## TABLE OF CONTENTS

LIST OF TABLES ..... 1
本項で使用する用語・略号 ..... 3
1. 非臨床試験計画概略 ..... 5
2. 薬理試験 ..... 7
2.1. 効力を裏付ける試験 ..... 7
2.2. 副次的薬理試験 ..... 8
2.3. 安全性薬理試験 ..... 9
3. 薬物動態試験 ..... 10
3.1. 分析法 ..... 10
3.2. 吸収 ..... 10
3.3. 分布 ..... 11
3.4. 代謝 ..... 11
3.5. 排泄 ..... 12
3.6. 薬物動態学的薬物相互作用 ..... 12
3.7. 薬物動態と薬力学の関係 ..... 12
4. 毒性試験 ..... 13
4.1. 一般毒性 ..... 13
4.2. 遺伝毒性試験 ..... 15
4.3. がん原性 ..... 16
4.4. 生殖発生毒性 ..... 18
4.5. 光毒性 ..... 20
4.6. 代謝物の安全性 ..... 20
4.7. 不純物の安全性 ..... 20
5. 総括及び結論 ..... 23
6. 参考文献 ..... 26

## LIST OF TABLES

Table 1. 重要な反復投与毒性試験におけるエトラシモドの NOAEL および曝露量比 ..... 15
Table 2. S1P 受容体調節薬による血管肉腫および血管腫に対する安全域 ..... 17
Table 3. 重要な生殖発生毒性試験におけるエトラシモドの NOAEL および曝露量比 ..... 19

Table 4. ラットおよびイヌを用いた重要な反復投与毒性試験におけるエトラシモド原薬の不純物（*不純物I， *不純物J および *不純物K） ..... 21

## 本項で使用する用語・略号

| 略号，用語 | 省略していない表現または定義 |
|---|---|
| $5\text{-}HT_3$ | serotonin 3 receptor：セロトニン 3 受容体 |
| AI | accumulation index：累積係数 |
| ALP | alkaline phospahatase：アルカリホスファターゼ |
| ALT | alanine transaminase ：アラニンアミノトランスフェラーゼ |
| AUC | area under the plasma concentration-time curve：血漿中濃度 - 時間曲線下面積 |
| $AUC_{last}$ | area under the plasma concentration-time curve from zero to time of last measurable concentration：0 時間から最終定量可能時間までの血漿中濃度 - 時間曲線下面積 |
| AUCR | ratio of AUC：AUC 変化率 |
| $AUC_t$ | area under the plasma concentration-time curve from zero to time t：<br>0 時間から t 時間までの血漿中濃度 - 時間曲線下面積 |
| BCRP | breast cancer resistance protein |
| BSEP | bile salt export pump |
| $C_b/C_p$ | ratio of drug concentration in blood/plasma：血液/血漿中濃度比 |
| CFR | Code of Federal Regulation：連邦規則集 |
| $C_{max}$ | maximum plasma concentration：最高血漿中濃度 |
| CYP | cytochrome P450 |
| EAE | experimental autoimmune encephalomyelitis：実験的自己免疫性脳脊髄炎 |
| $EC_{50}$ | 50% effective concentration：50%有効濃度 |
| EMA | European Medicines Agency：欧州医薬品庁 |
| FDA | Food and Drug Administration：米国食品医薬品局 |
| FITC | fluorescein isothiocyanate isomer I：フルオレセインイソチオシアネート異性体 I |
| GIRK | G-protein-gated inwardly rectifying potassium：G タンパク依存性内向き整流性カリウム |
| GLP | Good Laboratory Practice：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準 |
| GPCR | G protein-coupled receptor：G タンパク質共役受容体 |
| GTPγS | guanosine 5′-O-[gamma-thio]triphosphate：グアノシン 5′-O-[γ-チオ]三リン酸 |
| HED | human equivalent dose：ヒト等価用量 |
| hERG | human ether-à-go-go-related gene：ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子 |
| HPBL | human peripheral blood lymphocytes：ヒト末梢血リンパ球 |
| $IC_{50}$ | 50% inhibitive concentration：50%阻害濃度 |
| ICH | International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use：医薬品規制調和国際会議 |
| $I_{KACh}$ | acetylcholine-activated inward rectifying potassium channel：アセチルコリン活性化内向き整流性カリウムチャネル |
| $I_{Kr}$ | rapidly activating delayed rectifier cardiac potassium current：急速活性化遅延整流性カリウム電流 |
| KO | knock out：ノックアウト |
| LC | liquid chromatography：液体クロマトグラフィー |
| LOEL | Lowest observed effect level：最小影響量 |
| MATE | multidrug and toxin extrusion |
| MOG | myelin oligodendrocyte glycoprotein：ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 |
| mRNA | messenger ribonucleic acid：メッセンジャーRNA |
| MS/MS | tandem mass spectrometry：タンデム質量分析法 |
| MTD | maximum human exposure：最大耐量 |
| NK | natural killer (cells)：ナチュラルキラー（細胞） |

