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

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1　緒言

富士製薬工業株式会社

目次

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表 4
2.6.1 緒言 4

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）
CAS	Chemical Abstracts Service	ケミカル・アブストラクツ・サービス
CTD	Common Technical Document	国際共通化資料
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］
EE	ethinylestradiol	エチニルエストラジオール
ER	estrogen receptor	エストロゲン受容体
[redacted] 社	[redacted]	－
INN	International Nonproprietary Names	国際一般名
LNG	levonorgestrel	レボノルゲストレル
MF	Master File	原薬等登録原簿
[redacted] 社	[redacted]	―

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

2.6.1.1 一般情報

申請者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 及びプロゲスチンのドロスピレノン（DRSP）3 mg で構成される。

E4（エストラ-1,3,5(10)-トリエン-3,15α,16α,17β-テトロール）は、天然由来のエストロゲンの合成化合物である。E4 は、ヒトの妊娠中に胎児の肝臓で産生される。胎児及び母体の血漿中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）。この天然ホルモンは、1965 年に Diczfalusy らによって妊娠女性の尿中で発見された（Hagen, 1965）。

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]フェンタントレン-17,2' (5'H)-フラン]-3,5'(2H)-ジオン）は、カリウム保持性利尿薬として使用されている抗アルドステロン性利尿・降圧剤の有効成分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、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。

2.6 に、製造販売承認申請を裏付けるために実施した非臨床試験を記載している。20[redacted]年から 20[redacted]年までの E4 の初期開発は Pantarhei Bioscience 社（Pantarhei）が行い、E4 の効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験の大部分を実施した。20[redacted]年以降、Estetra SPRL 社（Estetra；Mithra Pharmaceuticals の子会社）が開発プログラムを継承し、安全性薬理試験、薬物動態試験及び毒性試験を含む E4 単独投与の非臨床試験一式を完了した。他にも、E4 の薬理学的特性に関する多くの公表文献があり、2.6.2 及び 2.6.3 にその内容を記載した。

Estetra 社は DRSP 単独での非臨床試験は実施していないが、雌サルを用いた E4/DRSP 併用の 13 週間反復経口投与毒性試験を実施している。この試験には E4 単独群及び DRSP 単独群が含まれる。公表されている情報源に基づく DRSP の薬理学的特性、薬物動態特性及び毒性プロファイルに関するデータを 2.4、2.6.2、2.6.4 及び 2.6.6 に示す。

本概要中では薬理（効力を裏付ける試験、副次的薬理試験、安全性薬理試験及び薬力学的薬物相互作用試験）、薬物動態（分析法、吸収、分布、代謝、排泄及び薬物動態学的薬物相互作用）及び毒性（単回投与毒性、反復投与毒性、遺伝毒性、がん原性、生殖発生毒性、局所刺激性及びその他の毒性）の各項を E4 に関する項と DRSP に関する項に細分した。

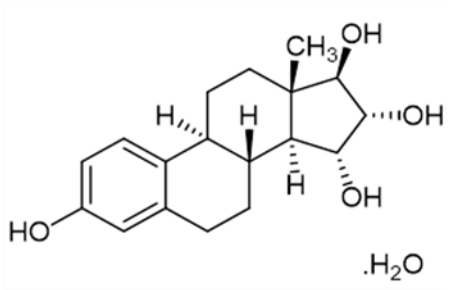
E4 は[redacted]社から入手する。E4 原薬の潜在的な不純物及び分解生成物に関する情報は、原薬等登録原簿（MF 登録番号：[redacted]、登録：令和[redacted]年[redacted]月[redacted]日）に示す（2.3.S.3.2、3.2.S.3.2）。DRSP 原薬は[redacted]社及び[redacted]社から入手する。[redacted]の DRSP 原薬については、潜在的な不純物及び分解生成物に関する情報は、原薬等登録原簿（MF 登録番号：[redacted]、登録：令和[redacted]年[redacted]月[redacted]日）に示す（2.3.S.3.2、3.2.S.3.2）。[redacted]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）。

2.6.1.2 医薬品情報

2.6.1.2.1 エステトロール

登録番号： 301-3-B7
JAN（日本名）： エステトロール水和物
JAN（英名）： Estetrol hydrate
化学名： estra-1,3,5(10)-triene-3,15,16,17-tetrol (15α,16α,17β) monohydrate
estra-1,3,5(10)-triene-3,15α,16α,17β-tetrol monohydrate
15α-hydroxyestriol monohydrate
3,15α,16α,17β-tetrahydroxyestra-1,3,5(10)-triene monohydrate
(8R,9S,13S,14S,15R,16R,17R)-13-methyl-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-decahydrocyclopenta[a]phenanthrene-3,15,16,17-tetrol monohydrate

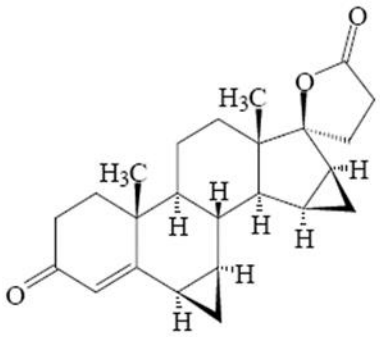
CAS 登録番号： 2055649-81-3
分子式： $C_{18}H_{24}O_4$・H_2O（無水物として $C_{18}H_{24}O_4$）
分子量： 322.40（無水物として 304.38）
構造式：



2.6.1.2.2 ドロスピレノン

JAN（日本名）： ドロスピレノン
JAN（英名）： Drospirenone
化学名： 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-hexadecahydro-10,13-dimethylspiro-[17H-dicyclopropa[6,7:15,16]cyclopenta[a]phenanthrene-17,2'(5'H)-furan]-3,5'(2H)-dione
17-hydroxy-6beta,7beta,16beta-dimethylene-3-oxo-17alpha-pregnen-4-ene-21,17-carbolactone
17-hydroxy-6β,7β:15β,16β dimethylene-3-oxo-17α-pregn-4-ene-21-carboxylic acid, γ-lactone

CAS 登録番号： 67392-87-4
分子式： $C_{24}H_{30}O_3$
分子量： 366.49
構造式：



2.6.1.2.3 製剤の処方

E4 と DRSP はフィルムコート錠に配合し、E4 15 mg 及び DRSP 3 mg と下表に示す添加剤を含有する。

表 1. E4 15 mg/DRSP 3 mg に使用する添加剤

Components	Function	Unit Formula
Monohydrate lactose	Filler	39.9 mg
Sodium carboxymethyl starch	Disintegrant	5.0 mg
Maize starch	Filler	14.0 mg
Povidone	Binder for wet granulation	2.1 mg
Magnesium stearate	Lubricant	1.0 mg
[redacted]	[redacted]	3.0 mg

2.6.1.3 薬理学的分類及び配合根拠

In vitro 及び *in vivo* の効力を裏付ける試験（2.6.2）で、E4 は弱いエストロゲンであることが明らかになった。E4 はエストロゲン受容体 ERα 及び ERβ と選択的に結合し、ERα に対して 4〜5 倍高い選択性を示す。*In vivo* の効力を裏付ける試験で観察された E4 のエストロゲン作用の効力は、EE の作用に比べ概して 1/10〜1/20 で、さらにエストラジオール（E2）の作用と比べても低かった。

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プロゲスチンである。DRSP は、抗ミネラルコルチコイド作用及び抗アンドロゲン作用も有するが、アンドロゲン活性、エストロゲン活性、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はない（Muhn, 1995）。

E4 15 mg/DRSP 3 mg からなる FSN-013 に E4 と DRSP を配合する根拠は、臨床結果、すなわち、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。

2.6.1.4 適応疾患及び用法・用量

FSN-013（E4 15 mg/DRSP 3 mg）の予定される効能又は効果は、「月経困難症」であり、予定される用法及び用量は、「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。」である。

2.6.1.5 参考文献

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

Hagen AA, Barr M, Diczfalusy E. Metabolism of 17-beta-oestradiol-4-14-C in early infancy. Acta Endocrinol (Copenh). 1965 Jun;49:207-20.

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

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.

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

FSN-013

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2　薬理試験の概要文

富士製薬工業株式会社

目次

2.6.2 薬理試験の概要文 6
2.6.2.1 まとめ 6
2.6.2.1.1 エステトロール 6
2.6.2.1.2 ドロスピレノン 11
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 14
2.6.2.2.1 エステトロール 14
2.6.2.2.2 ドロスピレノン 26
2.6.2.3 副次的薬理試験 27
2.6.2.3.1 エステトロール 27
2.6.2.3.2 ドロスピレノン 46
2.6.2.4 安全性薬理試験 51
2.6.2.4.1 エステトロール 51
2.6.2.4.2 ドロスピレノン 53
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 54
2.6.2.5.1 エステトロール 54
2.6.2.5.2 ドロスピレノン 54
2.6.2.6 考察及び結論 54
2.6.2.6.1 エステトロール 54
2.6.2.6.2 ドロスピレノン 59
2.6.2.6.3 結論 61
2.6.2.7 図表 63
2.6.2.8 参考文献 63

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）
ADP	adenosine diphosphate	アデノシン二リン酸
AF-1 又は AF-2	activation function 1 or 2	活性化機能 1 又は 2
AngII	angiotensin II	アンジオテンシン II
AP-1	activator protein-1	—
approx.	approximately	約
AT	antithrombin	アンチトロンビン
bid	bis in die	1 日 2 回
CALUX	chemically activated luciferase reporter gene	化学活性化ルシフェラーゼ遺伝子発現
CBG	corticosteroid binding globulin	コルチコステロイド結合グロブリン
CXCL12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12	ケモカイン（C-X-C モチーフ）リガンド 12
cGMP	cyclic guanosine monophosphate	環状グアノシン一リン酸
COC	combined oral contraceptive	配合型経口避妊薬
CYP3A	cytochrome P450 3A	チトクロム P450 3A
DMBA	dimethylbenz[a]anthracene	ジメチルベンズ[a]アントラセン
DMSO	dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
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
E3	estriol	エストリオール
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
EP	estrogen progestin	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
ERK1/2	extracellular signal regulated kinase	細胞外シグナル調節キナーゼ
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
GPER	G-protein coupled estrogen receptor 1	G 蛋白共役型エストロゲン受容体 1
GPIb-IX-V	glycoprotein Ib-IX-V	血小板膜糖蛋白 Ib-IX-V
GPVI	Glycoprotein VI	血小板膜糖蛋白 VI
GREB1	gene regulated by estrogen in breast cancer 1	乳癌のエストロゲンによる調節遺伝子 1
HCC1500	human breast cancer cell line	ヒト乳癌細胞株
HEK	human embryonic kidney cell line	ヒト胎児由来腎細胞株
HepG2	human hepatocellular carcinoma cell line	ヒト肝細胞癌細胞株

Hep89	HepG2 cells overexpressing human ERα	―
HeLa	human cervival cancer cell line	ヒト子宮頸癌細胞株
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
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells	ヒト臍帯静脈内皮細胞
IC50	median inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1	細胞間接着分子 1
ID100	100% inhibitory dose	100%阻害用量
Kd	dissociation constant	解離定数
Ki	inhibitory constant	阻害定数
LDLr	low density lipoprotein receptor	低比重リポ蛋白受容体
L-NAME	Nω-nitro-L-arginine	N^{ω}-ニトロ-L-アルギニン
MAPK	mitogen activated protein kinase	マイトジェン活性化プロテインキナーゼ
MCF-7	human breast cancer cell line	ヒト乳癌細胞株
MCP-1	monocyte attracting protein-1	―
MEK	mitogen-activated protein kinase/ extracellular signal-related kinase kinase	―
MISS	membrane-initiated steroid signaling	膜開始ステロイドシグナル伝達
mRNA	messenger ribonucleic acid	メッセンジャーリボ核酸
NO	nitric oxide	一酸化窒素
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
pc	post coitum	交配後
PGRMC1	progesterone receptor membrane component 1	プロゲステロン受容体膜成分 1
PI3K/AKT	phosphoinositide 3-kinase/protein kinase b	―
pM	picomolar	ピコモル
PR	progesterone receptor	プロゲステロン受容体
RBA	relative binding affinity	相対結合親和性
RNA	ribonucleic acid	リボ核酸
RT-qPCR	reverse transcriptase and real-time quantitative polymerase chain reaction	逆転写リアルタイム定量的ポリメラーゼ連鎖反応
SHBG	sex hormone binding globulin	性ホルモン結合グロブリン
Sp1	specificity protein-1	―
siRNA	silencing ribonucleic acid	サイレンシングリボ核酸
SRC3	steroid receptor co-activator 3	ステロイド受容体コアクチベーター-3
T47-D	ER- and PR-positive human breast cancer cell line	―
TFPI	tissue factor pathway inhibitor	組織因子経路インヒビター
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
U2-OS	human osteosarcoma cell line	ヒト骨肉腫細胞株
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

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

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

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（EP）配合剤である。E4 は、天然由来のエストロゲンの合成化合物である。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）。

E4 の薬理学的特性を明らかにするため、広範な試験プログラムを実施した。DRSP の十分に確立された使用法及び臨床的有効性が立証されていることを考慮し、DRSP 単独投与又は E4 と DRSP の併用投与の薬理試験は実施していない。DRSP に関するデータは、公表されている情報源から入手した。

2.6.2.1.1 エステトロール

E4 を用いて実施した薬理試験プログラムを表 2.6.2-1 及び概要表（TS）の表 2.6.3.1 に示す。ほぼ全ての試験は Estetra 社又は Pantarhei 社が実施し、一部の試験は公表された情報源から引用した。臨床適応を考慮して、雌動物を用いて *in vivo* 試験を実施した。

効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験は、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）に準拠して実施したものではない。安全性薬理試験は、毒性試験と同じ動物種／系統を用いて実施し、GLP を遵守して実施した。

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。

表 2.6.2-1 薬理試験プログラム

Study Type	Route of Administration	Species or Test System
Primary pharmacodynamics		
Estrogen receptor binding and transactivation by E4 and its main human metabolites	*in vitro*	recombinant human ERα or ERβ; U2-OS, HepG2 and HeLa cells expressing human ERα or ERβ
Effect on vagina	subcutaneous	mouse ($ERα^{+/+}$ or $ERα^{-/-}$, $ERβ^{+/+}$ or $ERβ^{-/-}$, ERα-$AF2^{0}$ or C451A-ERα; ovariectomized)
Uterotrophic effect	subcutaneous	mouse (ovariectomized)
Mammary gland growth	oral (gavage)	mouse (prepubertal, ovariectomized)
Modified Allen-Doisy test	oral (gavage) subcutaneous	rat (ovariectomized)
Inhibition of ovulation and/or implantation	oral (gavage)	rat, rabbit

表 2.6.2-1 薬理試験プログラム（続き）

Study Type	Route of Administration	Species or Test System
Primary pharmacodynamics		
Effects on endometriotic cell growth, migration and PR levels	*in vitro*	primary endometrial cells from endometriotic patients, human endometriotic cell lines (11Z or Hs832)
Secondary pharmacodynamics		
[redacted] screen for off-target activities	*in vitro*	approx. 130 targets
Effect on breast cell growth, proliferation, migration and invasion	*in vitro*	normal human breast cells; MCF-7 and T47-D breast cancer cells
Tumor growth after MCF-7 cell implantation	oral (gavage)	mouse (immunodeficient, ovariectomized)
Mammary tumor development and regression (DMBA-model)	oral (gavage)	rat
Binding of SHBG	*in vitro*	human SHBG
Induction of SHBG and CBG	*in vitro*	HepG2 and Hep89 cells
Effect on fibrinolysis regulators and endothelial migration	*in vitro*	HUVEC cells
Effect on hemostasis and thrombosis in mouse	subcutaneous	mouse (ovariectomized)
Effect on NO release, eNOS activation and expression	*in vitro*	HUVEC cells; mouse aorta
Vasorelaxation effects	*in vitro*	rat arteries
Prevention of atheroma	oral (diet)	mouse ($ER\alpha^{+/+}/LDLr^{-/-}$ or $ER\alpha^{-/-}/LDLr^{-/-}$; ovariectomized)
Effect on endothelial healing	subcutaneous	mouse (ovariectomized or gonad-intact)
Effect on neointimal hyperplasia, flow-mediated arteriolar remodeling and angiotensin II-induced hypertension	subcutaneous	mouse (ovariectomized)
Effect on vasomotor symptoms	oral (gavage)	rat (ovariectomized)
Prevention of bone loss	oral (gavage)	rat (ovariectomized)
Effect on collagen-induced arthritis	oral (gavage)	mouse
Effect in experimental autoimmune encephalomyelitis	oral (gavage)	mouse
Safety pharmacology		
Functional Observation Battery	oral (gavage)	rat
hERG assay	*in vitro*	HEK-293 cells stably expressing hERG channels
Cardiovascular function (telemetry)	oral (gavage)	monkey
Whole-body plethysmography	oral (gavage)	rat

Abbreviations: DMBA = 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, eNOS = endothelial nitric oxide synthase, ER = estrogen receptor, CBG = corticosteroid binding globulin, HEK-293 = human embryonic kidney cell line, HeLa = cervical cancer cell line, HepG2 = human hepatocellular carcinoma cell line, Hep89 = HepG2 cells overexpressing human ERα, hERG = human ether-a-go-go-related gene, HUVEC: human umbilical vein endothelial cells, LDLr = low density lipoprotein receptor, MCF-7 = human breast cancer cell line, NO = nitric oxide, PR = progesterone receptor, SHBG = sex hormone binding globulin, T47-D = ER-positive human breast cancer cell line, U2-OS = human osteosarcoma cell line.

効力を裏付ける試験

エストロゲン特性

エストラジオール（E2）と比較した場合の E4 のヒトエストロゲン受容体 ERα 及び ERβ に対する相対結合親和性（RBA）について、1 つの試験では両受容体とも 1.7%、別の試験では両受容体に対してそれぞれ 4%及び 0.68%であった（[redacted] Preclinical Studies of Estetrol、PR3019）。トランス活性化アッセイにおいて、E4 は ERα 及び ERβ のいずれに対してもエストロゲン活性を示し、ERα の方が優先的であった。E4 の効力は E2 又は EE の効力より低かった。本試験で、E4 はいずれの受容体に対してもアンタゴニスト活性を示さなかった（PR3046）。E4 は、古典的なエストロゲン応答配列（ERE）の機序を介して遺伝子転写を活性化した（Abot, 2014）。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]）。

ERα 及び ERβ の両生物検定において、E4 代謝物の E4-3-グルクロニド及び E4-16-グルクロニドは弱いエストロゲン活性を示した。E4-3-グルクロニド及び E4-16-グルクロニドの効力は、ERα の生物検定で E4 の効力のそれぞれ 1/3793 及び 1/586 であった（Es0001-NC-014）。

E2（8 又は 80 µg/kg/日）及び E4（1 又は 6 mg/kg/日）を 3 週間皮下投与したとき、卵巣摘出 C57BL/6J マウスの膣重量、上皮の高さ、上皮の増殖及び潤滑性は同程度に増加した。これらの膣への作用は、完全に核内 ERα 活性化を介したものであった（Benoit, 2017）。

卵巣摘出 C57BL/6J マウスでは、E4（1 mg/kg）を単回皮下投与したところ、子宮腔上皮及び間質の高さが増加し、子宮上皮増殖が誘発された。その効力は E2 の効力の約 1%であった。子宮の E2 反応性遺伝子も E4 に反応し、ほとんどの上方制御遺伝子で 1/100 の効力差、ほとんどの下方制御遺伝子で 1/10 の効力差が認められた（Abot, 2014）。

卵巣摘出幼若 C57BL/6J マウスでは、E4（3 mg/kg/日を 6 又は 14 日間の強制経口投与）により乳腺上皮管の成長が刺激されたが、その効力は E2 よりも低かった。上皮成長の刺激は ERα 介在性であった。E4 は E2 の作用を部分的に拮抗した（Gérard, 2015a）。

卵巣摘出 Sprague-Dawley ラットを用いた Allen-Doisy 変法による検査で、E4 を 0.1～3 mg/kg/日の用量で 7 日間強制経口投与又は皮下投与した。E4 は用量依存的な膣角化、最終体重の減少及び子宮重量の増加を引き起こした。そのエストロゲン効力は、皮下投与後より経口投与後の方が高く、EE の効力の 1/20 と推定された（PR3014）。

雌 Sprague-Dawley ラットの性周期の 4 日間に E4 を強制経口投与したところ、排卵が抑制され、ED50 は約 0.2 mg/kg *bid* であった。E4 の排卵抑制作用の効力は EE の 1/20 であり、E2 よりも低かった（PR3015、PR3026）。ニュージーランド白ウサギにおいて、E4 は排卵及び着床を抑制し、それぞれの経口投与時の ED50 は 0.735 mg/kg *bid* 及び 0.055 mg/kg *bid* であった（ES-T04）。

子宮内膜症細胞に対する in vitro 作用

ヒト子宮内膜細胞及びヒト子宮内膜症細胞株において、E4 は 0.01～10000 nM の濃度で細胞増殖に影響しなかった。ヒト子宮内膜症細胞株において、E4 は 1000 nM の濃度で細胞遊走に影響しなかった。一方、E2 は、E4 とは異なりこれら細胞の増殖及び遊走を促進した。ヒト子宮内膜

症細胞株において、E4 は、プロゲステロン受容体（PR）蛋白量を増加させ、プロゲステロンによるプロゲステロン応答性遺伝子の発現を促進した（Patiño-García, 2023）。

副次的薬理試験

オフターゲット受容体相互作用試験

E4 は、その主要標的である ER 受容体を除き、130 種類の一連の薬物標的（受容体、トランスポーター、イオンチャネル）と相互作用を示さなかった（PR3019）。

乳癌リスクに関連する試験

E4（1 μM までの濃度で 72 時間又は 96 時間）は、正常なヒト乳腺細胞及びヒト乳癌細胞 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）。エストロゲン誘導性乳腺細胞成長の機序は、核内（転写活性化）ERα 活性化と核外［膜開始ステロイドシグナル伝達（MISS）］経路の両者が関与している（Gérard, 2015b）。E4（100 nM を 24 又は 48 時間）もヒト乳癌細胞 T47-D の遊走及び浸潤を促進したが、その効力は E2 より低かった（PR3101）。乳腺細胞の増殖及び遊走に対する E4 の作用は、抗エストロゲン薬 ICI 182 780 や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、PR3101）。乳腺細胞成長に対する E4 のアンタゴニスト作用は、E2 誘発核内 ERα 経路の阻害によって介在されなかった（Gérard, 2015b）。しかし、E4 は ERα とチロシンキナーゼ Src との間の E2 誘導性相互作用を阻害した（Abot, 2014）。

In vivo で、ヒト乳癌細胞 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 誘導性腫瘍成長を用量依存的に一部拮抗した（Gérard, 2015b）。

雌 Sprague-Dawley ラットのジメチルベンズ[a]アントラセン（DMBA）誘発乳腺腫瘍モデルにおいて、E4 は 1 mg/kg/日の投与量で化学的に誘発された乳腺腫瘍の発生を阻害した。3 mg/kg/日では腫瘍の発生は認められず、E4 の有効性は卵巣摘出術及び抗エストロゲン薬のタモキシフェンと同程度であった。また、10 mg/kg/日の E4 は、本モデルの既存の腫瘍を退縮させた（PR3028、PR3049、PR3066）。

凝固線溶系リスクに関連する試験

E4 は、放射性標識リガンド結合試験において、ヒト性ホルモン結合グロブリン（SHBG）に対する親和性を示さなかった（PR3025、TS 表 2.6.5.6.B）。E4 は、ERα を発現している Hep89 細胞を 1 μM 以下の濃度で最長 72 時間曝露させたとき、SHBG 又はコルチコステロイド結合グロブリン（CBG）の産生を誘導しなかった（PR3060）。

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、uPA 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）。

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）において、*in vivo* での長期投与後、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（Valera, 2018）。

血管作用に関連する試験

E4（0.1～10 nM を 30 分間又は 48 時間）は、HUVEC 細胞において一酸化窒素（NO）の急速な放出及び内皮型一酸化窒素合成酵素（eNOS）の活性化及び発現を誘導した。E4 は E2 より効力が低く、その作用は ER アンタゴニストの 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）。*In vitro* で、E4（1 μM を 30 分間）は、マウス大動脈において eNOS 活性化又は NO 産生に影響を及ぼさなかったが、本モデルでは E2 誘導性刺激に拮抗した（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（PR3093）。

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していた（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。しかし、E4 は、E2 によって誘発された内皮治癒促進を消失させた（Abot, 2014）。一方、卵巣摘出 C57BL/6J マウスにおいて、E4（1 mg/pellet、2 週間皮下投与）は、頸動脈の血管内皮のみを傷害し、平滑筋細胞を保存した際の内皮治癒を促進した。これらの成績は、平滑筋細胞が E4 による内皮治癒に必要であることを示した。本作用は、平滑筋細胞における ERα によって仲介された。また、E4 は、内因性エストロゲンが分泌される卵巣正常マウスにおいて内皮治癒を誘導した（Davezac, 2023）。

大腿動脈障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摘出し、これを用いて血流依存性リモデリングを評価した。核内 ERα 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（Guivarc’h, 2018）。

その他の適応疾患のモデルを用いた試験

卵巣摘出したモルヒネ依存性 Sprague-Dawley ラットにおいて、モルヒネ離脱を達成するためナロキソンを投与して誘発した尾部皮膚温上昇［顔面紅潮（ホットフラッシュ）モデル］は、0.3 mg/kg/日以上の用量で E4 を 7 日間反復経口投与することで抑制された。E4 の効力は、EE の効力の 1/10 と推定された（PR3018）。

卵巣摘出した Sprague-Dawley ラット（骨粗鬆症モデル）において、2.5 mg/kg/日の E4 の 4 週間経口投与は、卵巣摘出で誘発した血漿中オステオカルシンの増加及び骨密度の低下を防止した。E4 は、これらの条件下でも骨強度を維持した。本試験における E4 のエストロゲン効力は、EE の 1/20 と推定された（PR3004）。

DBA/1 マウス（関節炎モデル）において、3 mg/kg/日の E4 の経口投与は、コラーゲン誘発関節炎の発症及び重症度を抑制した（PR3065）。

E4 の 1 又は 3 mg/kg/日の経口投与は、SJL/J マウスの実験的自己免疫性脳脊髄炎（多発性硬化症のモデル）の発生率及び重症度を低下させた（PR3064）。

