スリンダ錠 28

医薬品製造販売承認申請書添付資料

2.6.1 緒言

あすか製薬株式会社

目次

2.6.1 緒言 3
2.6.1.1 名称及び構造式 3
2.6.1.2 DRSP の薬理作用 3
2.6.1.3 予定する効能・効果 3
2.6.1.4 予定する用法・用量 4

2.6.1　緒言

2.6.1.1　名称及び構造式

ドロスピレノン（DRSP、開発コード：LF111）の名称及び化学構造式は以下のとおりである。

（1）　一般名

英名：Drospirenone（JAN）

和名：ドロスピレノン（JAN）

（2）　構造式

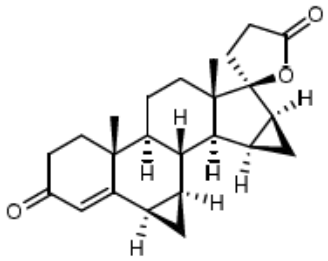


図 2.6.1-1. DRSP の構造式

（3）　分子式及び分子量

分子式：$C_{24}H_{30}O_3$

分子量：366.49

（4）　化学名

3-Oxo-6β,7β:15β,16β-dimethano-17α-pregn-4-ene-21,17-carbolactone（IUPAC）

2.6.1.2　DRSP の薬理作用

DRSP はプロゲステロン作用と抗ミネラルコルチコイド作用、そして弱い抗アンドロゲン作用を持つスピロノラクトン誘導体である。DRSP の薬力学的効果はこれらのステロイドホルモン受容体との相互作用に依存し、天然のプロゲステロンに類似した薬理作用を示す。DRSP の避妊効果は黄体ホルモン活性に基づく排卵の抑制、子宮内膜の菲薄化、子宮頸管粘液の高粘稠による精子の侵入障害によると考えられる。

2.6.1.3　予定する効能・効果

避妊

2.6.1.4 予定する用法・用量

1 日 1 錠を毎日一定の時刻に白色錠から開始し、指定された順番に従い 28 日間連続経口投与する。以上 28 日間を 1 周期とし、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。

スリンダ錠 28

医薬品製造販売承認申請書添付資料

2.6.2 薬理試験の概要文

あすか製薬株式会社

目次

略語一覧表 3
2.6.2 薬理試験の概要文 4
2.6.2.1 まとめ 4
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 5
2.6.2.3 副次的薬理試験 13
2.6.2.4 安全性薬理試験 13
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 13
2.6.2.6 考察及び結論 14
2.6.2.7 図表 14
2.6.2.8 参考文献一覧 15

表

表 2.6.2 -1. ステロイドホルモン受容体結合能 6
表 2.6.2 -2. ヒトのステロイドホルモン受容体に対するアゴニスト/アンタゴニスト活性 7

略語一覧表

略語	省略しない形	
	日本語	英語
ALP	アルカリホスファターゼ	Alkaline phosphatase
AR	アンドロゲン受容体	Androgen receptor
BrdU	ブロモデオキシウリジン	Bromodeoxyuridine
CHO	チャイニーズハムスター卵巣	Chinese hamster ovary
COC	経口避妊薬	Combined oral contraceptions
DMEM/Ham F12	—	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
DRSP	ドロスピレノン	Drospirenone
EC_{50}	50%効果濃度	Effective concentration producing 50% of the maximum response
ED_{50}	50%有効用量	Effective dose producing 50% of the maximum response
ELISA	酵素免疫測定法	Enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	内皮一酸化窒素合成酵素	Endothelial nitric oxide synthase
ER	エストロゲン受容体	Estrogen receptor
FBS	ウシ胎児血清	Fetal-bovine serum
G3PDH	グリセロール-3-リン酸脱水素酵素	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase
GR	グルココルチコイド受容体	Glucocorticoid receptor
HUVEC	ヒト臍帯静脈内皮細胞	Human umbilical vein endothelial cells
IBMX	イソブチルメチルキサンチン	Isobutylmethylxanthine
IC_{50}	50%阻害濃度	Concentration resulting in 50% of the maximum inhibition
ID_{50}	50%阻害用量	Dose resulting in 50% of the maximum inhibition
ID_{100}	100%阻害用量	Dose resulting in 100% of the maximum inhibition
LH	黄体形成ホルモン	Luteinizing hormone
LNG	レボノルゲストレル	Levonorgestrel
MCP	単球走化性タンパク	Monocyte chemoattractant protein
MEM	—	Minimum Essential Media
MR	ミネラルコルチコイド受容体	Mineralocorticoid receptor
mRNA	メッセンジャーリボ核酸	Messenger ribonucleic acid
NADH	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド	Nicotinamide adenine dinucleotide
P4	プロゲステロン	Progesterone
PAI	プラスミノーゲン活性化抑制因子	Plasminogen activator inhibitor
POP	プロゲストゲン・オンリー・ピル	Progestogen-only pill
PR	プロゲステロン受容体	Progesterone receptor
RBA	相対結合親和性	Relative binding affinity
TNF	腫瘍壊死因子	Tumor necrosis factor

2.6.2　薬理試験の概要文

2.6.2.1　まとめ

スリンダ錠 28 の有効成分であるドロスピレノン（DRSP）は天然のプロゲステロンに類似した薬理作用を示すスピロノラクトン系のプロゲスチンであり、プロゲステロン作用に加え、抗ミネラルコルチコイド作用及び抗アンドロゲン作用を有する。DRSP の避妊効果は強力なプロゲステロン作用により発揮されると考えられ、作用機序に関しては各種ステロイドホルモン受容体に対する結合親和性及び受容体転写活性に対する作用を *in vitro* で評価した。さらに、DRSP のプロゲステロン作用、抗ミネラルコルチコイド作用及び抗アンドロゲン作用について検討した *in vitro* 及び *in vivo* の試験成績をまとめた。

