないと判断した。

ヘマトキシリン／エオジン染色した心臓の病理組織学的検査では、特筆すべき所見は認められなかったが、E4/LNG 併用試験（0031-NC-018、2.4.4.1.4 項を参照）で毒性として心臓所見が認められたため、その後、マッソントリクローム染色による詳細な評価を実施した。心筋細胞の軽微な空胞化を伴う軽微な間質性の線維症は、30/6（減量後 20/4） mg/kg/日の雌 2 例（早期死亡例 1 例を含む）の心臓に特殊染色を施した後にのみ認められた。サル 1 例でも軽微な心筋細胞の肥大が認められた。これらの変化は軽微かつ散発的であり、投与後の休薬により回復した動物では認められなかった。したがって、これらは本試験の条件下では毒性ではないと判断された。さらに、E4/DRSP を投与したサルの心臓の病理組織学的変化には、E4/LNG を投与し、影響を受けた動物で観察された肉眼的変化（左室壁肥厚及び左室腔容積の減少）を伴うことはなかった（2.4.4.1.4 項を参照, [redacted], 20[redacted]）。

すべての変化は投与中止後に可逆性を示したが、投与後の期間終了時に、必ずしも対照値まで完全に回復しなかった。

反復投与毒性試験で観察された作用は、E4 及び DRSP の薬理学的特性と一致した。NOAEL は、高血糖及び関連する早期屠殺に基づいて決定し、3/0.6 mg/kg/日であった。これらの投与量における投与終了時の $AUC_{0\text{-last}}$ 及び $C_{max}$ は、E4 では 483 ng·hr/mL 及び 173 ng/mL、DRSP では 630 ng·hr/mL 及び 105 ng/mL であった。

#### 2.4.4.1.4 エステトロールとレボノルゲストレルの併用

雌カニクイザルを用いた 13 週間毒性試験において、30/0.225 mg/kg/日までの投与量で LNG と併用した場合の E4 を評価した（0031-NC-018、TS 表 2.6.7.7.C.1）。

30/0.225 mg/kg/日を投与した雌 1 例は、重度の高血糖及び関連する変化のため Day 47 に早期屠殺となった。20/0.150 mg/kg/日への減量後も個々の動物に高血糖が認められ、雌 1 例で 2～4 日間の投与中断に至った。2.4.4.1.3 項に示したように、高血糖はエストロゲンとプロゲスチン併用で発現する可能性があることが知られており、毒性とみなされる。

30/0.225 （減量後 20/0.150） mg/kg/日を投与した別の雌が Day 83 に死亡した状態で発見されたが、死亡以前に臨床徴候は認められなかった。死亡原因は主に左心室の萎縮及び線維化であった。30/0.225 （減量後 20/0.150） mg/kg/日群の別の雌 2 例及び 10/0.075 mg/kg/日群の雌 1 例に、心臓の病理組織学的所見（軽微な心筋細胞の空胞化を伴う軽微な間質性の線維症並びに軽微から軽度の左室及び中隔の筋線維の肥大）が認められた。E4 単独投与した雌 1 例でも、軽微な心臓の病理組織学的変化が認められたが、この群の血漿検体が LNG で汚染されたため、これらの所見を E4 投与に帰することはできなかった。

高用量群では心拍数のわずかな増加と PQ 間隔の短縮及び収縮期血圧の低下が認められたが、病理組織学的所見との明らかな相関は認められなかった。全体的な心臓の変化は、E4/LNG の併用により増強されるようであった。

[redacted]（20[redacted]）は、サルを用いた E4 の 39 週間試験及びサルを用いた E4/DRSP 併用と E4/LNG 併用の 13 週間試験 2 件から得た心臓の病理組織スライドについて、独立した専門家レビューを実施した。このレビューにより、報告された心臓の病理組織学的所見が確認され、さらに、心筋細胞及び（細胞内）筋原線維の錯綜配列を伴うことが認められた。病理組織学的変化は左室壁及び心室中隔の主に中輪層に認められた。変化が認められた動物では、病理組織学的変化に加えて、左室壁肥厚、左室腔容積の減少、心臓重量の増加及び乳酸脱水素酵素値の上昇傾向が認められた。全体的な所見は、ヒトの肥大型心筋症で報告されている所見と極めて類似している。E4 を用いた 39 週間試験（ES-T20、[redacted], 20[redacted]）の溶媒投与動物 1 例の心臓でも、上述の肉眼的及び病理組織学的変化が認められたことから、この肥大型心筋症はカニクイザルで自然発生すると考えられる。これと一致して、最近、Konishi（2018）により 11 歳の雄カニクイザルで自然発生の肥大型心筋症の症例が報告され、心臓の顕微鏡所見は E4/LNG 併用で報告された所見とほぼ同一であった（0031-NC-018、[redacted], 20[redacted]）。他の著者ら［特に Zabka（2009）］が報告しているカニクイザルで自然発生する心臓所見とも類似する。モーリシャス原産カニクイザル（E4 の試験で使用）は、他の起源のカニクイザルより自然発症の心筋症に感受性が高いことが知られている（[redacted], 20[redacted]、[redacted], 20[redacted]）。ヒト肥大型心筋症の発病機序には、サルコメアタンパク質をコードする変異遺伝子の肥大刺激による上方制御が含まれる。カニクイザルのサルコメア遺伝子突然変異については現在のところ同定されていないが（Konishi, 2018）、病理組織学的検査で同様の結果が得られたことから、同様の発症機序の仮説が支持される。

E4 30（減量後 20） mg/kg/日/LNG 0.225（減量後 0.150） mg/kg/日を投与した生存動物では、乳頭からの白色分泌物の発現が一過性に認められたほか、全身性脱毛症の発現率がわずかに高かった。E4/LNG 併用投与に体重に対する影響は認められなかった。

生殖組織の変化は、E4 及び LNG の薬理活性を反映しており、主にプロゲステロン作用である卵管、子宮及び膣の所見並びに両化合物に起因する卵巣、乳腺及び下垂体への影響が認められた。雌ではすべての用量（≥3/0.0225 mg/kg/日）で投与開始後に性周期が停止した。

血液学的検査及び血液生化学検査パラメータ（高血糖を除く）の変化は、軽微～中等度であり、E4 単独投与による変化とほぼ同程度であった。

その他の病理組織学的変化（骨髄の細胞充実性の軽微な低下、皮膚における毛包の萎縮や空の毛包、リンパ萎縮やリンパ節、脾臓及び胸腺における胚中心の発達の欠如又は低下（胸腺重量の低下を伴う）は、E4 の特性を反映しており、毒性とは判断しなかった。

心臓の病理組織学的所見を除き、すべての変化は投与中止後に可逆性を示したが、投与後の期間終了時に、必ずしも対照値まで完全に回復しなかった。

観察された影響は、心臓の病理組織学的所見を除き、E4 及び LNG の薬理学的特性に起因する可能性がある。心臓の観察所見及び関連する死亡に基づいて NOAEL を決定し、3/0.0225 mg/kg/日であった。これらの用量における投与終了時の $AUC_{0\text{-last}}$ 及び $C_{max}$ は、E4 が 282 ng·hr/mL 及び 87.1 ng/mL、LNG が 145 ng·hr/mL 及び 20.7 ng/mL であった。

### 2.4.4.2 遺伝毒性試験

#### 2.4.4.2.1 エステトロール

ネズミチフス菌株の TA1535、TA1537、TA98 及び TA100 又は大腸菌株の WP2 uvrA を用いたエームス試験では、代謝活性化の有無にかかわらず、上限濃度 5000 µg/プレート［ICH S2(R1)］までの濃度で、E4 の変異原性は認められなかった。ネズミチフス菌株 TA102 では、代謝活性化の有無にかかわらず 2 つの試験で復帰変異コロニー数の増加が認められたが、別の試験施設で実施した 3 回目の試験では認められなかった。これらの増加は、1250 µg/プレートの濃度から認められ、5000 µg/プレートでは陰性対照の 3〜4 倍に達した（ES-T21、ES-T29、ES-T48、TS 表 2.6.7.8.A〜2.6.7.8.C）。試験施設間の再現性欠如の原因は、完全には明らかではない。しかし、菌株を用いた試験（TA102 及び WP2 uvrA）において陰性対照と陽性対照の反応に認められた差は、菌株感受性の差を反映している可能性がある（[redacted], 20[redacted]）。

E4 が TA102 株で弱い変異原性を引き起こす作用機序は不明であった。TA102 株は酸化変異原と架橋化剤をいずれも検出する。E4 の 2-又は 4-位の水酸化により生成されるカテコール代謝物は、酸化還元サイクル及び活性酸素種（ROS）の生成を誘発する可能性がある。これらの生成は、S9 ミックス存在下での反応の説明となるが、S9 ミックス非存在下での反応の説明とはならない。さらに、マウスリンフォーマ細胞における ROS の誘導に関する試験では、E4 の酸化促進特性よりも抗酸化特性が示唆された（ES-T44; TS 表 2.6.7.17）。DNA アルキル化剤としてのキノロンの生成には、最初のステップとして、水酸化してカテコールとなる必要があるため、同様に S9 ミックスがない場合の所見を説明することはできない（ES-T21, ES-T29, ES-T48; TS 表 2.6.7.8.A〜2.6.7.8.C）。しかし、マスバランス試験のヒト血漿や尿の分析から得られた質量分析データを用いて、E4 の水酸化代謝物の有無を検討したところ、マスバランス試験の検体に、E4 の水酸化代謝物は認められなかった［Es0001-NC-015; 第 2 部（7.2）］。

最初のマウスリンフォーマ試験で、E4 は代謝活性化の存在下で突然変異頻度の上昇を引き起こし、875 及び／又は 1000 µg/mL の濃度では総合的評価ファクターの閾値（$126\times10^{-6}$）を超えた。これらの濃度は沈殿濃度であり（潜在的交絡因子）、1000 µg/mL の場合は毒性が高かった（補正後相対総増殖率の 90%超の低下）。E4 は、マウスリンフォーマ試験のフォローアップ試験において、代謝活性化の有無にかかわらず、1 mM（304 µg/mL）の限界濃度までの非沈殿濃度において遺伝子突然変異を誘発しなかった（ICH S2(R1)）（ES-T22、ES-T45、TS 表 2.6.7.8.D 及び E）。

*In vivo* では、2000 mg/kg の上限量までの投与量を単回経口投与した雌 Sprague-Dawley ラットの骨髄小核試験で、E4 は陰性であり［ICH S2(R1)］、概算 $T_{max}$（0.5 時間）での平均血漿中濃度は 42.4 µg/mL であった（ES-T37、TS 表 2.6.7.9.A）。

ネズミチフス菌株 TA102 を用いたエームス試験における E4 の所見を考慮して、遺伝毒性試験のプログラムにコメット試験を追加した。雌 Sprague-Dawley ラットを用いて 2 回の試験を実施した（ES-T46、0030-NC-001、TS 表 2.6.7.9.B 及び 2.6.7.9.C）。