安全性薬理試験

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さなかった。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）。

溶媒対照と比較して、E4 は 28.17 μM 濃度で、hERG テール電流の振幅が 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%減少した（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）。

2.6.2.1.2 ドロスピレノン

効力を裏付ける試験

プロゲスチン特性

DRSP はヒト PR に対してプロゲステロンと同程度の親和性を示した（Pollow, 1992）。トランス活性化試験で、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、レボノルゲストレル、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裏付けられた。

- 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、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 ラットに対して 1 周期の投与後に排卵抑制。経口投与後の ED50 値は 1 mg/日、皮下投与後の ED50 値は 0.3〜1 mg/日であった（Muhn, 1995）。
- エストロゲン置換後 5 日間、0.3 mg/日を投与した幼若な卵巣摘出ニュージーランド白ウサギにおける顕著な子宮内膜の変化（McPhail スコア）（Muhn, 1995）

副次的薬理試験

副次的なホルモン特性

In vitro 結合試験で、DRSP は鉱質コルチコイド受容体に対して高い親和性を示し、アンドロゲン及びグルココルチコイド受容体に対する親和性は低く、ER に対する親和性はなかった。*In vitro* トランス活性化試験では、DRSP 及びプロゲステロンのいずれも抗鉱質コルチコイド作用及び抗アンドロゲン様作用を示した。DRSP 及びプロゲステロンのいずれもアンドロゲン活性を示さなかった。DRSP には抗グルココルチコイド作用もグルココルチコイド作用もないが、プロゲステロンには極めて弱いグルココルチコイド活性が認められた（Krattenmacher, 2000、Furhmann, 1996、Louw-du Toit, 2017）。

In vivo において、DRSP には、抗鉱質コルチコイド活性及び抗アンドロゲン活性があること、並びにアンドロゲン活性、グルココルチコイド活性、抗グルココルチコイド活性及びエストロゲン活性がないことを以下により確認した。

大部分のラット試験において、DRSP は最大 10 mg/日まで皮下投与された。

- グルココルチコイド補充を行い、アルドステロンを投与した副腎摘出 Wistar ラット並びに卵巣摘出 Wistar ラットにおける尿中 Na^+/K^+比の上昇（Losert, 1985、Muhn, 1995）
- 幼若な去勢 Wistar ラットにおける精嚢及び前立腺のテストステロン刺激性成長に対する用量依存性抑制並びに交尾後（*pc*）17〜20 日目に投与した妊娠 Wistar ラットの雄胎児の雌性化（Muhn, 1995）
- 幼若な去勢 Wistar ラットにおいて副生殖器重量に対する作用なし（Muhn, 1995）
- 無処置雄性 Wistar ラットにおける副腎重量及び副腎摘出雄性 Wistar ラットにおける胸腺重量（デキサメタゾン併用の有無を問わない）に作用なし（Muhn, 1995）
- 卵巣摘出 Wistar ラットにおいて、膣上皮及び子宮重量に対する作用なし（Muhn, 1995）
- 雄カニクイザルにおいて、4 mg/kg/日を 2 又は 3 日に 1 回投与した際、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（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 陽性のヒト乳癌細胞 HCC1500 及び T47-D の E2 誘導性の増殖を阻害した（Seeger, 2011）。

DRSP（1 μM）に 5 日間曝露させたとき、ヒト乳癌細胞 MCF-7 の増殖は 18%高まり、PGRMC1[1]を安定的に導入した MCF-7 細胞の増殖は 156%増進した。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）。

[1] 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。

DRSP（100 nM）は、T47-D 細胞の遊走を 32%高めた。E2（10 nM）も T47-D 細胞の遊走を高めたが、併用の顕著な相加作用はなかった。DRSP（100 nM）は、T47-D 細胞の浸潤を促進し、浸潤指数は 3.49 であった。E2（10 nM）は DRSP よりもはるかに効力が強く、浸潤指数は 5.42 であった。E2 と DRSP を併用して細胞を曝露させたところ、E2 単独処理と比較して、浸潤指数は顕著に低下した。

細胞の遊走及び浸潤は、T47-D 細胞におけるアクチン調節蛋白であるモエシンのリン酸化を伴い、30 分間にわたる仮足及び波状構造の形成として明らかな一過性のアクチン細胞骨格のリモデリングが生じた。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、アクチン細胞骨格のリモデリングを遮断し、DRSP に関連した細胞遊走を低下させた（Fu, 2008）。

DRSP は、E2 誘導性乳腺上皮細胞の増殖を刺激するよりも、E2 誘導性子宮上皮細胞の増殖をより強力に阻害した。卵巣摘出 C57BL/6 マウスの乳腺において、DRSP は、E2 誘導性の導管側分岐及び上皮細胞増殖を促進し、皮下投与時の ED50 値はそれぞれ 69.4 及び 50.5 mg/kg/日であった。一方、E2 誘導性の子宮上皮細胞増殖に対する阻害用量 ID100 は 17.5 mg/kg/日であった（Otto, 2008）。

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対する直接的な作用はなかった。DRSP（60 ng/mL）単独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、ボトロセチン及び von Willebrand 因子併用（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[2] 阻害薬 AG205 との共培養により軽減した（Fan, 2015）。

卵巣摘出 Sprague-Dawley ラットを用いて抗凝固薬の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及ぼす作用を評価したところ、10 mg/kg/日までの用量の 3 日間あるいは 7 日間経口投与で DRSP の影響は認められなかった（Shirk, 2005）。

血管作用に関連する試験

DRSP（100 nM）に eNOS 発現亢進の非存在下で 30 分間曝露させると、HUVEC 細胞において NO 合成及び eNOS 活性化の迅速な誘導をもたらした。DRSP（0.1 nM～1 μM）に 48 時間曝露させると、その曝露期間に HUVEC 細胞における NO 合成、eNOS 活性及び eNOS 発現が濃度依存的に亢進した。DRSP は E2 の迅速な増強作用を促進したが、E2 刺激性の eNOS 発現には影響を及ぼさなかった。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、アルドステロンによる eNOS 発現の鉱質コルチコイド受容体媒介性減少を阻害した（Simoncini, 2007）。

[2] 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。

DRSP（100 nM）単独適用もしくは E2（1 nM）又は EE（0.1 nM）との併用適用は、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）[3]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ることもなかった（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[4]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）。

安全性薬理試験

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)[5] 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認められず、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）。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 エステトロール

2.6.2.2.1.1 *In Vitro* エストロゲン受容体結合

ヒトエストロゲン受容体への結合

組換えヒト ER を用いた結合アッセイで、E2 を基準物質として用い、E4 の ERα 及び ERβ に対する相対結合親和性（RBA）を算出した（[redacted] Preclinical Studies of Estetrol[6]）。

[^{3}H]-E2 を用いた放射性リガンド結合アッセイで測定した E4 の Ki 値と E2 の Kd 値から、ヒト ERα 及び ERβ に対する E4 の RBA も RBA=Kd/Ki[7]として算出した（PR3019[8]）。

Abot（2014）は、E4、E2 又はエストリオール（E3）と複合体を形成した ERα-リガンド結合ドメインの結晶構造を比較した。ERα-リガンド複合体のステロイド受容体コアクチベーター3（SRC3）[9]に対する親和性を、時間分解蛍光共鳴エネルギー転移法により測定した。

---

[3] ICAM-1：intercellular adhesion molecule-1；VCAM-1：vascular cell adhesion molecule-1

[4] MCP-1：monocyte attracting protein-1；PAI-1：プラスミノーゲンアクチベータインヒビター1

[5] 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。

[6] 報告書 [redacted] Preclinical Studies of Estetrol に E4 及び E2 の検討濃度は記載されていない。

[7] K_d = ([酵素]×[リガンド]) / [酵素-リガンド複合体]。50%結合時、[リガンド] = K_d
K_i = ([酵素]×[阻害薬]) / [酵素-阻害薬複合体]。50%結合時、[阻害薬] = K_i

[8] 報告書 PR3019 の成績は Visser（2008）が発表した。

[9] SRC3 は ER-リガンド結合後の転写活性化に関与する。

MARCoNI®（Microarray Assay for Real-time Corregulator-Nuclear receptor Interaction）のプラットフォーム上で共調節因子由来の 154 のモチーフに対する ERα の結合パターンを比較することによって、共調節ベースの動員を通じて E2 及び E4 の機能特性を評価した（[redacted] study report, 20[redacted][10]）。

これらの試験は GLP に準拠して実施したものではない。

結果

ERα 結合アッセイで、E2 の IC50 は 1.1 nM、E4 の IC50 は 66 nM であった。ERβ 結合アッセイで、E2 の IC50 は 7 nM、E4 の IC50 は 420 nM であった。このように、どちらのアッセイでも、E4 の RBA は 0.017%又は 1.7%であった（[redacted] Preclinical Studies of Estetrol）。

ERα 及び ERβ に対する[^{3}H]-E2 結合の E4 による阻害の Ki 値は、それぞれ 4.9 nM 及び 19 nM であった。E2 の Kd 値はそれぞれ 0.2 nM 及び 0.13 nM と報告されている。ERα に対する E4 の推定 RBA は 0.04（4%）、ERß に対する E4 の推定 RBA は 0.0068（0.68%）であった（PR3019）。E4 の Hill 係数は ERα に対して 1.01、ERß に対して 0.99 であり、両受容体上の単一結合部位と一致している（Visser, 2008）。

E4、E2 及び E3 と複合体を形成した ERα-リガンド結合ドメインの結晶構造は極めて類似した。同様に、SRC3 の ERα-リガンド複合体に対する結合親和性は、3 種類のエストロゲンで同程度であった（Abot, 2014）。

E4 により誘発された ERα 共調節因子動員のパターンは、E2 により誘発されたパターンと極めて類似したが、E4 の効力は E2 の効力より低かった（[redacted] study report, 20[redacted]）。

2.6.2.2.1.2 *In Vitro* 及び *In Vivo* のエストロゲン活性

E4 のエストロゲン活性の *in vitro* 及び *in vivo* 評価には以下の試験を含めた。

- エストロゲン活性や抗エストロゲン活性に関するトランス活性化試験（PR3046、Abot, 2014）
- E4 及びその主要なヒト代謝物のエストロゲン活性に関するトランス活性化試験（Es0001-NC-014）
- 卵巣摘出マウスにおける膣に対する作用（Benoit, 2017）
- 卵巣摘出マウスにおける子宮肥大作用（Abot, 2014）
- 卵巣摘出幼若マウスにおける乳腺の成長に対する作用（Gérard, 2015a）
- 卵巣摘出ラットにおける Allen-Doisy 変法による検査（PR3014）
- 雌ラットにおける排卵抑制（PR3015、PR3026）
- 雌ウサギにおける排卵及び着床の抑制（ES-T04）

ほぼ全ての試験で、E4 を E2 や EE と比較した。

これらの試験は GLP に準拠して実施したものではない。

[10] 報告書 [redacted] study report, 20[redacted] の成績は Gérard（2022）が発表した。

エストロゲン活性／抗エストロゲン活性に関するトランス活性化試験

トランス活性化試験で E4 のエストロゲン活性及び抗エストロゲン活性を評価した（ER-CALUX® Assay）（PR3046[11]）。ヒト ERα 又は ERβ 及びエストロゲン応答性ルシフェラーゼレポーター遺伝子を安定的に発現させたヒト骨肉腫細胞 U2-OS を、以下の試験品に曝露させた。

- エストロゲン活性：5%デキストランと活性炭で処理したウシ胎児血清を添加したフェノールレッド不含培地において、細胞を 10 濃度の E4、E2 又は EE に 24 時間曝露した。陰性対照として、溶媒（0.1%(v/v) エタノール）を用いた。
- 抗エストロゲン活性：E2 の EC50 及び 100×EC50 濃度の存在下で、細胞を 10 濃度の E4 に 24 時間曝露させた。陰性対照として、溶媒（0.1%(v/v) エタノール）を用い、抗エストロゲン活性陽性対照として 4-ヒドロキシタモキシフェン（10^{-6} 及び 10^{-7} M）を用いた。

曝露後、細胞を溶解し、Luclite Luciferase Reporter Gene Assay Kit（Packard Instruments）を用いて細胞溶解液のルシフェラーゼ活性を測定した。

Abot（2014）は、ERE-TK[12]プロモーター駆動性のルシフェラーゼレポーター遺伝子と、完全長 ERα、ERαΔ79［活性化機能 1（AF-1）box 1 の欠失］又は ERαAF-1^0（AF-1 box 1、2 及び 3 の欠失）発現ベクターを導入した HepG2 細胞及び HeLa 細胞において、1 pM～1 μM 濃度の E4 及び E2 がルシフェラーゼの転写を誘導する能力を比較した。AF-1 及び AF-2 はそれぞれ HepG2 及び HeLa 細胞において ERα 転写活性に関与する主な活性化機能である。

結果

E2 と比較した場合の EC50 値及び効力を表 2.6.2-2 に要約する。E4 は、ERα 及び ERβ のいずれに対してもエストロゲン活性を示し、ERα に対する効力の方が高かった。E4 の効力は E2 又は EE の効力より低かった。

表 2.6.2-2 ERα 及び ERß トランス活性化アッセイにおける EC50 値（PR3046）

	EC50 (M)		Relative Potency	
Estrogen	**ERα**	**ERβ**	**ERα**	**ERβ**
Estetrol	6.2×10^{-10}	1.2×10^{-8}	0.0037	0.0044
Estradiol	2.3×10^{-12}	5.3×10^{-11}	1	1
Ethinylestradiol	8.7×10^{-13}	2.5×10^{-10}	2.6	0.21

Abbreviations: EC50 = half maximal effective concentration, ER = estrogen receptor

本試験で、E4 はいずれの受容体に対してもアンタゴニスト活性を示さなかった。抗エストロゲン陽性対照物質 4-ヒドロキシタモキシフェンは、ERα 及び ERβ の両アッセイにおいて E2 の活性に対して予想された阻害反応を示した（PR3046）。

Abot（2014）は、ルシフェラーゼレポーター遺伝子の 50%刺激を達成するために E4 は E2 の 100 倍以上の濃度を必要とすることを確認した。HepG2 細胞において、AF-1 box 1 の欠失によって転写活性が著しく減少し（65%減少）、AF-1 box 1～3 の欠失ではほぼ完全に失われた。HeLa 細胞において AF-1 欠失による転写活性の低下はさほど顕著ではなかった。このように、E4 は、古

[11] 報告書 PR3046 の成績は Gérard（2023）が発表した。
[12] ERE：エストロゲン応答配列；TK：チミジンキナーゼ

典的なエストロゲン応答配列（ERE）の機序を介して ERα によって遺伝子転写を活性化することができ、活性化機能 AF-1 及び AF-2 がいずれも関与することが示された。

E4 及びその主要なヒト代謝物のエストロゲン活性に関するトランス活性化試験

トランス活性化試験（ER-CALUX® Assay）で、E4 並びに主要代謝物 E4-3-グルクロニド及び E4-16-グルクロニドのエストロゲン受容体トランス活性化特性を評価した（Es0001-NC-014[13]）。ヒト ERα 又は ERβ 及びエストロゲン応答性ルシフェラーゼレポーター遺伝子を安定的に発現させたヒト骨肉腫細胞 U2-OS を、以下の試験物質に曝露させた。

- エストロゲン活性：18 濃度の E4 又は 15 濃度の E4-3-グルクロニド及び E4-16-グルクロニドに細胞を 24 時間曝露させた。

曝露後、細胞を溶解し、Luclite Luciferase Reporter Gene Assay Kit（Packard Instruments）を用いて細胞溶解液のルシフェラーゼ活性を測定した。

基準物質として E4 及び E2 を用い、E4、E4-3-グルクロニド及び E4-16-グルクロニドの EC50 及び相対効力を比較した。

結果

E2 及び E4 を基準とした被験化合物の EC50 値及び相対効力をそれぞれ表 2.6.2-3 及び表 2.6.2-4 に要約する。

表 2.6.2-3 エストラジオールを基準とした ERα 及び ERβ のトランス活性化試験における EC50 値（Es0001-NC-014）

	EC50 (M)		Relative Potency	
Estrogen	**ERα**	**ERβ**	**ERα**	**ERβ**
Estradiol	9.5×10^{-12}	1.5×10^{-10}	1	1
Estetrol	2.9×10^{-9}	2.2×10^{-8}	3.3×10^{-3}	6.8×10^{-3}
Estetrol-3-glucuronide	1.1×10^{-5}	NC[1]	8.6×10^{-7}	NC[1]
Estetrol-16-glucuronide	1.7×10^{-6}	9.0×10^{-6}	5.6×10^{-6}	1.7×10^{-5}

[1] No full curve obtained

Abbreviations: ER = estrogen receptor, NC = not calculated

表 2.6.2-4 エステトロールを基準とした ERα 及び ERβ のトランス活性化試験における EC50 値（Es0001-NC-014）

	EC50 (M)		Relative Potency	
Estrogen	**ERα**	**ERβ**	**ERα**	**ERβ**
Estradiol	9.5×10^{-12}	1.5×10^{-10}	3.1×10^{2}	1.5×10^{2}
Estetrol	2.9×10^{-9}	2.2×10^{-8}	1	1
Estetrol-3-glucuronide	1.1×10^{-5}	NC[1]	2.6×10^{-4}	NC[1]
Estetrol-16-glucuronide	1.7×10^{-6}	9.0×10^{-6}	1.7×10^{-3}	2.4×10^{-3}

[1] No full curve obtained

Abbreviations: ER = estrogen receptor, NC = not calculated

[13] 報告書 Es0001-NC-014 の成績は Gérard（2023）が発表した。

ERα の生物検定で、代謝物 E4-3-グルクロニド及び代謝物 E4-16-グルクロニドはいずれもエストロゲン活性を示したが、E4 より効力は低かった（それぞれ 1/3793 及び 1/586）。代謝物のうち、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。E4 の効力は、基準物質 E2 の効力より低かった（1/305）。

ERβ の生物検定で、代謝物 E4-3-グルクロニドと代謝物 E4-16-グルクロニドのいずれにもエストロゲン活性が認められたが、E4 より効力は低かった（E4-16-グルクロニドでは 1/409；E4-3-グルクロニドは完全な用量反応性を示さなかった）。代謝物のうち、E4-3-グルクロニドの効力は E4-16-グルクロニドよりも低かった。E4 の効力は、基準物質 E2 の効力より低かった（1/147）。E4-3-グルクロニドについては、完全な用量反応曲線が得られなかったため、相対力価を算出することができなかった。

卵巣摘出マウスの腟に対する作用

Benoit （2017）は、卵巣摘出 C57BL/6J マウスを用いて、E4 及び E2 の腟に対する作用を検討した。卵巣摘出の 3 週間後に、マウスに E2 ペレット（8 又は 80 µg/kg/日）、E4 ミニポンプ（1 又は 6 mg/kg/日）、エストロゲン／デンドリマー複合体（240 µg/kg/日）[14]又は空のデンドリマーを皮下移植した。3 週間の投与後にマウスを安楽死させ、腟重量、病理組織学的変化及び ERα の発現を評価した。屠殺前に腟潤滑性を測定した。卵巣摘出した ERα$^{-/-}$、ERβ$^{-/-}$、ERα-AF2^{0} 及び C451A-ERα マウスを用いた同様の実験で、ERα、ERβ 及び ERα 介在性の核又は膜経路の役割を詳細に評価した [15]。

結果

卵巣摘出マウスにおいて、E2 及び E4 はそれぞれの用量で、腟重量、上皮高さ、上皮増殖及び潤滑性を同程度に増大させた。これらの変化は ERα$^{+/+}$、ERß$^{+/+}$及び ERß$^{-/-}$マウスでは観察されたが、ERα$^{-/-}$マウスでは観察されず、腟への作用が ERα 介在性であることを示している。ERα は、溶媒を投与した卵巣摘出マウスの腟上皮及び間質に存在することが確認されたが、E4 又は E2 の 3 週間の投与により蛋白及びメッセンジャーリボ核酸（mRNA）レベルは顕著に低下した。

エストロゲン／デンドリマー複合体は卵巣摘出マウスの腟上皮の高さや潤滑性に影響を及ぼさず、膜 ERα 活性化の関与は低いか無いことが示唆された。ERα-AF2^{0} マウスでは腟反応が完全に消失し、核内 ERα 機能の喪失が認められた。対照的に、膜 ERα を不活化した C451A-ERα マウスでは、野生型マウスと比較して、E4 に対する腟反応の差は認められなかった。卵巣摘出マウスの腟における E4 誘発性の変化は、完全に ERα の核内活性化によってもたらされると結論づけられた。

[14] エストロゲン／デンドリマー複合体は、膜エストロゲン受容体介在性の核外シグナル伝達（MISS）を選択的に活性化する。

[15] 膜 ERα の特異的機能喪失をもたらすために、ERα のパルミトイル化部位であるシステイン 451 をアラニンに変異（C451A-ERα と指定）させて作製したノックインマウスモデル。

卵巣摘出マウスにおける子宮肥大作用

Abot（2014）は、卵巣摘出した C57BL/6J マウスを用いて、E4 及び E2 の子宮肥大作用を評価した。マウス（n=4～6/群）に、E4（200 又は 1000 µg/kg）又は E2（8 µg/kg）を単独又は併用して単回皮下注射した。対照には溶媒（ヒマシ油）を投与した。投与 24 時間後にマウスを屠殺し、子宮腔上皮の高さ及び間質の高さを顕微鏡で観察した。Ki-67 免疫組織化学検査を実施し、上皮細胞の増殖を評価した。さらに、皮下投与の 6 時間後に安楽死させたマウス（n=4～8/群）の子宮を用いて、E2 によって調節されることが知られている約 50 の一連の遺伝子の発現に対する E4（8 µg/kg～10 mg/kg）及び E2（8～200 µg/kg）の作用を検討した。

結果

子宮腔上皮の高さ及び間質の高さは E4（1000 µg/kg）及び E2（8 µg/kg）によって同程度に増加し、上皮増殖の誘導は最大であった。低用量の E4（200 µg/kg）は、これらのパラメータに対して全く又はほとんど影響を及ぼさなかった。E4（200 又は 1000 µg/kg）と E2（8 µg/kg）を併用投与した場合の観察結果は、E2 単独投与によって誘発されたものと差がなかった。

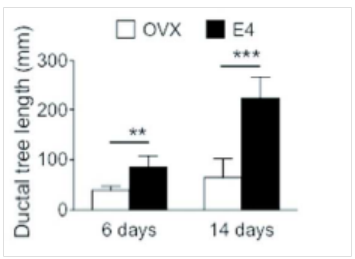
全ての E2 標的遺伝子も E4 曝露に反応した。上方制御された遺伝子の転写を最大限に活性化するために、E4 は E2 と比較して通常、100 倍高い用量を必要とした（1 mg/kg E4 及び 8 µg/kg E2）。 下方制御された遺伝子については、ほとんどの場合、E4（80 µg/kg）は E2（8 又は 30 µg/kg）と比較して、3～10 倍の用量で十分に最大効果が得られた。

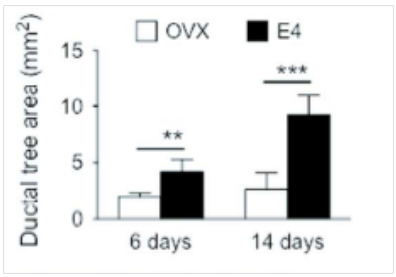
卵巣摘出幼若マウスにおける乳腺の成長に対する作用

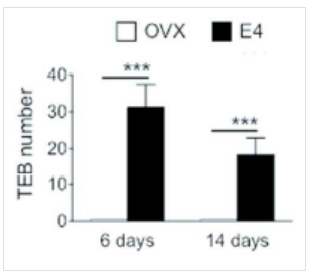
Gérard（2015a）は、卵巣摘出した幼若の C57BL/6 マウス（n=5/群）を用いて乳腺の上皮構造に対する E4 の作用を評価した。卵巣摘出 1 週間後、マウスに E4（0.3、1、3 又は 10 mg/kg/日）又は E2（1 mg/kg/日）を単独又は併用して 6 又は 14 日間、強制経口投与した。対照動物には溶媒［ラッカセイ油中 5%（v/v）エタノール］を投与した。投与終了時にマウスを屠殺し、乳腺組織を解剖して全載標本作製、RT-qPCR[16]による上皮 RNA の分析並びに Ki-67 及び PR に対する免疫組織化学的検査を実施した。全載標本の乳管の面積及び長さ（上皮成長速度を反映するパラメータ）並びに末端芽（分化及び増殖を反映するパラメータ）を分析した。液体クロマトグラフィー質量分析法によって E4 の血漿中濃度を測定した。

結果

3 mg/kg/日の用量で 6 日間又は 14 日間投与したとき、E4 は乳腺上皮管の成長及び末端芽の出現を誘発した（図 2.6.2-1）。乳腺管及び末端芽の増殖状態は、Ki-67 染色陽性に基づき確認した。







[16] RT-qPCR：逆転写リアルタイム定量的ポリメラーゼ連鎖反応

図 2.6.2-1 卵巣摘出幼若マウスにおける乳腺の成長に対するエステトロールの作用（Gérard, 2015a）

Dose of E4: 3 mg/kg/day
** p< 0.01, *** p < 0.001 versus ovariectomized controls
Abbreviations: E4 = estetrol, OVX = ovariectomized, TEB = terminal end buds

E4 は、0.3～10 mg/kg/日の用量で、乳腺管の成長を刺激した。E4 の乳腺管の成長に対する刺激作用は、E2 を 1 mg/kg/日で投与した際の刺激作用の 55～75%であった。一方、E4 の血漿中濃度は、E2 を 1 mg/kg/日で投与した際の E2 の血漿中濃度よりも一貫して高かった（最大 374 倍）。併用投与した場合、E4 は E2 の作用を部分的に拮抗した（図 2.6.2-2）。