ステロイドホルモン受容体を発現する組織の細胞質画分を用いた *in vitro* 試験では、DRSP は天然型のプロゲステロンと同様にプロゲステロン受容体（PR）及びミネラルコルチコイド受容体（MR）に対して高い結合親和性を示した。また、DRSP はアンドロゲン受容体（AR）及びグルココルチコイド受容体（GR）に対する結合親和性は低く、エストロゲン受容体（ER）には結合しなかった。ヒトの各種ステロイドホルモン受容体を発現させたチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を用いて各受容体の転写活性に対する作用を評価した結果、DRSP は PRB に対してアゴニスト作用（転写促進作用）を示し、MR 及び AR に対してアンタゴニスト作用（転写抑制作用）を示した。GR 及び ER（α 及び β）に対するアゴニスト作用及びアンタゴニスト作用は認められなかった。また、ヒト乳癌 T47D 細胞を用いたアルカリホスファターゼ（ALP）活性を指標とした試験においても、DRSP はプロゲステロン応答性遺伝子の発現を変化させた。DRSP の各種ステロイドホルモンに対する作用はプロゲステロンに類似したプロファイルであった。

DRSP のプロゲステロン作用を *in vivo* 試験で評価した。DRSP はウサギの子宮内膜腺の発育を促進し、妊娠ラット及びマウスに対して卵巣摘出後の妊娠を維持した。DRSP はラットの排卵を抑制し、更に雄性カニクイサルの黄体形成ホルモン（LH）分泌及びテストステロン産生を抑制した。また、マウスにおいて DRSP はエストロゲンによる子宮内膜上皮細胞の増殖を抑制し、乳腺細胞の増殖を促進した。

DRSP の抗ミネラルコルチコイド作用に起因した影響を *in vitro* 及び *in vivo* で評価した。ヒト冠動脈内皮細胞及びヒト臍帯血静脈内皮細胞（HUVEC）を用いて心血管マーカーに及ぼす DRSP の影響を評価し、心血管疾患リスクを増加させる因子を抑制あるいは心血管疾患リスクの軽減につながる因子を増加させた。また、マウス前駆脂肪細胞及びヒト前駆脂肪細胞において、DRSP は成熟脂肪細胞への分化を抑制する作用を示した。DRSP は副腎摘出ラットにおいてアルドステロン持続投与による尿中 Na^+/K^+比の減少を抑制し、抗ミネラルコルチコイド作用が確認された。また、高血圧自然発症ラットを用いて血圧に対する DRSP の作用を検討し、DRSP は収縮期血圧を低下させることが確認された。DRSP は抗ミネラルコルチコイド作用により心臓血管系に対する有益な作用や抗脂肪形成効果を発揮することが示唆された。

In vivo で DRSP の抗アンドロゲン作用に起因した影響を評価した。DRSP はプロピオン酸テストステロンによる去勢ラットの精嚢重量及び前立腺重量の増加を抑制した。妊娠ラットに DRSP

を皮下投与することにより、雄性胎児の肛門性器間距離及び尿生殖洞の長さが短縮し、雄胎児の雌性化が認められたことで、DRSP の抗アンドロゲン作用が確認された。

2.6.2.2　効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1　作用機序

（1）　ステロイドホルモン受容体結合能

DRSP の各種ステロイドホルモン受容体（PR、MR、AR、GR 及び ER）に対する結合親和性を評価した[1)-5)]。

PR、MR、AR、GR 及び ER を発現する組織から細胞質画分を調製し、各受容体の標識リガンドとして[^{3}H]プロゲステロン又は[^{3}H]R5020（プロメゲストン）、[^{3}H]アルドステロン、[^{3}H]R1881（メチルトリエノロン）又は[^{3}H]ジヒドロテストステロン、[^{3}H]デキサメタゾン及び[^{3}H]エストラジオールを用いた。また、PR、MR、AR、GR 及び ER に対する標準物質には、それぞれプロゲステロン又はプロメゲストン、アルドステロン、メチルトリエノロン又はジヒドロテストステロン、デキサメタゾン、エストラジオールを設定した。各受容体への標識リガンドの結合に対する各標準物質の 50%阻害濃度（IC_{50}）を DRSP の IC_{50} で除した値に 100 を乗じて相対結合親和性（RBA、%）を算出した。

DRSP は、プロゲステロンと同様にラット及びヒトの PR 及び MR に対して結合親和性を示した。また、DRSP 及びプロゲステロンはラット及びヒトの AR 並びにラット及びヒトの GR に対してそれぞれ結合能を示したが、各標準物質と比較すると弱い結合であった。一方、DRSP 及びプロゲステロンはラット及びヒトの ER には結合を示さなかった。