ラット肝臓を用いたいずれの試験でも、上限量である 2000 mg/kg/日までの経口用量で E4 は、テール輝度の中央値（テールにおける DNA 率%）の上昇を誘発しなかった［ICH S2(R1)］。

ラット十二指腸では、最初の試験の 500 mg/kg/日群でテール輝度の中央値の上昇が認められたが、1000 及び 2000 mg/kg/日群では認められなかった。1000 及び 2000 mg/kg/日では、ghost 細胞率（%）の上昇が認められたが、500 mg/kg/日では認められなかった。用量に関連したこの反応が通常とは異なることから、より広範囲の用量（62.5～2000 mg/kg/日）で試験を再度実施し、細胞毒性を広範囲に評価した（病理組織学的検査を含む）。また、最初のコメットアッセイで用いた酵素消化の代わりに、機械的方法で肝臓及び十二指腸の細胞を単離した。酵素消化は、著しく損傷を受けた細胞を除去し、それによって 1000 及び 2000 mg/kg でのコメットアッセイのパラメータが交絡して、異常な用量反応に寄与した可能性があると考えられた。より頑健と考えられるこの第 2 のコメットアッセイで、E4 は、2000 mg/kg/日の上限用量まで十二指腸における DNA 損傷及び細胞毒性を誘発しなかった。この試験で、2000 mg/kg 投与時の E4 の血漿中濃度は、投与 0.5 時間後に平均 22.8 µg/mL であった（ES-T37、ES-T46、0030-NC-001、TS 表 2.6.7.9.A～2.6.7.9.C）。

E4 は、*in vitro* で弱い遺伝毒性の徴候をいくつか示したが、*in vivo* では、高用量（2000 mg/kg）で遺伝毒性を示す信憑性のある証拠は認められなかった（[redacted], 20[redacted]）。概算 $T_{max}$（0.5 時間）で、この用量における E4 の平均血漿中濃度は 22.8～42.4 µg/mL であった。

#### 2.4.4.2.2 ドロスピレノン

DRSP は、ICH S2(R1)の一連の標準的な遺伝毒性試験及び HGPRT 試験において、遺伝毒性陰性であった（Lang, 1993、Reimann, 1996）。DRSP は、ラット肝細胞では不定期 DNA 合成を増加させたが、ヒト肝細胞では増加させなかった（Martelli, 2003）。ラット肝細胞における所見の臨床的意義には疑問の余地があると考える。

### 2.4.4.3 がん原性試験

#### 2.4.4.3.1 エステトロール

雌 CD-1 マウスに 0、0.125、0.25、0.5 及び 1 mg/kg/日の用量で並びに雌 Wistar ラットに 0、0.08、0.27 及び 0.8 mg/kg/日の用量で E4 を経口投与し、2 年間のがん原性試験を実施した。ラットのがん原性試験には、Sprague-Dawley 系ではなく Wistar 系を選択した。その理由は、Sprague-Dawley 系では乳癌の自然発生率が高いためである。がん原性試験のデザインは、FDA の発がん性評価委員会（Executive Carcinogenicity Assessment Committee）による SPA（Special Protocol Assessment）で承認された（FDA, 20[redacted]）。

マウスでは、投与開始後 3 箇月間に、特に 1 mg/kg/日で体重増加量の増加（0.5 mg/kg/日で+15%、1 mg/kg/日で+33%）及び体重の増加が認められたことから、最大耐量（MTD）に達した

と判断した。E4 は、0.25 mg/kg/日以上の投与量で子宮及び子宮頸部の上皮性腫瘍及び間質腫瘍、1 mg/kg/日で乳腺腫瘍（腺腫、腺癌、良性及び悪性の腺表皮癌）並びに下垂体腫瘍（前葉の腺腫及び癌腫）の増加を誘発した。全生存率に対する E4 投与の影響は認められなかったが、乳腺腫瘍及び子宮／腟脱（子宮や子宮頸部腫瘍の存在による）による死亡率は 0.25 mg/kg/日以上の群で上昇した。非腫瘍性増殖性所見の増加が、全用量の子宮（腺筋症、嚢胞性腺過形成）及び乳腺（腺房細胞及び異型細胞過形成）で、1 mg/kg/日の下垂体（前葉の過形成）及び肺（気管支肺胞過形成）で認められた。投与に関連した臨床病理所見及び非増殖性の所見（子宮、腟、乳腺、下垂体、甲状腺、副腎、肝臓、胃、胸骨／大腿骨、脳及び脾臓）は、E4 のエストロゲン作用と一致しており、他の所見に続発したもので、毒性学的な重要性は低いと考えた（0031-NC-004、TS 表 2.6.7.10.A）。

ラットでは、体重増加量の減少（0.27 及び 0.8 mg/kg/日群で投与開始後 12～18 箇月間に 10%以上、全投与期間でほぼ 10%）に基づき、MTD に達したと判断した。0.8 mg/kg/日の用量で乳腺腫瘍（腺癌）の発生率が上昇した。全用量で乳腺（腺房細胞の過形成）、並びに 0.27 mg/kg/日以上で子宮（嚢胞状及び異型性の過形成）及び肝臓（グリコーゲンを含む明細胞巣）に非腫瘍性増殖性所見の増加が認められた。卵巣の増殖性所見（間質細胞過形成）及び肝臓の好塩基性細胞巣の発生頻度／重症度は、対照群と比較して E4 投与群で減少が認められた。ラットで認められた投与に関連した臨床病理所見及び非増殖性の所見（子宮、腟、卵巣、副腎、肝臓、脳、胸腺、腸間膜リンパ節及び脾臓）は、他の所見に続発したものや加齢動物でよくみられる E4 のエストロゲン特性と一致していた（Greaves, 2012、Laast, 2014、Mclnnes, 2011、Pearse, 2006）（0031-NC-003、TS 表 2.6.7.10.B）。

E4 は、マウスでは 0.25 mg/kg/日以上の経口用量で、ラットでは 0.8 mg/kg/日の経口用量で、がん原性であると考えられた。マウスでは、0.125 mg/kg/日の投与量でがん原性は認められなかった。この用量における Week 25 の $AUC_{0\text{-last}}$ 及び $C_{max}$ は、それぞれ 4.60 ng·hr/mL 及び 3.75 ng/mL であった。ラットでは、0.27 mg/kg/日の投与量でがん原性は認められなかった。この用量における Week 25 の $AUC_{0\text{-last}}$ 及び $C_{max}$ は、それぞれ 18.8 ng·hr/mL 及び 9.99 ng/mL であった。

マウスの乳腺、子宮や子宮頸部、下垂体並びにラットの乳腺で観察された E4 による腫瘍性及び非腫瘍性の増殖性所見は、これらの動物種における EE 及びメストラノール等の他のエストロゲンで報告された所見と一致する。これらは、直接的なエストロゲン作用やエストロゲンによるプロラクチン分泌増加の結果である（IARC, 1999、IARC, 2007、Dixon, 2014、Greaves, 2012）。また、エストロゲンは、ラットにおいて肝病巣の変化を誘発することも報告されている（IARC, 1999、IARC, 2007）。0.27 mg/kg/日以上の用量で E4 の投与により、肝明細胞巣（グリコーゲンを含む）の増加が認められたが、好塩基性細胞巣は減少した。明細胞巣は増殖性とみなされるが、必ずしも腫瘍性病変を引き起こすわけではない（Thoolen, 2012）。マウスでは、最高投与量（1 mg/kg/日）の E4 で気管支肺胞過形成の増加が認められた。E2 は、*in vitro* で肺腺癌細胞株の増殖を刺激し、卵巣摘出マウスの肺腫瘍モデルにおいて、肺腫瘍の多重性並びに悪性度を高めることが報告されている（Dougherty, 2006、Hershberger, 2005、Hammoud, 2008、Tang, 2013）。新生児マウスに 4 mg/kg までの用量で E2 を経口投与した 2 報の試験のうち 1 報では、肺腫瘍の誘発についても陽性であった（McClain, 2001）。

総合して、マウス及びラットで認められた E4 の腫瘍性及び非腫瘍性増殖所見は、そのエストロゲン特性と一致している。

閉経期のエストロゲン単独療法、閉経期のエストロゲン・プロゲスチン配合療法及びエストロゲン・プロゲスチン配合経口避妊薬は、IARC によってグループ 1（ヒトに対する発がん性がある）に分類されている（IARC、2012a、2012b 及び 2012c）。

#### 2.4.4.3.2 ドロスピレノン

DRSP のがん原性試験に関する公表文献は確認されていない。

プロゲスチン単剤の避妊薬は、IARC によりグループ 2B（ヒトに対する発がん性が疑われる）に分類されている（IARC, 1999）。

### 2.4.4.4 生殖発生毒性試験

#### 2.4.4.4.1 エステトロール

受胎能／初期胚発生試験の代替としての受胎能回復性試験並びにこの試験の実験デザインについては、FDA の合意が得られている（FDA, 20[redacted]）。

雌 Wistar Han ラットを用いた E4 の受胎能回復性試験では、1.5 mg/kg/日までの経口用量で、4 週間の投与期間中に用量依存的な体重増加量の減少及び摂餌量の減少が認められた。性周期の消失雌（0.5 及び 1.5 mg/kg/日）の動物数の増加のほか、発情期が 3 日間以上続く動物数の増加（1.5 mg/kg/日）が認められた。体重及び摂餌量は、投与後 3 週間の休薬期間中に一部又は完全な回復を示し、投与中止後 1 週間以内に性周期は完全に回復した。交尾、受胎能又は妊娠指数に対する影響はなく、着床データに対する影響も認められなかった。これらの試験から、投与中止後の受胎能回復に関する明確なエビデンスが得られた。発情周期に関する NOAEL は 0.17 mg/kg/日であった。受胎能及び初期胚発生に関する NOEL は 1.5 mg/kg/日であった。曝露量は観察しなかった（ES-T27、ES-T43、TS 表 2.6.7.12A 及び B）。

ラットに妊娠 0 日（G0）から G6 まで投与する初期胚発生試験は実施しなかった。ニュージーランドホワイトウサギに交尾の 4 日前から G9 まで投与した非 GLP 試験において、0.1 mg/kg/日以上の 1 日 2 回経口投与量で E4 が完全に着床を阻害することが明らかになったため、このような試験は有用ではないと考えられた。用量 0.1 mg/kg/日では、投与終了時の $AUC_{0\text{-last}}$ が 12.1 ng·hr/mL、$C_{max}$ が 4.11 ng/mL であった（ES-T04、TS 表 2.6.7.11）。

妊娠 Wistar Han ラットに妊娠 6～17 日まで 3 mg/kg/日以下の投与量で、妊娠ニュージーランドホワイトウサギには妊娠 6～18 日（又は 15 日）まで 0.45 mg/kg/日以下の投与量で E4 を投与し、胚・胎児発生に関する経口投与試験を実施した[25]（ES-T01、ES-T02、ES-T03、ES-T04、ES-T16、ES-T19、TS 表 2.6.7.11, 2.6.7.13.A 及び B）。