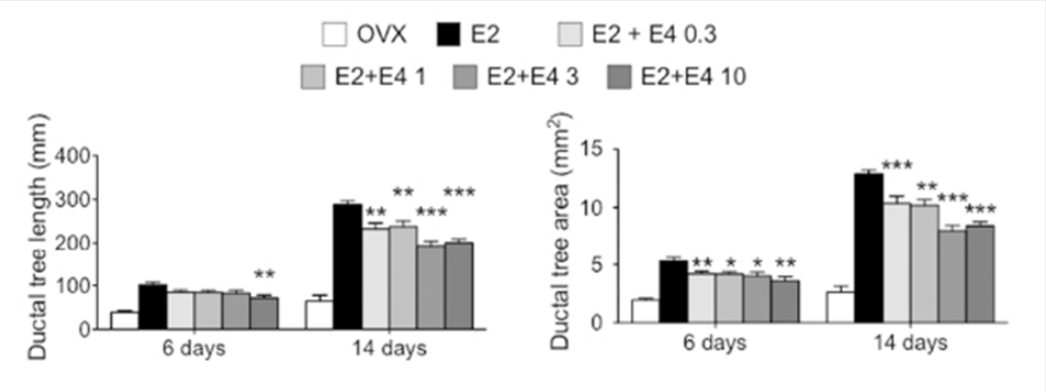


図 2.6.2-2 卵巣摘出幼若マウスにおけるエストラジオール誘発乳腺成長に対するエステトロールの作用（Gérard, 2015a）

E2 was given at 1 mg/kg/day
** p< 0.01, *** p < 0.001 versus ovariectomized controls
Abbreviations: E2 = estradiol, E4 = estetrol, OVX = ovariectomized

ERα は、E2 によって活性化されることで、乳腺上皮における PR 発現を促進することが知られている。卵巣摘出マウスにおいて、E4 未投与の対照動物では乳腺上皮に PR の発現は認められなかったが、E4 を投与することで乳腺上皮に PR が発現した。さらに、マウスに ICI 182 780 を併用して皮下投与することで、E4 誘発性の乳腺上皮管の成長が完全に阻害された。これらのデータから、マウスの乳腺上皮構造に対する E4 の成長刺激作用が ERα を介したものであることが示唆された。

卵巣摘出ラットにおける Allen-Doisy 変法による検査

Allen-Doisy 変法による検査で、成体の卵巣摘出 Sprague-Dawley ラットを用い、膣上皮の角化に対する E4 のエストロゲン様作用を評価した（PR3014[17]）。卵巣摘出ラット（各用量 n=8）に、0.1、0.3、1 又は 3 mg/kg/日の E4 を 7 日間強制経口投与又は皮下投与した。陰性対照には溶媒

[17] 報告書 PR3014 の経口投与の成績は、Heegaard（2008）が発表した。

（ゴマ油中 10%（v/v）エタノール；2 mL/kg）を経口投与した。陽性対照には、0.05 mg/kg/日の用量で EE の経口投与又は E2 の皮下投与を行った。

投与前（Day 0～6）又は剖検前（Day 7）に腟垢塗抹標本を毎日採取し、角化を評価した。試験開始時及び終了時の体重を測定し、剖検時に子宮重量を記録した。

結果

E4 の経口投与後の腟上皮角化の発現は用量依存的であった。各群の腟の角化は Day 2 で 0.1（0/8 例）、0.3（1/8 例）、1（4/8 例）及び 3（6/8 例）mg/kg/日投与群にて認められた。0.1 mg/kg/日投与群では Day 3 で腟の角化が認められた（3/8 例）。全ての用量の E4 投与ラットで、Day 7 までに腟のエストロゲン反応性が認められた。EE を投与した全てのラットで、Day 3 までに腟のエストロゲン反応性が認められた。E4（1 及び 3 mg/kg/日）及び EE はいずれも、溶媒対照群と比較して最終体重を抑制し、子宮重量を増加させた。

E4 の 1 及び 3 mg/kg/日の皮下投与は、全てのラットで Day 7 までに腟のエストロゲン反応性を誘発した。0.1 mg/kg/日及び 0.3 mg/kg/日の E4 の皮下投与後、それぞれラット 4/8 匹及び 7/8 匹が Day 7 までに腟のエストロゲン反応性を示した。E2 を投与した全てのラットで、Day 2 までに腟のエストロゲン反応性が認められた。3 mg/kg/日の E4 の投与に伴い、溶媒対照群と比較して最終体重がわずかに減少し、本用量では子宮重量の増加が認められた。E2 の投与でも同様に最終体重が減少し、子宮重量は増加した。

E4 のエストロゲン効力は、皮下投与後より経口投与後の方が高く、EE の効力の 1/20 と推定された。

雌ラットにおける排卵抑制

性周期のある Sprague-Dawley ラットで排卵抑制に対する E4 の作用を評価した。4 日間の性周期を有するラットのみを使用した。同じデザインを用いて 2 つの試験を実施した。最初の試験（PR3015[18]）では、E4 を EE と比較した。第 2 の試験（PR3026）では、E4 を E2 と比較した。

発情日から 4 日間の性周期にわたりラット（n=8/用量）に強制経口投与を行った。いずれの試験でも、0.03、0.1、0.3、1 及び 3 mg/kg *bid* の投与量で E4 を投与した。EE は 0.0003、0.001、0.003、0.01 及び 0.03 mg/kg *bid* で投与し、E2 は E4 と同用量で投与した。対照群には溶媒［ゴマ油中 10%（v/v）エタノール；2 mL/kg］を投与した。PR3026 試験では、E4 及び E2 も 2 mg/kg の 1 日 1 回経口投与量で投与した。最終投与の翌日（Day 5）に動物を屠殺した。

ラットの死亡及び臨床徴候を毎日観察した。最終体重を測定した。卵管内の卵子数を記録した。

結果

（PR3015）死亡又は臨床徴候は認められなかった。

溶媒対照群のラットは全て排卵したが、E4 又は EE を 1 日 2 回投与したラットは排卵活性の用量依存的な低下を示した。E4 は、0.1 mg/kg *bid* 以上の投与量で排卵を抑制した。算出した E4 の経口 ED50 値は、0.182 mg/kg *bid* であった。

EE の 1 日 2 回経口投与は、0.003 mg/kg 以上の用量で排卵を抑制した。算出した経口 ED50 値は 0.01 mg/kg *bid* であった。

[18] 報告書 PR3015 の成績は、Coelingh Bennink HJ（2008a）が発表した。

E4 の排卵抑制作用の効力は EE の約 1/20 であった。

（PR3026）死亡又は臨床徴候は認められなかった。

溶媒対照群のラットは全て排卵したが、E4 又は E2 を 1 日 2 回投与したラットは排卵活性の用量依存的な低下を示した。E4 は、0.03 mg/kg *bid* 以上の投与量で排卵を抑制した。算出した E4 の経口 ED50 値は、0.204 mg/kg *bid* であった。

E2 は、0.03 mg/kg *bid* では排卵抑制を示さなかったが、0.1 mg/kg *bid* では 7/8 匹の動物で排卵が抑制された。E2 の経口 ED50 値は、0.03 と 0.1 mg/kg *bid* との間にあったが、用量反応曲線が急勾配であったため、ED50 値を算出できなかった。

2 mg/kg の E4 を 1 日 1 回経口投与すると、4/8 匹のラットで排卵が阻害されたが、同じ用量の E2 では全てのラットで排卵が阻害された。

E4 は、E2 よりも低い排卵抑制活性を示した。

雌ウサギにおける排卵及び着床の抑制

雌のニュージーランド白ウサギにおいて、排卵及び着床に対する E4 の作用を評価した（ES-T04）。ウサギ（n=3/用量）に、交尾の 4 日前から妊娠 9 日目まで、0.01、0.03、0.1、0.3 及び 1 mg/kg の E4 を 1 日 2 回強制経口投与した。対照群には溶媒の滅菌溶媒（蒸留水、塩化ナトリウム、ベンジルアルコール、Tween 80 及びカルボキシメチルセルロース；1 mL/kg）を投与した。

黄体数及び着床数を測定した。

結果

E4 を 1.0 mg/kg *bid* で投与したウサギでは、排卵が抑制され、1 例において少数の黄体（3 個）を認めたのみであり、残りの 2 例において黄体を認めなかった。0.1 mg/kg *bid* 以上の E4 で、着床は完全に阻害された。排卵抑制及び着床抑制に対する経口 ED50 を算出したところ、それぞれ 0.735 mg/kg *bid* 及び 0.055 mg/kg *bid* であった。

2.6.2.2.1.3 子宮内膜症細胞に対する *in vitro* 作用

Patiño-García（2023）は、ヒト初代子宮内膜細胞及びヒト子宮内膜症細胞株において、細胞増殖、遊走、PR 蛋白量及びプロゲステロン応答性遺伝子発現に対する作用を評価した。ヒト初代子宮内膜細胞は、子宮内膜症患者から生検により採材した子宮内膜組織から上皮細胞及び間質細胞を分離して使用した。ヒト子宮内膜症細胞株は、子宮内膜症上皮細胞株（11Z）及び子宮内膜症間質細胞株（Hs832）を使用した。

細胞増殖は、テトラゾリウム塩（MTS[19]）還元法を用いて評価した。フェノールレッド不含培養培地中で、溶媒［エタノール（E2）又は DMSO（E4）］、E2（0.01～10000 nM）又は E4（0.01～10000 nM）に細胞を 24 時間曝露した。その後に MTS を添加し、生細胞によって生成されるホルマザン色素を定量した。

細胞遊走は、培養皿から細胞単層の一部をかきとった後の創傷（vertical wound）の治癒によって評価した。細胞 80%コンフルエントの状態で、創傷時に E2（1 nM）又は E4（1000 nM）を添

[19] 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt

加し、48 時間後まで細胞に曝露した。創傷後 12、24、36 及び 48 時間における創傷治癒をイメージングソフトウェアによって定量した。

PR 蛋白量は、ウエスタンブロット法によって評価した。培養培地中で、E2（0.01～100 nM）又は E4（1～10000 nM）に細胞を 24 時間曝露した。その後に細胞を可溶化し、可溶化蛋白を電気泳動により分離した。蛋白はニトロセルロース膜に転写した後、抗 PR 蛋白抗体を用いて PR 蛋白を可視化した。蛋白発現量はイメージングシステムによって定量した。蛋白量は、β アクチン蛋白量で補正した。

プロゲステロン応答遺伝子は、RT-qPCR 法を用いて評価した。培養培地中で、E2（1 nM）又は E4（1000 nM）に細胞を 24 時間曝露した後、生理学的濃度のプロゲステロン（100 nM）を添加して 6 時間培養した。その後、細胞より全 RNA を抽出し、相対定量法によりプロゲステロン応答性遺伝子の発現量を解析した（$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法）。

結果

（細胞増殖）

エストロゲンによる子宮内膜症細胞の増殖は、子宮内膜症の発症及び進展に関与すると考えられる。そこで、細胞増殖の指標である細胞生存に対する E2 及び E4 の作用を評価した。

E2 は、1～100 nM の濃度範囲で、検討したほぼ全ての細胞において溶媒対照と比較して細胞生存を上昇させた（図 2.6.2-3）。一方、E4 は、検討した濃度（0.01～10000 nM）で全ての細胞の細胞生存に有意な作用を示さなかった。

本成績によって、ヒト初代子宮内膜細胞及びヒト子宮内膜症細胞株において、E2 が細胞増殖を促進するのに対し、E4 は細胞増殖に影響しないことが示された。

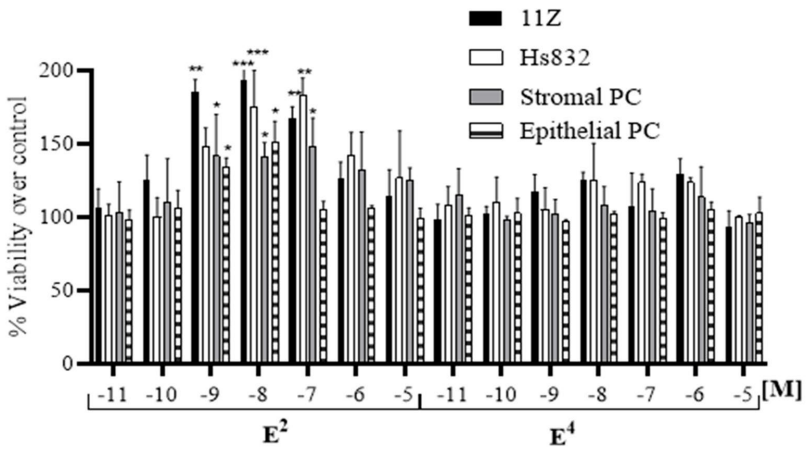


図 2.6.2-3 ヒト初代子宮内膜細胞及びヒト子宮内膜症細胞株の細胞生存に対するエステトロール及びエストラジオールの作用（Patiño-García, 2023）

Analyzed by one-way ANOVA along with Dunnett's post hoc test. n = 3; * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001, vs control.
Abbreviations: E2 = estradiol, E4 = estetrol, 11Z= human epithelial endometriotic cell line, Hs832= human stromal endometriotic cell line, PC= human primary endometrial cells

（細胞遊走）

子宮内膜症細胞の遊走は、子宮内膜症の発症及び進展に関与すると考えられる。そこで、細胞遊走のモデルである *in vitro* 創傷治癒モデルにおいて E2 及び E4 の作用を評価した。

E2 は、1 nM の濃度で、創傷後 24 時間（11Z 細胞株）並びに 24 及び 36 時間（Hs832 細胞株）において、媒体対照と比較して創傷治癒を促進した（図 2.6.2-4）。一方、E4 は、1000 nM の濃度で、いずれの細胞株においても、媒体対照との差を示さなかった。

本成績によって、ヒト子宮内膜症細胞株において、E2 が細胞遊走を促進するのに対し、E4 は細胞遊走に影響しないことが示された。

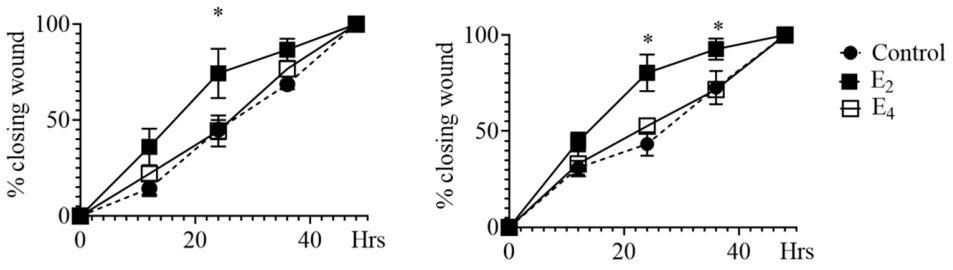


図 2.6.2-4 ヒト子宮内膜症細胞株の遊走に対するエステトロール及びエストラジオールの作用（Patiño-García, 2023）

左図：ヒト子宮内膜症上皮細胞株（11Z 細胞株）、右図：ヒト子宮内膜症間質細胞株（Hs832 細胞株）
Analyzed by one-way ANOVA along with Dunnett's post hoc test. n = 3; * p < 0.05, vs control.
Abbreviations: E2 = estradiol, E4 = estetrol

（PR 蛋白発現）

子宮内膜症において PR 発現が低下し、プロゲステロン抵抗性に関与する可能性が示唆されている。PR 蛋白質には二つのアイソフォーム PRA 及び PRB が存在する。そこで、PRA 及び PRB 蛋白発現に対する E2 及び E4 の作用を評価した。

PRA：

11Z 細胞株において、E2 は PRA 蛋白量に有意な作用を示さなかった。E4 は、1 及び 10 nM の濃度で PRA 蛋白量を媒体対照と比較して増加させた。

Hs832 細胞株において、E2 は、0.1 及び 100 nM の濃度で PRA 蛋白量を媒体対照と比較して低下させた。E4 は、1 及び 100 nM の濃度で PRA 蛋白量を媒体対照と比較して低下させ、10000 nM の濃度で増加させた。このように E4 は、PRA 蛋白量に対して濃度と関連した明瞭な作用を示さなかった。

PRB:

11Z 細胞株において、E2 は、0.01 及び 100 nM の濃度で PRB 蛋白量を媒体対照と比較して増加させた（図 2.6.2-5）。また、E4 は、1～10000 nM の濃度で PRB 蛋白量を媒体対照と比較して増加させた。

Hs832 細胞株において、E2 は、0.1 及び 1 nM の濃度で PRB 蛋白量を媒体対照と比較して増加させた。また、E4 は、1000 及び 10000 nM の濃度で濃度依存的に PRB 蛋白量を媒体対照と比較して増加させた。

本成績によって、ヒト子宮内膜症細胞株において、E4 は、E2 と同様に PRB 蛋白量を増加させることが示された。

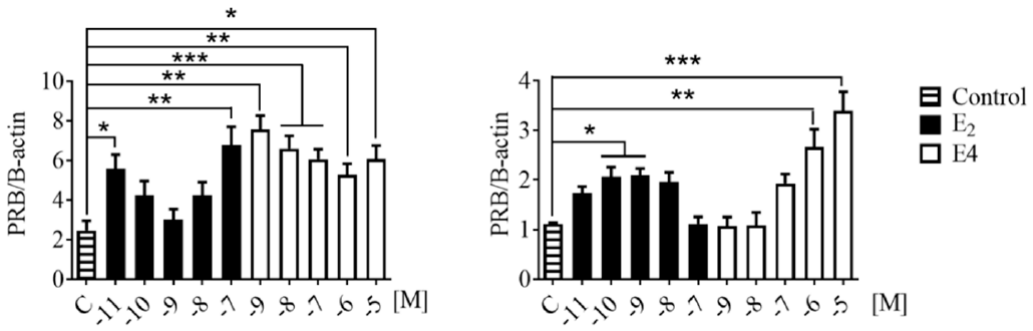


図 2.6.2-5 ヒト子宮内膜症細胞株の PRB 蛋白量に対するエステトロール及びエストラジオールの作用（Patiño-García, 2023）

左図：ヒト子宮内膜症上皮細胞株（11Z 細胞株）、右図：ヒト子宮内膜症間質細胞株（Hs832 細胞株）
Analyzed by one-way ANOVA along with Dunnett's post hoc test. n = 3; * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001, vs control.
Abbreviations: C = control, E2 = estradiol, E4 = estetrol, PRB = progesterone receptor B

（プロゲステロン応答遺伝子）

ヒト子宮内膜におけるプロゲステロン応答性と関連する 28 遺伝子の発現を測定した。これら遺伝子発現に対する E2 及び E4 の作用を評価した。なお、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応において cycle threshold 値が求まらなかった遺伝子は解析から除外した。このため、11Z 細胞株について 17 遺伝子、Hs832 細胞株について 23 遺伝子を評価した。

11Z 細胞株において、E2 群及び E4 群において、プロゲステロン応答性遺伝子の発現は媒体対照に対しておおむね低かった（図 2.6.2-6）。一方、プロゲステロン群（P4）では、プロゲステロン応答性遺伝子の発現は媒体対照に対しておおむね高く、E2 群及び E4 群と比較して、評価した 17 遺伝子のうち 15 遺伝子の発現が高かった。E4 で処置した後にプロゲステロンを添加した群（E4+P4）では、E2 で処置した後にプロゲステロンを添加した群（E2+P4）と比較して、評価した 17 遺伝子のうち 15 遺伝子の発現が高かった。

Hs832 細胞株において、11Z 細胞株と同様な傾向が認められた。E4 で処置した後にプロゲステロンを添加した群（E4+P4）では、E2 で処置した後にプロゲステロンを添加した群（E2+P4）と比較して、評価した全遺伝子の発現が高かった。さらに、E4 で処置した後にプロゲステロンを添加した群（E4+P4）では、プロゲステロン群と比較して評価した 23 遺伝子のうち 18 遺伝子の発現が高かった。

本成績によって、ヒト子宮内膜症間質細胞株において、E4 は、プロゲステロンによるプロゲステロン応答性遺伝子の発現を促進することが示された。

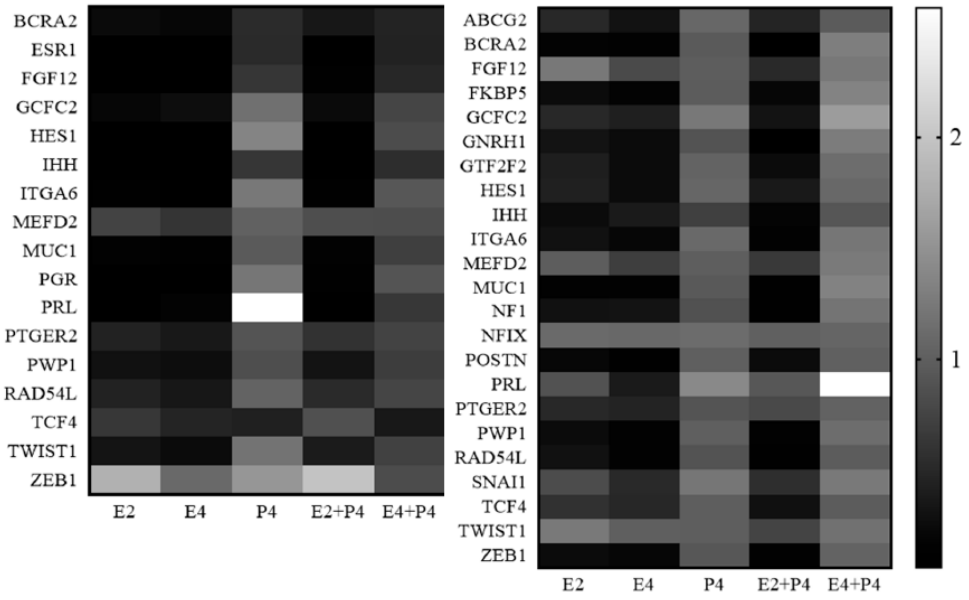


図 2.6.2-6 プロゲステロン応答性遺伝子発現に対するエステトロール及びエストラジオールの作用（Patiño-García, 2023）

左図：ヒト子宮内膜症上皮細胞株ヒートマップ（11Z 細胞株）、中図：ヒト子宮内膜症間質細胞株ヒートマップ（Hs832 細胞株）、右図：遺伝子発現のスケール。ヒートマップの縦軸は遺伝子記号を示す。遺伝子発現は、媒体対照に対する相対量で示す（$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法）。

Abbreviations: E2 = estradiol, E4 = estetrol, P4 = progesterone

2.6.2.2.2 ドロスピレノン

2.6.2.2.2.1 *In Vitro* でのプロゲステロン受容体結合

受容体結合アッセイで、DRSP はヒト PR に対してプロゲステロン自体と同程度の親和性を示した（基準物質 R5020 に対して、DRSP では RBA20%、プロゲステロンでは RBA30%）。DRSP の Kd は 0.109 nM、結合能は 465 fmol/mg 蛋白であった（Pollow, 1992）。

Krattenmacher（2000）は、DRSP の薬理学的及び薬物動態的特性に関するレビューにおいて、プロゲステロンと比較した場合、ヒト PR での DRSP の RBA は 19%であると報告した。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、レボノルゲストレル、酢酸ノメゲストロール及びプロゲステロンより低かった（van Diepen, 2011）。

DRSP はウサギ PR に対しても高い親和性を示した（RBA 40% vs.プロゲステロン）（Fuhrmann, 1996）。

2.6.2.2.2.2 *In Vitro* 及び *In Vivo* のプロゲスチン活性

ヒト子宮内膜間質細胞培養物を DRSP 単独（1～100 nM）又は E2（10 nM）と併用して 8 日間処理したところ、細胞形態（紡錘状の形状）の変化及びプロラクチン分泌亢進が認められ、脱落膜化に至った。プロラクチン分泌に対する作用は PR アンタゴニスト RU486 により阻害された。プロゲステロン（100 nM）単独又は E2（10 nM）との併用でも同様の作用が認められた（Miyashita, 2015）。

妊娠維持試験では、雌の NMRI マウス又は Wistar ラットの交尾後（*pc*）8 日目に卵巣を摘出し、その後エストロンの皮下投与及び DRSP の皮下（両動物種）又は経口（ラット）投与を行っ

た。マウスにおいて DRSP の妊娠維持[20]に対する皮下投与での ED50 値は 25.8 mg/kg/日と認められた（Otto, 2008）。Day 8～11 *pc* に投与したラットにおける妊娠維持率は、10 mg/日 DRSP の皮下投与後で 95.7%、0.5 mg DRSP を 1 日 6 回経口投与後で 82.9%であった。DRSP は、ラットへの皮下投与後の妊娠維持において、酢酸シプロテロンと同程度の効力であった（Muhn, 1995）。

定期的に 4 日間の性周期のある雌性 Wistar ラットを用いた排卵抑制試験で、4 日間の皮下投与後の DRSP の ED50 値は 0.3～1 mg/日、経口投与後の ED50 値は 1 mg/日であった。皮下投与後の効力は、酢酸ノルエチンドロンと同程度であった（Muhn, 1995）。

卵巣摘出した幼若なニュージーランド白ウサギに 5 µg/日の E2 を 6 日間皮下投与又は経口投与した後、0.3 mg/日の DRSP を 5 日間皮下投与又は経口投与したところ、子宮内膜に顕著な変化が認められた。0.1 mg/日から 0.3 mg/日の DRSP の投与では、閾値レベル（McPhail スコア 1.5）で子宮内膜の変化が認められた。DRSP は、酢酸ノルエチンドロンより効力は弱いが、皮下投与した場合、プロゲステロンよりやや強い効力を示した（Muhn, 1995）。

2.6.2.3 副次的薬理試験

2.6.2.3.1 エステトロール

2.6.2.3.1.1 潜在的なオフターゲット活性の *in vitro* 評価

神経伝達物質受容体及びトランスポーター、神経ペプチド受容体、ホルモン受容体、ロイコトリエン／プロスタグランジン受容体、サイトカイン受容体、及びイオンチャネルを含む約 130 の標的を用いた放射性リガンド結合アッセイ（[redacted] スクリーニング）において、E4 の潜在的なオフターゲット活性を評価した（PR3019[21]）。全ての試験で、E4 を 10 µM の濃度で試験した。エストロゲン受容体 ERα 及び ERβ を用いた放射性リガンド結合アッセイでは、それぞれ 3 nM～1 µM 及び 0.03 µM～10 µM の濃度範囲で IC50 及び Ki 値を求めた。

本試験は GLP に準拠して実施したものではない。

結果

10 µM の濃度で、E4 は、その主要標的 ERα 及び ERβ を除き、評価したいずれの標的に対しても放射性リガンド結合の顕著な阻害を示さなかった。ERα 及び ERβ に対する[^{3}H]-E2 の結合阻害の Ki 値は、それぞれ 4.9 nM 及び 19 nM であった。E4 は、プロゲステロン、アンドロゲン及びグルココルチコイド受容体に結合しなかった。