以上の結果より、DRSP は各種ステロイドホルモン受容体に対してプロゲステロンと類似した結合親和性を示すことが確認された。

表 2.6.2 -1. ステロイドホルモン受容体結合能

受容体	組織	RBA（%）			標準物質	文献
		DRSP	P4	LNG		
PR	ウサギ子宮	40	100	-	プロゲステロン	1)、2)
	ヒト子宮	19	100	-		1)
	ヒト子宮	20	30	250	R5020	3)、4)
MR	ラット海馬	100	100	-	アルドステロン	1)、2)
	ヒト組織	500	1000	-		1)
	ラット腎臓	230	100	75		3)、4)
AR	ラット前立腺	0.6	1.4	-	メチルトリエノロン	2)
		65	<0.1	45		3)、4)
	ヒト組織	2	3	-		1)
	ヒト線維芽細胞	0.3	0.6	-	ジヒドロテストステロン	5)
GR	ラット胸腺	1	11	-	デキサメタゾン	1)、2)
	ヒト組織	3	35	-		1)
	ラット肝臓	5	12	2.1		3)、4)
ER	ラット子宮	N.C.	N.C.	-	エストラジオール	1)、2)
	ヒト子宮	<0.5	<0.5	-		1)
		<0.1	<0.1	<0.1		3)、4)

DRSP：ドロスピレノン、P4：プロゲステロン、LNG：レボノルゲストレル、N.C.：No Competition 競合なし、-：未実施

（2）　ヒト・ステロイドホルモン受容体に対するアゴニスト/アンタゴニスト活性

DRSP の PRB、AR、MR、GR 及び ER（α 及び β）に対するアゴニスト活性/アンタゴニスト活性を評価するため、DRSP、プロゲステロン及びレボノルゲストレル（LNG）の PRB、AR、MR、GR 及び ER（α 及び β）介した転写作用について評価した[6)]。

ヒトの PRB、AR、MR、GR 及び ER（α 及び β）をそれぞれ安定発現させた CHO-K1 細胞に試験化合物（DRSP、プロゲステロン、LNG）を加えた際の各受容体に対するアゴニスト作用と、各受容体の標準化合物（PRB：Org 2058、AR：5α-ジヒドロテストステロン、MR：アルドステロン、GR：デキサメタゾン、ERα 及び β：エストラジオール）を添加した状態に試験化合物を加えた際の各受容体に対するアンタゴニスト作用を評価した。各受容体の応答配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子を繋いだベクターを各受容体発現細胞に導入し、試験化合物及び標準化合物を添加し、CO_2インキュベーター内で 16 時間培養した。アゴニスト作用の測定では、PRB、AR、MR、GR 及び ER（α 及び β）に対する標準化合物として、それぞれ Org 2058（0.0003～10 nmol/L）、5α-ジヒドロテストステロン（0.0003～10 nmol/L）、アルドステロン（0.003～100 nmol/L）、デキサメタゾン（0.003～100 nmol/L）及びエストラジオール（0.0003～10 nmol/L）を用いた。各標準化合物の最大反応を 100%とし、各試験化合物が標準化合物の最大反応の 50%を示す濃度を 50%効果濃度（EC_{50}）とした。アンタゴニスト作用の測定では、試験化合物が標準アゴニスト化合物の最大反応の 50%を阻害できる濃度を IC_{50} とした。

DRSP、プロゲステロン及び LNG は PRB に対してアゴニスト作用を示し、EC_{50} はそれぞれ 1.7 ± 0.3 nmol/L、0.7 ± 0.1 nmol/L 及び 0.09 ± 0.01 nmol/L であった。DRSP、プロゲステロン及び LNG は MR に対してアンタゴニスト作用を示し、IC_{50} はそれぞれ 5.1 ± 1.4 nmol/L、10.1 ± 2.5 nmol/L 及

び 171 ± 58 nmol/L となり、DRSP 及びプロゲステロンの MR に対するアンタゴニスト作用は LNG より強かった。DRSP、プロゲステロン及び LNG は AR に対してアンタゴニスト作用を示し、IC_{50} はそれぞれ 279 ± 43 nmol/L、141 ± 22 nmol/L 及び 4.0 ± 2.6 nmol/L であった。DRSP 及びプロゲステロンは AR に対するアンタゴニスト作用を示したが、その濃度は黄体ホルモン作用を示す濃度の 150～200 倍であった。なお、DRSP、プロゲステロン及び LNG は、GR 及び ER（α 及び β）に対する活性は見られなかった。

以上の結果から、DRSP はプロゲステロンと同様に、PRB に対して強いアゴニスト活性、MR に対して強いアンタゴニスト活性を示し、また、DRSP は AR に対して弱いアンタゴニスト活性を示し、GR 及び ER に対する活性は示さないことが確認された。

表 2.6.2 -2. ヒトのステロイドホルモン受容体に対するアゴニスト/アンタゴニスト活性

受容体	活性	EC_{50}（nmol/L）又は IC_{50}（nmol/L）		
		DRSP	P4	LNG
PRB	アゴニスト	1.7 ± 0.3	0.7 ± 0.1	0.09 ± 0.01
	アンタゴニスト	>1000	>1000	>1000
MR	アゴニスト	>1000	>1000	>1000
	アンタゴニスト	5.1 ± 1.4	10.1 ± 2.5	171 ± 58
AR	アゴニスト	>100	>100	1.57 ± 0.33
	アンタゴニスト	279 ± 43	141 ± 22	4.0 ± 2.6
GR	アゴニスト	>1000	>1000	>1000
	アンタゴニスト	>10000	>10000	>10000
ER（α 及び β）	アゴニスト	>100	>100	>100
	アンタゴニスト	>1000	>1000	>1000

DRSP：ドロスピレノン、P4：プロゲステロン、LNG：レボノルゲストレル

（3）　プロゲステロン活性及びプロゲステロン応答遺伝子発現に対する影響

DRSP のプロゲステロン作用を *in vitro* で評価するため、PR を内在的に発現するヒト乳癌由来 T47Dco 細胞においてプロゲステロン応答性の ALP 活性及び遺伝子発現変化を評価した[7]。