ラットでは 3 mg/kg/日、ウサギでは 0.15 及び 0.45 mg/kg/日の E4 投与により流産や全同腹児死亡が生じ、両動物種で複数の早期屠殺に至った。0.45 mg/kg/日の投与期間を短縮しても、ウサギの妊娠転帰は改善されなかった。ウサギにおける胎児の評価は、0.45 mg/kg/日投与群の同腹児が 2 例のみであったため、0.05 及び 0.15 mg/kg/日投与群に基づいて行った。両動物種とも全用量で母体毒性が認められ、これは体重増加量及び摂餌量の減少として示された。また、0.15 及び

[25] 0.45 mg/kg/日では、複数の雌で床敷内に血液が認められたため、投与期間を妊娠 15 日目まで短縮した。

0.45 mg/kg/日投与群のウサギでは、臨床徴候（脱毛、削痩、無排糞）が記録された。1 及び 3 mg/kg/日投与群のラットの剖検において、大型又は肥厚した胎盤が認められた。

生存胎児を有する雌では、両動物種の最高用量で着床後死亡が増加したが、着床前死亡、生存胎児数又は胎児の性比に対する影響は認められなかった。

両動物種で胎児の発育遅延が認められた。ラットにおけるこれらの所見は、1 mg/kg/日及び 3 mg/kg/日で胸骨分節の不完全骨化や未骨化、肋骨結節及び刃状肋骨の増加、3 mg/kg/日で胎児体重の減少などであった。胎児の発育遅延として、0.05 及び 0.15 mg/kg/日群で第 13 肋骨過剰、0.15 mg/kg/日群で指骨、複数の骨及び椎体の不完全骨化や未骨化が認められた。

評価した両動物種において、母体毒性と関連した投与量で認められた胚致死作用及び胎児発育遅滞は、動物に高用量で投与した場合に、エストロゲンが胚死亡や流産及び胎児発育遅滞を引き起こす可能性があることと一致している（Bartholomeusz, 1999、IARC, 1999）。

ウサギでは、投与に関連した形態異常は認められなかった。ラットでは、E4 の 1 mg/kg/日投与群の 3 母体の胎児 3 例及び E4 の 3 mg/kg/日投与群の 4 母体の胎児 5 例に、長骨（上腕骨、橈骨）及び肩甲骨の短縮、肥厚又は屈曲が認められた。また、数例の胎児では足関節の回転異常及び重度の屈曲が認められた。観察された骨格所見を形態異常と分類し、報告した。しかし、Wistar Han ラット（E4 を用いた試験で使用した系統）の胎児骨格所見に関する最近の公表文献は、これらが一過性（出生後にリモデリングを発現し、離乳時に回復）であることを裏付けている（Mitchard, 2014、Kimmel, 2014、de Schaepdrijver, 2014）。[redacted]（20[redacted]）による専門家レビューによれば、これらは一般に母体毒性に続発し、出生後の骨量の増加及びリモデリングにより修復されることから、ラットの妊娠期間が短いことを反映していると考えられた。公表された多くの

胚・胎児発生に関する試験を評価した Kimmel（2014）は、長骨の弯曲や短縮及び肩甲骨の弯曲は、母体毒性や胎児毒性に関連した条件下で、波状肋骨とともに高頻度に発現し（通常は発現率は低い）、これらの変化は一過性であり、四肢の外表観察で短縮や形態異常が示されない限り形態異常ではなく変異に分類すべきであると結論付けた。ラットを用いた E4 の試験では、E4 の 1 及び 3 mg/kg/日のいずれにおいても母体毒性及び胎児毒性又は発育遅延が認められた。長骨の弯曲や短縮や肩甲骨の弯曲を示したすべての動物では、肋骨の結節や波状肋骨も認められ、肋骨の結節や波状肋骨が認められた胎児の全体的な割合は、長骨や肩甲骨の病変が認められた胎児の割合よりも高かった。1 mg/kg/日群の胎児 1 例（特に影響を受けた個体）のみ、外表観察時に前肢及び後肢の重度の短縮が認められた。ラットを用いた 1.5 mg/kg/日までの出生前及び出生後の発生に関する試験で（Es0001-NC-003、TS 表 2.6.7.14）、生存出生児に不可逆的な異常の徴候は認められなかった。ラットで観察された骨格所見は、Kimmel（2014）が報告した一過性のものであると結論付けられる。ただし、1 mg/kg/日で四肢短縮が外表観察で認められた胎児は例外と考えられる。したがって、ラットにおける骨格所見は、E4 固有の催奇形性を示すものではないと考えられる。

しかし、1 mg/kg/日よりの骨格所見及び 3 mg/kg/日の胚致死作用を考慮し、E4 のラットにおける胚・胎児発生に関する NOAEL は 0.3 mg/kg/日と結論する。0.3 mg/kg/日の反復投与後の$AUC_{0\text{-}last}$及び$C_{max}$は、それぞれ 9.33 ng·hr/mL 及び 6.83 ng/mL であった。母動物の生殖パラメータ及び胚・胎児発生に関するウサギの NOAEL は 0.05 mg/kg/日であり、投与終了時の$AUC_{0\text{-}last}$は6.84 ng·hr/mL、$C_{max}$は 0.925 ng/mL であった。

妊娠ラットを用いた出生前及び出生後の発生に関する試験では、0.5 又は 1.5 mg/kg/日の経口投与を受けた $F_0$ 雌の数例が死亡して発見されたか又は同腹児死亡、若しくは分娩なしとしてみられた分娩困難のために早期に屠殺された。1.5 mg/kg/日で複数の一般状態の所見が認められ、そのほとんどが早期に屠殺した雌であり、両用量で赤色の腟分泌物が認められた。いずれの用量でも、$F_0$ 雌は妊娠中や授乳中の体重増加量及び摂餌量の減少も示した。0.5 mg/kg/日では、$F_0$ の同腹仔 1 組全体が分娩後 2 日に死亡し、1.5 mg/kg/日では喰殺及び「発見時死亡」の出生児の発現率が高く、分娩後 4 日の生存率は低下した。$F_0$ 動物にも $F_1$ 動物にも他に特記すべき所見は認められなかったが、例外として 0.5 及び 1.5 mg/kg/日群の $F_1$ 雄に軽微で毒性ではない体重増加量及び摂餌量の減少が認められた。

出生前及び出生後の発生に関する試験における観察所見の大部分は、分娩困難や分娩困難に起因する母体の異常行動に起因すると考えられる。$F_0$ 雌における妊娠及び授乳の NOAEL は、それぞれ 0.5 及び 0.17 mg/kg/日と考えられた。$F_0$ 出生児の分娩後 4 日生存率に対する NOAEL は 0.17 mg/kg/日であり、4 日目以降の生存及び $F_0$ 出生児の発育に対する NOEL は 1.5 mg/kg/日であった。$F_1$ 世代の発生、生殖能及び受胎能に対する NOAEL は 1.5 mg/kg/日であった（Es0001-NC-001、Es0001-NC-009、Es0001-NC-003、TS 表 2.6.7.11 及び 2.6.7.14）。

妊娠げっ歯類へのエストロゲンの投与は、子宮活動を抑制し、妊娠期間を含む分娩に影響を及ぼす（Yanagimachi, 1968、Kraus, 1993、Murakami, 2016）。雌 C57BL マウスで、エストロゲン投与の結果として、喰殺が認められた（Mann, 1983）。ラットに E2 を計画的に注入して周産期の神経内分泌動態を実験的にシミュレーションしたところ、死産及び授乳不足、分娩困難及び喰殺の発現率上昇に至った（Inoue, 1981）。さらに、ラットにおける分娩困難（用量依存的な母動物体重の減少、妊娠期間の延長、遅延分娩、遷延分娩又は問題となる分娩など）も、選択的エストロゲン受容体モジュレーターで報告されており、このため母動物は死亡や病的状態となり、死亡出生児数が増加した（Buelke-Sam, 1998a、Buelke-Sam, 1998b、Weisenburger, 2004）。

幼若動物を用いた試験は実施しておらず、計画もしていない。非臨床データセットからは、初経後の少女と成人の妊娠可能な女性で異なる影響を及ぼす可能性のある発生への影響に関する懸念は示されていない。

#### 2.4.4.4.2 ドロスピレノン

DRSP の受胎能（受胎能回復性）及び着床までの初期胚発生に関する試験の公表文献は確認されていない。

DRSP はこれに特化した試験で排卵抑制特性及び抗アンドロゲン作用を示し、受胎能を低下させると予想される。サルの性周期に対する E4/DRSP の影響は可逆的であった（0030-NC-002、TS 表 2.6.7.7.B.1）。

DRSP の胚・胎児発生に関する試験の公表文献は確認されていない。

DRSP を用いた出生前／出生後の発生試験に関する公表文献はわずかである。妊娠後期の妊娠ラットに DRSP を単独投与又は EE と併用投与したとき、抗アンドロゲン特性によって雄胎児の雌性化が生じた（Muhn, 1995、Battenfeld, 1995）。

### 2.4.4.5 局所刺激性試験

局所刺激性は反復投与毒性試験で評価した。

### 2.4.4.6 その他の毒性試験

#### 2.4.4.6.1 エステトロール

*光毒性*

光毒性の症状（皮膚刺激、紅斑、そう痒、浮腫など）はどの動物試験でも認められていない。E4 は光に曝露される組織への分布が比較的弱く、メラニンを含む構造に長時間滞留しないことが示されているため、ICH S10 に準じて、光毒性試験を実施しないことは妥当と考えられた。

*不純物及び分解生成物*

E4 は[redacted]社から入手する。E4 原薬の潜在的な不純物及び分解生成物に関する情報は、原薬等登録原簿（MF 登録番号：[redacted]、登録：令和[redacted]年[redacted]月[redacted]日）に示すとともに、以下に概略を記載する（2.3.S.3.2、3.2.S.3.2）。

E4 原薬の製造工程では、ニトロソ化剤は使用されない。またリスクアセスメントから、酸化剤により、N－ニトロソアミンが理論的に形成されるリスクはわずかである。また、[redacted]社においてニトロソアミンの混入又は発生の根本原因を特定できていることからも E4 原薬においてニトロソアミンの定期的な管理は不要であると判断した。E4 原薬の潜在的な不純物のうち、ICH M7 のクラス[redacted]及び[redacted]の不純物として分類された[redacted]化合物については、変異原性不純物の TTC に基づいて[redacted]あるいは[redacted]未満で管理され、実際の分析結果は、許容限度値未満であったことから、変異原性の可能性を示さなかった。