| 略号，用語 | 省略していない表現または定義 |
|---|---|
| NOAEL | no observed adverse effect level：無毒性量 |
| NOEL | no observed effect level：無影響量 |
| OAT | organic anion transporter |
| OATP | organic anion transporting polypeptide |
| OCT | organic cation transporter |
| OECD | Organisation for Economic Co-operation and Development：経済協力開発機構 |
| PD | pharmacodynamics；薬力学 |
| P-gp | P-glycoprotein |
| PK | pharmacokinetics：薬物動態 |
| PLGF | placental growth factor：胎盤増殖因子 |
| S1P | sphingosine 1-phosphate：スフィンゴシン 1-リン酸 |
| $S1P_{1-5}$ | sphingosine 1-phosphate receptor $_{1-5}$：スフィンゴシン 1-リン酸受容体 $_{1-5}$ |
| $t_{1/2}$ | apparent terminal elimination half-life：終末相の見かけの消失半減期 |
| TK | toxicokinetics：トキシコキネティクス |
| $T_{max}$ | time of occurrence of $C_{max}$：最高血漿中濃度到達時間 |
| UGT | uridine diphosphate glucuronosyl transferase：ウリジン二リン酸グルクロン酸転移酵素 |

**1. 非臨床試験計画概略**

エトラシモド（APD334，AR401959）は，中等症から重症の潰瘍性大腸炎（UC）の治療薬として開発された，スフィンゴシン 1-リン酸（S1P）受容体 1,4,5（$S1P_{1,4,5}$）選択的な調節薬である。成人 UC 患者には，エトラシモド L-アルギニンとして，2 mg を 1 日 1 回経口投与する。

S1P 受容体ファミリーは，内因性の生理活性物質であるリゾリン脂質 S1P に高い親和性で結合する 5 種類の膜結合型 GPCR から構成される。S1P とその 5 つの受容体（$S1P_{1-5}$）の結合により，G タンパク質を介したシグナル伝達経路とβアレスチン動員を介した G タンパク質非依存性のシグナル伝達経路が活性化する。$S1P_{1-5}$ を介したシグナル伝達により，リンパ球の移出，免疫細胞機能，内皮細胞増殖，細胞骨格形成，タイトジャンクション形成および形態形成を含む，様々な細胞の機能が生じる[1,2,3,4]。

S1P 受容体調節薬は $S1P_1$ と結合し，受容体の内在化を誘導し維持させることにより，機能的アンタゴニストとして作用する。B リンパ球および T リンパ球などの細胞表面における $S1P_1$ の発現低下により，S1P の濃度勾配に従うリンパ球の移出が妨げられ，リンパ組織内にリンパ球が留まる。リンパ組織内にリンパ球が留まることにより，炎症部位に動員される血中リンパ球数が減少する[5]。浸潤リンパ球の減少により，組織損傷を引き起こすシグナル伝達タンパク質である炎症性サイトカインの産生が低下する可能性がある[6]。このような $S1P_1$ の機能的アンタゴニズムを介した血中リンパ球数の減少は，炎症を軽減し，多発性硬化症および UC において臨床的寛解を誘導することが示されている[5,7,8,9,10]。$S1P_{1-3}$ はヒトの肺，リンパ節および胎盤などの組織に広く発現する，心血管系における主な S1P 受容体である[11]。心臓の心房筋細胞には $S1P_1$ が発現し，心拍数の調節に関与している[12]。

$S1P_4$ は，ほぼ免疫細胞のみに発現しており[13,14]，樹状細胞の遊走および機能に関与していると考えられる。$S1P_5$ は NK 細胞および中枢神経系の白質に認められ[15,16]，中枢神経系での発現は主に脳のミエリン形成細胞であるオリゴデンドロサイトに限局している[17]。$S1P_5$ は，NK 細胞の遊走およびリンパ節内での配置を制御している可能性がある[18,19]。さらに，S1P 受容体は種々の組み合わせで各細胞に特異的に発現し，G タンパク質のカップリングや下流シグナル伝達経路が異なるため，内因性 S1P によって誘発される反応は様々であり，各組織/細胞に特異的な作用を示す[1]。