T47Dco 細胞を 5%活性炭処理済みウシ胎児血清（FBS）含有 Minimum Essential Media（MEM）培地に懸濁して 96 well プレートに播種し、培養上清に DRSP、プロゲステロン及び LNG を添加し、CO_2 インキュベーター内で 15 時間培養した。続いて、0.2% Triton X-100 含有 0.1 mol/L トリス塩酸緩衝液（pH 9.8）を用いて細胞を可溶化した。次に、ALP の基質として *p*-ニトロフェニルリン酸含有 0.1 mol/L トリス塩酸緩衝液（pH 9.8）を添加し、*p*-ニトロフェノールの生成を指標に ALP 活性を評価した。また、T47Dco 細胞を播種し、DRSP 1 nmol/L、プロゲステロン 10 nmo/L を 12 時間添加した後、Gene Chip を使った Array 解析によりプロゲステロン応答性遺伝子発現変化を評価した。

DRSP、プロゲステロン及び LNG は ALP 活性を上昇させ、EC_{50} はそれぞれ 3.38 ± 0.191 nmol/L、0.58 ± 0.040 nmol/L 及び 0.19 ± 0.012 nmol/L であった。また、プロゲステロン応答性遺伝子の発現について、プロゲステロンは 115 個の遺伝子発現を促進し、45 個の遺伝子発現を抑制したのに対し、DRSP は 16 個の遺伝子発現を促進し、2 個の遺伝子発現を抑制した。

以上の結果から、DRSP は PR を介してプロゲステロン作用を発揮し、プロゲステロン応答性遺伝子発現を変化させることが確認された。

2.6.2.2.2　*In vitro* 及び *in vivo* 薬理試験

（1）　プロゲステロン作用

1）　子宮内膜腺の発育促進作用

DRSP の子宮内膜腺の発育に及ぼす影響について評価した[4),8)]。

幼若雌性ウサギ（New Zealand White、1 群当たり n = 6～8）を卵巣摘出し、7 日後から 17β-エストラジオール（5 μg/匹）を 6 日間反復皮下投与した。続いて DRSP（0.1、0.3、1 mg/匹/日）及び LNG（0.01、0.03、0.1 mg/匹/日）を 5 日間反復皮下投与した。11 日目に子宮を摘出し、子宮内膜腺の発育の度合いを McPhail の方法［McPhail スコア：1（作用なし）～4（最大反応）］により組織学的に評価した。

DRSP は 0.3 mg/匹/日（皮下投与）以上の用量で子宮内膜腺の発育を促進し、1 mg/kg/日で最大スコアまで上昇した。LNG は、0.03 mg/kg 以上の用量で子宮内膜腺の発育を促進した。

以上の結果から、DRSP はウサギの子宮内膜腺の発育を促進し、*in vivo* においてプロゲステロン作用を示すことが確認された。

2）　妊娠維持作用

DRSP の妊娠維持作用を評価した。

a)　ラット皮下投与試験（7 日間）

妊娠したラットの卵巣を妊娠 8 日で摘出し、妊娠 8～14 日にエストロン（1 μg/匹/日）及び DRSP（0.1、0.3、1、3 mg/匹/日）をそれぞれ反復皮下投与した後、妊娠 15 日目に剖検した結果、DRSP は 1 mg/匹/日以上の用量で妊娠を維持し、DRSP の 1～3 mg/匹の妊娠維持率は 75～85%であった[4)]。

b)　ラット皮下及び経口投与試験（4 日間）

妊娠したラット（HAN：WIST、1 群当たり n = 10）の卵巣を妊娠 8 日で摘出し、妊娠 8～11 日にエストロン（1 μg/匹/日、皮下）と共に DRSP を皮下投与（0.1、1、3、10 mg/匹/日）、あるいは経口投与（総投与量 3 mg/動物/日を 3 mg × 1 回/匹/日、1.5 mg × 2 回/匹/日、1 mg × 3 回/匹/日、0.5 mg × 6 回/匹/日）した後、妊娠 12 日目に剖検した。なお、妊娠維持率は（生存している胎児の数）/（左側子宮角にある着床部位の合計数）× 100（%）で算出し、心臓鼓動が確認できる胎児を生存していると見なした。着床部位がない場合、妊娠維持率は 0%とした。DRSP の皮下投与による妊娠維持率は 3 mg/匹/日で 80%、10 mg/匹/日で 95.7%であった。また、DRSP の経口投与試験では、0.5 mg × 6 回/匹/日投与により妊娠維持作用が認められた（妊娠維持率は 82.9%）[8)]。

c)　マウス皮下投与試験（10 日間）

妊娠したマウス（NMRI、1 群当たり n＝8）の卵巣を妊娠 8 日目に摘出し、妊娠 8～17 日目までエストロン（0.03 μg/匹/日）及び DRSP（8、16、32、64、100 mg/kg/日）を反復皮下投与した後、妊娠 18 日目に剖検し生存している胎児数をカウントした。DRSP の妊娠維持率における 50%有効用量（ED_{50}）は 25.8 mg/kg であった [9]。

以上の結果から、DRSP は皮下及び経口投与によって妊娠ラット及び妊娠マウスの卵巣摘出後の妊娠を維持し、*in vivo* においてプロゲステロン作用を示すことが確認された。