2.6.2.3.1.2 乳癌リスクに関連する *in vitro* 及び *in vivo* 試験

COC の使用及び閉経期（後）ホルモン補充療法は乳癌リスクの増大と関連しており、エストロゲンとプロゲスチンの両成分が関与している可能性がある（IARC, 2012a、IARC, 2012b、IARC, 2012c）。

乳癌細胞に対する影響を評価するため、E4 を用いて以下の *in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施した。

---

[20] マウスの妊娠維持率は、卵巣摘出の偽手術を行い溶媒投与したマウスにおける生存胚数を 100%とし、1 匹あたりの生存胚数の割合として算出し、ラットの妊娠維持は、生存胎児数と左子宮角の着床痕数の比として求めた。

[21] 報告書 PR3019 の成績は Visser（2008）が発表した。

- 正常ヒト乳腺細胞及びヒト乳癌細胞 MCF-7 の増殖に対する作用（PR3032）
- ヒト乳癌細胞 MCF-7 の増殖に対する作用機序（Gérard, 2015b、Abot, 2014）
- ヒト乳癌細胞 T47-D の遊走及び浸潤に対する作用（PR3101）
- 卵巣摘出した免疫不全マウスにおける MCF-7 細胞移植後の腫瘍成長に対する作用（Gérard, 2015b）
- 雌ラットのジメチルベンズ[a]アントラセン（DMBA）モデルにおける乳腺腫瘍の発生及び退縮に対する作用（PR3028、PR3049、PR3066）

これらの試験は GLP に準拠して実施したものではない。

正常ヒト乳腺細胞及びヒト乳癌細胞 MCF-7 の増殖に対する作用

ヒト乳癌細胞 MCF-7 及び正常ヒト乳腺細胞（審美的な乳房縮小術を受けた女性の乳房標本から入手）の増殖に対する E4 の作用を評価した（PR3032[22]）。フェノールレッド不含培養培地中、10 nM から 1 μM までの E4 又は 10 nM から 0.1 μM の E2 に細胞を 72 又は 96 時間曝露させた。[^{3}H]-チミジンの取り込みを測定して増殖を評価した。

このアッセイでは、E4（最大 1 μM）及び E2（正常ヒト乳腺細胞で 10 nM、MCF-7 細胞で 0.1 nM）の共培養によって、E2 に対する E4 の潜在的なアンタゴニスト特性を評価した。

結果

正常ヒト乳腺細胞で、E4 は試験した濃度範囲（10 nM～1 μM）で直線的に増殖を促進した。最高濃度の 1 μM の E4 で、[^{3}H]-チミジンの取り込みは対照の 166%であった。正常ヒト乳腺細胞の増殖に対する E2 の最大作用（対照の 154%）は 10 nM の濃度で得られた。

ヒト乳癌細胞 MCF-7 で、E4 は検討した全ての濃度（0.1 nM～1 μM）で最大の増殖刺激を誘発した。E2 は 0.1 nM で同程度の最大効果を示した。

正常ヒト乳腺細胞及びヒト乳癌細胞 MCF-7 の増殖に対する E4 の刺激作用は、抗エストロゲン薬 ICI 182 780 及びタモキシフェンによって阻害された。E4 は E2 の増殖作用を用量依存的に減弱させ、その作用は両細胞型とも E4/E2 比が約 100 で顕著となった。E4/E2 比が 10000（0.1 nM E2 に対して 1 μM E4）では、ヒト乳癌細胞 MCF-7 の増殖が再び増大する傾向が認められた。

ヒト乳癌細胞 MCF-7 の増殖に対する作用機序

Gérard（2015b）は、ヒト乳癌細胞 MCF-7 の増殖に対する E4 のアゴニスト作用及びアンタゴニスト作用並びにこれらの作用の分子機構について検討した。

0.1 pM～100 μM の濃度範囲の E4 又は E2 と共に 72 時間インキュベートした MCF-7 細胞において、細胞成長、増殖、アポトーシス及び細胞毒性に対する作用を検討した。

細胞成長に対する作用への ER の関与を以下によって評価した。

- MCF-7 (ERα+, ERß+, GPER+)[23]、T47-D (ERα+, ERβ-, GPER+)、MDA-MB-231 (ERα-, ERβ+, GPER+)及び SKBR3 (ERα-, ERβ-, GPER+)細胞の細胞成長に対する作用の比較
- MCF-7 細胞培養液中へのタモキシフェン（ERα アンタゴニスト）、ICI 182 780（ER アンタゴニスト）又は G15（GPER アンタゴニスト）の添加

[22] 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。
[23] GPER：G 蛋白共役型エストロゲン受容体 1

- Ser118 及び Ser167 残基のリン酸化による MCF-7 細胞中の ERα の活性化（ウエスタンブロット法）
- ルシフェラーゼレポーター遺伝子を組み込んだ T47-D-Kbluc 細胞及び酵母エストロゲンスクリーニング（β-ガラクトシダーゼ発現）における ERα の活性化及び ERE との結合
- *BRCA1* 及び *CCDN1* 遺伝子[24]（RT-qPCR）の発現を評価することによるプロモーター領域の AP-1 又は Sp1 部位での ERα の活性化及び結合
- MCF-7 細胞におけるプロゲステロン受容体（PR）の上方制御の評価

ERK1/2 のリン酸化を測定することにより（ウエスタンブロット法）、MCF-7 細胞の細胞成長に対する作用への核外シグナル伝達カスケード（MAPK 経路）の関与[25]を評価した。

T47-D-Kbluc 細胞における ERα の活性化及び ERE との結合に対する E4（10 pM～10 μM）及び E2（10 pM 及び 1 nM）の複合作用を測定し、E4 の E2 に対するアンタゴニスト作用における ERα-ERE 依存性核内経路の役割を評価した。

Abot（2014）は、MCF-7 細胞を用いて、E4（1 μM）及び E2（10 nM）の単独処理又は併用が、ERα-ERE 依存性の遺伝子発現（GREB1、PR、CXCL12）[26]及び ERα MISS 経路（ERα とチロシンキナーゼ Src との相互作用）に及ぼす影響を解析した。

結果

E4 は MCF-7 細胞の細胞成長を促進したが、刺激を達成するためには E2 より 1000 倍高い濃度を必要とした。E2 は高濃度での細胞毒性によって説明がつくベル型の反応曲線を示した（図 2.6.2-7 **A**）。E4 は、100 μM までの濃度で細胞毒性の徴候を示さなかった。

E4 及び E2 はいずれも、増殖を刺激し（[^{3}H]-チミジンの取込みを促進）、アポトーシスを低下させることにより、細胞成長を促進した。

E4（100 nM）及び E2（1 nM）は、T47-D 細胞の成長を MCF-7 細胞と同様に増大させたが、MDA-MB-231 及び SKBR3 細胞の成長は刺激せず、ERα の関与が示唆された（図 2.6.2-7 **B-D**）。

---

[24] AP-1：activator protein-1；Sp1：specificity protein-1；*BRCA1*：乳癌遺伝子（この遺伝子の変異は乳癌のリスクを高める）；*CCDN1*：サイクリン D 遺伝子；これら 2 つの遺伝子は、ERα がそのプロモーター領域の AP-1 又は Sp1 転写因子の部位に動員されることにより調節されると考えられる。

[25] 膜エストロゲン受容体介在性核外シグナル伝達又は膜開始ステロイドシグナル伝達（MISS）；MAPK：マイトジェン活性化プロテインキナーゼ；ERK1/2：細胞外シグナル調節キナーゼ

[26] GREB1：乳癌のエストロゲンによる調節遺伝子 1；CXCL12：ケモカイン（C-X-C モチーフ）リガンド 12

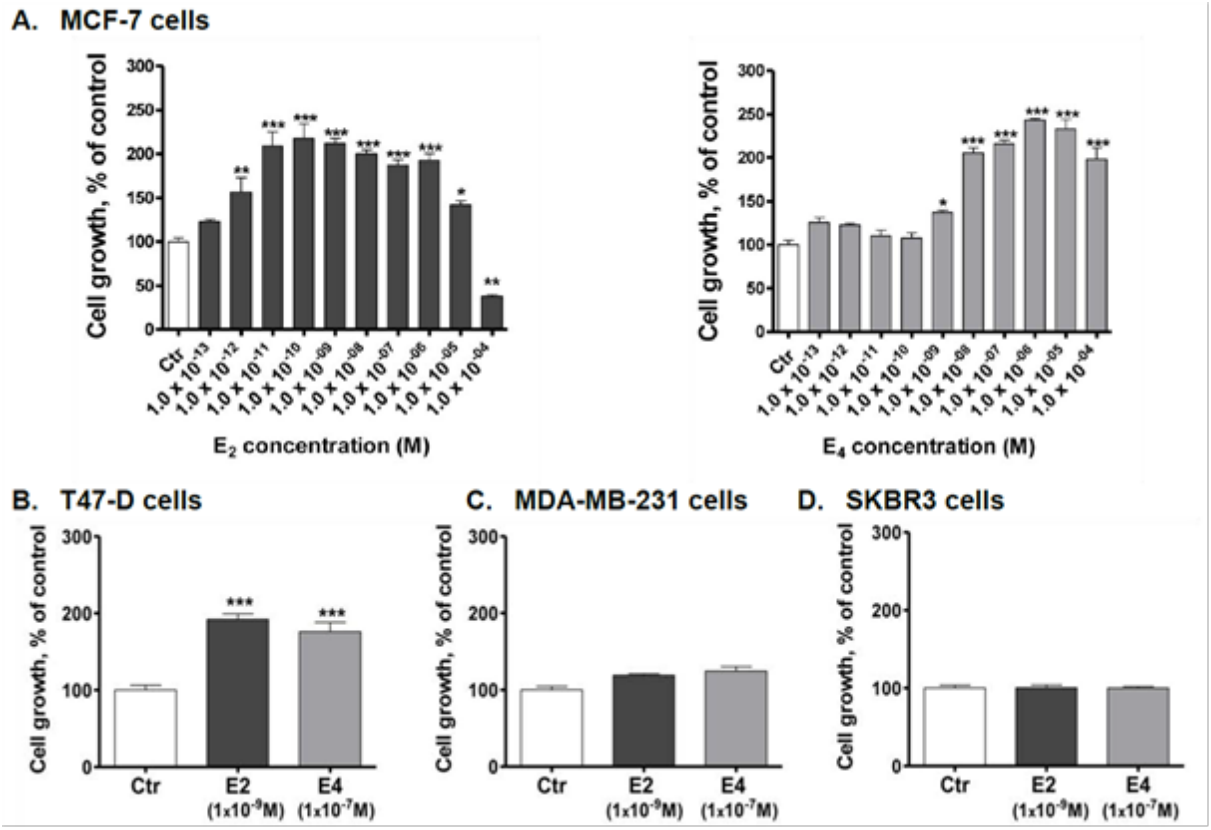


図 2.6.2-7 乳癌細胞の成長に対するエステトロール及びエストラジオールの作用（Gérard, 2015b）

Abbreviations: Ctr = control, E2 = estradiol, E4 = estetrol

E4 及び E2 による MCF-7 細胞の成長刺激に対する ERα の役割は、タモキシフェン又は ICI 182 780 の存在下でこのような刺激作用がないことによってさらに確認できた。ほかにも、E4 及び E2 は、MCF-7 細胞において ERα の Ser118 及び Ser167 のリン酸化を誘導し、これが受容体を活性化することが知られている。SKBR3（ERα-、ERβ+、GPER+）細胞では、いずれのエストロゲンも細胞成長を増強しなかったが、GPER アンタゴニストの G15 は、MCF-7 細胞における E4 及び E2 の成長刺激作用を 20～25%低下させたことから、GPER が寄与する可能性が示唆された。

E4 及び E2 は、核内の古典的及び非古典的経路を介して ERα の転写活性を促進した。両エストロゲンは、T47-D 細胞において ERE-Luc のトランス活性化を刺激し、EC50 は各々10 nM 及び 10 pM であった。また、酵母エストロゲンスクリーニング試験でいずれの化合物も ERE 依存性の ß-ガラクトシダーゼ発現を促進したが、E4 の効力は E2 の 1/10000 であった。E4（100 nM）及び E2（1 nM）は BRCA1 及び CCDN1 mRNA を上方制御したが、これはそのプロモーター領域における AP-1 又は Sp1 部位への ERα の動員に依存すると考えられた。最終的に、両エストロゲンは PR 発現を上方制御した。

E4（100 nM）及び E2（1 nM）は、MCF-7 細胞における ERK1/2 のリン酸化を一過性に高めた。このリン酸化は、MAPK 経路の上流の MEK1/2 の阻害物質である U0126 によって消失した。したがって、両化合物は核内への作用に加えて核外の MAPK 経路も活性化し、MISS 活性が示唆された。

E4 は、E2 の核内作用に拮抗しなかった。E2 を 0.01 nM（E2 誘発性の最大値以下のトランス活性化）で適用したとき、E4 は T47-D-Kbluc 細胞における E2 誘発性 ERE-luc トランス活性化を最大値まで増強した。また、E2 を 1 nM（E2 誘発性の最大のトランス活性化）で適用すると、E4 の作用は認められなかった（Gérard, 2015b）。

Abot（2014）は、E4（1 μM）及び E2（10 nM）がいずれも MCF-7 細胞における GREB1、PR 及び CXCL12 の ERα-ERE 依存性遺伝子発現を増加させたが、E4 は E2 による上方制御に影響を及ぼさないことを明らかにした。1 μM の E4 は 10 nM の E2 よりも、ERα とチロシンキナーゼ Src との間の相互作用の誘導能は弱かった。しかし、併用して適用した場合、E4 は E2 が誘発する相互作用を完全に阻害した。

ヒト乳癌細胞 T47-D の遊走及び浸潤に対する作用

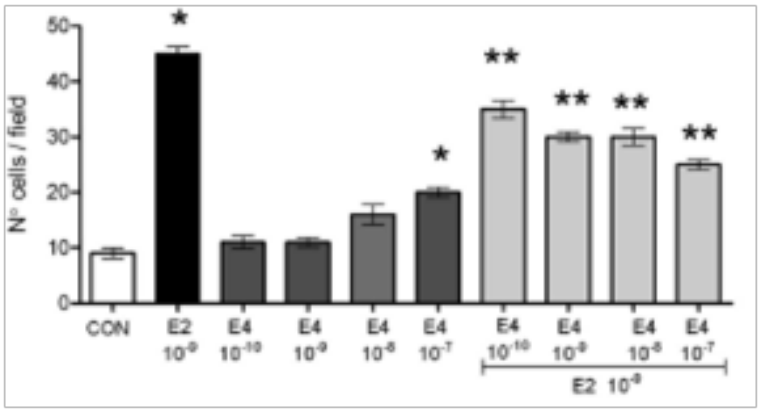
エストロゲンは、アクチン細胞骨格のリモデリング及び細胞外マトリックスへの細胞接着を可能にする接着構造（波状構造、仮足、糸状仮足）の形成を介して、ER 陽性乳癌細胞の遊走及び浸潤を促進すると考えられる。ER 陽性ヒト乳癌細胞 T47-D を用いて、E4（0.1～100 nM）及び E2（1 nM）を単独適用又は併用して適用し、細胞の遊走及び浸潤、アクチンリモデリング並びに膜修飾に対するそれぞれの作用検討した（PR3101[27]）。培養皿から T47-D 細胞単層の一部をかきとり、シトシンアラビノシドで増殖を阻害して、細胞遊走を評価した[28]（razor-scrape horizontal システム）。遊走を 48 時間モニタリングし、位相差顕微鏡／デジタル撮像で定量した。細胞浸潤は、BD BioCoat™ の Growth Factor Reduced Matrigel™ 細胞浸潤チャンバー（BD Biosciences）において 24 時間かけて評価した。アクチン細胞骨格は免疫蛍光法によって可視化した。アクチン調節蛋白であるモエシンの活性化（リン酸化）をウエスタンブロット法により測定した。

結果

E4 を単独適用すると、弱いエストロゲンとして T47-D 細胞の遊走及び浸潤が増強したが、その効力は E2 と比べてかなり低かった。ICI 182 780 は、細胞遊走に対する E4 の作用を減弱させた。E4 を E2 と共培養すると、T47-D 細胞の E2 誘発性遊走及び浸潤が減弱した。これらの作用を図 2.6.2-8 に示す。

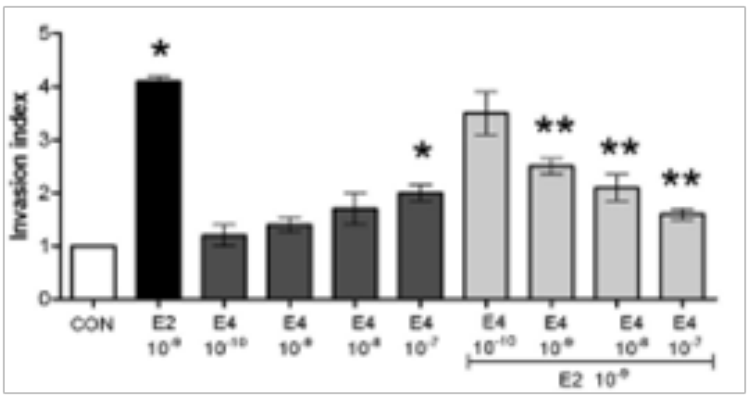
[27] 報告書 PR3101 の成績は Giretti（2014）が発表した。
[28] シトシンアラビノシドは DNA 合成を阻害するが、mRNA 合成は阻害しない。

A. Migration



Concentration of E2: 10^{-9} M; concentration range of E4: 10^{-10} to 10^{-7} M

B. Invasion



Concentration of E2: 10^{-9} M; concentration range of E4: 10^{-10} to 10^{-7} M

図 2.6.2-8. T47-D 細胞の遊走及び浸潤に対するエステトロールの作用（PR3101）

Figures taken from Giretti (2014)
Abbreviations: Con = control, E2 = estradiol, E4 = estetrol

E4 は、10 及び 100 nM の濃度で仮足及び波状構造の形成を誘発した。本作用は、1 nM の E2 と同程度であった。1 nM の E2 の存在下で、E4 はアンタゴニストとして作用し、細胞骨格再配列及び細胞の形態学的変化が減少した（図 2.6.2-9）。この過程は ERα 介在性核外シグナル伝達に依存することが知られている（Sanchez, 2010）。

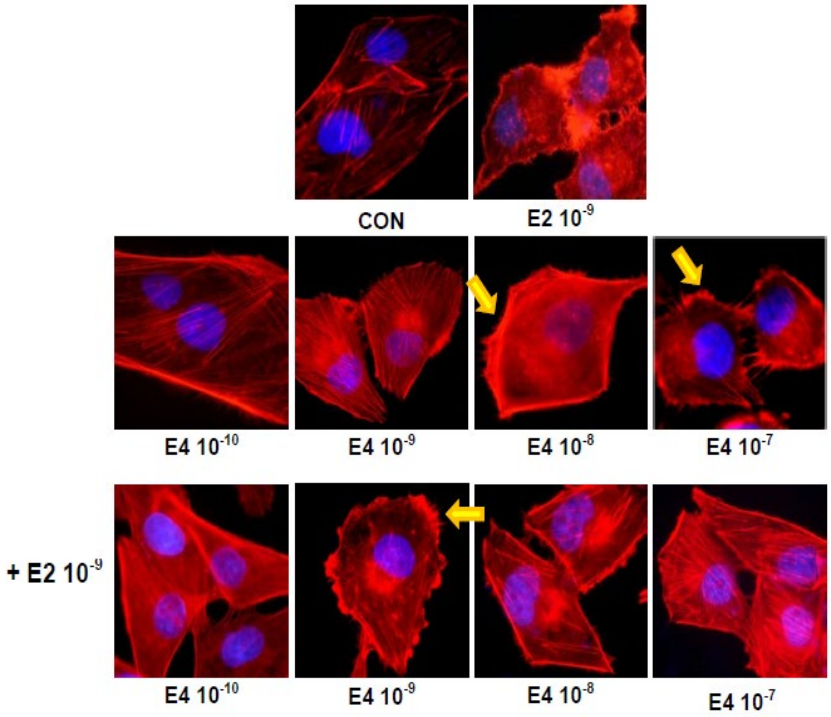


図 2.6.2-9 T47-D 細胞のアクチン細胞骨格に対するエステトロールの作用（PR3101）

Yellow arrows indicate pseudopodia and ruffles
Abbreviations: Con = control, E2 = estradiol, E4 = estetrol

E4 は、濃度及び時間依存的なモエシンのリン酸化を誘発した。E4 によるモエシンのリン酸化は、ER アンタゴニストの ICI 182 780 との共培養により完全に抑制された（PR3101）。T47-D 細胞における ERß の SiRNA サイレンシングは、モエシンリン酸化の発生に影響を及ぼさなかった（Giretti, 2014）。E4 は E2 誘発性のモエシンリン酸化に拮抗した。

卵巣摘出した免疫不全マウスにおける MCF-7 細胞移植後の腫瘍成長に対する作用

Gérard（2015b）は、卵巣摘出した免疫不全マウス（系統不明；n=5/群）を用いて、E4 の乳腺細胞腫瘍成長に対する作用及び E2 に対する拮抗作用について検討した。マウスの皮下に 2 x 10^6 個のヒト乳癌細胞 MCF-7 を移植し、E4（0.5～10 mg/kg/日）、E2（3 mg/kg/日）又は溶媒（ラッカセイ油中 5%エタノール）を 5 週間強制経口投与した。投与期間中に腫瘍を触診し、剖検時に腫瘍重量を測定した。併用投与群には、触知可能な腫瘍が 40～50 mm^2 に達するまで、E2（1.7 mg）の皮下ペレットをマウスに投与した。その後 5 週間、マウスに無処置、経口経路による溶媒投与、経口経路による E4（1、3、又は 10 mg/kg/日）投与又は皮下経路による E2（1.7 mg ペレット）投与を行った。剖検時に腫瘍重量を測定した。

結果

E4 は腫瘍成長を刺激したが、E2 より効力は低かった。10 mg/kg/日の E4 による成長は、3 mg/kg/日の E2 による成長と同程度であった。切除した腫瘍を免疫組織化学法により解析した

ところ、ERK1/2 及び AKT のリン酸化の亢進が認められ、核外 MAPK 経路及び PI3K/AKT 経路（MISS）の活性化が示された [29]。

E4 は E2 誘発性腫瘍成長に用量依存的に一部拮抗し、E2 単独投与と比較して腫瘍体積及び重量を約 50%減少させた。

雌ラットの DMBA モデルにおける乳腺腫瘍の発生阻害

雌 Sprague-Dawley ラットを用いた DMBA モデルで 2 つの試験を実施し、DMBA 誘発乳腺腫瘍の発生に対する E4 の作用を評価した。雌ラット（n=12/用量）に DMBA を 16 mg の用量で単回経口投与し、続いて溶媒［20%（w/v）ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン、3 mL/kg］、E4、EE 又はタモキシフェンを 8 週間連日経口投与した。

最初の試験（PR3028[30]）では、E4 を 0.5 及び 2.5 mg/kg/日の用量で投与した。EE は 0.025 及び 0.125 mg/kg/日の用量で、タモキシフェンは 3 mg/kg/日の用量で投与した。また、本試験には卵巣摘出ラットに溶媒を投与する群を設けた。

第 2 の試験（PR3049[31]）では、E4 を 0.5、1、1.5、2、2.5 及び 3 mg/kg/日の用量で投与した。タモキシフェンは 0.5、1.5 及び 3 mg/kg/日の用量で投与した。

死亡、臨床徴候及び体重をモニタリングした。試験の生存期間中、腫瘍を触診し、腫瘍の大きさ（幅、長さ）を測定し、腫瘍体積を算出した。剖検時に腫瘍重量を測定した。

結果

PR3028 試験では、3 匹が死亡し、4 匹が早期に屠殺された。0.5 mg/kg/日の E4 を投与したラット 1 匹が腫瘍破裂により死亡した。本試験における他の全ての死亡又は早期屠殺は、DMBA の毒性の結果であった。PR3049 試験では、DMBA の毒性のため 2 匹が死亡し、2 匹は早期に屠殺された。

生存動物では、投与に関連した臨床症状は認められなかった。PR3028 試験の最終体重は卵巣摘出群の方が他の投与群より重かった。PR3049 試験の最終体重はタモキシフェン投与動物が最も軽く、溶媒対照群が最も重かった。

腫瘍パラメータを表 2.6.2-5 に示す。

[29] ERK1/2：細胞外シグナル調節キナーゼ；AKT：プロテインキナーゼ b；MAPK：マイトジェン活性化プロテインキナーゼ；PI3K/AKT：ホスホイノシチド 3-キナーゼ/プロテインキナーゼ b

[30] 報告書 PR3028 の成績は、Coelingh Bennink HJ（2008c）及び Visser（2012）が発表した。

[31] 報告書 PR3049 の成績は、Coelingh Bennink HJ（2008c）及び Visser（2012）が発表した。

表 2.6.2-5 雌ラットの DMBA モデルにおける乳腺腫瘍発生に対する作用（PR3028, PR3049）

Treatment	No. Rats with Tumors	No. Tumors/ Rat	Tumor Volume/ Rat (mm^3)	Tumor Mass/ Rat (mg)
Study PR3028				
Vehicle	8/12	1.8	120	474
OVX + Vehicle	0/10	0.0**	NA	NA
Tamoxifen 3 mg/kg	1/9	0.1**	0**	1.5**
Ethinyl estradiol 0.025 mg/kg	7/12	1.3	86	238
Ethinyl estradiol 0.125 mg/kg	9/12	1.4	144	381
Estetrol 0.5 mg/kg	6/10	1.2	95	454
Estetrol 2.5 mg/kg	2/12	0.2**	6.3*	35**
Study PR3049				
Vehicle	10/12	1.8	90	258
Tamoxifen 0.5 mg/kg	0/11	0.0**	NA	NA
Tamoxifen 1.5 mg/kg	0/12	0.0**	NA	NA
Tamoxifen 3 mg/kg	0/12	0.0**	NA	NA
Estetrol 0.5 mg/kg	5/10	1.3	86	257
Estetrol 1 mg/kg	2/12	0.2**	100	232
Estetrol 1.5 mg/kg	5/12	0.4**	193	438
Estetrol 2 mg/kg	5/12	0.4**	274	496
Estetrol 2.5 mg/kg	0/12	0.0**	NA	NA
Estetrol 3 mg/kg	0/11	0.0**	NA	NA