#### 2.4.4.6.2 ドロスピレノン

*不純物及び分解生成物*

DRSP 原薬は[redacted]社及び[redacted]社から入手する。[redacted]の DRSP 原薬については、潜在的な不純物及び分解生成物に関する情報は、原薬等登録原簿（MF 登録番号：[redacted]、登録：令和[redacted]年[redacted]月[redacted]日）に示す（2.3.S.3.2、3.2.S.3.2）。[redacted]社の DRSP 原薬については、潜在的な不純物及び分解生成物に関する情報は、原薬等登録原簿（MF 登録番号：[redacted]、登録：令和[redacted]年[redacted]月[redacted]日）に示す（2.3.S.3.2、3.2.S.3.2）。以下に概略を記載する。

[redacted]社の DRSP 原薬の製造工程においてニトロソ化剤は使用されておらず、また生成もされていないため、ニトロソアミンが混入するリスクはないと判断した。DRSP 原薬の潜在的な不純物のうち、TTC に基づいて[redacted]未満の管理が提案された 3 化合物については、ICH M7 Option 4 に従い、製造工程中で完全に除去され、最終原薬中にこれらが残留しないことを確認したため、いずれも規格設定して管理しないこととした。

[redacted]社 DRSP 原薬の製造工程では、ニトロソアミンを混入するリスクがないことを確認された。DRSP 原薬の製造方法及び出発物質、製造試薬、中間体及び反応副生成物について、(Q)SAR 方法により評価した。その結果、いずれの不純物においても実測値が 1 ppm 未満であり、最終原薬中にほとんど存在しないことから、規格設定して管理しないこととした。

### 2.4.5 総括及び結論

#### 2.4.5.1 ヒト曝露量及び動物／ヒト曝露量比

総括は、EP 配合剤である E4 15 mg/DRSP 3 mg の 1 日 1 回錠剤を 24 日間投与、その後、プラセボの 1 日 1 回錠剤を 4 日間投与という特定の投与レジメンの条件下で、DRSP と併用した場合の E4 の安全性を評価することを目的としている。

臨床試験（FSN-013P-02）で、日本人の健康な閉経前成人女性を対象に、E4/DRSP 15 mg/3 mg 配合錠を 3 周期（28 日間／周期）にわたり周期投与（24 日間連日経口投与後に 4 日間のプラセボ投与）、又は 84 日間連続投与した。E4 及び DRSP の血漿中濃度測定は、初回投与開始 14～15 日目に実施した。E4 の平均 $C_{max}$ は 26.07 ng/mL、平均 $AUC_{0\text{-}24}$ は 81.61 ng· hr/mL であり、また DRSP の平均 $C_{max}$ は 57.12 ng/mL、平均 $AUC_{0\text{-}24}$ は 546.9 ng· hr/mL であった（表 2.4-2）。

表 2.4-2 E4 15 mg/DRSP 3 mg を投与した後、定常状態の E4 及び DRSP に対するヒト曝露量（FSN-013P-02）

| Treatment | E4/DRSP 15/3 mg | |
|---|---|---|
| | E4 | DRSP |
| **Steady-State (Day 14)** | | |
| **$AUC_{0-24}$ (ng·hr/mL)** | 81.61 | 546.9 |
| **$C_{max}$ (ng/mL)** | 26.07 | 57.12 |

Abbreviations: $AUC_{0-24}$ = area-under-the-concentration-versus-time-curve up to 24 hours, $C_{max}$ = maximum plasma concentration

NO(A)EL、NO(A)EL での全身曝露量並びに関連する動物／ヒトの用量比及び曝露量比を表 2.4-3 に示す。

動物／ヒト用量比の算出にあたっては、FDA Guidance for Industry（2005）に従って、体表面積に対して投与量を標準化した。1 日あたり E4 15 mg/DRSP 3 mg の用量は、体重 60 kg の女性において 9.25/1.85 mg/$m^2$/日に相当する。

曝露量比は、定常状態のヒト曝露量（$AUC_{0-24}$：E4 及び DRSP でそれぞれ 81.61 及び 546.9 ng·hr/mL；$C_{max}$：E4 及び DRSP でそれぞれ 26.07 及び 57.12 ng/mL）に対して算出した。

表 2.4-3 無影響（毒性）量における曝露量、動物／ヒト用量比及び動物／ヒト曝露量比

| Species | NO(A)EL (mg/kg/day) | $AUC_{0\text{-last}}$ (ng·hr/mL) | $C_{max}$ (ng/mL) | Dose Ratio | AUC Ratio | $C_{max}$ Ratio |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Safety Pharmacology** | | | | | | |
| **CNS, rat** | 15 | 1968[1] | 1039[1] | 9.7 | 24 | 40 |
| **hERG, *in vitro*** | 28.17 µM | NA | 8574 | NA | NA | 329 |
| **CV, monkey** | 100 | 6816[1] | 2282[1] | 130 | 84 | 88 |
| **Respiratory, rat** | 150 | 48990[1] | 14394[1] | 97 | 600 | 552 |
| **Repeat-Dose Toxicity** | | | | | | |
| ***Estetrol*** | | | | | | |
| **Rat** | 5 | 736 | 238 | 3.2 | 9 | 9 |
| **Monkey** | 3 | 328 | 97.2 | 3.9 | 4.0 | 3.7 |
| ***Estetrol/Drospirenone*[2]** | | | | | | |
| **Monkey** | 3/0.6 | 483/630 | 173/105 | 3.9/3.9 | 5.9/1.2 | 6.6/1.8 |
| ***Estetrol/Levonorgestrel*[2]** | | | | | | |
| **Monkey** | 3/0.0225 | 282/145 | 87.1/20.7 | 3.9/NA | 3.5/NA | 3.3/NA |
| **Genotoxicity** | | | | | | |
| **Micronucleus test** | 2000 | NA | 42400 | 1297 | NA | 1626 |
| **Comet Assay** | 2000 | NA | 22800 | 1297 | NA | 875 |
| **Carcinogenicity** | | | | | | |
| **Mouse** | 0.125 | 4.60 | 3.75 | 0.04 | 0.06 | 0.14 |
| **Rat** | 0.27 | 18.8 | 9.99 | 0.18 | 0.23 | 0.38 |
| **Return-to-Fertility** | | | | | | |
| **Rat** | 1.5 | 118[3] | 61.2[3] | 1.0 | 1.4 | 2.3 |
| **Embryo-Fetal Development** | | | | | | |
| **Rat** | 0.3 | 9.33[4] | 6.83[4] | 0.19 | 0.11 | 0.3 |
| **Rabbit** | 0.05 | 6.84 | 0.925 | 0.06 | 0.08 | 0.04 |
| **Pre-/Postnatal Development** | | | | | | |
| **Rat** | 0.17[5] | 13.4[3] | 6.94[3] | 0.11 | 0.16 | 0.27 |

[1] Data on Day 1 in the 4-week toxicity study in rat (ES-T10; TS Table 2.6.5.4.A.3) and the maximum tolerated dose study in monkey (ES-T05; TS Table 2.6.5.3.B)

[2] Data values are presented as E4/progestogen

[3] Calculated with average normalized $AUC_{0\text{-last}}$ (78.7) and $C_{max}$ (40.8) under steady-state conditions in female Wistar rats (ES-T39; 0031-NC-003; TS Table 2.6.5.4.A.4)

[4] Determined in the dose-finding study ES-T02 (TS Table 2.6.5.4.A.6)

[5] NOAEL concerning parturition difficulties and neonatal survival until Day 4 post-partum

Abbreviations: $AUC_{0\text{-last}}$ = area-under-the-concentration-versus-time-curve up to the last measurable concentration, $C_{max}$ = maximum plasma concentration, NA = not applicable, NOAEL = No-Observed-Adverse-Effect-Level

### 2.4.5.2 安全性の総括及び評価

E4 の薬理学的プロファイルは、活性の弱いエストロゲンである。E4 は、ヒト ER と高度に選択的に結合して ERα 及び ERβ のいずれとも結合するが、ERβ と比較して ERα に対する親和性が高い。*In vivo* で観察される E4 のエストロゲン活性に関する効力は、EE の効力の約 1/10～1/20 で、E2 の効力よりも低い。

DRSP は、天然ホルモンのプロゲステロンと同様の薬理学的プロファイルを有し、プロゲスチン活性、抗鉱質コルチコイド活性及び抗アンドロゲン活性を示す。EE を配合する COC においてプロゲスチン成分としての DRSP の臨床的有効性は十分に確立されている。

総合すると、以上のデータから、DRSP 配合の EP 配合剤におけるエストロゲン成分としての E4 の潜在的有効性が裏付けられる。

E4 は、乳癌細胞の増殖、遊走及び浸潤を刺激する作用が E2 より弱く、これらのプロセスに対する E2 の作用を減弱させる。EE とは対照的に、E4 は等力価の用量（1/20）で、ラットの DMBA 誘発乳腺腫瘍モデルにおいて腫瘍発生を抑制する。このモデルで、E4 は高用量で既存の腫瘍の退縮も誘発する。

同様に、DRSP も *in vitro* で乳癌細胞の増殖、遊走及び浸潤の刺激に関して E2 より低い効力を示す。DRSP は、細胞遊走に対する E2 との相加作用はなく、E2 単独と比較して、細胞浸潤を減少させる。

これらの特性は、E4 が DRSP を配合する COC のエストロゲン成分として、EE 又は E2 より望ましい乳癌リスクプロファイルを有する可能性があることを示唆している。しかし、乳癌のリスクを完全に排除することはできない。2 年間のがん原性試験では、マウス及びラットのいずれにおいても、E4 は臨床範囲の E4 曝露量と関連する投与量で乳腺腫瘍の増加を誘発した。

E4 は、E2 及び EE とは対照的に、ERα 発現細胞において SHBG 産生を誘導しない。E4 及び DRSP は SHBG に対する親和性がない。E4 は、HUVEC 細胞における t-PA、u-PA 及び PAI-1 の発現増強並びに HUVEC 細胞遊走の誘導において、E2 よりも効力が低い。E4 は、マウスにおいて尾出血時間を延長させ、動脈及び静脈血栓症を防御する。DRSP は血小板凝集を引き起こさない。DRSP は、ボトロセチンや von Willebrand 因子誘発性の血小板凝集を促進するが、評価した他の誘導薬による凝集はいずれも促進しない。

データから、E4 は EE 及び E2 と比較して VTE リスクプロファイルが良好な可能性があることが示唆されている。臨床試験（MIT-Es0001-C201）では、E4/DRSP 併用により良好な止血パラメータのプロファイルが示された［2.5.3 及び 2.7.4 を参照］。

E4 及び DRSP はいずれも、HUVEC 細胞において急速な NO 放出、eNOS 活性化及び eNOS 発現を誘導する。E4 は E2 より効力が弱く、高濃度の E2 存在下でその作用に拮抗する。DRSP は E2 の迅速な増強作用を促進したが、E2 刺激性の eNOS 発現には影響しないと考えられる。

E4 は、内皮依存性（ER が関与する）cGMP 介在性の機序並びに平滑筋細胞の $Ca^{2+}$流入及び収縮の阻害に関与する内皮非依存性機序の両者を介して、E2 よりも弱い効力でラット動脈の血管緊張低下を引き起こす。E4 は、AngII 誘発性高血圧を予防し、細動脈血流介在性のリモデリングを回復させることにより、マウスにおいて新生内膜過形成を抑制し、血管保護作用を示す。