3)　排卵抑制作用

DRSP のラットの排卵に及ぼす影響を評価した [8]。

4 日間の発情周期を有するラット（HAN：WIST、1 群当たり n＝6）に DRSP（0.3、1、3、10 mg/匹/日）又は LNG（0.003、0.01、0.03、0.1 mg/匹/日）を発情後期から 4 日間反復皮下投与した。DRSP は経口投与による評価も実施した。投与開始 4 日目及び 5 日目に卵管を摘出し、光学顕微鏡下で排卵卵子の有無を確認した。

DRSP 及び LNG はラットの排卵を抑制し、50%阻害用量（ID_{50}）はそれぞれ 0.3～1.0 mg/匹/日（およそ 2.1～7.1 mg/kg/日に相当）及び 0.01～0.03 mg/匹/日の用量範囲であった。なお、DRSP を経口投与した場合においても排卵抑制が認められ、皮下投与と同程度の ID_{50} を示した。

以上の結果から、DRSP は排卵抑制作用を示すことが確認された。

4)　抗ゴナドトロピン作用

DRSP の抗ゴナドトロピン作用を評価するため、雄性カニクイサルの血中 LH 及びテストステロン濃度に及ぼす影響を評価した [8]。

DRSP 投与前の血中 LH 及びテストステロン濃度の値は 2 回（1 回目を Day1、2 回目を Day3）の採血を行って測定した。雄性カニクイサル（1 群当たり n＝5）に DRSP（4 mg/kg/日）を Day 5、7、10、12 及び 14 に経口投与し、各投与の 24 時間後に採血を実施した。

DRSP は血清 LH 濃度及びテストステロン濃度を投与前値と比べて低下させ、抗ゴナドトロピン作用を有することが確認された。

以上の結果から、DRSP は抗ゴナドトロピン作用を介して血中テストステロン濃度を低下させることが確認された。

5)　子宮内膜上皮細胞及び乳腺細胞のエストロゲン誘発増殖に対する作用

DRSP がエストロゲンによる子宮内膜上皮細胞及び乳腺細胞の増殖に及ぼす影響を評価した [9]。

6 週齢のマウス（C57BL/6、1 群当たり n＝8）を卵巣摘出し、2 週間後から 17β-エストラジオール（100 ng/匹/日）と同時に DRSP（0.8、5、30、60、180 mg/kg/日）又は酢酸メドロキシプロゲス

テロン（0.15、0.75、5、10、30 mg/kg/日）を 3 週間反復皮下投与した。ブロモデオキシウリジン（BrdU、70 mg/kg）を腹腔内投与し、2 時間後に解剖して組織切片を作製した。乳腺の発育は切片から視覚的に評価し、乳腺細胞及び子宮内膜上皮細胞の増殖は抗 BrdU 免疫染色で評価した。

DRSP 及び酢酸メドロキシプロゲステロンは 17β-エストラジオールによる子宮内膜上皮細胞への BrdU の取込みを抑制し、それぞれの 100%阻害用量（ID_{100}）は 17.5 mg/kg/日及び 2.9 mg/kg/日であった。DRSP 及び酢酸メドロキシプロゲステロンは 17β-エストラジオールによる乳腺細胞への BrdU の取込みを促進し、それぞれの ED_{50} は 50.5 mg/kg/日及び 1.2 mg/kg/日であった。また、DRSP 及び酢酸メドロキシプロゲステロンは 17β-エストラジオールによる乳腺の側枝形成を促進し、それぞれの ED_{50} は 69.4 mg/kg/日及び 4.3 mg/kg/日であった。

以上の結果から、DRSP は PR アゴニストである酢酸メドロキシプロゲステロンと同様に、エストロゲンによる子宮内膜上皮細胞の増殖を抑制することが確認された。また、DRSP は乳腺細胞の増殖促進作用を示したが、子宮内膜上皮細胞の増殖抑制作用より高用量で認められた。

（2）　抗ミネラルコルチコイド作用

1）　心血管マーカー発現に及ぼす影響

ヒト冠動脈内皮細胞及び HUVEC における心血管系マーカーに及ぼす DRSP の影響を評価した[10),11)]。

ヒト冠動脈内皮細胞（Promo Cell 製、18 歳白人女性由来）を 24 well プレートに播種した後、フェノールレッド不含デキストラン/活性炭処理済み FBS 含有培地に交換し、DRSP、プロゲステロン、スピロノラクトン及び酢酸メドロキシプロゲステロン（いずれも 10 μmol/L）を添加して 24 時間 CO_2 インキュベーター内で培養した。プラスミノーゲン活性化抑制因子（PAI-1）は培養上清を用いて酵素免疫測定法（ELISA）で測定した。E-セレクチン及び単球走化性タンパク（MCP）-1 は、腫瘍壊死因子（TNF）-α（1 μg/mL）を添加し、24 時間刺激後の培養上清を回収し、ELISA にて濃度を測定した[10)]。HUVEC を用いた検討では、細胞培養上清に DRSP（10^{-11}～10^{-6} mol/L）を添加して 48 時間培養し、タンパクを抽出し、内皮一酸化窒素合成酵素（eNOS）活性を測定した。なお、eNOS 活性は[^{3}H]アルギニンを反応基質として[^{3}H]シトルリンへの変換量により評価した[11)]。