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus vehicle

Abbreviations: DMBA = dimethylbenz[a]anthracene, NA = not applicable

最初の触知可能な腫瘍は、DMBA による腫瘍誘導後 4～5 週目に出現した。無処置溶媒投与群では、腫瘍数及び腫瘍体積が徐々に増加した。内因性エストロゲンがない場合（卵巣摘出群）、腫瘍形成は完全に阻害された。タモキシフェンも同様に腫瘍形成をほぼ完全に阻害した。EE 投与群では、全ての用量において大幅な腫瘍形成及び成長が認められた。同様に、0.5 mg/kg/日の E4 投与では、腫瘍形成の顕著な減少は認められなかった。より高用量の E4 では、ラット 1 匹あたりの腫瘍数が減少するか（1～2.5 mg/kg/日；PR3049、PR3028）又は腫瘍発生がなかった（2.5 及び 3 mg/kg/日；PR3049）。腫瘍体積及び腫瘍量は 1、1.5 及び 2 mg/kg/日の投与量で顕著な影響を受けなかったが（PR3049）、2.5 mg/kg/日ではこれらのパラメータが低下した（PR3028）。

雌ラットの DMBA モデルにおける乳腺腫瘍退縮に対する作用

DMBA ラットモデルを用いた第 3 の試験では、雌の Sprague-Dawley ラットにおいて、E4 が既存の乳腺腫瘍の数やサイズを低下させる可能性を評価した（腫瘍退縮）（PR3066[32]）。雌ラット（n=120）に DMBA 16 mg を単回経口投与した。8～11 週間後、ラットを 8 群（n=8～10/群）に分け、溶媒［20%（w/v）ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン；3 mL/kg/日］、並びに卵巣

[32] 報告書 PR 3066 の成績は、Coelingh Bennink HJ（2008c）及び Visser（2012）が発表した。

摘出術を施したラットに溶媒、E4（1、3 又は 10 mg/kg/日）、EE（0.15 又は 0.5 mg/kg/日）又はタモキシフェン（1 mg/kg/日）のいずれかを 4 週間強制経口投与した。

死亡、臨床徴候及び体重をモニタリングした。腫瘍を触診し、腫瘍の大きさ（幅、長さ）を測定し、剖検時に腫瘍重量を測定した。

結果

ラット 5 匹（卵巣摘出群のラット 1 匹、E4 の 3 mg/kg/日を投与したラット 1 匹、E4 の 10 mg/kg/日を投与したラット 2 匹、EE の 0.15 mg/kg/日を投与したラット 1 匹）は腫瘍の排出／出血のため早期に屠殺された。E4 又は EE を投与した少数の動物で腟出血が認められた。最終体重は卵巣摘出群の方が他の投与群より重かった。剖検時に、E4 及び EE 投与群の子宮に用量と関連した水分貯留が認められた。

10 mg/kg/日の E4 投与により、投与期間中に乳腺腫瘍の数が顕著に減少した。E4 はこの用量でタモキシフェンよりも有効であり、卵巣摘出術と同程度の有効性を示した。腫瘍数の変化は、全ての群で既存の腫瘍の退縮及び新たな腫瘍の発現の減少により判定した。E4 及び EE はいずれも、用量の増加に伴い、腫瘍数に対して用量依存的な効果を示し、用量の増加とともに新規腫瘍数が減少し、退縮腫瘍数が増加した（図 2.6.2-10）。

総腫瘍体積の顕著な退縮は、E4 を 3 mg/kg の用量で投与した動物及び卵巣摘出動物でのみ認められた。これは、E4（1 及び 10 mg/kg/日）、EE（0.5 mg/kg/日）又はタモキシフェンを投与した群において、進行の速い腫瘍が少数認められたことから説明できると考えられた。

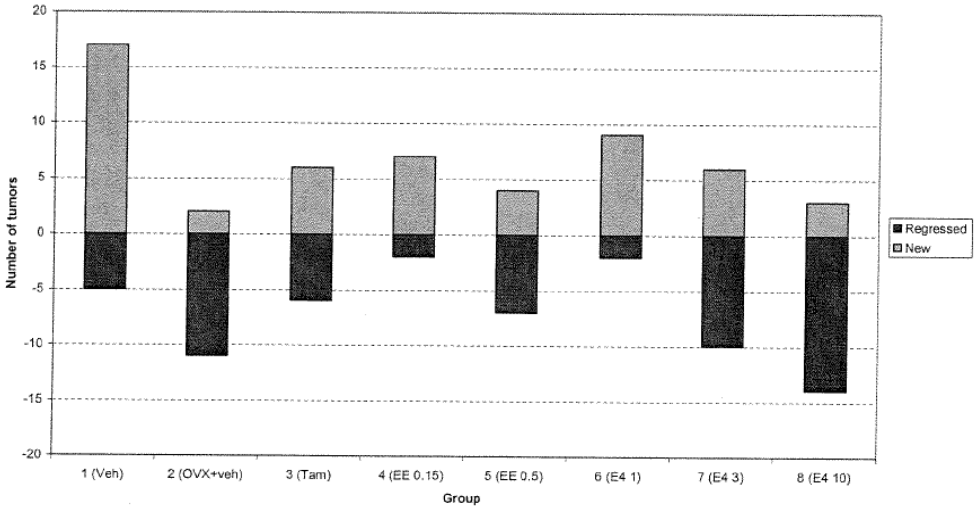


図 2.6.2-10 雌ラットの DMBA モデルにおける腫瘍発生及び退縮に対する作用（PR3066）

Abbreviations: DMBA = dimethylbenz(a)anthracene), E4 = estetrol, EE = ethinylestradiol, OVX = ovariectomized, TAM = tamoxifen, Veh = vehicle

2.6.2.3.1.3 凝固線溶系リスクに関連する *In Vitro* 及び *In Vivo* 試験

静脈血栓塞栓症（VTE）は、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。血漿中 SHBG 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、VTE リスクの予測マーカーである（Odlind, 2002、van Vliet, 2005、Stegeman, 2013）。

凝固線溶系リスクに関連した特性を評価するため、以下の E4 を用いた *in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施した。

- ヒト SHBG に対する相対結合親和性（PR3025）
- HepG2 及び Hep89 細胞における SHBG 及びコルチコステロイド結合グロブリン（CBG）の誘導（PR3060）
- 内皮の線維素溶解調節因子及び内皮細胞遊走に対する作用（Montt-Guevara, 2017）
- 雌の卵巣摘出マウスにおける止血及び血栓形成に対する作用（Valera, 2018）

これらの試験は GLP に準拠して実施したものではない。

性ホルモン結合グロブリンに対する相対結合親和性

[^{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でヒト SHBG の RBA を評価した（PR3025[33]、TS 表 2.6.5.6.B）。ヒト SHBG（トランスジェニックマウス血清より精製；リン酸緩衝生理食塩液中 1 nM）を 10 nM の[^{3}H]-ジヒドロテストステロン又は[^{3}H]-E2 と 0.17～33 μM の E4 と共に室温で 1 時間インキュベートした。デキストラン被覆炭末で未結合のステロイドを除去した後、液体シンチレーション計数法によって結合した[^{3}H]-リガンドの量を測定した。

結果

いずれの試験でも、E4 は SHBG の放射標識リガンドを置換しなかった。EE の RBA は[^{3}H]-ジヒドロテストステロンと比較して 0.08%、[^{3}H]-E2 と比較して 2.02%であった。E2 の RBA は[^{3}H]-ジヒドロテストステロンと比較して 6.8%であった。

性ホルモン結合グロブリン及びコルチコステロイド結合グロブリンの誘導

ERα を欠く野生型 HepG2 細胞及び ERα を過剰発現する HepG2 細胞株である Hep89 細胞を用いて、ヒト SHBG 及び CBG の E4 による誘導を検討した（PR3060[34]）。

フェノールレッド不含培養培地中で、0.1 nM～1 μM の範囲の E4、E2、E3 又は EE 濃度に細胞を最長 72 時間曝露した。24、48 及び 72 時間後に培地中の SHBG 及び CBG 濃度をそれぞれ蛍光免疫測定法及びラジオイムノアッセイ法により測定した。

結果

72 時間のエストロゲン曝露に反応した HepG2 細胞及び Hep89 細胞の培地中の SHBG 濃度を図 2.6.2-11 に示す。

ERα を欠く野生型 HepG2 細胞では、検討したいずれのエストロゲンも SHBG の顕著な誘導を引き起こさなかった。ERα 発現 Hep89 細胞では、E2、EE 及び E3 によって SHBG 産生が増加し、E2 に対して最も強い反応が得られた。対照的に、E4 はこの細胞株において SHBG を誘導しなかった。

[33] 報告書 PR3025 の成績は Hammond（2008）が発表した。
[34] 報告書 PR3060 の成績は Hammond（2008）が発表した。

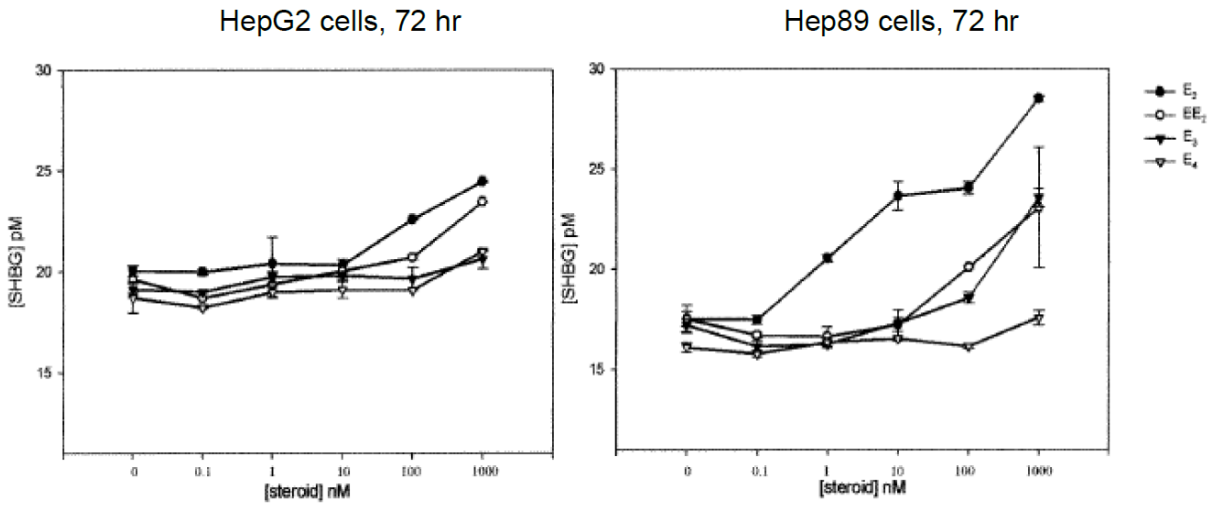


図 2.6.2-11 HepG2 及び Hep89 細胞におけるエステトロール、エストラジオール、エストリオール及びエチニルエストラジオールによる性ホルモン結合グロブリンの誘導（PR3060）

Abbreviations: E_2 = estradiol, EE_2 = ethinylestradiol, E_3 = estriol, E_4 = estetrol, hr = hour, SHBG = sex hormone binding globulin

HepG2 細胞において、CBG 産生は、検討したエストロゲンのいずれによっても 72 時間の曝露後に変化は認められなかった。Hep89 細胞における培地中 CBG 濃度は検出限界未満であった。

内皮の線維素溶解調節因子及び内皮細胞遊走に対する作用

Montt-Guevara（2017）は、HUVEC 細胞における t-PA、u-PA 及び PAI-1 の産生並びにそれぞれの遺伝子の調節に関与する c-Fos 及び c-Jun 転写因子に対して E4（0.1～10 nM）及び E2（0.1～10 nM）の単独又は併用適用が及ぼす作用を検討した。また、razor-scrape horizontal システム及びマルチウェルインサートシステムの 2 種類の分析法を用いて、HUVEC 細胞遊走に対するエストロゲン単独又は併用の作用を検討した。

結果

E4 及び E2 はいずれも、HUVEC 細胞における t-PA、u-PA 及び PAI-1 発現を濃度依存的に増加させ、また転写因子 c-Fos 及び c-Jun 発現を増加させた。E4 は、t-PA、u-PA 及び PAI-1 の発現刺激において E2 より効力が弱く、高濃度の E2（10 nM）によって誘発された作用に拮抗したが、低濃度の E2（0.1 nM）により誘発された作用を阻害しなかった。E4 及び E2 はいずれも HUVEC 細胞遊走を誘導し、E4 は高濃度の E2 の場合のみ、その作用を阻害した。t-PA、u-PA 又は PAI-1 の発現を siRNA でサイレンシングすると、E4 又は E2 誘導性の細胞遊走が減少した。ICI 182 780 によって E4 の作用が阻害されたことから、ER 受容体の関与が考えられた。

卵巣摘出マウスにおける止血及び血栓形成に対する作用

Valera（2018）は、6 mg/kg/日の E4 を放出する浸透圧性ミニポンプを皮下移植した C57BL/6J 卵巣摘出マウスを用いて、E4 の長期投与が止血及び血栓形成に及ぼす影響を評価した。血液学的パラメータ［血小板数、プロトロンビン時間、血漿フィブリノーゲン濃度、活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）及び凝固因子］に及ぼす作用を評価した。急性血栓症（高用量のコ

ラーゲン及びエピネフリンの頸静脈への注射により誘発）、頸動脈血栓症（$FeCl_3$ 誘発性頸動脈損傷）及び下大静脈部分結紮又は全結紮により誘発した静脈血栓症の様々な静脈及び動脈血栓症モデルに対する E4 の影響もマウスを用いて検討した。*Ex vivo* における動脈血流条件下での血小板粘着及び血栓の成長も評価した。核内 ERα の作用が止血や血栓形成に及ぼす影響を解析するために、核内 ERα が欠損した骨髄細胞を有する造血キメラを作製した。

結果

E4 の 3 週間の長期投与後、血小板数、プロトロンビン時間及び血漿フィブリノーゲン濃度に影響は認められなかった。APTT のわずかな短縮並びに第 II 及び第 IX 因子の増加が認められた。E4 の投与により、マウスにおける尾出血時間が増加した。卵巣摘出した対照マウスはコラーゲン＋エピネフリン混合液の注射後 10 分以内に閉塞性血栓塞栓症により死亡したが（死亡率 100%、n=12）、E4 投与マウスの 40%はコラーゲン＋エピネフリン混合液の投与後 10 分でも生存した。対照マウス及び E4 投与マウスの死亡例と比較して、生存マウスは、血管の閉塞性血栓に対する顕著な防御と正常な左室機能を示した。結紮誘発性の静脈血栓症の両モデルにおいて、E4 投与マウスは対照マウスと比較して血栓が顕著に小さかった。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。E4 による血栓塞栓症予防作用は、造血細胞の核内 ERα 活性化がない場合には顕著に低下したが、尾出血時間の延長はこの欠失の影響を受けなかった。

2.6.2.3.1.4 血管作用に関連する *In Vitro* 及び *In Vivo* 試験

エストロゲンには一定の有益な血管作用があり、E4 の潜在的役割を検討するために以下の試験を実施した。

- HUVEC 細胞及びマウス大動脈における NO 放出、eNOS 活性化及び eNOS 発現に対する作用（PR3102、Abot, 2014）
- ラット動脈の血管弛緩作用（PR3093）
- $ERα^{+/+}/LDLr^{-/-}$及び $ERα^{-/-}/LDLr^{-/-}$卵巣摘出マウスにおけるアテロームの予防（Abot, 2014）
- 卵巣摘出及び卵巣正常マウスにおける内皮治癒に対する作用（Abot, 2014、Davezac, 2023）
- 卵巣摘出マウスにおける新生内膜過形成、血流依存性細動脈リモデリング及び AngII 誘発性高血圧に対する作用（Smirnova, 2015、Guivarc'h, 2018）

これらの試験は GLP に準拠して実施したものではない。

<u>ヒト臍帯静脈内皮細胞及びマウス大動脈における一酸化窒素放出並びに内皮型一酸化窒素合成酵素の活性化及び発現に対する作用</u>

一酸化窒素（NO）は、L-アルギニンから内皮型一酸化窒素合成酵素（eNOS）により合成され、主に血管内皮により産生される血管作動性分子であり、血管保護作用及び血管壁の抗動脈硬化作用を発揮する（Montt-Guevara, 2015）。エストロゲンは、迅速な非ゲノム経路（MISS 作用）及び eNOS 発現の核内誘導を介して eNOS を活性化することができる。

eNOS 発現、活性化及び NO 放出に対する E4（0.1～10 nM）及び E2（0.1～10 nM）の作用を、30 分間又は 48 時間曝露させた HUVEC 細胞において検討した（PR3102[35]）。

[35] 報告書 PR3102 の成績は Montt-Guevara（2015）が発表した。

Abot（2014）は、*in vitro* で、無処置マウスから摘出した大動脈を用い、E4（1 μM）又は E2（10 nM）を単独で又は併用して 30 分間曝露させ、NO 産生及び eNOS リン酸化をモニタリングした。

結果

HUVEC 細胞において、E4（0.1～10 nM）は eNOS の過剰リン酸化（活性化）により投与後 30 分以内に NO 放出を誘発した。48 時間処理した場合も、E4 は eNOS 発現を誘導した。濃度作用曲線はベル型であった。すなわち、用量の増加により刺激が低下した。上記パラメータに対する E4 の作用は E2 の作用より弱く、ER 拮抗薬 ICI 182 780 によって阻害可能であった。E4 は、特に高濃度（10 nM）の E2 による E2 誘発性 NO 放出、eNOS 活性化及び eNOS 発現を減弱させた。この拮抗作用は、より低濃度の E2 では次第に消失した（PR3102）。

E4（1 μM）は、*in vitro* で曝露させたマウス大動脈において eNOS リン酸化及び NO 産生を誘発しなかったが、E2 の刺激作用を阻害した（Abot, 2014）。

ラット摘出動脈の血管弛緩作用

E2 は、内皮依存性 ER 介在性の NO 放出及び平滑筋細胞の Ca^{2+}流入に対する内皮非依存性抑制作用を含める機序によって、血管弛緩を引き起こす。ラットの摘出動脈を用いて、E4 の潜在的な血管弛緩作用を E2 と比較した（PR3093[36]）。雌の Sprague-Dawley ラットから子宮動脈及び他の 6 種類の動脈（頸動脈、腸間膜動脈、中大脳動脈、肺動脈、腎動脈、中隔冠動脈）[37]を摘出し、Krebs-Ringer 緩衝液で満たしたワイヤーミオグラフシステム（Danish Myotech）に載せ、37°C、95% O_2/5% CO_2 の条件下で維持した。フェニレフリン（1～10 μM）で安定した収縮を得てから、0.1～100 μM の濃度範囲の E4 及び E2 に対する累積濃度-反応曲線を作成した。

フェニレフリンで収縮させて濃度-反応曲線を求める前に、種々の阻害薬と共に 30 分間プレインキュベーションすることによって、ラット子宮動脈における E4 誘発性血管弛緩の機序を評価した。

- 非選択的 ER 阻害薬 ICI 182 780（1 μM）及び選択的 ERα 阻害薬 MPP 二塩酸塩（1 μM）を用いて ER の関与を評価した。
- 一酸化窒素合成酵素阻害薬である N^{ω}-ニトロ-L-アルギニン（L-NAME；100 μM）を用いて NO 放出の関与を評価した。
- シクロオキシゲナーゼ阻害薬インドメタシン（10 μM）を用いて、プロスタグランジンの役割を評価した。
- L-NAME とインドメタシンを併用して、内皮由来過分極因子の役割を検討した。過分極反応はカルシウム活性化 K^+チャネルの活性化により開始されるため、選択的阻害薬 UCL1684（1 μM）及び TRAM-34（1 μM）をそれぞれ小コンダクタンス及び中間コンダクタンス K^+チャネルを阻害するために適用した。
- L-NAME、インドメタシン及び可溶性グアニル酸シクラーゼ阻害薬 ODQ（10 μM）を用いて、環状グアノシン一リン酸（cGMP）の NO 介在性放出の役割を検討した。

[36] 報告書 PR3093 の成績は Hilgers（2012）が発表した。

[37] Hilgers（2012）は、更に胸部大動脈における血管拡張作用を評価した。

アセチルコリン介在性の血管弛緩に対する阻害薬の作用を陽性対照の目的に供した。内皮依存性は、内皮を剥離した子宮動脈を用いて評価した。

血管収縮性ペプチドであるエンドセリン-1 に対する収縮反応を抑制する E4 の可能性について、エンドセリン-1 に対する反応を測定する前に、EC50 濃度の E4 と共に子宮動脈を 10 分間プレインキュベーションして検討した。

最終的に、Ca^{2+}非含有/高 K^{+}溶液中 EC50 濃度の E4 と共に子宮動脈を 10 分間プレインキュベーションし、その後、塩化カルシウムを累積的に添加することにより、平滑筋細胞の Ca^{2+}流入に対する E4 の阻害作用を評価した。その他の内皮因子の可能性ある調節作用は L-NAME、インドメタシン及び ODQ によって抑制された。

結果

様々なラット動脈の血管弛緩に対する E4 及び E2 の作用を表 2.6.2-6 に要約する。血管弛緩を引き起こす E4 に対する感受性（pEC50 範囲 3.71～4.43）は、子宮動脈と他の 6 つの組織の動脈で同程度であった。E4 は、子宮動脈の弛緩において E2 の 1/20 の効力を示した。評価した他の動脈の弛緩においても、E4 の効力は E2 よりも低く、E4 と E2 の感度の差は、小型の筋性動脈で最も大きく、大動脈（頸動脈及び腎動脈）で最も小さかった。

表 2.6.2-6 ラット動脈におけるエステトロール及びエストラジオールによる血管弛緩（PR3093）

	Estetrol		Estradiol		Relative Potency[1]
Artery Type[2]	**pEC50**	**E_{max} (%)**	**pEC50**	**E_{max} (%)**	
Uterine	4.10*	72*	5.45	92	20
Carotid	4.43*	61	4.93	59	3
Mesenteric	4.26*	93	5.68	98	30
Middle Cerebral	3.71*	65*	5.42	97	37
Pulmonary	4.20*	80	5.49	97	55
Renal	4.43*	67*	5.25	81	17
Septal Coronary	4.32*	92	5.77	100	26

1 Relative potency (x-fold) of estradiol versus estetrol

2 In thoracic aorta, pEC50 and E_{max} were 4.30 and 68% for estetrol and 4.61 and 59% for estradiol (Hilgers, 2012); Hilgers (2012) report slightly different values for the other artery types, but pEC50, E_{max} and relative potencies show the same tendency

*$p < 0.05$ versus estradiol

Abbreviations: pEC50 = -log of median effective concentration, E_{max} = relaxation at the highest concentration tested

子宮動脈において、E4 及び E2 に対する血管弛緩反応は、非選択的 ER アンタゴニストの ICI 182 780 によって部分的に阻害されたが、選択的 ERα アンタゴニストの MPP 二塩酸塩（1 μM）では阻害されず、ERβ 依存性機序が示唆された。

L-NAME によって一酸化窒素合成酵素を阻害することで、子宮動脈の E2 誘発性血管弛緩は鈍化したが、E4 誘発性血管弛緩は作用を受けなかった。

シクロオキシゲナーゼ阻害薬インドメタシンは、いずれのエストロゲンに対する血管弛緩反応にも影響を及ぼさなかったことから、血管作動性プロスタグランジンは関与しなかったことが示唆された。

L-NAME とインドメタシンを併用した場合も、L-NAME のみの場合と同様の作用が認められた。L-NAME 及びインドメタシンの存在下で、小コンダクタンス及び中間コンダクタンスカルシウム活性化 K^+チャネルが阻害されたことで、E2 に対する反応がわずかに促進されたが、E4 に対する反応には影響は認められず、過分極の役割がないことと一致した。

L-NAME 及びインドメタシンの存在下で、ODQ によって可溶性グアニル酸シクラーゼを阻害したところ、E4 に対する弛緩反応は鈍化し、cGMP 活性化の NO 非依存性機序が示唆された。E2 ではわずかな作用しか認められなかった。

内皮剥離により E2 及び E4 に対する反応はいずれも低下した。

どのエストロゲンも、子宮動脈においてエンドセリン-1 に対する用量依存的な収縮反応を阻害しなかった。

E2 及び E4 はいずれも、K^+脱分極及び Ca^{2+}枯渇を行った子宮動脈への平滑筋細胞 Ca^{2+}流入を用量依存的に阻害し、E4 の効力は E2 の 1/3～1/10 であることが示された。

E4 誘発性血管弛緩は、内皮依存性（ER が関与）の cGMP 介在性の機序と、平滑筋細胞の Ca^{2+}流入及び収縮の阻害を伴う内皮非依存性の機序の両方によって介在されると考えられた。

<u>ERα$^{+/+}$/LDLr$^{-/-}$及び ERα$^{-/-}$/LDLr$^{-/-}$卵巣摘出マウスにおけるアテローム予防</u>

Abot（2014）は、ERα$^{+/+}$/LDLr$^{-/-}$及び ERα$^{-/-}$/LDLr$^{-/-}$の卵巣摘出マウス[38]（n=4～8/群）に、E4 を 0、0.6 又は 6 mg/kg/日の用量（推定）で含有する高コレステロール（1.25%）食を 12 週間摂取させ、大動脈洞における脂質沈着に対する E4 の影響を評価した。血漿中コレステロールを測定し、顕微鏡的形態計測により大動脈洞における脂質沈着を定量した。

結果

E4 は ERα$^{+/+}$/LDLr$^{-/-}$の卵巣摘出マウスにおいて、脂質沈着を用量依存的に予防し、アテローム沈着をほぼ 80%減少させた。E4 は 6 mg/kg/日の投与量で、血漿中総コレステロール値を減少させたが、高比重リポ蛋白コレステロールに対して影響しなかった。E4 は、ERα$^{-/-}$/LDLr$^{-/-}$の卵巣摘出マウスにおいてアテローム保護作用を示さず、ERα の役割が確認された。