これらのデータは、E4 や DRSP の潜在的な血管調節特性を示唆するものであるが、懸念される原因とは関連しない。

E4 は卵巣摘出マウスにおいてアテローム保護作用を示すが、DRSP は接着分子の産生や単球様細胞の HUVEC 細胞への接着に影響を及ぼさない。これらのデータは、アテローム性動脈硬化症のリスクに関する懸念を示すものではない。

安全性薬理のデータから、中枢神経系、心血管系又は呼吸器系の機能に対する E4 又は DRSP の潜在的な有害作用に関する懸念は示されていない。E4 について懸念がないことは、E4 15 mg/DRSP 3 mg の予定投与条件と比較した場合の実際の NOEL で認められた高い動物／ヒト用量比（10 以上）及び曝露量比（AUC で 24 以上、$C_{max}$ で 40 以上）によって裏付けられる（表 2.4-3）。

DRSP 含有の COC は、DRSP の抗鉱質コルチコイド活性を考慮して、腎機能障害を有する被験者又は高カリウム血症のリスクがある被験者に使用してはならない。カリウム増進薬又は強力な CYP3A 阻害薬を併用している被験者では、血清カリウム値をモニタリングしなければならない。

毒性試験で使用した動物種に E4 を反復投与したとき、E4 は経口投与後に速やかに吸収され、血漿中での蓄積はほとんど又は全く認められない。曝露量は、マウスでは 30 mg/kg/日まで、ラットでは 50 mg/kg/日まで、サルでは 30 mg/kg/日までの用量に対してほぼ比例性を示した。$T_{1/2}$ はマウスで 1.4～3 時間、ラットで 2～6 時間、サルで 10～19 時間であった。サルでは、E4 はエストロゲンの既知の特性である腸肝循環の影響を受けると考えられる。

DRSP の吸収はやや速やかである。臨床曝露量は 10 mg/日まで用量に比例して増加する。初回投与と比較して、雌サルでは反復投与後に曝露量が減少するが、女性ではわずかな蓄積（2～3 倍）が生じる。女性の $T_{1/2}$ は 25～33 時間である。

雌サルに DRSP を併用投与すると、定常状態の条件で E4 曝露量が増加する（AUC のみ）。E4 の併用投与は DRSP への曝露量に影響を及ぼさない。しかし、13 週間反復投与毒性試験の安全性データから、観察された高血糖以外の懸念は生じなかった。高血糖は薬力学的相互作用によるもので、E4 はグルコース濃度を低下させるが、上昇させないことを考慮すると、E4 の血漿中濃度の上昇によって高血糖を説明することはできない。治療用量での E4 の薬物動態に対する DRSP の潜在的影響を評価することを目的とした臨床試験は実施しなかった。異なる臨床試験のデータを比較した結果、DRSP と併用したとき、E4 の曝露量は約 20%減少し、DRSP は E4 の薬物動態に臨床的に重要な影響を及ぼさないと考えられた（2.7.2）。

ラットに単回経口投与後、E4 やその代謝物は広範な組織分布を示し、速やかに排泄され、メラニン含有組織における長期滞留のエビデンスは認められなかった。

E4 は、ヒトを含む評価したすべての動物種で中等度の血漿蛋白結合率（ほぼ 50%）を示す。DRSP のヒト血清蛋白結合率は 95%～97%である。E4 も DRSP もヒト SHBG とは結合しない。

E4 は妊娠中にヒト胎児の肝臓で生成され、胎盤を介して母体循環系に移行する天然エストロゲンであり、E4 が胎盤を通過することは既知であると考えられる。また、他のエストロゲン及びプロゲスチンで乳汁中への移行が報告されていることから、E4 も乳汁中に移行する可能性はあると考えられる。DRSP やその代謝物の胎盤通過性に関する公表文献は確認されていない。DRSP は少量（0.02%）が乳汁中に移行する。

マウス、ラット、ウサギ及びサルの肝細胞での E4 の代謝経路並びに *in vivo* におけるマウス及びラットの E4 の代謝経路には、グルクロン酸抱合、硫酸抱合、水酸化及びメチル化が含まれる。ヒト肝細胞で認められる代謝経路はグルクロン酸抱合及び硫酸抱合のみであり、2 種類の直接グルクロニド（E4-3-グルクロニド及び E4-16-グルクロニド）がヒト血漿及び尿中で認められる主要な代謝物である。

E4-3-グルクロニドはマウス及びラット血漿中の重要な代謝物でもあり、マウスの尿及びラットの胆汁中にも認められた。E4-16-グルクロニドは、マウス検体又はラット血漿中では有意な量では認められなかったが、ラットの尿及び胆汁中では重要な代謝物であり、投与量の 14.5%以上を占めた。別の代謝物である E4-グルクロニド-硫酸抱合体（最も可能性の高い置換部位は C16 位及び C3 位）は、ヒト血漿中放射能の約 9%～11%に相当したが、ラット胆汁中で検出されたのはごく微量であった。同定されたヒトグルクロニドに加え、E4-15-グルクロニドが複数のマウス

及びラット検体で認められた。全体として、ヒトに特異的な代謝物を示唆する所見はなく、データは、マウス、ラットやサルにおいて、E4 がヒトの主要な 3-及び 16-グルクロニドにかなり変換されることを示している。マウス、ラット及びサルを用いた反復投与毒性試験でそれぞれ 30 mg/kg/日、150 mg/kg/日及び 50 mg/kg/日までの用量が投与されたことを考慮すると、ヒトの主要な 2 種類のグルクロニドの潜在的な毒性は十分評価されたと考えられる。

ヒト血漿中に認められる DRSP の主要代謝物は DRSP の酸性型及び 4,5-ジヒドロドロスピレノン-3-硫酸塩である。尿中及び糞中の DRSP 代謝物の大部分はグルクロニド及び硫酸抱合体である。

雌のマウス、ラット又はサルを用いた E4 単独の反復経口投与毒性試験で観察された作用は、そのエストロゲン特性と一致しており、投与中止後に回復する。NOAEL は、体重に対する軽微から軽度の作用に基づいている。ラット及びサルの長期投与試験で観察された NOAEL で、動物／ヒト用量比は 3～4、AUC で示す動物／ヒト曝露量比は 4～9、$C_{max}$ では 3.7～93 である（表 2.4-3）。

同様に、DRSP を 6（減量後 4） mg/kg/日の用量で単独投与した雌サルにおける 13 週間反復投与毒性試験の所見は、その薬理学的特性を反映している。この投与量における $AUC_{0\text{-}last}$（3150 ng·hr/mL）及び $C_{max}$（399 ng/mL）は、E4 15 mg/DRSP 3 mg の予定投与条件下における臨床曝露量のそれぞれ 6 倍及び 7 倍であった。

E4 と DRSP の併用は、ホルモンの特性に関連した変化のほかに、雌サルにおいて可逆的ではあるが毒性である高血糖を誘発する。高血糖は、エストロゲン／プロゲスチン配合剤の既知のリスクであり、E4／DRSP 配合剤（3/0.6 mg/kg/日）の反復投与毒性試験において NOAEL の判断の基準となった。NOAEL における動物／ヒト用量比は 3.9 であり、E4/DRSP の動物／ヒト曝露量比は、AUC で 5.9/1.2、$C_{max}$ で 6.6/1.8 である（表 2.4-3）。EE を含有する COC のプロゲスチン成分として DRSP の比率は比較的低いが、その臨床的安全性は目標用量の 3 mg/日で明らかにされており、E4 15 mg/DRSP 3 mg 投与後の DRSP の曝露量（$AUC_{0\text{-}24}$=546.9 ng·hr/mL、$C_{max}$=57.12 ng/mL；表 2.4-2）は、DRSP 3 mg/EE 0.02 mg の定常状態条件下での曝露量（$AUC_{0\text{-}24}$=763 ng·hr/mL、$C_{max}$=70.3 ng/mL；2.6.4.3.2 項の表 2.6.4-18）よりも低い。E4 15 mg/DRSP 3 mg を用いた臨床試験（MIT-Es0001-C101、MIT-Es0001-C103、MIT-Es0001-C106、MIT-Es0001-C109、MIT-Es0001-C110、MIT-Es0001-C201、MIT-Es0001-C202、MIT-Es0001-C301、MIT-Es0001-C302、FSN-013P-02、FSN-013P-05、FSN-013P-03、FSN-013P-04）では、グルコース恒常性に影響は認められなかった。以上を考慮し、E4 15 mg/DRSP 3 mg の投与条件下で高血糖が発現するリスクは極めて低いと考えられる。

E4 と LNG の併用により、雌カニクイザルに心臓への毒性として病理組織学的変化が生じたが、この変化は可逆性ではなかった。観察された肥大型心筋症の病因として最も可能性が高いのは、サルコメアタンパク質をコードする変異遺伝子の肥大刺激による上方制御である。これまで、カニクイザルのサルコメア遺伝子変異は確認されていないが、カニクイザルは自然発生的に肥大型心筋症を発症することが報告されており、モーリシャス原産のカニクイザルは他の起源のカニクイザルと比較して自然発生的心筋症を発症しやすい（Konishi, 2018、[redacted], 20[redacted]）。E4 30(20) mg/kg/日/DRSP 6(4) mg/kg/日を 13 週間投与したサル 2 例では、特殊染色後にのみ、軽微で散発性の心臓の病理組織学的変化が認められたが、この試験条件下では毒性ではないと判断された。E4/LNG を投与して病変が認められた動物とは対照的に、E4/DRSP を投与したサルの心臓の

病理組織学的変化には、左室壁肥厚及び左室腔容積の減少という肉眼的変化を伴うことはなかった。さらに、E4/DRSP 併用試験の NOAEL（3/0.6 mg/kg/日）での動物／ヒト曝露量比並びに中用量（E4 10 mg/kg/日/DRSP 2 mg/kg/日）では心臓の病理組織学的所見が認められなかったことを考慮すると、全体的なデータから、E4 15 mg/DRSP 3 mg の予定の投与条件で肥大型心筋症に関する重大な懸念は生じないと考えられる。E4 を DRSP と併用した臨床試験（MIT-Es0001-C101、MIT-Es0001-C103、MIT-Es0001-C106、MIT-Es0001-C109、MIT-Es0001-C110、MIT-Es0001-C201、MIT-Es0001-C202、MIT-Es0001-C301、MIT-Es0001-C302、FSN-013P-02、FSN-013P-05、FSN-013P-03、FSN-013P-04）における心臓モニタリングの結果、臨床的に重要な所見は認められなかった。