エトラシモドは，ヒト $S1P_{1,4,5}$ の強力かつ選択的な調節薬であり，$S1P_1$ に対して完全アゴニスト作用を示し，$S1P_{4,5}$ に対して部分的なアゴニスト作用を示す。一方，ヒト $S1P_{2,3}$ に対してほとんど活性を示さず（これらに対する選択性と比較し $S1P_1$ への選択性は 1000 倍超），$S1P_{1,4,5}$ に対するエトラシモドの選択的な活性は臨床における安全性プロファイルに関連すると考えられる（M2.7.4）。

エトラシモドの非臨床開発計画には，効力を裏付ける試験および副次的薬理試験，安全性薬理試験，薬物動態試験ならびに毒性試験が含まれる。非臨床試験では，エトラシモド L-アルギニンまたはその遊離酸を使用した。特に記載のない限り，すべての in vivo 非臨床試験におけるエトラシモドの濃度および用量は，遊離酸相当量で表記した。

エトラシモドの S1P 受容体に対する有効性，選択性，および複数の in vivo 疾患モデルにおける薬力学的作用を明らかにするために，エトラシモドの効力を裏付ける一連の in vitro および in

vivo 試験を実施した。複数の評価系を用い，エトラシモドの S1P 受容体活性化作用を評価した。主な評価系として β アレスチン動員アッセイおよび GTPγS 結合アッセイを用いた。これらは，S1P 受容体の結合により生じる 2 つの主要なシグナル伝達カスケードの評価系として最も広く用いられている[20,21]。健常 C57BL/6 マウス，実験的大腸炎モデルマウス，MDR1a ノックアウト（KO）自然発生性大腸炎モデルマウス，コンカナバリン A 誘発急性肝炎モデルマウス，多発性硬化症モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）モデルマウス，接触過敏症モデルマウス，コラーゲン誘発性関節炎モデルラットの多様な機序のモデルに，エトラシモドを単回あるいは反復経口投与し，エトラシモドの有効性を評価した。

エトラシモドのオフターゲット作用を評価するため，広範な GPCR（S1P 受容体以外），イオンチャネルおよび神経伝達物質トランスポーターに対する放射性リガンド競合アッセイならびに広範な酵素に対する阻害アッセイを行った。

ICH S7A および S7B ガイドラインに記載される安全性薬理試験として一連のコアバッテリー試験を実施し，生命維持に重要な影響を及ぼす器官系（中枢神経系，呼吸系および心血管系）に対するエトラシモドの影響を検討した。すべての試験は GLP に準拠して実施した。

FDA ガイダンス（FDA 2001[22], FDA 2018[23]）および EMA ガイドライン（EMA 2012a[24]）に基づき，マウス，ラット，ウサギおよびイヌ血漿中のエトラシモドを定量するために，LC-MS/MS を用いた高感度かつ特異的な分析法を開発し，バリデートした。これらの方法を用いて，マウス，ラット，ウサギおよびイヌのトキシコキネティクス（TK）解析（GLP 適用）で用いる血漿中エトラシモド濃度を測定した。内標準物質としてエトラシモドの構造類似化合物（AR436434）または $d_9$-エトラシモドを使用した。GLP 非適用試験では，バリデートされた分析法と同様の適切な LC-MS/MS 法を，バリデーションを行わずに試験ごとに用いた。GLP 非適用試験では，各試験報告書に方法および試験実施施設を記載した。［$^{14}$C］エトラシモドを用いたラットおよびイヌの試験について，組織，体液および装置からすべての残留放射能を回収するための方法を開発した。

薬物動態学的薬物相互作用の可能性および PK/PD の検討を含む，エトラシモドの薬物動態を評価した。標準的な in vitro および in vivo 試験において，エトラシモドの吸収に関する薬物動態を検討した。In vitro では，Caco-2 細胞単層膜を用いて，エトラシモドの双方向の膜透過性を評価した。In vivo では，雄の BALB/c マウス，Sprague Dawley ラット，妊娠 New Zealand White ウサギ，ビーグル犬およびカニクイザルを用いて，単回静脈内投与あるいは単回または反復経口投与後の血漿中エトラシモド濃度推移を検討した。ラットおよびイヌに[$^{14}$C]エトラシモドを投与し，in vivo での分布および排泄を検討した。In vitro では，CD-1 マウス，Sprague Dawley ラット，New Zealand White ウサギ，ビーグル犬，カニクイザルおよびヒトの血漿を用いて血漿蛋白結合率を評価した。また，ラット，イヌ，サルおよびヒトの血液および血漿を用いて血液/血漿中濃度比（$C_b/C_p$）を評価した。エトラシモドの代謝を in vitro および in vivo で評価した。In vitro において，種々の動物種およびヒトの肝ミクロソームおよび肝細胞を用いた評価により代謝物を同定した。In vivo において，非標識エトラシモドを投与したマウスの血漿中および排泄物中における代謝物を同定し，[$^{14}$C]エトラシモドを単回経口投与したラットおよびイヌの血漿中および排泄物中においても代謝物を同定し特性を明らかにした。また，エトラシモドの代謝に関与するヒトの P450 分子種および UGT 分子種も同定した。エトラシモドの薬物動態学的薬物相互作用の可能性を，標準的な in vitro アッセイ系を用いて評価した。非臨床動物種を用い