ヒト冠動脈内皮細胞において、DRSP（10 μmol/L）は、TNF-α によって誘導される E-セレクチン及び単球走化性タンパク（MCP）-1 の産生を有意に抑制した。また、PAI-1 の産生も有意に抑制した。さらに、DRSP はアルドステロン誘導 E-セレクチン、MCP-1 及び PAI-1 産生も有意に抑制した。プロゲステロン及び MR アンタゴニスト作用を持つスピロノラクトンも同様の作用を示したが、抗ミネラルコルチコイド作用のない酢酸メドロキシプロゲステロンでは認められなかった[10)]。HUVEC において、DRSP は eNOS 活性を 10^{-10} mol/L 以上で有意に増加させた。プロゲステロンも eNOS 活性を上昇させたが、酢酸メドロキシプロゲステロンでは認められなかった[11)]。

以上の結果から、DRSP は抗ミネラルコルチコイド作用により心血管疾患リスクを増加させる因子を抑制あるいは心血管疾患リスクの軽減につながる因子を増加させることが確認された。

2)　脂肪分化等への影響

マウス前駆脂肪細胞及びヒト前駆脂肪細胞の脂肪細胞分化に対する DRSP の影響について検討した[12]。

マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 は、DRSP の存在下又は非存在下で 3-イソブチル-1-メチルキサンチン（IBMX、100 μmol/L）、インスリン（175 nmol/L）、及びコルチコステロン（100 nmol/L）又はデキサメタゾン（250 nmol/L）を添加した培地で 48 時間培養し、脂肪細胞へ分化させた。ヒト前脂肪細胞は、DRSP の存在下又は非存在下、トログリタゾン（1 mg/mL）/IBMX（0.2 mmol/L）/ヒドロコルチゾン（100 nmol/L）/インスリン（80 nmol/L）/トリヨードサイロニン（0.2 nmol/L）含有 DMEM/Ham F12 培地で 3 日間培養し、脂肪細胞に分化させた。分化誘導処理後、脂肪細胞分化マーカーの発現及び細胞内の脂肪含量を測定した。脂肪含量は細胞を 5%ホルムアルデヒドにて固定し、オイルレッド O で染色し分光光度法を用いて評価した。トリグリセリド含量は PAP150 トリグリセリドキットにより測定した。IBMX 活性は 25°C における nicotinamide adenine dinucleotide（NADH）の酸化初速度を測定し分析した。

3T3-L1 において、DRSP は脂肪滴蓄積を 10^{-7} mol/L 以上の濃度で有意に減少（IC_{50}：約 5×10^{-7} mol/L）させ、トリグリセリド含量も 10^{-5} mol/L の濃度で有意に減少させた。また、DRSP は 10^{-6} mol/L の濃度で脂肪細胞分化のマーカーであるリポタンパクリパーゼ、アディポネクチン及びレジスチンの mRNA 発現を抑制し、10^{-5} mol/L の濃度で glycerol-3-phosphate dehydrogenase（G3PDH）活性を有意に低下させた。さらに、DRSP（10^{-6} mol/L 以上）は分化後の 3T3-L1 のトリグリセリド含量を有意に減少させた。3T3-L1 よりも分化能が高い 3T3-F442A においても、DRSP（10^{-6} mol/L 以上）は脂肪細胞分化を抑制し、脂肪滴蓄積及びトリグリセリド含量を有意に減少させた。デキストラン/活性炭処理した培地で培養した 3T3-L1 にアルドステロン（10 nmol/L）を添加し 7 日間培養すると DRSP（10^{-6} mol/L）はアルドステロン処置による脂肪細胞への分化に伴う G3PDH 発現上昇を有意に抑制した。また、ヒト前脂肪細胞においても DRSP（10^{-6} mol/L）はリポタンパクリパーゼの mRNA 発現及び G3PDH 活性を有意に抑制した。

以上の結果から、DRSP は抗ミネラルコルチコイド作用により前駆脂肪細胞の成熟脂肪細胞への分化を抑制することが確認された。

3)　副腎摘出ラットにおけるアルドステロン依存性 Na^+排泄に対する作用

DRSP の抗ミネラルコルチコイド作用を評価するため、副腎摘出ラットにアルドステロンを投与したときの Na^+/K^+排泄に及ぼす影響について評価した[13]。

雄ラット（Wistar、1 群当たり n=7～10）の副腎を摘出し（day 1）、5 日間 1%の生理食塩液を飲水させた。フルオコルトロンカプロン酸（10 mg/kg）を day 1 に皮下投与し、続いて day 4 にフルオコルトロン（1.25 mg/kg）を皮下投与した。day 5 にスピロノラクトン（6.7、13.3 及び 26.7 mg/kg）及び DRSP（1.7、3.3 及び 6.7 mg/kg）を経口投与し、投与 1 時間後からアルドステロン（1 μg/kg/hr）を 15 時間持続的に静脈投与した。尿サンプルは、アルドステロン投与開始から 21 時間経過するまで 1 時間ごとに採取した。

アルドステロン投与群では、コントロール群と比較して、尿中 Na^+排泄量が減少し、尿中 K^+量が増加した（尿中 Na^+/K^+比の低下）。これに対し、DRSP はアルドステロンによる尿中 Na^+排泄量の低下及び尿中 K^+排泄量の増加を抑制し（尿中 Na^+/K^+比の低下の抑制）、3.3 mg/kg 及び 6.7 mg/kg の用量においてアルドステロン投与群と比べて尿中 Na^+/K^+比が有意に増加した。一方、スピロノラクトン投与群でも 26.7 mg/kg の用量でアルドステロンによる尿中 Na^+/K^+比の低下を有意に抑制する作用が見られた。

以上の結果から、DRSP はアルドステロンによる副腎摘出ラットの尿中 Na^+/K^+比の減少を抑制（尿中 Na^+排泄量増加、尿中 K^+排泄量減少）し、*in vivo* で抗ミネラルコルチコイド作用を発揮することが確認された。