<u>卵巣摘出又は卵巣正常マウスにおける内皮治癒に対する作用</u>

Abot（2014）及び Davezac（2023）は、卵巣摘出又は卵巣正常 C57BL/6J マウスにおいて内皮治癒に対する E4 及び E2 の作用を評価した。E2 による再内皮化の促進には、血管内皮細胞における膜 ERα シグナル伝達が関与する。

最初の試験（Abot, 2014）では、プラセボ又は E2 を放出するペレット（約 80 µg/kg/日）又は E4 を放出する浸透圧性ミニポンプ（約 1 又は 6 mg/kg/日）をマウス（n=7～23/群）に皮下移植した。また、マウスに E4（6 mg/kg/日）及び E2（80 µg/kg/日）を併用投与する群を設定した。2 週間の投与後、頸動脈に電気的傷害を加えることで血管周囲傷害を誘導し、3 日後に屠殺した。頸動脈の再内皮化を顕微鏡下で評価した。

[38] LDLr：低比重リポ蛋白受容体

第 2 の試験（Davezac, 2023）では、媒体（コレステロール）、E2（75 µg/pellet）又は E4（1 mg/pellet）を放出するペレットをマウス（n=5～11/群）に皮下移植した。また、マウスに E4（75 µg/pellet）及び E2（1 mg/pellet）を併用投与する群を設定した。2 週間の投与後、頸動脈に血管内皮傷害（平滑筋細胞は保存される）を誘導し、5 日後に屠殺した。頸動脈の再内皮化を顕微鏡下で評価した。

結果

最初の試験において、血管周囲傷害モデルを用いたところ、E2 は内皮治癒を促進したのに対し、E4 は、E2 とは異なり、いずれの投与量でも内皮治癒に対する促進作用を示さなかった。しかし、E4 は、E2 と併用した場合、E2 によって誘発された内皮治癒促進を消失させた。

第 2 の試験において、血管内皮傷害モデルを用いたところ、E4 は、E2 と同程度に内皮治癒を促進した。傷害時（day 0）に対する再内皮化率は、媒体対照群では約 30%であり、E4 群では約 80%を示した。E4 による再内皮化の促進は、平滑筋細胞における ERα を介することが示された。さらに、内因性エストロゲンが分泌される卵巣正常マウスにおいて、E4 は、内皮治癒を促進した。

<u>新生内膜過形成、血流依存性細動脈リモデリング及びアンギオテンシン II 誘発性高血圧に対する作用</u>

Smirnova（2015）は、E4（6 mg/kg/日）の浸透圧性ミニポンプを皮下移植した卵巣摘出マウスの大腿動脈損傷の実験的モデルを用いて、E4 が新生内膜過形成に及ぼす影響を評価した。血管平滑筋細胞又は内皮細胞中の ERα を選択的に欠損させたトランスジェニックマウスも用いた。

E4 を 2 週間長期投与した卵巣摘出マウスから摘出した腸間膜動脈で、二本の腸間膜動脈を結紮するモデルによって血流依存性細動脈リモデリングを評価した（Guivarc'h, 2018）。その後、*in vitro* で動脈径を計測した。また、加圧し、前収縮させた腸間膜動脈における短期的な急性血流依存性血管拡張（生理学的な *ex vivo* 条件）を評価した。

Guivarc'h（2018）は、卵巣摘出し、1 箇月間 AngII（0.5 mg/kg/日）及び E4（6 mg/kg/日）を送達する浸透圧性ミニポンプを移植した雌マウスを用いて、AngII 誘発性高血圧に対する E4 の作用も分析した。毎週 5 日間、収縮期血圧を測定した。

結果

E4 は、内皮細胞に対する作用ではなく、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血管平滑筋細胞の新生内膜過形成を抑制した。E4 は E2 と同程度に新生内膜過形成を抑制した。

卵巣摘出により血流依存性細動脈リモデリングが完全に失われたが、E4 を 2 週間投与することにより、卵巣摘出マウスで血流依存性の細動脈リモデリングが生じる能力が回復した。E4 又は溶媒は、管腔内血流の段階的増加に対して極めて類似した血管拡張反応を引き起こし、E4 は NO 産生の最も重要な生理学的刺激である内皮せん断応力に対する血管拡張反応を阻害しないことが示された。

E4 は、E2 と同様に、雌の卵巣摘出マウスを AngII 誘発性高血圧から保護した。AngII の高血圧作用は、卵巣摘出マウスや ERα 欠損マウスで顕著に増悪し、内因性エストロゲンの有益な作用が ERα 依存性であることが示された。

2.6.2.3.1.5 その他の適応疾患のモデルを用いた試験

他の適応症のモデルを用いた試験には、閉経期（後）症状（ホットフラッシュ、骨粗鬆症）のラットモデルを用いた 2 試験、関節炎のマウスモデルを用いた 1 試験及び多発性硬化症のマウスモデルを用いた 1 試験が含まれた（PR3018、PR3004、PR3065、PR3064）。

卵巣摘出したモルヒネ依存ラットの血管運動神経症状に対する作用

モルヒネ離脱（通常は顕著な皮膚温度上昇をもたらす）を達成するためにナロキソンを投与したモルヒネ依存性の卵巣摘出 Sprague-Dawley ラットで、血管運動神経症状に対する E4 の作用を評価した（PR3018[39]）。本モデルは、閉経期のホットフラッシュを検討するための標準的なモデルと考えられる。

卵巣摘出ラット（n=6/用量）に E4（0.1、0.3、1 又は 3 mg/kg/日）、EE（0.3 mg/kg/日）又は溶媒（20%（w/v）ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン（3 mL/kg/日）を、ナロキソン投与日（ホットフラッシュの期間）を含めて 8 日間連続経口投与した。モルヒネ依存性は、ホットフラッシュの期間の前に 2 回、75 mg のモルヒネペレットを皮下移植して誘発した。ホットフラッシュの期間には、ラットにナロキソン塩酸塩（1 mg/kg）を注射し、5 分間隔で 1 時間、尾の皮膚温を記録した。

結果

投与前の全群の平均体温は 22.9℃であった。ナロキソン投与によるモルヒネ離脱後 15 分以内に、溶媒対照群の平均体温は 27.3℃まで上昇した。0.3 mg/kg/日以上の用量で E4 を投与すると、体温上昇が用量依存的に減弱した。最高用量の E4（3 mg/kg/日）及び EE を投与すると、体温上昇は完全に抑制された。E4 の効力は、EE の効力の 1/10 と推定された。

卵巣摘出ラットにおける骨量減少予防

卵巣摘出した成体 Sprague-Dawley ラットを用いて、E4 がエストロゲン欠乏による骨量減少を予防する可能性を検討した（抗骨粗鬆症試験）（PR3004[40]）。卵巣摘出ラット（n=10/用量）に E4（0.1、0.5 又は 2.5 mg/kg/日）、EE（0.1 mg/kg/日）又は溶媒（アラキドン酸油中 10% (v/v)エタノール；3 mL/kg/日）を 4 週間経口投与した。また、卵巣摘出の偽手術を行い溶媒投与した対照群を設け、無処置群をベースライン対照として屠殺した。

血清中オステオカルシン濃度（骨代謝回転の特異的マーカー）を測定した。腰椎（L3～L6 椎骨）では PIXImus 骨密度測定装置を用い、脛骨近位部では末梢骨定量的コンピュータ断層撮影法を用いて、骨塩量、面積及び密度を記録した。インデンテーション試験により大腿骨遠位部の骨強度を測定した。子宮重量も測定した。

結果

卵巣摘出により、偽手術対照群と比較してオステオカルシンが約 50%増加した。E4 投与は卵巣摘出に関連したオステオカルシンの増加を用量依存的に抑制した。2.5 mg/kg/日の E4 を投与したところ、オステオカルシンの濃度は偽手術対照群の濃度を下回った。EE 投与群の濃度は、偽手術対照群と同等であった。

---

[39] 報告書 PR3018 の成績は Holinka（2008a）が発表した。

[40] 報告書 PR3004 の成績は、Coelingh Bennink HJ（2008b）が発表した。

腰椎骨密度は卵巣摘出術後に 4.2%低下した。E4 は用量依存的に骨密度の低下を抑制した。骨密度は 0.1 mg/kg/日投与群で卵巣摘出群をわずかに上回り、2.5 mg/kg/日投与群で偽手術対照群と同程度の値に達した。0.1 mg/kg/日の EE を投与した結果、骨密度は高用量 E4 群及び偽手術対照群と同程度であった。骨塩量についても同様の傾向が認められたが、骨塩面積に対する投与の影響は認められなかった。

卵巣摘出術後、脛骨近位部の骨密度も同様に全骨（-8.7%）及び骨梁（-28%）のいずれにおいても低下した。E4 は、全骨及び骨梁の骨密度の低下を用量依存的に抑制した。0.5 mg/kg/日の E4 では、骨密度は偽手術対照群と同等の値を示した。2.5 mg/kg/日の E4 の投与は、偽手術対照群の値を上回る骨密度の増加をもたらし、0.1 mg/kg/日の EE と同等であった。骨塩量についても同様の傾向が認められた。

0.5 mg/kg/日及び 2.5 mg/kg/日の E4 の投与は、遠位大腿骨の骨強度試験の全パラメータ（極限強度、最大荷重、剛性及びエネルギー）について、卵巣摘出に関連した低下を予防し、骨強度を維持することが示された。全てのパラメータにおいて、2.5 mg/kg/日の E4 に対する反応は、0.1 mg/kg/日の EE に対する反応と同等又はより顕著であった。

E4 は卵巣摘出ラットの子宮重量減少を用量依存的に抑制した。2.5 mg/kg/日群の子宮重量は、偽手術対照群の子宮重量と同程度であった。

本試験における E4 の効力は、EE の 1/20 であると推定された。

コラーゲン誘発関節炎に対する作用

コラーゲン誘発関節炎マウスを用いて、関節炎における E4 の潜在的有効性を評価した（PR3065）。雄 DBA/1 マウスにフロイント完全アジュバントと混和した 100 μg のウシ II 型コラーゲンを皮下投与し、3 週間後、すなわち Day 21 にリン酸緩衝生理食塩液と混和した 100 μg の II 型コラーゲンを腹腔内注射して、関節炎を誘発した。Day 22 から、マウス（n=13/用量）に E4（0.1、0.3、1 又は 3 mg/kg/日）、デキサメタゾン（1 mg/kg/日、陽性対照）又は溶媒［20%(w/v)ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン；投与量は報告なし］を連続 21 日間、すなわち Day 42 まで経口投与した。

疾患の発症及び重症度は、腫脹した関節の数及び発赤としてスコアで示した（関節 4 個につき、各スコア 0～2）。また、体重をモニタリングした。

結果

溶媒投与群のマウスではいずれも、追加のコラーゲン注射後 7 日以内、すなわち Day 28 までに関節炎が発現した。平均発症日は 25.4 日であった。肉眼的関節炎スコアは経時的に上昇し、Day 42 の平均スコアは 5.90 であった。平均累積関節炎スコアは 31.4 であった。関節炎の発現には体重減少が伴っており、Day 42 の体重は Day 21 の初期体重の 87.9%であった。

0.1、0.3、1 及び 3 mg/kg/日の E4 の投与により、平均発症日はそれぞれ Day 25.8、26.0、28.2 及び 30.7 まで用量依存的に遅れた。同様に、試験終了時の肉眼的関節炎スコア（累積関節炎スコア）は、各用量で 5.69（30.2）、5.31（29.4）、4.56（25.4）及び 2.71（12.4）まで用量依存的に低下した。体重減少は 1 mg/kg/日までは対照群と同程度であったが、Day 42 の体重は 3 mg/kg/日投与群では初期体重の 97.9%であった。

デキサメタゾン群では、試験終了前に関節炎は認められなかった。

マウスの実験的自己免疫性脳脊髄炎に対する作用

実験的自己免疫性脳脊髄炎マウスを用いて多発性硬化症における E4 の潜在的有効性を検討した（PR3064）。雌 SJL/J マウスに、完全フロイントアジュバントに混和したプロテオリピッド蛋白（$PLP_{139-151}$）の合成ペプチド 50 µg を皮下投与し、その後、熱で不活化した百日咳菌 10^9 個を静脈内投与して、実験的自己免疫性脳脊髄炎を誘導した。試験期間を通して、すなわち Day 42 まで、マウス（n=10/用量）に、E4（0.1、0.3、1 又は 3 mg/kg/日）又は溶媒［20% (w/v)ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン；0.2 mL/マウス/日）を経口投与した。

疾患の発症及び重症度は、障害スコア（死亡までの麻痺の程度、スコア 0～5）としてスコアで評価した。また、体重をモニタリングした。

結果

溶媒を投与したマウスの 70%が実験的自己免疫性脳脊髄炎を発症し、免疫後 Day 12 に臨床症状が現れた。平均最大障害スコアは 1.8、平均累積障害スコアは 17.4 であった。

1 及び 3 mg/kg/日の用量で、E4 は実験的自己免疫性脳脊髄炎を抑制した。これは以下の結果から明らかであった。

- 平均発症日の遅延（それぞれ 14.7 日及び 15.7 日まで）
- 疾患の発現率の低下（それぞれ 30%及び 33%まで低下）
- 最大障害スコアの低下（それぞれ 0.9 及び 0.8 まで）
- 平均累積障害スコアの低下（それぞれ 3.9 及び 5.1 まで）

Day 26～42 以降、これらの投与群のマウスでは、他の投与群とは対照的に疾患活動性のエビデンスはほとんど認められなかった。

0.1 及び 0.3 mg/kg/日の用量で、E4 は臨床症状の発現を遅らせる傾向を示したが、疾患の発現率又は重症度に影響は認められなかった。

疾患を発症した動物では、投与に関係なく、麻痺の徴候に伴う体重減少が認められた。

2.6.2.3.2 ドロスピレノン

2.6.2.3.2.1 *In Vitro* 及び *In Vivo* における副次的なホルモン特性

Krattenmacher（2000）、Fuhrmann（1996）や Louw-du Toit（2017）は、ヒト及びラットのアンドロゲン、エストロゲン、鉱質コルチコイド及びグルココルチコイド受容体に対する DRSP の *in vitro* 相互作用及び親和性を報告した。DRSP の抗鉱質コルチコイド活性、アンドロゲン／抗アンドロゲン活性、グルココルチコイド／抗グルココルチコイド活性及びエストロゲン活性に関する *in vivo* 試験は Losert（1985）、Muhn（1995）及び Furhmann（1996）が実施した。

ステロイド受容体に対する相対結合親和性

DRSP は、鉱質コルチコイド受容体に対して高い親和性を示し、アンドロゲン受容体及びグルココルチコイド受容体には低い親和性を示し、ER に対する親和性はなかった（表 2.6.2-7）。DRSP の結合プロファイルはプロゲステロンと同等であった。但し、グルココルチコイド受容体に対する親和性はプロゲステロンの方がやや高かった（Krattenmacher, 2000）。Louw-du Toit（2017）は、ヒト ERα 受容体と ERβ 受容体のいずれにも結合しないことを確認した。ラットアンドロゲン受容体、鉱質コルチコイド受容体、グルココルチコイド受容体及びエストロゲン受容

体に対する DRSP 及びプロゲステロンの結合親和性は、それぞれのヒト受容体に対する結合親和性と一致していた（Fuhrmann., 1996）。

表 2.6.2-7 ヒトステロイド受容体に対するドロスピレノン及びプロゲステロンの相対結合親和性（%）

Compound	AR		ER		MR		GR	
	hAR	rAR	hER	rER	hMR	rMR	hGR	rGR
Drospirenone	2	0.6	<0.5	nc	500	100	3	1
Progesterone	3	1.4	<0.5	nc	1000	100	35	11

Data taken from Krattenmacher (2000) and Fuhrmann (1996).

The radiolabeled reference compounds for the androgen, estrogen, mineralocorticoid, and glucocorticoid receptors were methyltrienolone, estradiol, aldosterone, and dexamethasone, respectively. RBAs of these reference compounds were arbitrarily set at 100%.

Abbreviations: hAR, rAR = human and rat androgen receptor, hER, rER = human and rat estrogen receptor, hGR, rGR = human and rat glucocorticoid receptor, hMR, rMR = human and rat mineralocorticoid receptor, nc = no competition

In vitro トランス活性化試験で、DRSP 及びプロゲステロンはいずれも抗鉱質コルチコイド作用を有し、弱い鉱質コルチコイド活性を示した。両化合物にはアンドロゲン活性は認められなかったが、抗アンドロゲン活性を示した。プロゲステロンの抗アンドロゲン活性は DRSP よりも強かった。DRSP にはグルココルチコイド作用も抗グルココルチコイド作用も認められなかったが、プロゲステロンはごく弱いグルココルチコイド活性を示した（Fuhrmann, 1996）。DRSP の抗アンドロゲン活性は Louw-du Toit（2017）が確認した。さらに、同著者らは、DRSP が転写抑制に働く部分的アンドロゲン受容体アゴニストであることを示した。

抗鉱質コルチコイド活性

Losert（1985）は、副腎摘出した雄 Wistar ラットを用い、グルココルチコイド補充条件下で、DRSP を含むいくつかのプロゲスチンの抗鉱質コルチコイド活性を検討した。アルドステロン存在下において、塩化ナトリウム-グルコース溶液の持続注入の 1 時間前に DRSP（13.3 mg/kg）を投与したところ、皮下投与後及び経口投与後のいずれにおいても、尿中 Na^+/K^+比に対するアルドステロンの抑制作用を有意に逆転させることができた。経口投与した場合（用量範囲 1.7～6.7 mg/kg）、スピロノラクトンと比較して、DRSP の相対的な抗鉱質コルチコイド効力は 8 であった。

Muhn（1995）は、低ナトリウム（0.014%）餌を給餌した雌の卵巣摘出 Wistar ラットを用い、DRSP とスピロノラクトンの抗鉱質コルチコイド活性を比較した。ラットに DRSP 又はスピロノラクトンを 1～10 mg/日の用量で 21 日間皮下投与した。DRSP 及びスピロノラクトンはいずれも、投与初日に尿中 Na^+/K^+比（抗アルドステロン作用の指標）を上昇させたが、持続的な作用を示したのは 10 mg/日の用量での DRSP のみであった。試験終了時に血清中アルドステロン濃度が上昇し、逆調節が活性化されていることが示された。この逆調節によって、おそらく、スピロノラクトン及び低用量 DRSP の初期投与後に効果が軽減したと考えられた。

アンドロゲン／抗アンドロゲン活性

去勢した幼若雄の Wistar ラットに DRSP を 10 mg/日で 2 週間皮下投与したところ、精嚢及び前立腺の重量に影響は認められず、DRSP にアンドロゲン特性はないことが示された。プロピオン酸テストステロン（0.1 mg/日）により、副生殖器の重量が顕著に増加した（Muhn, 1995）。

去勢した幼若雄 Wistar ラットに DRSP（0.1～10 mg/日）及びプロピオン酸テストステロン（1 mg/日）を 7 日間併用皮下投与したところ、DRSP は精嚢及び前立腺のテストステロン刺激による成長を用量依存的に抑制した。DRSP の効力は、酢酸シプロテロンの約 1/3 であり、プロゲステロンよりも 5～10 倍高かった（Muhn, 1995、Fuhrmann, 1996）。

妊娠 Wistar ラットに Day 17～20 *pc* まで 0.1～10 mg/日の DRSP を皮下投与した場合にも DRSP の抗アンドロゲン活性が認められた。3 mg/日及び 10 mg/日の DRSP は、肛門生殖突起間距離の減少、尿生殖洞の短縮並びに前立腺原基及び腹側グランダーラメラ（ventral glandar lamella）の存在の減少として明らかな雄胎児の雌性化を引き起こした。DRSP の効力は酢酸シプロテロンの約 1/3～1/10 であった（Muhn, 1995）。

雄カニクイザルに 4 mg/kg の DRSP を試験 Day 5、7、10、12 及び 14 に経口投与したところ、投与前値と比較して、血清中テストステロン濃度及び黄体形成ホルモン濃度が顕著に低下した（Muhn, 1995）。

グルココルチコイド／抗グルココルチコイド活性

雄 Wistar ラットに DRSP の 5 mg を 6 週間以内に 36 日間、皮下投与又は経口投与したところ、副腎重量に対する影響は認められなかった。

DRSP はデキサメタゾン（0.01 mg/日）との併用の有無に関わらず、副腎摘出雄 Wistar ラットに 10 mg/日を 4 日間皮下投与しところ、胸腺溶解作用及び抗胸腺溶解作用を示さなかった。デキサメタゾンは顕著な胸腺退縮を誘発した（Muhn, 1995）。

エストロゲン活性

卵巣摘出の 10 日後、雌 Wistar ラットに DRSP の 10 mg を単回皮下投与したところ、膣上皮のエストロゲン反応は認められず、子宮湿重量のわずかな増加が誘発されたが、子宮乾燥重量には影響は認められなかった。E2（0.1 µg/匹）は、膣上皮で予想されるエストロゲン反応を示し、子宮の湿重量及び乾燥重量はいずれも増加した（Muhn, 1995）。

2.6.2.3.2.2 乳癌リスクに関連する *in vitro* 及び *in vivo* 試験

高濃度の 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 陽性のヒト乳癌細胞 HCC1500 及び T47-D の E2 誘導性の増殖を阻害した。DRSP とプロゲステロンの作用は同等で、レボノルゲストレル又は酢酸メドロキシプロゲステロンの作用よりも顕著であった（Seeger, 2011）。

ヒト乳癌細胞 MCF-7 に DRSP（1 µM）を 5 日間曝露させたところ、その増殖が 18%促進した。同様に、デソゲストレル、ジドロゲステロン、レボノルゲストレル及びノルエチステロンの 1 µM でも増加が認められた。PGRMC1 を安定的にトランスフェクトしたヒト乳癌細胞 MCF-7 に

おいて[41]、DRSP は 0.1 μM 濃度で 87%、1 μM 濃度で 156%の増殖促進を誘発した。本作用は、5 μM の PGRMC1 阻害薬 AG205 によって完全ではないが顕著に低下した。濃度 1 μM の DRSP の効力はジドロゲステロン又はノルエチステロンより弱く、レボノルゲストレル、デソゲストレル又は酢酸メドロキシプロゲステロンより強かった。プロゲステロン、ノメゲストロール及び酢酸クロルマジノンは、MCF-7 細胞又は PGRMC1 を過剰発現した MCF-7 細胞のいずれにおいても増殖を刺激しなかった（Ruan, 2012）。

Fu（2008）は、モジュール 2.6.2.3.1.2 の報告書 PR3101 で E4 について記述したのと同様の一連の実験において、DRSP、プロゲステロン、酢酸メドロキシプロゲステロン及びネストロンを単独又は E2 と併用適用し、ER 陽性及び PR 陽性のヒト乳癌細胞 T47-D の遊走及び浸潤に対する作用を評価した。

対照と比較して、DRSP（100 nM）、プロゲステロン（100 nM）、酢酸メドロキシプロゲステロン（100 nM）及びネストロン（1 nM）は、T47-D 細胞の遊走をそれぞれ 32%、37%、54%及び 26%増強した。E2 も T47-D 細胞の遊走を亢進したが、E2 にはどのプロゲスチンと併用しても有意な相加作用は認められなかった。PR アンタゴニストの Org31710 は、E2 の非存在下及び存在下のいずれにおいても、プロゲスチンに関連する細胞遊走を減少させた。

T47-D 細胞の浸潤指数は、DRSP（100 nM）、プロゲステロン（100 nM）、酢酸メドロキシプロゲステロン（100 nM）及びネストロン（1 nM）で処理した場合に、それぞれ 3.49、3.91、4.68 及び 3.73 であった。E2 で処理した場合の浸潤指数は 5.42 であり、どのプロゲスチンよりも強力であった。酢酸メドロキシプロゲステロンを除き、E2 とプロゲスチンの併用に細胞を曝露させたところ、E2 単独に比べて浸潤指数が顕著に低下した。

全てのプロゲスチンは、T47-D 細胞においてアクチン調節蛋白であるモエシンの濃度依存性及び時間依存性のリン酸化を誘発し、30 分間にわたる仮足及び波状構造の形成として現れる一過性のアクチン細胞骨格リモデリングに至った。モエシン活性化を誘発する効力は DRSP が最も弱く、酢酸メドロキシプロゲステロンは最も強かった。ER 陽性及び PR 陽性 T47-D 細胞におけるプロゲスチンによるアクチン細胞骨格リモデリングは、PR アンタゴニスト Org 31710 によって遮断された。ER 陰性及び PR 陰性乳癌細胞 MDA-MB-468 は、PR-A 及び PR-B をコードするプラスミドのトランスフェクション後にプロゲスチンに反応し、アクチン細胞骨格リモデリングに至り、PR の役割が確認された。プロゲスチンによるモエシン活性化に対して様々なシグナル伝達経路阻害薬の作用に差が認められ、効力の差は部分的に異なる PR 依存性核外シグナル伝達カスケードの動員に関連している可能性が示唆された。

Otto（2008）はマウスモデルを用い、閉経期（後）ホルモン補充療法に DRSP と酢酸メドロキシプロゲステロンを使用した場合、子宮における望ましい作用（エストロゲンの増殖作用を弱める作用）と乳腺におけるあまり望ましくない作用（上皮細胞増殖刺激）との間で効力に乖離が生じるかどうかについて検討した。

卵巣摘出した雌 C57BL/6 マウスの乳腺において、DRSP は、E2 誘導性の導管側分岐及び上皮細胞増殖を促進し、皮下投与した場合の ED50 値はそれぞれ 69.4 及び 50.5 mg/kg/日であった。E2 誘導性子宮上皮細胞増殖に対する阻害用量 ID100 は 17.5 mg/kg/day であった。このように DRSP は、E2 誘導性乳腺上皮細胞の増殖を刺激するよりも、E2 誘導性子宮上皮細胞の増殖をよ

[41] 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。

り強力に阻害した。一方、酢酸メドロキシプロゲステロンの子宮及び乳腺に対する効力は同程度であった。

2.6.2.3.2.3 凝固線溶系リスクに関連する *In Vitro* 及び *In Vivo* 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）。