遺伝毒性試験では、*in vitro* で E4 の弱い遺伝毒性の可能性を示すいくつかの徴候が認められたが、*in vivo* では高用量（2000 mg/kg）で遺伝毒性を示す信憑性のある証拠は認められていない。概算 $T_{max}$ の時点で、平均血漿中濃度は、E4 15 mg/DRSP 3 mg の投与における $C_{max}$ の 875 倍以上である。したがって、これらの条件下で、E4 は遺伝毒性のリスクをもたらさないと考えられる。DRSP は、ICH S2(R1)の一連の標準的試験において遺伝毒性陰性である。

2 年間のがん原性試験で、E4 は、マウスにおいて子宮及び子宮頸部上皮腫瘍、子宮間質腫瘍、乳腺腫瘍及び下垂体腫瘍の増加を誘発し、ラットでは乳腺腫瘍の増加を引き起こした。すべての腫瘍性及び非腫瘍性増殖性病変は、E4 のエストロゲン特性によって説明された。いずれの動物種においても発がん性がないと考えられる投与量での E4 曝露量は、E4 15 mg/DRSP 3 mg の予定投与条件下の曝露量を下回った。

DRSP の動物でのがん原性に関して、公表文献は確認されていない。

エストロゲン／プロゲスチン COC は、IARC によってグループ 1（ヒトに対して発がん性がある）に分類されている（IARC, 2012c）。

E4 は光に曝露される組織への分布が比較的弱く、メラニン含有組織における長期間の滞留は認められないため、光毒性試験は不要であった。光毒性を示唆する非臨床所見が認められず、完了した臨床試験で光に関連する有害事象の報告件数がわずかであることも、更なる評価が必要ではないことを示唆している。

雌ラットを用いた試験では、E4 の投与を中止すると受胎能が回復することが確認されている。同様に、DRSP による受胎能喪失はごく一過性に過ぎない。検討した E4 の最高用量（NOEL）は、動物／ヒト用量比（1.0）及び曝露量比（AUC で 1.4、$C_{max}$ で 2.3）が比較的低いが（表 2.4-3）、反復経口投与毒性試験における投与後の発情周期の回帰並びに E4 10 mg/DRSP 3 mg を投与した後約 17 日以内に最初の排卵が復帰することを示す臨床データにより、受胎能への回復がさらに裏付けられる（ES-C01）。

ラット及びウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験では、動物におけるエストロゲンの既知の作用の母体毒性用量で、E4 は胚致死作用及び胎児発育遅滞を誘発する。ラットで長骨の弯曲や短縮及び肩甲骨の弯曲の発現率上昇が肋骨の結節や波状肋骨とともに認められているが、一過性であると報告されている。ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験で、E4 の投与に関連して認められた足関節の回転異常及び重度屈曲という外表形態異常の原因は不明と考えられた。したがって、骨格形態異常発現率の用量依存的な増加のみが、被験物質に関連するものであった。ラットを用いた出生前及び出生後の発生に関する試験で、1.5 mg/kg/日までの用量で生存出生児に非可逆的な異常は認められなかった。ヒト胎児が妊娠中に E4 に自然に曝露されていること及

び妊娠初期に不注意から COC（COC の FDA 標準ラベル表示）を使用していた女性で先天性欠損のリスクが上昇することはほとんどないことが疫学研究及びメタアナリシスの結果から示されていることを考慮すると、ラットで認められた骨格及び外表形態異常は臨床的に重要ではないと考えられる。ラット又はウサギのいずれにおいても、E4 又は DRSP の固有の催奇形性を示す徴候はない。胚・胎児毒性に基づいて NOAEL を決定し、動物／ヒトの用量比及び曝露量比は 1 未満である（表 2.4-3）。

ラットを用いた出生前／出生後の発生試験では、E4 及び DRSP はいずれも分娩困難を引き起こし、$F_1$ 出生児の新生児の死亡率を高めた。E4 について、これらの所見は 1 未満の動物／ヒトの用量比及び曝露量比で生じており、その薬理学的特性によって説明されると思われる。DRSP の所見はその黄体ホルモン特性によって説明される。さらに DRSP は、その抗アンドロゲン特性によって雄胎児の雌性化も引き起こした。

総合すると、E4 及び DRSP の胚・胎児発生試験及び出生前／出生後発生試験における所見は、それらの薬理学的特性と一致している。E4 15 mg/DRSP 3 mg が妊娠中の使用を意図していないことを考慮すると、これらの所見は、予定の投与条件下における E4 15 mg/DRSP 3 mg の安全性を損なうものではない。

### 2.4.5.3 結論

富士製薬工業株式会社が開発した FSN-013 は、15 mg のエストロゲン E4 と 3 mg のプロゲスチン DRSP からなる。

これは以下を根拠としている。

- E4 を用いて実施した薬理、薬物動態及び毒性試験
- DRSP に関して公表されている薬理、薬物動態及び毒性データ
- E4/DRSP を併用投与した雌カニクイザルにおける 13 週間反復投与毒性試験

結論として、E4 15 mg/DRSP 3 mg は月経困難症に有効である可能性があり、申請用法・用量（1 日 1 錠を毎日一定の時刻に定められた順に従って（ピンク色錠から開始する）28 日間連続経口投与する。以上 28 日間を投与 1 周期とし、出血が終わっているか続いているかにかかわらず、29 日目から次の周期の錠剤を投与し、以後同様に繰り返す。）で安全であると考えられる。

非臨床安全性試験で認められた所見は以下のとおりであった。

- E4 及び DRSP の薬理学的特性によって説明される。
- エストロゲン／プロゲスチン配合剤でも発現する可能性があることが知られている。
- 動物とヒトにおける用量比又は曝露量比の高値に関連する。
- 臨床には外挿されない。

### 2.4.6 参考文献一覧

Abot A, Fontaine C, Buscato M, Solinhac R, Flouriot G, Fabre A, et al. The uterine and vascular actions of estetrol delineate a distinctive profile of estrogen receptorα modulation, uncoupling nuclear and membrane activation. EMBO Mol Med. 2014;6:1328-46.

Bartholomeusz RK, Bruce NW, Lynch AM. Embryo survival, and fetal and placental growth following elevation of maternal estradiol blood concentrations in the rat. Biol Reprod. 1999 Jul;61(1):46-50.

Battenfeld R, Putz B, Siegmund F, Blode H. Sexual development in the rat after treatment with ethinylestradiol (EE) together with drospirenone (DRSP) during the fetal phase of gestation. 23rd Annual Conference of the European Teratorogy Society. 1995.Sep;20A.

Benoit T, Valera MC, Fontaine C, Buscato M, Lenfant F, Raymond-Letron I, et al. Estetrol, a Fetal Selective Estrogen Receptor Modulator, Acts on the Vagina of Mice through Nuclear Estrogen Receptor α Activation. Am J Pathol. 2017;187:2499-507.

Berger V, Beier S, Elger W, Müller U, Stock G. Influence of different progestogens on blood pressure of non-anaesthetized male spontaneously hypertensive rats. Contraception. 1992 Jul;46(1):83-97.

Blode H, Wuttke W, Loockt W, Roll G, Heitheckert R. A 1-year pharmacokinetic investigation of a novel oral contraceptive containing drospirenone in healthy female volunteers. Eur J Contracept Reprod Health Care. 2000;5:256-64.

Blode H, Foidart JM, Heithecker R. Transfer of drospirenone to breast milk after a single oral administration of 3 mg drospirenone + 30 microg ethinylestradiol to healthy lactating women. Eur J Contracept Reprod Health Care. 2001;6(3):167-71.

Blode H. Pharmacokinetics of drospirenone. Gynaecol Forum. 2002;7(1):18-22.

Blode H, Kowal K, Roth K, Reif S. Pharmacokintics of drospirenone and ethinylestradiol in Caucasian and Japanese women. Eur J Contracept Reprod Health Care. 2012;17:284-97.

Buelke-Sam J, Bryant HU, Francis PC. The selective estrogen receptor modulator, raloxifene: an overview of nonclinical pharmacology and reproductive and developmental testing. Reprod Toxicol. 1998a May-Jun;12(3):217-21.

Buelke-Sam J, Cohen IR, Wierda D, Griffey KI, Fisher LF, Francis PC. The selective estrogen receptor modulator, raloxifene: a segment II/III delivery study in rats. Reprod Toxicol. 1998b May-Jun;12(3):271-88.

Buhl AE, Yuan YD, Cornette JC, Frielink RD, Knight KA, Ruppel PL, et al. Steroid-induced urogenital tract changes and urine retention in laboratory rodents. J Urol. 1985 Dec;134(6):1262-7.

[redacted]. Assessment of the Reproductive Hazard of Estetrol and Review of the Reproductive Toxicology Reports on Estetrol. [redacted] Study Reference ERX0006. 20[redacted].

Coelingh Bennink F, Holinka CF, Visser M, Coelingh Bennink HJT. Maternal and fetal estetrol levels during pregnancy. Climacteric. 2008;11(Suppl 1):69-72.

Coelingh Bennink HJ, Skouby S, Bouchard P, Holinka CF. Ovulation inhibition by estetrol in an in vivo model. Contraception. 2008a;77:186-90.

Coelingh Bennink HJ, Heegaard AM, Visser M, Holinka CF, Christiansen C. Oral bioavailability and bone-sparing effects of estetrol in an osteoporosis model. Climacteric. 2008b;11 Suppl 1:2-14.

Coelingh Bennink HJ, Singer C, Simoncini T, Genazzani AR, Holinka CF, Kubista E. Estetrol, a pregnancy-specific human steroid, prevents and suppresses mammary tumor growth in a rat model. Climacteric. 2008c;11(sup1):29.

De Oliveira CAR, Dos Reis Araujo T, Aguiar GS, da Silva Junior JA, Vettorazzi JF, Freitas IN, et al. Combined oral contraceptive in female mice causes hyperinsulinemia due to β-cell hypersecretion and reduction in insulin clearance. J Steroid Biochem Mol Biol. 2019 Jun;190:54-63.

De Schaepdrijver L, Delille P, Geys H, Boehringer-Shahidi C, Vanhove C. In vivo longitudinal micro-CT study of bent long limb bones in rat offspring. Reprod Toxicol. 2014 Jul;46:91-7.

Dixon D, Alison R, Bach U, Colman K, Foley GL, Harleman JH, et al. Nonproliferative and proliferative lesions of the rat and mouse female reproductive system. J Toxicol Pathol. 2014;27(3-4 Suppl):1S-107S.

Dougherty SM, Mazhawidza W, Bohn AR, Robinson KA, Mattingly KA, Blankenship KA, et al. Gender difference in the activity but not expression of estrogen receptors alpha and beta in human lung adenocarcinoma cells. Endocr Relat Cancer. 2006 Mar;13(1):113-34.

Fan X, Chen X, Wang C, Dai J, Lu Y, Wang K, et al. Drospirenone enhances GPIb-IX-V-mediated platelet activation. J Thromb Haemost. 2015;13:1918-24.

Food and Drug Administration(FDA). Guidance for Industry, Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. 2005.