て，エトラシモドの血漿中濃度（PK）とエトラシモドによる血中リンパ球減少（PD）との関連性を検討した。

エトラシモドの臨床開発と承認申請のための一連の毒性試験を実施した。エトラシモドの毒性試験は，ICH M3(R2)「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験実施についてのガイダンス」に従い実施され，成人および小児の中等症から重症の UC 患者に対するエトラシモド経口投与時の安全性を裏付けている。エトラシモドの安全性を評価するために，マウス，ラットおよびイヌに単回または反復投与した探索的および重要な毒性試験，ICH S2(R1)「医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンス」に準拠した遺伝毒性試験（オプション 1），ICH S1C(R2)「医薬品のがん原性試験に関するガイドライン」に準拠したげっ歯類（マウスおよびラット）を用いた 104 週間のがん原性試験，ICH S5(R3)「医薬品の生殖発生毒性評価に係るガイドライン」に準拠した生殖発生毒性試験，ICH S11「小児用医薬品開発の非臨床安全性試験ガイドライン」に準拠した小児患者の安全性を裏付けるための幼若動物試験を実施した。その他の毒性試験として，ICH S10「医薬品の光安全性評価ガイドライン」に準拠した in vitro 光毒性試験，エトラシモドの原薬に含まれる不純物の DNA 反応性を評価するための細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。In vivo 試験は，臨床で用いられる 1 日 1 回経口投与で実施した。すべての毒性試験は米国で実施し，21 CFR Part 58 に記載された FDA の GLP 規則，および欧州連合（OECD GLP 原則），日本（厚生労働省），ならびにその他の OECD データ相互受入れ制度の署名国の各規制当局の規則に準拠して重要な毒性試験を実施した。

## 2. 薬理試験

### 2.1. 効力を裏付ける試験

S1P 受容体ファミリーの受容体活性化作用に基づき，エトラシモドの主な作用機序を検討した。効力を裏付ける試験において，エトラシモドは $S1P_{1,4,5}$ を選択的に調節し（$S1P_{2,3}$ に対する選択性と比較し $S1P_1$ への選択性は 1000 倍超）した。さらに，エトラシモドは $S1P_1$ に対して完全アゴニスト作用を示したが，$S1P_{4,5}$ に対しては部分アゴニスト作用を示した。エトラシモドにより $S1P_1$ が活性化されると，βアレスチン動員および G タンパク質共役経路を介したシグナル伝達が生じる。他の S1P 受容体調節薬に関する研究結果から，これらの 2 つのシグナル伝達経路が関与する機能が明らかにされている。G タンパク質共役経路を介した経路は，心臓細胞の GIRK $I_{KACh}$ チャネル活性化を惹起し，S1P 受容体調節薬の初回投与時にみられる一過性の心血管系への影響の原因と考えられている[12,20,25]。一方，βアレスチン動員を介した経路では，$S1P_1$ 受容体の内在化とそれによる機能的アンタゴニスト作用（脱感作）が認められ，リンパ組織からのリンパ球の移出が抑制される。このメカニズムはエトラシモドを用いた in vivo 試験において裏付けられており，実験的大腸炎モデルマウスまたは FITC 誘発接触過敏症モデルマウスにエトラシモドを経口投与したところ，リンパ組織からの $CD4^+$および $CD8^+$細胞の移出が抑制され，炎症組織における $CD4^+$または $CD8^+$細胞レベルの減少が認められた。また，エトラシモドはこれらのモデルマウスにおいて炎症性サイトカインおよび局所炎症のレベルを低下させた。さらに，MDR1a KO 自然発生性大腸炎モデルマウスにおいても血中リンパ球数が有意に減少し，また脾臓を採取してフローサイトメトリーにより分析したところ，エトラシモド投与群においてリンパ球レベルの顕著な低下が示された。