Fan（2015）は、DRSP が凝固に及ぼす影響について *in vitro* 試験を実施した。ヒト乏血小板血漿で、DRSP は 360 ng/mL までの濃度で、凝固パラメータのプロトロンビン時間、APTT、トロンビン時間及び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）は、ヒト末梢血由来の洗浄血小板に対して血小板凝集を誘導しなかった。また DRSP は、血小板膜糖蛋白 VI（GPVI）[42]や様々な G 蛋白共役型受容体を介した血小板活性化を伴うコラーゲン-、ADP-、トロンビン-、U46619-又はアドレナリン-誘発性の血小板凝集にも影響を及ぼさなかった。DRSP（60 ng/mL 又は 300 ng/mL）は、ボトロセチン／von Willebrand 因子誘発性血小板凝集を増強したが、これは血小板膜糖蛋白 Ib-IX-V（GPIb-IX-V）受容体複合体を介したものであった。この凝集促進は、PGRMC1[43]阻害薬 AG205 との共培養により減弱した。

Shirk（2005）は、卵巣摘出の 11～13 日後から 3 又は 7 日間、DRSP を 3 又は 10 mg/kg/日の用量で経口投与した雌 Sprague-Dawley ラットを用いて、抗凝固薬である組織因子経路インヒビター（TFPI）とアンチトロンビン（AT）の血漿中濃度に対する DRSP の作用を評価した。DRSP に血漿中 TFPI 及び AT 濃度に対する作用は認められなかった。

2.6.2.3.2.4 血管作用に関連する *In Vitro* 試験

モジュール 2.6.2.3.1.4 に示すように、NO は eNOS によって合成される血管作動性分子であり、血管保護作用及び血管壁に対する抗アテローム生成作用を有する（Montt-Guevara, 2015）。

Simoncini（2007）は、HUVEC 細胞における NO 合成、eNOS 活性及び eNOS 発現に対する DRSP の作用を検討した。

48 時間の曝露期間中、DRSP（0.1 nM～1 μM）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亢進した。NO 合成及び eNOS 活性は曝露開始後 1 時間という早期に増強されたが、eNOS 発現は 8 時間後に増加が始まった。DRSP は、上述のパラメータに対する E2 の増強作用を妨げなかったが、アルドステロンによる鉱質コルチコイド受容体介在性の eNOS 発現の低下を完全に阻害した。

30 分間の曝露期間中、DRSP（100 nM）は eNOS 発現亢進を伴わずに NO 合成及び eNOS 活性化の迅速な誘導を引き起こした。この迅速な誘導は、MEK 1/2 阻害薬 PD98059 及び PI3K 阻害薬ワートマニン並びに PR アンタゴニスト RU486 によって阻害されたことから、DRSP は PR を介して MAPK 及び PI3K シグナル伝達カスケードを動員することが示された。DRSP は、NO 合成及び eNOS 活性化に対する E2 の迅速な増強作用を促進したが、アルドステロン誘発性の迅速な作用には影響を及ぼさなかった。

---

[42] GPVI は血小板内の糖蛋白受容体であり、コラーゲンと結合する。GPIb-IX-V は血小板における糖蛋白受容体複合体であり、von Willebrand 因子がその主要リガンドである。

[43] 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。

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。Ito（2016）及び Seeger（2009）は、それぞれ HUVEC 細胞及びヒト女性の大動脈内皮細胞における単球接着及びアテローム性動脈硬化発症のマーカー分子に対する DRSP の *in vitro* 作用を検討した。

DRSP（100 nM）単独適用もしくは E2（1 nM）又は EE（0.1 nM）との併用適用は、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）[44]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[45]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。DRSP の作用は全体としてプロゲステロン及びスピロノラクトンの作用と同等であった（Seeger, 2009）。

2.6.2.4 安全性薬理試験

2.6.2.4.1 エステトロール

2.6.2.4.1.1 中枢神経系

機能観察総合評価法で、覚醒ラットに単回経口投与し、その後、中枢神経系に対する E4 の潜在的作用を評価した（ES-T25、TS 表 2.6.3.4）。

雌 Sprague-Dawley ラット（約 7 週齢、n=8/用量）に、1.5、15 及び 150 mg/kg の用量で E4（ロット CS02-032A-801）を単回強制経口投与した。対照群には、溶媒である 0.5% (w/v)カルボキシメチルセルロース水溶液（5 mL/kg）を投与した。

死亡及び臨床徴候をモニタリングした。投与前並びに投与約 1、2 及び 4 時間後に機能観察総合評価法で中枢神経系機能を評価した。この手順では、ケージ内、手の上、標準エリア内のラットを詳細に観察したほか、手技及び各種刺激に対する反応性を評価した。直腸温（℃）及び着陸開脚（mm）を除き、標準化された評価グリッドに従って各パラメータに重症度スコアの評価をつけた。

本試験は GLP を遵守して実施した。

結果

投与製剤中の被験物質濃度は、名目値の許容範囲内であった。

死亡は認められず、試験前に臨床徴候も認められなかった。

機能観察総合評価では、溶媒対照と比べて 150 mg/kg 群における投与 1 時間及び 2 時間後の直腸温のわずかな低下（それぞれ 38.2℃対 38.9℃及び 38.5℃対 39.2℃）を除き、特記すべき所見はなかった。本所見は、投与前と比較して投与後 1 時間及び 2 時間に対照群で直腸温がわずかに上昇したことによって説明できる可能性があると考えられた。

本試験の実験条件下で、E4 は 15 mg/kg までの用量で中枢神経系に影響を及ぼさないと考えられた。

---

[44] ICAM-1：intercellular adhesion molecule-1；VCAM-1：vascular cell adhesion molecule-1

[45] MCP-1：monocyte attracting protein-1；PAI-1：プラスミノーゲンアクチベータインヒビター1

2.6.2.4.1.2 心血管系

hERG テール電流振幅測定試験で、心血管系機能に対する E4 の潜在的作用を *in vitro* で評価した。*In vivo* 評価はテレメトリーを装着した覚醒サルに単回経口投与して実施した（ES-T30、ES-T23、TS 表 2.6.3.4）。

In vitro hERG 試験

全細胞構成で従来のパッチクランプ法により室温で、hERG カリウムチャネルを安定的に発現する HEK-293 細胞（n=4）における hERG 電流に対する E4 の作用を *in vitro* で検討した（ES-T30、TS 表 2.6.3.4）。細胞を-80 mV の保持電位に維持し、+30 mV までの 1 秒間の脱分極とその後の-40 mV までの 1-秒間の再分極（周波数 0.05 Hz）により hERG 電流を活性化させた。細胞外溶液[46]（基準値）、溶媒（10 分）、E4（定常状態まで）及び陽性対照 E-4031（定常状態まで）によって流速 1 mL/分で細胞を表面灌流した。溶媒は細胞外溶液中 0.1%(v/v)DMSO であった。E4（ロット CS02-032A-801）は溶媒中 28.17 µM の濃度で評価し、E-4031 は細胞外溶液中 0.1 µM の濃度で試験した。再分極時のテール電流振幅を測定し、リーク電流振幅で補正した。

本試験は GLP を遵守して実施した。

結果

溶媒中の被験物質濃度（灌流前及び灌流後）は名目値の許容範囲内であった。

溶媒対照と比較して、E4 は hERG テール電流振幅をわずか 7.1%減少させ、E-4031 は hERG テール電流振幅を 83.6%減少させた。

本試験の実験条件下で、E4 は 28.17 µM 濃度で hERG テール電流の振幅に重大な影響を及ぼさなかった。

テレメトリー装置を装着した覚醒サルにおける心血管機能

既投与[47]のテレメトリー装着雌カニクイザル（実験用に繁殖、モーリシャス原産、39～43 箇月齢、n=6[48]）に、E4（ロット CS02-032A-801）を 0（溶媒）、1、10 及び 100 mg/kg の用量で単回強制経口投与した。溶媒は 0.5% (w/v)カルボキシメチルセルロース水溶液（5 mL/kg）を用いた（ES-T23、TS 表 2.6.3.4）。無作為化クロスオーバーデザインで各動物に全ての投与を行い、各投与間に 1 週間以上の休薬期間を設けた。

死亡及び臨床徴候をモニタリングした。投与前並びに投与後 0、0.5、1、2、4、6、8、12、16、20 及び 24 時間目に心拍数、血圧（拡張期、収縮期、平均動脈圧）及び心電図（ECG）を記録した。PQ、QRS 及び QT 間隔並びに不整脈の発生の有無について心電図記録を評価した。心拍数で補正した QT 間隔を Bazett（QTb）及び Fridericia（QTf）の式に従って算出した。

本試験は GLP を遵守して実施した。

---

[46] 細胞外溶液：137 mM 塩化ナトリウム、4 mM 塩化カリウム、1.8 mM 塩化カルシウム、1 mM 塩化マグネシウム、10 mM グルコース、10 mM 4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-1-エタンスルホン酸（HEPES） pH 7.4

[47] 過去に別の試験で使用されたサルは、エステトロールを用いる試験への組入れ前に 3 週間以上の休薬期間を設けた。

[48] ECG モニタリングの技術的問題及び局所感染のため、試験中にそれぞれ 2 匹のサルを入れ替えた。交換したサルは全て同じ順序で投与を受けた。

結果

投与製剤中の被験物質濃度は、名目値の許容範囲内であった。

死亡は認められず、投与に関連した臨床徴候も認められなかった。

E4 には、心拍数、血圧及び心電図パラメータに対する作用はなく、不整脈を誘発しなかった。

本試験の実験条件下で、E4 は、検討した最高用量である 100 mg/kg まで心血管機能及び心臓電気生理学パラメータに影響を及ぼさないと考えられた。

2.6.2.4.1.3 呼吸器系

覚醒ラットに単回経口投与した後、全身プレチスモグラフィーによって E4 が呼吸器系に及ぼす潜在的作用を評価した（ES-T24、TS 表 2.6.3.4）。

雌 Sprague-Dawley ラット（約 7 週齢、n=8/用量）に、1.5、15 及び 150 mg/kg の用量で E4（ロット CS02-032A-801）を単回強制経口投与した。対照群には、溶媒である 0.5% (w/v)カルボキシメチルセルロース水溶液（5 mL/kg）を投与した。

死亡及び臨床徴候をモニタリングした。投与前並びに投与後 15、30、45 分、1、1.5、2、3、4、5 及び 6 時間に呼吸機能を測定した。評価したパラメータは、呼吸数、最大吸気及び呼気流量、一回換気量及び分時換気量並びに気道収縮指標であった。

本試験は GLP を遵守して実施した。

結果

投与製剤中の被験物質濃度は、名目値の許容範囲内であった。

死亡例はなかった。E4 投与ラットの投与 6 時間後に観察された臨床徴候は、体の汚れ（腹部、胸部、鼻口部及び泌尿生殖器領域）であり、E4 投与とプレチスモグラフに動物を閉じ込めたことに起因するものであった。

検討したいずれの用量でも、E4 は呼吸パラメータに影響を及ぼさなかった。

本試験の実験条件下で、E4 は、検討した最高用量である 150 mg/kg までの用量で呼吸器系に影響を及ぼさないと考えられた。

2.6.2.4.2 ドロスピレノン

2.6.2.4.2.1 中枢神経系

中枢神経系に関して、DRSP を用いた特別な安全性薬理試験を記述した公表文献は確認されていない。

カニクイザルを用いた DRSP／E4 併用による 13 週間反復経口投与毒性試験では、6(4)[49] mg/kg/日の DRSP 単独投与群で、中枢神経系に対する作用を示唆する特記すべき臨床徴候は認められなかった（0030-NC-002、モジュール 2.6.6.3.3）。

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

2.6.2.4.2.2 心血管系

カニクイザルを用いた DRSP／E4 併用による 13 週間反復経口投与毒性試験では、6 (4) mg/kg/日の DRSP 単独投与群で、心電図パラメータ、心拍数及び血圧に対する投与関連の影響は認められなかった（0030-NC-002、モジュール 2.6.6.3.3）。

Krattenmacher（1996）は正常血圧の覚醒ラットを用いて、Berger（1992）は高血圧ラットを用いて、血圧及び心拍数に対する DRSP の潜在的な作用を検討した。

10 mg/日の DRSP を 21 日間皮下投与した雌 Wistar ラットでは、心拍数及び拡張期血圧に DRSP の影響は認められなかったが、Day 6～10 以降に収縮期血圧のわずかな低下（4 mmHg）が誘発された（Krattenmacher, 1996）。収縮期血圧に対するプロゲステロン（30 mg/日）の作用は統計学的に有意ではなかった。

溶媒、プロゲステロン（30 mg/日）又はスピロノラクトン（10 mg/日）を投与した雄の自然発症高血圧ラットは、投与期間を通じて血圧のわずかな低下を示した。10 mg/日の DRSP による低下は溶媒対照群よりやや大きい傾向があったが、これは収縮期血圧に関してのみ統計的に有意であった。同用量の DRSP は、細胞外液量の減少及び血漿中 Na^+濃度の低下を誘発した（Berger, 1992）。

2.6.2.4.2.3 呼吸器系

呼吸器系に関して DRSP の特定の安全性薬理試験を記述した公表文献は確認されていない。

カニクイザルを用いた DRSP／E4 併用による 13 週間反復経口投与毒性試験では、6(4) mg/kg/日の DRSP 単独投与群で、呼吸器系に対する作用を示唆する特記すべき臨床徴候は認められなかった（0030-NC-002、モジュール 2.6.6.3.3）。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

2.6.2.5.1 エステトロール

E4 の薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

2.6.2.5.2 ドロスピレノン

DRSP を用いた薬力学的薬物相互作用試験に関する公表文献は確認されていない。

2.6.2.6 考察及び結論

2.6.2.6.1 エステトロール

<u>効力を裏付ける試験</u>

E4 のエストロゲン特性は、以下のとおり Pantarhei が実施した試験又は公表された情報源から得た試験において広範に検討された。

- ヒトエストロゲン受容体結合及び転写活性化（[redacted] Preclinical Studies of Estetrol、PR3019, PR3046、Abot, 2014、Es0001-NC-014、[redacted] study report, 20[redacted]）
- 卵巣摘出マウスにおける膣に対する作用（Benoit, 2017）
- 卵巣摘出マウスにおける子宮肥大作用（Abot, 2014）
- 卵巣摘出幼若マウスにおける乳腺の成長に対する作用（Gérard, 2015a）
- 卵巣摘出ラットにおける Allen-Doisy 変法による検査（PR3014）

- 雌ラット及びウサギにおける排卵や着床の抑制（PR3015、PR3026、ES-T04）

In vitro で、E4 はヒトエストロゲン受容体 ERα 及び ERβ のいずれに対してもエストロゲン活性を示し、ERα の方が優先的であった。E4 の効力は E2 又は EE の効力より低かった。E4 代謝物の E4-3-グルクロニド及び E4-16-グルクロニドは弱いエストロゲン活性を示した。E4-3-グルクロニド及び E4-16-グルクロニドの効力はいずれも、E4 の効力の数百分の 1 であった。（[redacted] Preclinical Studies of Estetrol、PR3019、PR3046、Es0001-NC-014）

In vivo で、E4 は以下を示した。

- 卵巣摘出マウス及びラットの腟上皮に対して用量依存的なエストロゲン作用を示した（Allen-Doisy テスト）。マウスでは、E4 誘発性の腟の変化は、完全に ERα の核内活性化によって介在されることが示された（PR3014、Benoit, 2017）。
- 卵巣摘出マウスにおける子宮肥大作用及び E2 により調節されることが知られている子宮標的遺伝子に対する作用（Abot, 2014）
- 卵巣摘出マウスの乳腺に対する ERα を介した成長促進作用（Gérard, 2015a）
- ラットにおける卵巣摘出誘発性体重増加の用量依存性の抑制及び子宮重量抑制（PR3014、PR3004）
- ラットにおける排卵抑制。経口 ED50 は約 0.2 mg/kg *bid* であった（PR3015、PR3026）。
- 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）

E4 は、*in vivo* 試験において基準化合物 EE 及び E2（含める場合）と同様の作用を示したが、その効力は概して EE の効力の 1/10～1/20 であり、E2 の効力よりも低かった。

総合すると、*in vivo* の効力を裏付ける試験の成績から、E4 は弱い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。

子宮内膜症に関連して、E4 は *in vitro* で以下を示した。

- ヒト子宮内膜細胞及びヒト子宮内膜症細胞株において、0.01～10000 nM の濃度で細胞増殖に影響しなかった（Patiño-García, 2023）。
- ヒト子宮内膜症細胞株において、1000 nM の濃度で細胞遊走に影響しなかった（Patiño-García, 2023）。
- ヒト子宮内膜症細胞株において、PRB 蛋白量を増加させた（Patiño-García, 2023）。
- ヒト子宮内膜症間質細胞株において、プロゲステロンによるプロゲステロン応答性遺伝子の発現を促進した（Patiño-García, 2023）。

以上の成績より、E4 は、子宮内膜症に対して病態を増悪（細胞増殖及び遊走）させることなく、プロゲステロン抵抗性を抑制（PRB 蛋白量増加及びプロゲステロン応答性遺伝子発現促進）することで、子宮内膜症を改善する可能性が示唆された。

副次的薬理試験

オフターゲット活性について、*in vitro* の副次的薬力学的スクリーニング試験を実施した（PR3019）。その主要標的である ERα 及び ERβ を除き、E4 は約 130 種類の潜在的標的（受容体、トランスポーター又はイオンチャネル）と相互作用を示さず、高い選択性が確認された。

乳癌のリスク増大は、エストロゲン・プロゲスチン配合経口避妊薬及びエストロゲン含有（閉経後）閉経期ホルモン補充療法の有害な特徴である（IARC, 2012a、IARC, 2012b、IARC, 2012c）。Pantarhei が実施した又は公表された情報源から得たいくつかの試験では、乳癌細胞の増殖、遊走、浸潤及び *in vivo* での乳房腫瘍発生に対する E4 の影響を検討した。

- 乳腺細胞増殖（正常ヒト乳腺細胞、ヒト乳癌細胞 MCF-7）に対する作用（PR3032）
- ヒト乳癌細胞 MCF-7 の増殖に対する作用機序（Gérard, 2015b）
- 乳癌細胞の遊走及び浸潤（ヒト乳癌細胞 T47-D）に対する作用（PR3101）
- 卵巣摘出した免疫不全マウスにおける MCF-7 細胞移植後の腫瘍成長に対する作用（Gérard, 2015b）
- 雌ラットの DMBA モデルにおける乳腺腫瘍の発生及び退縮に対する作用（PR3028、PR3049、PR3066）

In vitro では、正常なヒト乳腺細胞及びヒト乳癌細胞 MCF-7 の増殖並びにヒト乳癌細胞 T47-D の遊走及び浸潤の刺激に関して、E4 は E2 よりも効力が低かった。細胞の遊走及び浸潤は、T47-D 細胞におけるアクチン調節蛋白であるモエシンのリン酸化を伴い、その結果、仮足及び波状構造の形成として明らかなアクチン細胞骨格のリモデリングが生じた。エストロゲン誘発性の細胞成長の機序には、核内（転写活性化）及び核外（MISS）の ERα 介在性経路がいずれも関与すると考えられる（Gérard, 2015b、Abot, 2014）。E4 は、乳癌細胞の増殖、遊走及び浸潤に対する E2 誘発性の作用を減弱する（PR3032、PR3101）。細胞骨格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、E4（1 μM）が MCF-7 細胞において、ERα-ERE 依存的な遺伝子発現の E2 誘導性上方制御に影響を及ぼさないが、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ことを認めた。

In vivo で、ヒト乳癌細胞 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 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。本モデルでは、E4 は E2 誘導性の腫瘍成長に対して拮抗した（Gérard, 2015b）。ラット DMBA 誘発乳癌モデルで、E4 は卵巣摘出と同程度に、また抗エストロゲン薬のタモキシフェンと同程度の用量で腫瘍発生を阻害した。EE は 1/20 倍の用量（同等の効力を示す用量）で作用を示さなかった。本モデルで高用量の E4 は、既存腫瘍を退縮させた（PR3028、PR3049、PR3066）。

全体として、E4 は *in vitro* 及び *in vivo* のいずれにおいても、乳癌細胞の増殖、遊走及び浸潤の刺激に関して E2 より効力が低く、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 又は 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た。

静脈血栓塞栓症（VTE）は、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。血漿中 SHBG 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、VTE リスクの予測マーカーである（Odlind, 2002、van Vliet, 2005、Stegeman, 2013）。EE 及び E2 とは対照的に、E4 は ERα 発現 Hep89 細胞において最高濃度 1 μM まで SHBG を誘導しなかった（PR3060）。また、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（PR3025、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。

E4 は、HUVEC 細胞における t-PA、u-PA 及び PAI-1 の発現増強並びに細胞遊走の誘導において、E2 よりも効力が低かった。E4 は、高濃度の E2 存在下でその作用に拮抗した（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。

E4 投与後、卵巣摘出マウスは尾出血時間が延長し、動脈及び静脈血栓症を予防した。動脈血流条件下で E4 は、コラーゲンによって生じる *ex vivo* の血栓の成長を低下させた（Valera, 2018）。

血管作用における E4 の潜在的役割は、以下の試験で評価した。

- HUVEC 細胞及びマウス大動脈における NO 放出、eNOS 活性化及び eNOS 発現に対する作用（PR3102、Abot, 2014）
- ラット動脈の血管弛緩作用（PR3093）
- $ERα^{+/+}/LDLr^{-/-}$ 及び $ERα^{-/-}/LDLr^{-/-}$ 卵巣摘出マウスにおけるアテロームの予防（Abot, 2014）
- 卵巣摘出及び卵巣正常マウスにおける内皮治癒に対する作用（Abot, 2014、Davezac, 2023）
- 新生内膜過形成、血流依存性細動脈リモデリング及び AngII 誘発性高血圧に対する作用（Smirnova, 2015、Guivarc'h, 2018）

E4 は HUVEC 細胞において急速な NO 放出、eNOS 活性化及び eNOS 発現を誘導した。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した（PR3102）。E4 は、*in vitro* のマウス大動脈で eNOS 活性化及び NO 産生を誘発しなかったが、本モデルでも E2 の作用を減弱させることができた（Abot, 2014）。

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が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した（PR3093）。

0.6 及び 6 mg/kg/日の E4 は、卵巣摘出した $ERα^{+/+}$/ $LDLr^{-/-}$マウスにおいて、ERα 依存性アテローム保護作用を示した（Abot, 2014）。

6 mg/kg/日までの用量の E4 は、頸動脈血管周囲傷害を与えた卵巣摘出マウスにおいて、内皮治癒に対する促進作用を示さなかったが、内皮治癒に対する E2 の促進作用を消失させた（Abot, 2014）。E4（1 mg/pellet 皮下投与）は、頸動脈血管内皮傷害（平滑筋細胞は保存される）を与えた卵巣摘出及び卵巣正常マウスにおいて、平滑筋細胞における核 ERα を介して内皮治癒を促進した。（Davezac, 2023）。

6 mg/kg/日の E4 は、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新生内膜過形成を抑制した（Smirnova, 2015）。

卵巣摘出マウスにおいて、核内 ERα の選択的活性化後に E4 の血管保護作用が認められた。その結果、AngII により誘発される高血圧が防止され、血流依存性の細動脈リモデリングが回復した（Guivarc'h, 2018）。

以上の成績は、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。

閉経期（後）症状の 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。

- モルヒネ離脱によって惹起したラットのホットフラッシュモデルにおいて、0.3 mg/kg/日以上を 7 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）。
- 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）。
- 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）。

E4 の全般的な薬理学的プロファイル

E4 の全般的な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と高度に選択的に結合し、ERα 及び ERβ のいずれとも結合するが、ERα に対する親和性が高い。E4 は核型 ERα に対してはアゴニストとして作用する。しかし、特定の細胞において膜型 ERα に対して拮抗的に作用することが報告されている（Abot, 2014、Davezac, 2023、Giretti, 2014）。*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。E4 は EP 配合剤のエストロゲン成分として有効である可能性があり、EE 及び E2 と比較してエストロゲン関連リスクの点で好ましいプロファイルを示すと考えられる。

安全性薬理試験

E4 の安全性薬理試験として、雌ラットを用いた機能観察総合評価試験、hERG テール電流振幅への作用に関する *in vitro* 試験、テレメトリー装着の雌サルを用いた心血管系試験及び雌ラットを用いた呼吸器系試験を実施した（ES-T23、ES-T24、ES-T25、ES-T30、TS 表 2.6.3.4）。

いずれも GLP を遵守して実施した。

- 雌ラットで 15 mg/kg までの用量で中枢神経系への影響は認められなかった（ES-T25; TS 表 2.6.3.4）。
- 28.17 µmol/L の濃度で、*in vitro* における hERG テール電流の振幅に意味のある阻害は認められなかった（ES-T30、TS 表 2.6.3.4）。
- 雌サルでは、検討した最高用量である 100 mg/kg まで、血圧及び心臓電気生理学に対する作用はなかった（ES-T23、TS 表 2.6.3.4）。
- 検討した最高用量である 150 mg/kg まで、雌ラットの呼吸器系パラメータに対する作用は認められなかった（ES-T24、TS 表 2.6.3.4）。

総合して、安全性薬理試験では、健康な女性被験者に治療量を反復投与したときの定常状態における E4 の曝露量と比較して、曝露量比が 24 倍以上高いため、中枢神経系、心血管系又は呼吸器系の機能に対する E4 の潜在的な有害作用に関する懸念の原因は示唆されなかった（モジュール 2.4.5.1）。

2.6.2.6.2 ドロスピレノン

効力を裏付ける試験

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、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、レボノルゲストレル、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（Miyashita, 2015、Muhn, 1995、Otto, 2008）によって確認されている。DRSP は以下を誘発した。

- 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）
- 卵巣摘出マウスに ED50 値 25.8 mg/kg/日の皮下投与及びラットに 0.5 mg を 1 日 6 回経口投与又は 10 mg/日を皮下投与した場合の妊娠維持
- 雌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。
- 0.3 mg/日の皮下又は経口投与後の幼若な卵巣摘出ウサギにおける顕著な子宮内膜の変化

副次的薬理試験

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、アンドロゲン活性又はグルココルチコイド／抗グルココルチコイド活性を示さなかった。DRSP の受容体相互作用プロファイルは、プロゲステロンが弱い抗グルココルチコイド活性を示す点を除き、プロゲステロンと同様であった。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、Furhmann, 1996、Louw-du Toit, 2017）。

In vivo において、以下の所見から DRSP の抗アンドロゲン活性及び抗鉱質コルチコイド活性が明らかになった（Losert, 1985、Muhn, 1995）。