Food and Drug Administration(FDA). MEMORANDUM OF MEETING MINUTES. Type B: PIND Meeting. Application Number: PIND [redacted]. Reference ID: [redacted]. 20[redacted]

Food and Drug Administration(FDA). Response to Carcinogenicity Special Protocol Assessment Request - Final CAC Report - IND [redacted]. Reference ID: [redacted]. 20[redacted].

Fu XD, Giretti MS, Goglia L, Flamini MI, Sanchez AM, Baldacci C, et al. Comparative actions of progesterone, medroxyprogesterone acetate, drospirenone and nestorone on breast cancer cell migration and invasion. BMC Cancer. 2008;8:166.

Fuhrmann U, Krattenmacher R, Slater EP, Fritzemeier KH. The novel progestin drospirenone and its natural counterpart progesterone: biochemical profile and antiandrogenic potential. Contraception. 1996;54:243-51.

[redacted]. The effects of combined estrogens and progestogens on glucose metabolism and its consequences in animals and in women. Position paper. 20[redacted].

Geary N, Asarian L. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and test meal size in ovariectomized rats. Physiol Behav. 1999 Aug 1;67(1):141-7.

Gérard C, Blacher S, Communal L, Courtin A, Tskitishvili E, Mestdagt M, et al. Estetrol is a weak estrogen antagonizing estradiol-dependent mammary gland proliferation. J Endocrinol. 2015a;224:85-95.

Gérard C, Mestdagt M, Tskitishvili E, Communal L, Gompel A, Silva E, et al. Combined estrogenic and anti-estrogenic properties of estetrol on breast cancer may provide a safe therapeutic window for the treatment of menopausal symptoms. Oncotarget. 2015b;6:17621-36.

Gérard C, Arnal JF, Jost M, Douxfils J, Lenfant F, Fontaine C, et al. Profile of estetrol, a promising native estrogen for oral contraception and the relief of climacteric symptoms of menopause. Expert Rev Clin Pharmacol. 2022;15:121-37.

Gérard C, Chatel G, Jost M, Foidart J-M. Estetrol: estrogenic activity and coregulator profiling. Proceedings of the European Congress of Endocrinology 2023; 13-16 May 2023; Istanbul, Turkey. 2023.

Giretti MS, Montt Guevara MM, Cecchi E, Mannella P, Palla G, Spina S, et al. Effects of Estetrol on Migration and Invasion in T47-D Breast Cancer Cells through the Actin Cytoskeleton. Front Endocrinol (Lausanne). 2014;5:80.

Greaves P. Histopathology of Pre-clinical Toxicity Studies - Endocrine glands. Academic Press; 2007. 805-6.

Greaves P. Histopathology of Preclinical Toxicity Studies - .Chapter 13 Endocrine Glands. Academic Press; 2012. 725-797.

Guivarc'h E, Buscato M, Guihot AL, Favre J, Vessieres E, Grimaud L, et al. Predominant Role of Nuclear Versus Membrane Estrogen Receptor alpha in Arterial Protection: Implications for Estrogen Receptor alpha Modulation in Cardiovascular Prevention/Safety. J Am Heart Assoc. 2018;29;7:e008950.

Hammond GL, Hogeveen KN, Visser M, Coelingh Bennink HJ. Estetrol does not bind sex hormone binding globulin or increase its production by human HepG2 cells. Climacteric. 2008;11 Suppl 1:41-6.

Hammoud Z, Tan B, Badve S, Bigsby RM. Estrogen promotes tumor progression in a genetically defined mouse model of lung adenocarcinoma. Endocr Relat Cancer. 2008 Jun;15(2):475-83.

Harris C. A lipofuscin-like pigment in the kidneys of estrogen-treated rats. Arch Pathol. 1966 Oct;82(4):353-5.

Hart JE. Endocrine pathology of estrogens: species differences. Pharmacol Ther. 1990;47(2):203-18.

Heegaard AM, Holinka CF, Kenemans P, Coelingh Bennink HJ. Estrogenic uterovaginal effects of oral estetrol in the modified Allen-Doisy test. Climacteric. 2008;11 Suppl 1:22-8.

Heikkilä J. Excretion of 15α-hydroxyestriol and estriol in maternal urine during normal pregnancy. Journal of Steroid Biochemistry. 1971;2:83-93.

Hershberger PA, Vasquez AC, Kanterewicz B, Land S, Siegfried JM, Nichols M. Regulation of endogenous gene expression in human non-small cell lung cancer cells by estrogen receptor ligands. Cancer Res. 2005 Feb 15;65(4):1598-605.

Heywood R, Wadsworth PF. The experimental toxicology of estrogens. Pharmac. Ther. 1980; 8:125-42.

Hilgers RH, Oparil S, Wouters W, Coelingh Bennink HJ. Vasorelaxing effects of estetrol in rat arteries. J Endocrinol. 2012 Oct;215(1):97-106.

Holinka CF, Brincat M, Coelingh Bennink HJ. Preventive effect of oral estetrol in a menopausal hot flush model. Climacteric. 2008a;11 Suppl 1:15-21.

Holinka CF, Diczfalusy E, Coelingh Bennink HJT, Estetrol: a unique steroid inhuman pregnancy, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2008b;110:138-43.

Hu HM, Zhang SB, Lei XH, Deng ZL, Guo WX, Qiu ZF, et al. Estrogen leads to reversible hair cycle retardation through inducing premature catagen and maintaining telogen. PLoS One. 2012;7(7):e40124.

IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 72, Hormonal Contraception and Post-menopausal Hormonal Therapy. 1999.

IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 91, Combined Estrogen- Progestogen Contraceptives and Combined Estrogen-Progestogen Menopausal Therapy. 2007.

IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans - Estrogen-only menopausal therapy. Volume 100A, Pharmaceuticals. 2012a.

IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans – Combined estrogen-progestogen menopausal therapy. Volume 100A, Pharmaceuticals. 2012b.

IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans – Combined estrogen-progestogen contraceptives. Volume 100A, Pharmaceuticals. 2012c.

Inoué S. Experimental simulation of neuroendocrine dynamics at periparturient periods--a synthetic approach to pregnancy maintenance, parturition and lactation by programmed infusion of sex steroids in ovariectomized rats. Endocrinol Jpn. 1981 Dec;28(6):747-55.

Ito F, Mori T, Takaoka O, Tanaka Y, Koshiba A, Tatsumi H, et al. Effects of drospirenone on adhesion molecule expression and monocyte adherence in human endothelial cells. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2016;201:113-7.

Jordan A. FDA requirements for nonclinical testing of contraceptive steroids. Contraception. 1992 Dec;46(6):499-509.

Kim JY, Jo KJ, Kim OS, Kim BJ, Kang DW, Lee KH, et al. Parenteral 17 $\beta$ -estradiol decreases fasting blood glucose levels in non-obese mice with short-term ovariectomy. Life Sci. 2010 Sep 11;87(11-12):358-66.

Kimmel CA, Garry MR, DeSesso JM. Relationship between bent long bones, bent scapulae, and wavy ribs: malformations or variations? Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. 2014 Oct;101(5):379-92.

[redacted]. Expert review of the genotoxicity of estetrol (E4). 20[redacted].

Konishi S, Kotera T, Koga M, Ueda M. Spontaneous hypertrophic cardiomyopathy in a cynomolgus macaque (Macaca fascicularis). J Toxicol Pathol. 2018 Jan;31(1):49-54.

Krattenmacher R, Dobrindt C, Hegele Hartung Ch. Effects of drospirenone on blood pressure and heart rate in rats measured by highly sensitive radiotelemetry. Gynecol Endocrinol. 1996;10, 1996(Suppl 2):183-5.

Krattenmacher R. Drospirenone: pharmacology and pharmacokinetics of a unique progestogen. Contraception. 2000;62(1):29-38.

Kraus WL, Katzenellenbogen BS. Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by progesterone and sex steroid hormone antagonists. Endocrinology. 1993 Jun;132(6):2371-9.

Kroeker R, Bellanca RU, Lee GH, Thom JP, Worlein JM. Alopecia in three macaque species housed in a laboratory environment. Am J Primatol. 2014 Apr;76(4):325-34.

Kuroda H, Kohrogi T, Uchida N, Imai I, Terada N, Matsumoto K, et al. Urinary retention induced by estrogen injections in mice: an analytical model. J Urol. 1985 Dec;134(6):1268-70.

Laast VA, Larsen T, Allison N, Hoenerhoff MJ, Boorman GA. Distinguishing cystic degeneration from other aging lesions in the adrenal cortex of Sprague-Dawley rats. Toxicol Pathol. 2014 Jul;42(5):823-9.

Lang R, Reimann R. Studies for a genotoxic potential of some endogenous and exogenous sex steroids. I. Communication: examination for the induction of gene mutations using the Ames Salmonella/microsome test and the HGPRT test in V79 cells. Environ Mol Mutagen. 1993;21(3):272-304.

Loose DS, Stancel GM. Estrogens and progestins. In: Brunton LL, editor. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 11th ed. New York: McGraw-Hill Co; 2006. p.1541-71.

Losert W, Casals-Stenzel J, Buse M. Progestogens with antimineralocorticoid activity. Arzneimittelforschung. 1985;35:459-71.

Louw-du Toit R, Perkins MS, Hapgood JP, Africander D. Comparing the androgenic and estrogenic properties of progestins used in contraception and hormone therapy. Biochem Biophys Res Commun. 2017;491:140-6.

Maier WE, Herman JR. Pharmacology and toxicology of ethinyl estradiol and norethindrone acetate in experimental animals. Regul Toxicol Pharmacol. 2001 Aug;34(1):53-61.

Mann MA, Kinsley C, Broida J, Svare B. Infanticide exhibited by female mice: genetic, developmental and hormonal influences. Physiol Behav. 1983 May;30(5):697-702.

Martelli A, Mattioli F, Angiola M, Reimann R, Brambilla G. Species, sex and inter-individual differences in DNA repair induced by nine sex steroids in primary cultures of rat and human hepatocytes. Mutat Res. 2003 Apr 20;536(1-2):69-78.

McClain RM, Keller D, Casciano D, Fu P, MacDonald J, Popp J, et al. Neonatal mouse model: review of methods and results. Toxicol Pathol. 2001;29 Suppl:128-37.

Mclnnes EF. Background Lesions in Laboratory Animals - Chapter 2 Wistar and Sprague–Dawley rats. Elsevier; 2011. 17-36.

Mitchard T, Stewart J. The novel use of a heterozygous knockout mouse for embryofetal development assessment of a glucokinase activator. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. 2014 Apr;101(2):152-61.

Miyashita M, Koga K, Izumi G, Makabe T, Hasegawa A, Hirota Y, et al. Drospirenone induces decidualization in human eutopic endometrial stromal cells and reduces DNA synthesis of human endometriotic stromal cells. Fertil Steril. 2015;104:217-24.

Monserrat AJ, Porta EA. Studies on the renal pigment of estrogen-treated rats histochemistry and electron microscopy. Exp Mol Pathol. 1978 Oct;29(2):211-27.