4)　高血圧自然発症ラットにおける DRSP の血圧に及ぼす影響

高血圧自然発症ラット（SHR、1 群当たり n = 12～13）を用いて、動脈圧は留置カテーテルを用いて測定し、収縮期、拡張期及び平均動脈圧並びに心拍数は Statham P_{23} pressure transducer を用いて測定した [14]。血圧は 3 日間隔で測定し、午前 9 時から午後 2 時まで実施した。細胞外液量及び血漿量はそれぞれ、イヌリン（細胞外液量、イヌリンは細胞内へは移行せず細胞外液中のみに均等に分布する）及びエバンスブルー（血漿量、水溶性が高く血漿アルブミンに強く結合する）を用いて測定した。イヌリンの排泄を避けるため、ラットは腎摘出を行い 1 時間保温後、腹部大動脈より採血した（6～10 mL）。なお、イヌリン及びエバンスブルーは静脈注射で投与した。

DRSP 10 mg/匹（排卵抑制における ED_{50}の 10 倍量及びプロゲステロンの抗ミネラルコルチコイド作用の 5 倍量に相当する、27 日間反復皮下投与）は、収縮期血圧を有意に低下させ、血漿ナトリウム濃度及び細胞外液量も僅かに減少させたが、血漿量に影響はなかった。また、DRSP 2 mg/匹（排卵抑制における ED_{50}の 2 倍量及びプロゲステロン 30 mg/匹及びスピロノラクトン 10 mg と同等の抗ミネラルコルチコイド作用に相当する）は、血圧に対して影響はなかった。なお、プロゲステロン（30 mg/匹）及びスピロノラクトン（10 mg/匹）ではコントロールと比較して血圧、血漿ナトリウム濃度及び細胞外液量に対し有意な変化はなかった。LNG（0.3 mg/匹）はコントロールと比較して収縮期血圧及び拡張期血圧を有意に上昇させたが、血漿ナトリウム濃度及び細胞外液量に対し有意な変化はなかった。

以上の結果から、DRSP は抗ミネラルコルチコイド作用により、収縮期血圧を低下させることが確認された。

(3)　抗アンドロゲン作用

1)　去勢ラットを用いたアンドロゲン誘発精嚢及び前立腺重量増加に対する作用

DRSP の抗アンドロゲン作用を評価するため、去勢ラットにおけるアンドロゲン誘発精嚢及び前立腺重量増加に及ぼす影響を評価した [8]。

幼若去勢ラット（HAN：WIST、1 群当たり n＝6）に対し、プロピオン酸テストステロン（0.1 mg/匹/日）及び DRSP（0.1、0.3、1、3、10 mg/匹/日）を 7 日間反復皮下投与した後、解剖して精嚢重量及び前立腺重量を測定した。

プロピオン酸テストステロンは、媒体投与と比べて精嚢重量及び前立腺重量を有意に増加させた。これに対し、DRSP はプロピオン酸テストステロンによる精嚢重量及び前立腺重量の増加を用量依存的に抑制し、10 mg/匹/日ではそれぞれ 79.6%及び 74.5%抑制した。

以上の結果から、DRSP はアンドロゲン誘発精嚢及び前立腺重量増加を抑制し、ラットで抗アンドロゲン作用を発揮することが確認された。

2）　ラット雄胎児の雌性化作用

DRSP の抗アンドロゲン作用を評価するため、抗アンドロゲン作用の指標となる妊娠ラットにおける雄胎児の雌化作用を評価した[4),8)]。

妊娠ラット（1 群当たり n＝6）に対し、DRSP（0.1、0.3、1、3、10 mg/匹/日）及び抗アンドロゲン剤である酢酸シプロテロン（0.1、0.3、1、3、10 mg/匹/日）を妊娠 17 日目から 4 日間反復皮下投与した。妊娠 23 日目に解剖し、雄胎児の肛門生殖結節間距離と尿生殖洞の長さを測定した。

DRSP 及び酢酸シプロテロン（いずれも 3 及び 10 mg/匹/日、およそ 15～50 mg/kg/日に相当）は、媒体投与群と比べて肛門生殖結節間距離と尿生殖洞の長さを有意に短縮させた。

以上の結果から、妊娠ラットにおいて DRSP は酢酸シプロテロンと同様に雄胎児の肛門生殖結節間距離と尿生殖洞の長さを短縮し（雌化作用）、抗アンドロゲン作用を発揮することが確認された。

2.6.2.3　副次的薬理試験

該当なし。

2.6.2.4　安全性薬理試験

該当なし。

2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用試験

該当なし。

2.6.2.6　　考察及び結論

最も頻繁に使用される避妊法の一つが経口避妊薬（COC）の使用であり、COC の一つとしてプロゲステロンのみのピル（POP）がある。POP の避妊作用は、排卵の抑制、子宮内膜の菲薄化、子宮頸管粘液の高粘稠による精子の侵入障害によって発揮される。

In vitro 試験において、DRSP の各種ステロイドホルモン受容体に対する結合能及び受容体転写活性に対するアゴニスト/アンタゴニスト活性を評価した。DRSP は PR と MR に対して親和性を示し、PR に対してはアゴニスト活性、MR に対してはアンタゴニスト活性を認めた。AR に対しては弱い結合親和性を示し、弱いながらも抗アンドロゲン活性を認めた。GR 及び ER に対しては親和性がなかった。ステロイドホルモン受容体との相互作用に基づくこれらの作用は天然のプロゲステロンの作用と一致しており、プロゲステロンと類似した作用プロファイルを示した。