- グルココルチコイド補充を行い、アルドステロンを投与したラット並びに卵巣摘出ラットにおける尿中 Na^+/K^+比の上昇
- 幼若な去勢ラットにおけるテストステロン刺激による精嚢及び前立腺成長の用量依存的阻害
- Day 17 *pc* から Day 20 *pc* まで投与した妊娠ラットの雄胎仔の雌性化
- 4 mg/kg/日を 2 又は 3 日に 1 回投与した雄カニクイザルにおける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

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／抗グルココルチコイド活性及びエストロゲン活性がないことを確認した（Muhn, 1995）。

- 幼若な去勢ラットにおいて副生殖器重量に対する作用なし
- 無処置ラットにおける副腎重量及び副腎摘出ラットにおける胸腺重量（デキサメタゾン併用の有無を問わない）に作用なし
- 卵巣摘出ラットにおいて、腟上皮及び子宮重量に対する作用なし

ほとんどの試験において、DRSP は最大 10 mg/日まで皮下投与された。

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 陽性のヒト乳癌細胞 HCC1500 及び T47-D の E2 誘導性の増殖を阻害した（Seeger, 2011）。DRSP（1 μM）は、ヒト乳癌細胞 MCF-7 の増殖をやや増加させたが（18%）、これは少なくとも一部は PGRMC1 依存性核外経路を介していた（Ruan, 2012）。DRSP（100 nM）は、T47-D 細胞の遊走もわずかに（32%）促進し、浸潤指数は E2（5.42）よりもかなり低い程度（3.49）まで上昇する結果となった。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 によって誘発された細胞遊走を低下させ、アクチン細胞骨格のリモデリングを阻害した（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（ED50: 50.5 mg/kg/日）するよりも、E2 誘導性の子宮上皮細胞増殖をより強力に阻害した（ID100: 17.5 mg/kg/日）（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な作用しか示さず、この点に関して E2 より効力は極めて低いと思われる。

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（360 ng/mL）にはヒト乏血小板血漿の凝固パラメータに対する直接的な作用はなかった。DRSP（60 ng/mL）は血小板凝集を誘発せず、GPVI[50]や特定の G 蛋白共役受容体を介して誘導された血小板凝集に影響を及ぼさなかった。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[51]阻害薬 AG205 との共培養により軽減した（Fan, 2015）。

卵巣摘出ラットに DRSP を最大 10 mg/kg/日までの用量で経口投与しても、抗凝固薬 TFPI 及び AT の血漿中濃度に影響は認められなかった（Shirk, 2005）。

HUVEC 細胞を DRSP（100 nM）に eNOS 発現亢進の非存在下で 30 分間曝露させると、NO 合成及び eNOS 活性化が迅速に誘導された。HUVEC 細胞を DRSP（0.1 nM～1 μM）に 48 時間曝露させると、その曝露期間に NO 合成、eNOS 活性及び eNOS 発現が濃度依存的に亢進した。DRSP は E2 の迅速な増強作用を促進したが、E2 刺激性の eNOS 発現には影響を及ぼさなかった。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、アルドステロンによる eNOS 発現の鉱質コルチコイド受容体媒介性減少を阻害した（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）単独適用もしくは E2（1 nM）又は EE（0.1 nM）との併用適用は、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）[52]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ることもなかった（Ito, 2016）。ドロスピレノン（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[53]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,

[50] GPVI は血小板内の糖蛋白受容体であり、コラーゲンと結合する。GPIb-IX-V は血小板における糖蛋白受容体複合体であり、von Willebrand 因子がその主要リガンドである
[51] 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。
[52] ICAM-1：intercellular adhesion molecule-1；VCAM-1：vascular cell adhesion molecule-1
[53] MCP-1：monocyte attracting protein-1；PAI-1：プラスミノーゲンアクチベータインヒビター1

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。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（モジュール 2.7.2.1.2.2)。

安全性薬理試験

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)[54] 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ず、DRSP に心電図パラメータ、心拍数及び血圧に対する作用はなかった（0030-NC-002、モジュール 2.6.6.3.2)。

10 mg/日の DRSP を 21 日間皮下投与した覚醒雌ラットでは、心拍数及び拡張期血圧に DRSP の影響は認められなかったが、Day 6～10 以降に収縮期血圧のわずかな低下（4 mmHg）が誘発された（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)。

総合して、以上の成績から、中枢神経系、心血管系又は呼吸器系機能に対する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なかった。

薬力学的薬物相互作用試験

DRSP を用いた薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。しかしながら、DRSP 含有 EP 配合剤は、DRSP の弱い抗鉱質コルチコイド作用により、血漿中レニン及びアルドステロン活性を上昇させることがあることから、添付文書では以下のように併用注意する。

「カリウム製剤、ACE 阻害剤、アンジオテンシンⅡ受容体拮抗剤、カリウム保持性利尿薬、非ステロイド性消炎鎮痛剤との併用において、高カリウム血症を誘発することがあるので、血清カリウム値を観察するなど十分注意すること。」

2.6.2.6.3 結論

E4 の薬理学的プロファイルは、弱いエストロゲンのプロファイルを示す。E4 はエストロゲン受容体に対して高い選択性を示し、ERα 及び ERβ に対して ERα 優先的に結合する。E4 は核型 ERα に対してはアゴニストとして作用するが、特定の細胞において膜型 ERα に対して拮抗的に作用することが報告されている。

In vivo で観察される E4 のエストロゲン作用に関する効力は、一般に EE の効力の約 1/10～1/20 で、E2 の効力よりも低い。

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

ヒト子宮内膜症細胞株を用いた *in vitro* 試験において、E4 は、PR 蛋白量を増加させ、プロゲステロンによるプロゲステロン応答性遺伝子の発現を促進することが示されている。

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。

これらの成績は、EP 配合剤におけるエストロゲン成分としての E4 の潜在的有効性を裏付ける。EP 配合剤におけるプロゲスチン成分としての DRSP の臨床的有効性は、EE を配合する COC において十分に確立されている。

E4 は、E2 に比べて乳癌細胞の増殖、遊走、浸潤の刺激能が低く、乳癌細胞に対する 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（すなわち、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阻害する。本モデルで、E4 は高用量で既存の腫瘍の退縮も誘発する。

同様に、*in vitro* での乳癌細胞の増殖、遊走及び浸潤の刺激に関して、DRSP は、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 EP 配合剤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。

E2 及び DRSP はヒト SHBG に対する親和性を示さない。E4 は、EE 又は E2 とは対照的に、ERα 発現 Hep89 細胞において SHBG を誘導しない。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／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。

これらの成績は、E4 の VTE リスクプロファイルが、EE 及び E2 と比較して良好である可能性を示唆する。

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 存在下でその作用を阻害した。DRSP は E2 の迅速な増強作用を促進したが、E2 刺激性の eNOS 発現には影響を及ぼさなかった。

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が関与する内皮非依存性機序の両者を介して、E2 よりも低い効力でラット動脈の血管緊張低下を引き起こす。E4 は、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新生内膜過形成を抑制し、AngII 誘発性高血圧の予防及び血流依存性の細動脈リモデリングの回復を通じて血管保護作用を示す。

以上の成績は、E4 や DRSP の潜在的な血管調節特性を示唆している。

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。これらの成績から、アテローム性動脈硬化症のリスクに関する懸念は認められなかった。

安全性薬理試験の成績から、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 の潜在的有害作用に関する懸念は認められなかった。

なお、DRSP 含有 EP 配合剤は、DRSP の弱い抗鉱質コルチコイド作用により、血漿中レニン及びアルドステロン活性を上昇させることがあることから、添付文書では以下のように注意喚起する。

- 重篤な腎障害又は急性腎障害のある患者に投与しないこと。ドロスピレノンのアルドステロン拮抗作用によりカリウム値が上昇するおそれがある。
- 腎障害のある患者（重篤な腎障害又は急性腎障害のある患者を除く）において、ドロスピレノンのアルドステロン拮抗作用によりカリウム値が上昇するおそれがある。
- カリウム製剤、ACE 阻害剤、アンジオテンシンⅡ受容体拮抗剤、カリウム保持性利尿薬、非ステロイド性消炎鎮痛剤との併用において、高カリウム血症を誘発することがあるので、血清カリウム値を観察するなど十分注意すること。
- 「血中カリウム上昇」及び「高カリウム血症」の副作用があらわれることがあるので、観察を十分に行い、異常が認められた場合には投与を中止するなど適切な処置を行うこと。

2.6.2.7 図表

本文中の適切な場所に示す。

2.6.2.8 参考文献

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.

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;46:83-97.

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.

Davezac M, Zahreddine R, Buscato M, Smirnova NF, Febrissy C, Laurell H, et al. The different natural estrogens promote endothelial healing through distinct cell targets. JCI Insight. 2023 Feb 2;8(5):e161284.

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.

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.

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. Endocrine Abstracts 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.

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.

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.

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

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.

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.

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.

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

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

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.

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.

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;51:99-110.

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.

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.

Patiño-García D, Palomino J, Pomés C, Celle C, Torres-Estay V, Orellana R. Estetrol Increases Progesterone Genetic Response without Triggering Common Estrogenic Effects in Endometriotic Cell Lines and Primary Cultures. Biomedicines. 2023 Apr 13;11(4):1169.

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.

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.

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.

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.

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 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.

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, 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.

FSN-013

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3　薬理試験概要表

富士製薬工業株式会社

目次

2.6.3 薬理試験概要表 3
2.6.3.1 薬理試験：一覧表 3
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 10
2.6.3.3 副次的薬理試験 11
2.6.3.4 安全性薬理試験 12
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 13

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

試験の種類／内容	試験系	投与方法	GLP 適用 a)	試験施設 b)	試験番号（CTD 番号）
効力を裏付ける試験					
相対結合親和性（ヒトエストロゲン受容体）	組換えヒト ERα 及び ERβ 受容体	*In vitro* 試験	非適	[redacted], BE	[redacted] Preclinical Studies of Estetrol (4.2.1.1-01)
阻害定数 Ki（ヒトエストロゲン受容体）	組換えヒト ERα 及び ERβ 受容体	*In vitro* 試験	非適	[redacted], TW	PR3019[c] (4.2.1.1-02)
エストロゲン受容体-リガンド相互作用	組換え ERα 受容体（結晶構造）	*In vitro* 試験	非適	未記載	Abot, 2014
エストロゲン受容体への共調節因子の動員	リアルタイム共調節因子-核内受容体相互作用に関するマイクロアレイアッセイ	*In vitro* 試験	非適	[redacted], NL	[redacted] study report, 20[redacted][d] (4.2.1.1-03)
エストロゲン／抗エストロゲン活性に関するトランス活性化試験（ER-CALUX®アッセイ）	ヒト ERα 又は ERβ 及びエストロゲン応答性ルシフェラーゼレポーター遺伝子を安定的に発現させた U2-OS 細胞	*In vitro* 試験	非適	[redacted], NL	PR3046[e] (4.2.1.1-04)

略語：CALUX=化学活性化ルシフェラーゼ遺伝子発現、ER=エストロゲン受容体、U2-OS=ヒト骨肉腫細胞株

a) 試験に GLP 適合性陳述書が含まれることを示す。

b) 試験施設：

[redacted], BE：[redacted], Belgium

[redacted], TW：[redacted], R.O.C.

[redacted], NL：[redacted], The Netherlands

[redacted], NL：[redacted], The Netherlands

c) 報告書 PR3019 の成績は、Visser（2008）が発表した。

d) 報告書[redacted] study report, 20[redacted] の成績は、Gérard（2022）が発表した。

e) 報告書 PR3046 の成績は、Gérard（2023）が発表した。

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

試験の種類／内容	試験系	投与方法	GLP 適用 a)	試験施設 b)	試験番号（CTD 番号）
効力を裏付ける試験					
エストロゲン活性に関するトランス活性化試験	ヒト ERα 及びエストロゲン応答性ルシフェラーゼレポーター遺伝子を安定的に発現させた HepG2 及び HeLa 細胞	*In vitro* 試験	非適	未記載	Abot, 2014
代謝物のエストロゲン活性に関するトランス活性化試験（ER-CALUX®アッセイ）	ヒト ERα 又は ERβ 及びエストロゲン応答性ルシフェラーゼレポーター遺伝子を安定的に発現させた U2-OS 細胞	*In vitro* 試験	非適	[redacted], NL	Es0001-NC-014 c)（4.2.1.1-05）
膣に及ぼす影響	マウス／C57BL/6J（卵巣摘出） マウス（$ERα^{+/+}$、$ERα^{-/-}$、$ERβ^{+/+}$、$ERβ^{-/-}$、ERα-$AF2^{0}$、C451 A-ERα。卵巣摘出）	皮下	非適	[redacted], FR	Benoit, 2017
子宮肥大作用	マウス／C57Bl/6J（卵巣摘出）	皮下	非適	未記載	Abot, 2014
乳腺増殖に対する作用	マウス／C57BL/6（卵巣摘出）	経口（強制）	非適	[redacted], BE	Gérard, 2015a

略語：CALUX=化学活性化ルシフェラーゼ遺伝子発現、ER=エストロゲン受容体、HeLa=ヒト子宮頸癌細胞株、HepG2=ヒト肝細胞癌細胞株、U2-OS=ヒト骨肉腫細胞株

a) 試験に GLP 適合性陳述書が含まれることを示す。

b) 試験施設：

[redacted], NL：[redacted], The Netherlands

[redacted], FR：[redacted], France

[redacted], BE：[redacted], Belgium

c) 報告書 Es0001-NC-014 の成績は、Gérard（2023）が発表した。

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

試験の種類／内容	試験系	投与方法	GLP 適用 a)	試験施設 b)	試験番号（CTD 番号）
効力を裏付ける試験					
Allen-Doisy 変法による検査	ラット／Sprague-Dawley（卵巣摘出）	経口（強制）皮下	非適	[redacted], USA	PR3014[c)]（4.2.1.1-06）
排卵抑制	ラット／Sprague-Dawley	経口（強制）	非適	[redacted], USA	PR3015[d)]（4.2.1.1-07）
排卵抑制	ラット／Sprague-Dawley	経口（強制）	非適	[redacted], USA	PR3026（4.2.1.1-08）
排卵抑制	ウサギ／NZW	経口（強制）	非適	[redacted], USA	ES-T04（4.2.1.1-09）
子宮内膜症細胞に対する作用	ヒト初代子宮内膜細胞 11Z 細胞、Hs832 細胞	*In vitro* 試験	非適	未記載	Patiño-García, 2023
副次的薬理試験					
オフターゲット活性に対する [redacted] スクリーニング	受容体、トランスポーター、イオンチャネル約 130 標的	*In vitro* 試験	非適	[redacted], TW	PR3019[e)]（4.2.1.1-02）
乳腺（乳癌）細胞の増殖に対する作用	正常ヒト乳腺細胞 MCF-7 細胞	*In vitro* 試験	非適	未記載	PR3032[f)]（4.2.1.2-01）

略語：11Z=ヒト子宮内膜症上皮細胞株、ER=エストロゲン受容体、Hs832=ヒト子宮内膜症間質細胞株、MCF-7=ヒト乳癌細胞株、NZW=ニュージーランドホワイト

a) 試験に GLP 適合性陳述書が含まれることを示す。

b) 試験施設：

[redacted], USA：[redacted], USA

[redacted], TW：[redacted], R.O.C.

c) 報告書 PR3014 の経口投与の成績は、Heegaard（2008）が発表した。

d) 報告書 PR3015 の成績は、Coelingh Bennink HJ（2008a）が発表した。

e) 報告書 PR3019 の成績は、Visser（2008）が発表した。

f) 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。

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

試験の種類／内容	試験系	投与方法	GLP 適用 [a)]	試験施設 [b)]	試験番号（CTD 番号）
副次的薬理試験					
乳癌細胞に対する拮抗作用	MCF-7 細胞	*In vitro* 試験	非適	未記載	Abot, 2014
乳癌細胞の増殖に対する作用	MCF-7 細胞、T47-D 細胞 MDA-MB-231 細胞、SKBR3 細胞	*In vitro* 試験	非適	[redacted], BE	Gérard, 2015b
乳癌細胞の遊走及び浸潤に対する作用	T47-D 細胞	*In vitro* 試験	非適	[redacted], IT	PR3101[c)] （4.2.1.2-02）
MCF-7 細胞移植後の腫瘍増殖に対する作用	マウス／免疫不全種（卵巣摘出）	経口（強制）	非適	[redacted], BE	Gérard, 2015b
乳腺腫瘍発生の抑制（DMBA モデル）	ラット／Sprague-Dawley	経口（強制）	非適	[redacted], FIN	PR3028[d)] （4.2.1.2-03）
乳腺腫瘍発生の抑制（DMBA モデル）	ラット／Sprague-Dawley	経口（強制）	非適	[redacted], FIN	PR3049[e)] （4.2.1.2-04）
乳腺腫瘍の退縮（DMBA モデル）	ラット／Sprague-Dawley	経口（強制）	非適	[redacted], FIN	PR3066[f)] （4.2.1.2-05）

略語：DMBA=ジメチルベンズ[a]アントラセン、GPER=G 蛋白共役型エストロゲン受容体 1、MCF-7=ヒト乳癌細胞株（ERα+、ERβ+、GPER+）、T47-D=ヒト乳癌細胞株（ERα+、ERβ-、GPER+）、MDA-MB-231=ヒト乳癌細胞株（ERα-、ERβ+、GPER+）、SKBR3=ヒト乳癌細胞株（ERα-、ERβ-、GPER+）

a) 試験に GLP 適合性陳述書が含まれることを示す。

b) 試験施設：

[redacted], BE：[redacted], Belgium

[redacted], IT：[redacted], Italy

[redacted], FIN：[redacted], Finland

c) 報告書 PR3101 の成績は、Giretti（2014）が発表した。

d) 報告書 PR3028 の成績は、Coelingh Bennink HJ（2008c）及び Visser（2012）が発表した。

e) 報告書 PR3049 の成績は、Coelingh Bennink HJ（2008c）及び Visser（2012）が発表した。

f) 報告書 PR3066 の成績は、Coelingh Bennink HJ（2008c）及び Visser（2012）が発表した。

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

試験の種類／内容	試験系	投与方法	GLP 適用 [a)]	試験施設 [b)]	試験番号（CTD 番号）
副次的薬理試験					
相対結合親和性（ヒト SHBG）	ヒト SHBG	*In vitro* 試験	非適	[redacted], CAN	PR3025[c)]（5.3.2.1-01）
SHBG 及び CBG の誘導	HepG2 細胞 Hep89 細胞	*In vitro* 試験	非適	[redacted], CAN	PR3060[d)]（4.2.1.2-06）
線溶制御因子及び内皮遊走に対する作用	HUVEC 細胞	*In vitro* 試験	非適	[redacted], IT	Montt-Guevara, 2017
止血及び血栓症に対する作用	マウス／C57BL/6J（卵巣摘出）	皮下（ミニポンプ）	非適	未記載	Valera, 2018
NO 放出、eNOS 活性化及び発現に対する作用	HUVEC 細胞	*In vitro* 試験	非適	[redacted], IT	PR3102[e)]（4.2.1.2-07）
NO 放出、eNOS 活性化に対する作用	マウス大動脈	*In vitro* 試験	非適	未記載	Abot, 2014

略語：CBG=コルチコステロイド結合グロブリン、eNOS=内皮型一酸化窒素合成酵素、HepG2=ヒト肝細胞癌細胞株、Hep89=ヒト ERα 過剰発現 HepG2 細胞、HUVEC=ヒト臍帯静脈内皮細胞、NO=一酸化窒素、SHBG=性ホルモン結合グロブリン

a) 試験に GLP 適合性陳述書が含まれることを示す。

b) 試験施設：

[redacted], CAN： [redacted], Canada

[redacted], IT： [redacted], Italy

[redacted], IT： [redacted], Italy

c) 報告書 PR3025 の成績は、Hammond（2008）が発表した。

d) 報告書 PR3060 の成績は、Hammond（2008）が発表した。

e) 報告書 PR3102 の成績は、Montt-Guevara（2015）が発表した。

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

試験の種類／内容	試験系	投与方法	GLP 適用 a)	試験施設 b)	試験番号（CTD 番号）
副次的薬理試験					
血管弛緩作用	ラット動脈	*In vitro* 試験	非適	[redacted], USA	PR3093c)（4.2.1.2-08）
アテロームの予防	マウス／ERα$^{+/+}$/LDLr$^{-/-}$及び ERα$^{-/-}$/LDLr$^{-/-}$（卵巣摘出）	経口（混餌）	非適	未記載	Abot, 2014
内皮修復に対する作用	マウス／C57BL/6J（卵巣摘出）	皮下（ミニポンプ）	非適	未記載	Abot, 2014
内皮修復に対する作用	マウス／C57BL/6J（卵巣摘出、卵巣正常）	皮下（ペレット）	非適	未記載	Davezac, 2023
新生内膜の過形成に対する作用	マウス／C57BL/6J（卵巣摘出）	皮下（ミニポンプ）	非適	未記載	Smirnova, 2015
血流依存的動脈リモデリング及びアンジオテンシン II 誘発性高血圧に対する作用	マウス／C57BL/6J（卵巣摘出）	皮下（ミニポンプ）	非適	未記載	Guivarc'h, 2018
血管運動神経症状に対する作用（ホットフラッシュモデル）	ラット／Sprague-Dawley（卵巣摘出）	経口（強制）	非適	[redacted], USA	PR3018d)（4.2.1.2-09）

略語：ER=エストロゲン受容体、LDLr=低比重リポ蛋白受容体

a) 試験に GLP 適合性陳述書が含まれることを示す。

b) 試験施設：

[redacted], USA：[redacted], USA

[redacted], USA：[redacted], USA

c) 報告書 PR3093 の成績は、Hilgers（2012）が発表した。

d) 報告書 PR3018 の成績は、Holinka（2008a）が発表した。

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

試験の種類／内容	試験系	投与方法	GLP 適用 a)	試験施設 b)	試験番号（CTD 番号）
副次的薬理試験					
骨量減少の予防	ラット／Sprague-Dawley（卵巣摘出）	経口（強制）	非適	[redacted], USA	PR3004 c)（4.2.1.2-10）
コラーゲン誘発性関節炎に対する作用	マウス／DBA/1	経口（強制）	非適	[redacted], NL	PR3065（4.2.1.2-11）
実験的自己免疫性脳脊髄炎に対する作用	マウス／SJL/J	経口（強制）	非適	[redacted], NL	PR3064（4.2.1.2-12）
安全性薬理試験					
機能観察総合評価	ラット／Sprague-Dawley	経口（強制）	適	[redacted], FR	ES-T25（4.2.1.3-03）
hERG アッセイ	hERG を安定的に発現する HEK-293 細胞	*In vitro* 試験	適	[redacted], FR	ES-T30（4.2.1.3-04）
心血管系に対する安全性	サル／カニクイザル	経口（強制）	適	[redacted], FR	ES-T23（4.2.1.3-01）
呼吸器系に対する安全性	ラット／Sprague-Dawley	経口（強制）	適	[redacted], FR	ES-T24（4.2.1.3-02）
薬力学的薬物相互作用試験					
試験は実施していない					

略語：HEK=ヒト胎児由来腎細胞株、hERG=ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子

a) 試験に GLP 適合性陳述書が含まれることを示す。

b) 試験施設：

[redacted], USA： [redacted], USA

[redacted], NL： [redacted], The Netherlands

[redacted], FR： [redacted], France

[redacted], FR： [redacted], France

c) 報告書 PR3004 の成績は、Coelingh Bennink HJ（2008b）が発表した。

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

被験物質：エステトロール

効力を裏付ける試験の概要表は示さない。図表は必要に応じて概要文に示す。

2.6.3.3 副次的薬理試験

被験物質：エステトロール

副次的薬理試験の概要表は示さない。図表は必要に応じて概要文に示す。

2.6.3.4 安全性薬理試験

被験物質：エステトロール

評価した器官系	動物種／系統	投与方法（溶媒／投与形態）	投与量 a)	性別及び動物数／群	特記すべき所見	GLP	試験番号（CTD 番号）
中枢神経系（FOB）	ラット／Sprague-Dawley	強制経口（0、0.3、3、30 mg/mL 0.5%（w/v）CMC）	0、1.5、15、150 mg/kg	雌 8 例	**150:** 投与後 1 時間及び 2 時間に直腸温の低下 b)	適	ES-T25（4.2.1.3-03）
心血管系	hERG チャネルを安定的に発現する HEK-293 細胞	*In vitro* 試験細胞外溶液 c)中 0.1%（v/v）DMSO	*エステトロール* 0、28.17 µM *E-4031* 0.1 µM	NA	*エステトロール* **28.17:** hERG テール電流の振幅が 7.1%減少 *E-4031* **0.1:** hERG テール電流の振幅が 83.6%減少	適	ES-T30（4.2.1.3-04）
心血管系	サル／カニクイザル	強制経口（0、0.2、2、20 mg/mL 0.5%（w/v）CMC）	0、1、10、100 mg/kg d)	雌 6 例	血行動態パラメータ又は ECG に対する特記すべき影響は認められなかった。	適	ES-T23（4.2.1.3-01）
呼吸器系	ラット／Sprague-Dawley	強制経口（0、0.3、3、30 mg/mL 0.5%（w/v）CMC）	0、1.5、15、150 mg/kg	雌 8 例	**≥ 1.5:** 体部位（腹部、胸部、鼻口部、泌尿生殖器）の汚れ 呼吸器パラメータに特記すべき影響なし	適	ES-T24（4.2.1.3-02）

略語：CMC=カルボキシメチルセルロース、DMSO=ジメチルスルホキシド、ECG=心電図、F=雌、FOB=機能観察総合評価法、HEK=ヒト胎児由来腎臓、HEPES=4-（2-ヒドロキシエチル）ピペラジン-1-エタンスルホン酸、hERG=ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子、NA=該当なし、No.=例数

a) 特に記載のない限り単回投与

b) 投与前値と比較してこれらの時点の対照群で認められたわずかな増加に関連する可能性があると考えられる。

c) 細胞外溶液：137 mM NaCl、4 mM KCl、1.8 mM CaCl2、1 mM MgCl2、10 mM グルコース、10 mM HEPES pH 7.4

d) 各動物は無作為化クロスオーバーデザインで全投与量が投与された。各投与間に 1 週間以上の休薬期間を設けた。

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

被験物質：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。