Montt-Guevara MM, Giretti MS, Russo E, Giannini A, Mannella P, Genazzani AR, et al. Estetrol Modulates Endothelial Nitric Oxide Synthesis in Human Endothelial Cells. Front Endocrinol (Lausanne). 2015;6:111.

Montt-Guevara MM, Palla G, Spina S, Bernacchi G, Cecchi E, Campelo AE, et al. Regulatory effects of estetrol on the endothelial plasminogen pathway and endothelial cell migration. Maturitas. 2017;99:1-9.

Muhn P, Krattenmacher R, Beier S, Elger W, Schillinger E. Drospirenone: a novel progestogen with antimineralocorticoid and antiandrogenic activity. Pharmacological characterization in animal models. Contraception. 1995 Feb;51(2):99-110.

Murakami G. Distinct Effects of Estrogen on Mouse Maternal Behavior: The Contribution of Estrogen Synthesis in the Brain. PLoS One. 2016 Mar 23;11(3):e0150728.

Nilsson S, Nygren K-G, Johansson EDB. d-Norgestrel concentrations in maternal plasma, milk, and child plasma during administration of oral contraceptives to nursing women. Am.J.Obstet.Gynecol. 1977a;129(2):178-84.

Nilsson S, Nygren K-G, Johansson EDB. Megestrol acetate concentrations in plasma and milk during administration of an oral contraceptive containing 4 mg megestrol acetate to nursing. Contraception. 1977b;16(6):615-24.

Nilsson S, Nygren K-G, Johansson EDB. Ethinyl estradiol in human milk and plasma after oral administration. Contraception. 1978a;17(2):131-9.

Nilsson S, Nygren K-G, Johansson EDB. Transfer of estradiol to human milk. Am J Obstet Gynecol. 1978b;132(6):653-7.

Odlind V, Milsom I, Persson I, Victor A. Can changes in sex hormone binding globulin predict the risk of venous thromboembolism with combined oral contraceptive pills? Acta Obstet Gynecol Scand. 2002;81:482-90.

Ohnemus U, Uenalan M, Inzunza J, Gustafsson JA, Paus R. The hair follicle as an estrogen target and source. Endocr Rev. 2006 Oct;27(6):677-706.

Otto C, Fuchs I, Altmann H, Klewer M, Walter A, Prelle K, et al. Comparative analysis of the uterine and mammary gland effects of drospirenone and medroxyprogesterone acetate. Endocrinology. 2008;149:3952-9.

Pearse G. Histopathology of the thymus. Toxicol Pathol. 2006;34(5):515-47.

Pearse G, Frith J, Randall KJ, Klinowska T. Urinary retention and cystitis associated with subcutaneous estradiol pellets in female nude mice. Toxicol Pathol. 2009 Feb;37(2):227-34.

Pollow K, Juchem M, Elger W, Jacobi N, Hoffmann G, Möbus V. Dihydrospirorenone (ZK30595): a novel synthetic progestagen--characterization of binding to different receptor proteins. Contraception. 1992;46:561-74.

Reimann R, Kalweit S, Lang R. Studies for a genotoxic potential of some endogenous and exogenous sex steroids. II. Communication: examination for the induction of cytogenetic damage using the chromosomal aberration assay on human lymphocytes in vitro and the mouse bone marrow micronucleus test in vivo. Environ Mol Mutagen. 1996;28(2):133-44.

Ruan X, Neubauer H, Yang Y, Schneck H, Schultz S, Fehm T, et al. Progestogens and membrane-initiated effects on the proliferation of human breast cancer cells. Climacteric. 2012;15:467-72.

Sanchez AM, Flamini MI, Baldacci C, Goglia L, Genazzani AR, Simoncini T. Estrogen receptor-alpha promotes breast cancer cell motility and invasion via focal adhesion kinase and N-WASP. Mol Endocrinol. 2010;24:2114-25.

Santollo J, Eckel LA. Estradiol decreases the orexigenic effect of neuropeptide Y, but not agouti-related protein, in ovariectomized rats. Behav Brain Res. 2008 Aug 22;191(2):173-7.

Schardein JL. Studies of the components of an oral contraceptive agent in albino rats. I. Estrogenic component. J Toxicol Environ Health. 1980 Jul;6(4):885-94.

Seeger H, Wallwiener D, Mueck AO. Effects of drospirenone on cardiovascular markers in human aortic endothelial cells. Climacteric. 2009;12:80-7.

Seeger H, Ruan X, Neubauer H, Mueck AO. Effect of drospirenone on proliferation of human benign and cancerous epithelial breast cells. Horm Mol Biol Clin Investig. 2011;6:211-4.

Shirk RA, Zhang Z, Winneker RC. Differential effects of estrogens and progestins on the anticoagulant tissue factor pathway inhibitor in the rat. J Steroid Biochem Mol Biol. 2005;94:361-8.

Simoncini T, Fu XD, Caruso A, Garibaldi S, Baldacci C, Giretti MS, et al. Drospirenone increases endothelial nitric oxide synthesis via a combined action on progesterone and mineralocorticoid receptors. Hum Reprod. 2007;22:2325-34.

Smirnova NF, Fontaine C, Buscato M, Lupieri A, Vinel A, Valera MC, et al. The Activation Function-1 of Estrogen Receptor Alpha Prevents Arterial Neointima Development Through a Direct Effect on Smooth Muscle Cells. Circ Res. 2015;117:770-8.

[redacted]. Study synopsis, Microscopic examination of hearts stained with Masson's trichrome for background/historical data collection in mature mauritius female cynomolgus monkeys. [redacted] France No. 41792 EPP. 20[redacted].

Stegeman BH, Raps M, Helmerhorst FM, Vos HL, van Vliet HA, Rosendaal FR, et al. Effect of ethinylestradiol dose and progestagen in combined oral contraceptives on plasma sex hormone-binding globulin levels in premenopausal women. J Thromb Haemost. 2013;11:203-5.

Tang H, Liao Y, Xu L, Zhang C, Liu Z, Deng Y, et al. Estrogen and insulin-like growth factor 1 synergistically promote the development of lung adenocarcinoma in mice. Int J Cancer. 2013 Nov 15;133(10):2473-82.

Thoolen B, Ten Kate FJ, van Diest PJ, Malarkey DE, Elmore SA, Maronpot RR. Comparative histomorphological review of rat and human hepatocellular proliferative lesions. J Toxicol Pathol. 2012 Sep;25(3):189-99.

Tobias JH, Chow J, Colston KW, Chambers TJ. High concentrations of 17 beta-estradiol stimulate trabecular bone formation in adult female rats. Endocrinology. 1991 Jan;128(1):408-12.

Tulchinsky D, Frigoletto FD, Ryan KJ, Fishman J. Plasma estetrol as an index of fetal well-being. J Clin Endocrinol Metab 1975;40(4):560-7.

Uemura H, Irahara M, Yoneda N, Yasui T, Genjida K, Miyamoto KI, et al. Close correlation between estrogen treatment and renal phosphate reabsorption capacity. J Clin Endocrinol Metab. 2000 Mar;85(3):1215-9.

Valéra MC, Noirrit-Esclassan E, Dupuis M, Fontaine C, Lenfant F, Briaux A, et al. Effect of estetrol, a selective nuclear estrogen receptor modulator, in mouse models of arterial and venous thrombosis. Mol Cell Endocrinol. 2018;477:132-39.

Van der Molen HJ, Hart PG, Wijmenga HG. Studies with 4-14C-lynestrenol in normal and lactating women. Acta Endocrinol (Copenh). 1969;61(2):255-74.

Van Diepen HA, Lam TW, Kuil CW. Nomegestrol acetate: steroid receptor transactivation profile in Chinese hamster ovary cells and ovulation inhibition in rat and monkey. Contraception. 2011;84:199-204.

[redacted]. Cardiac Lesions in a 13-Week Study with Estetrol/Levonorgestrel Combination in Cynomolgus Monkeys. Review of Cardiac Findings - [redacted] Study 40427 TCP. 20[redacted].

[redacted]. New Insights in Cardiac Pathology Observed in Studies with Estetrol, Estetroi/Levonorgestrel and Estetroi/Drospirenone Combinations in Female Mauritian Cynomolgus Monkeys. Review of Cardiac Findings in E4 Studies. 20[redacted].

Van Vliet HA, Frolich M, Christella M, Thomassen LG, Doggen CJ, Rosendaal FR, et al. Association between sex hormone-binding globulin levels and activated protein C resistance in explaining the risk of thrombosis in users of oral contraceptives containing different progestogens. Hum Reprod. 2005;20:563-8.

Visser M, Foidart JM, Coelingh Bennink HJ. In vitro effects of estetrol on receptor binding, drug targets and human liver cell metabolism. Climacteric. 2008;11 Suppl 1:64-8.

Visser M, Coelingh Bennink HJT. Clinical applications for estetrol. J Steroid Biochem Mol Biol. 2009;114:85-9.

Visser M, Kloosterboer HJ, Bennink HJ. Estetrol prevents and suppresses mammary tumors induced by DMBA in a rat model. Horm Mol Biol Clin Investig. 2012;9:95-103.

Webster R, Sheriff S, Faroqui R, Siddiqui F, Hawse JR, Amlal H. Klotho/fibroblast growth factor 23- and PTH-independent estrogen receptor-α-mediated direct downregulation of NaPi-IIa by estrogen in the mouse kidney. Am J Physiol Renal Physiol. 2016Aug 1;311(2):F249-59.

Weisenburger WP, Hagler AR, Tassinari MS. Pre- and postnatal development studies of lasofoxifene, a selective estrogen receptor modulator (SERM), in Sprague-Dawley rats. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. 2004 Jun;71(3):171-84.

Wiesinger H, Berse M, Klein S, Gschwend S, Höchel J, Zollmann FS, Schütt B. Pharmacokinetic interaction between the CYP3A4 inhibitor ketoconazole and the hormone drospirenone in combination with ethinylestradiol or estradiol. Br J Clin Pharmacol. 2015;80(6):1399-410.

Wijmenga HG, van der Molen HJ. Studies with 4-$^{14}$C-mestranol in lactating women. Acta Endocrinol (Copenh). 1969;61:665-77.

Witte MM, Resuehr D, Chandler AR, Mehle AK, Overton JM. Female mice and rats exhibit species-specific metabolic and behavioral responses to ovariectomy. Gen Comp Endocrinol. 2010 May 1;166(3):520-8.

Xu H, Uno JK, Inouye M, Xu L, Drees JB, Collins JF, et al. Regulation of intestinal NaPi-IIb cotransporter gene expression by estrogen. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2003 Dec;285(6):G1317-24.

Yanagimachi R, Sato A. Effects of a single oral administration of ethinyl estradiol on early pregnancy in the mouse. Fertil Steril. 1968 Sep-Oct;19(5):787-801.

Zabka TS, Irwin M, Albassam MA. Spontaneous cardiomyopathy in cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis). Toxicol Pathol. 2009 Oct;37(6):814-8.