In vivo 試験において、DRSP は卵巣摘出した幼若雌性ウサギに対して子宮内膜腺の発育促進作用を示し、卵巣摘出した妊娠ラットにおいても妊娠維持作用を示した。また、卵巣摘出した妊娠マウスでも DRSP は妊娠維持作用を示し、典型的なプロゲステロン作用を発揮することを確認できた。また、サルに経口投与することにより血清 LH 濃度及びテストステロン濃度を低下させ、抗ゴナドトロピン作用を発揮したことから、DRSP は主として視床下部-下垂体系へのネガティブフィードバック作用により、下垂体からのゴナドトロピン分泌を抑制し、排卵を抑制する作用により避妊効果を発揮する可能性が示唆された。さらに、DRSP はマウスにおいてエストロゲンによる子宮内膜上皮細胞の増殖を抑制したことから、ヒトにおいても月経開始から服用することで卵胞期のエストラジオールによる子宮内膜増殖を抑制し、その結果黄体期において子宮内膜を菲薄化させることで受精卵の着床を抑制する作用が期待される。子宮頸管粘液の粘稠変化による精子通過抑制について非臨床試験では示されていないが、第 II 相臨床試験（CF111/202）において精子の子宮頚管粘液通過性を子宮頚管の状態（Insler Score）を基に評価しており、DRSP はデソゲストレルと比較して精子の貫通性をより低下させていることが示されている [15]。

MR 遺伝子を安定発現させた CHO-K1 細胞を用いた *in vitro* 試験で、DRSP は MR に対するアンタゴニスト作用が確認され、抗ミネラルコルチコイド作用を示した。また、副腎摘出ラットを用いたアルドステロン依存性尿中 Na^+排泄の減少に対し、DRSP は 3.3 mg/kg 及び 6.7 mg/kg の用量で拮抗作用を示した。本所見は、排卵抑制用量（2.1～7.1 mg/kg）と近似した用量で認められた。

AR 遺伝子を安定発現させた CHO-K1 細胞を用いた *in vitro* 試験で、DRSP は AR に対するアンタゴニスト作用が確認され、抗アンドロゲン作用を示した。妊娠ラットにおいて酢酸シプロテロンと同様に雄胎児の肛門生殖結節間距離と尿生殖洞の長さを短縮し（雌化作用）、抗アンドロゲン作用を示した。本所見は、排卵抑制用量よりも高い用量であった。

以上、効力を裏付ける試験結果から、DRSP はプロゲステロンと類似した作用プロファイルを有することが確認された。したがって、スリンダ錠 28 は COC としての有効性が期待される。

2.6.2.7　　図表

本文中に記載した。

2.6.2.8 参考文献一覧

1) Krattenmacher R. Drospirenone: pharmacology and pharmacokinetics of a unique progestogen. Contraception. 2000 Jul;62(1):29-38.【4.3-1】

2) Fuhrmann U, Krattenmacher R, Slater EP, Fritzemeier KH. The novel progestin drospirenone and its natural counterpart progesterone: biochemical profile and antiandrogenic potential. Contraception. 1996 Oct;54(4):243-51.【4.3-2】

3) 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 Dec;46(6):561-74.【4.3-3】

4) Elger W, Beier S, Pollow K, Garfield R, Shi SQ, Hillisch A. Conception and pharmacodynamic profile of drospirenone. Steroids. 2003 Nov;68(10-13):891-905.【4.3-4】

5) Breiner M, Romalo G, Schweikert HU. Inhibition of androgen receptor binding by natural and synthetic steroids in cultured human genital skin fibroblasts. Klin Wochenschr. 1986 Aug 15;64(16):732-7.【4.3-5】

6) 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 Aug;84(2):199-204.【4.3-6】

7) Bray JD, Jelinsky S, Ghatge R, Bray JA, Tunkey C, Saraf K, et al. Quantitative analysis of gene regulation by seven clinically relevant progestins suggests a highly similar mechanism of action through progesterone receptors in T47D breast cancer cells. J Steroid Biochem Mol Biol. 2005 Dec;97(4):328-41.【4.3-7】

8) 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.【4.3-8】

9) 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 Aug;149(8):3952-9.【4.3-9】

10) Seeger H, Wallwiener D, Mueck AO. Effects of drospirenone on cardiovascular markers in human aortic endothelial cells. Climacteric. 2009 Feb;12(1):80-7.【4.3-10】

11) 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 Aug;22(8):2325-34.【4.3-11】

12) Caprio M, Antelmi A, Chetrite G, Muscat A, Mammi C, Marzolla V, et al. Antiadipogenic effects of the mineralocorticoid receptor antagonist drospirenone: potential implications for the treatment of metabolic syndrome. Endocrinology. 2011 Jan;152(1):113-25.【4.3-12】

13) Losert W, Casals-Stenzel J, Buse M. Progestogens with antimineralocorticoid activity. Arzneimittelforschung. 1985;35(2):459-71.【4.3-13】

14) Berger V, Beier S, Elger W, Müller U, Stock G. Influence of different progestogens on blood pressure of non-anaesthetized male spontaneously hypertensive rats. Contraception. 1992 Jul;46(1):83-97.【4.3-14】

15) Ingrid JMD, Doris HM, Dominique D, Sven S. A randomised study comparing the effect on ovarian activity of a progestogen-only pill (POP) containing desogestrel and a new POP containing drospirenone in a 24/4 regimen. Eur J Contracept Reprod Health Care. 2015;20(6):419-27.【4.3-15】