In vitro におけるエトラシモドによる $S1P_1$ 活性化試験（βアレスチン動員アッセイおよび GTPγS 結合アッセイ）では，内因性 S1P および他の S1P 受容体調節薬と比較して，エトラシモドは特

徴的な活性バランスを示し，G タンパク質シグナル伝達よりもβアレスチン動員を優先的に活性化すると考えられる。エトラシモドおよび S1P の βアレスチン動員を介した経路に対する効力は他の S1P 受容体調節薬と同等であったが，G タンパク質シグナル伝達経路（GTPγS に対する結合を測定）に対する効力は他の S1P 受容体調節薬よりも低かった。以上のことから，検討した他の S1P 受容体調節薬と比較して，エトラシモドは G タンパク質シグナル伝達（心臓細胞の GIRK $I_{KACh}$ チャネル活性化に伴う心拍数減少に関する経路）よりもβアレスチン動員（リンパ球の移出に関する経路）を優先的に活性化すると考えられた [12,20,25]。

In vitro で認められたエトラシモドの有効性，選択性および機能的活性を in vivo で評価するために，健常マウスおよび免疫介在性炎症性疾患のげっ歯類モデルを用いて検討した。健常マウスにおいて，エトラシモドは溶媒対照と比較して血中のリンパ球数（B 細胞および T 細胞）減少を誘導したが，血中の単球数，顆粒球数または NK 細胞数に影響はみられなかった。実験的大腸炎モデルマウスでは，エトラシモドは溶媒対照群に比べて T 細胞および単球の結腸への浸潤/拡散を減少させた。同モデルにおいて，疾患誘発マウスに溶媒を投与した時と比較して，エトラシモドは炎症性サイトカインを減少させ，抗炎症性サイトカインの IL-10 を増加させた。MDR1a KO 自然発生性大腸炎モデルマウスにおいても，エトラシモドは大腸炎の重要な指標である結腸重量，結腸の長さを含む種々の病理組織学的所見を改善し，また結腸における炎症性サイトカイン産生を抑制した。急性肝炎モデルマウスにおいて，エトラシモドは溶媒と比較してコンカナバリン A により誘導された血清中 ALT 放出を抑制し，肝臓への T 細胞浸潤および血中 T 細胞の割合を減少させた。疾患発現前の C57BL/6 マウスにエトラシモドを予防的に投与したところ，MOG 誘発 EAE の用量依存的な抑制が認められた。同 EAE モデルマウスに治療的に投与したとき，エトラシモドは速やかに疾患を抑制し，これは脊髄および脳への $CD4^+$ T 細胞浸潤の減少と関連していた。FITC 誘発接触過敏症モデルマウスにおいて，エトラシモドは無処置動物と比べて血中リンパ球数および組織炎症を減少させ，疾患症状を改善した。Lewis ラットに不完全フロイントアジュバントおよびウシ由来コラーゲンを皮下投与した後にエトラシモドを反復投与したところ，エトラシモドは関節炎の症状（膝および足首の限局性の腫脹および病理組織学的な炎症性変化）を予防した。以上のことから，エトラシモドは用量依存的なリンパ球の減少を速やかに誘導し，免疫介在性の炎症疾患に有用である可能性が示された。

効力を裏付ける試験の詳細は M2.6.2.2 に示す。

**2.2. 副次的薬理試験**

放射性リガンド結合アッセイにより 97 の受容体，イオンチャネルおよび神経伝達物質トランスポーターに対するエトラシモドの親和性ならびに広範な酵素に対する阻害を評価し，エトラシモドのオフターゲット作用を検討した。アッセイ濃度を 10 µmol/L として試験した結果，9 つの標的に対してエトラシモドは放射性リガンド結合を中等度～顕著に阻害した。特定された 9 つの標的に対するエトラシモドの結合親和性および $K_i$ 値を求めるためのさらなる検討を行ったところ，評価した 9 つの受容体のいずれにおいても，エトラシモドは放射性リガンドと臨床的に意味のある濃度で競合しなかった。これらに対する $K_i$ 値は 2.00 µmol/L（アデノシン $A_3$）～15.0 µmol/L（5-$HT_3$）であり，いずれに対しても低い結合親和性を示した。一方，エトラシモドの薬効の標的である $S1P_1$ に対する $EC_{50}$ 値は 6.10 nmol/L であった。

副次的薬理試験の詳細は M2.6.2.3 に示す。

**2.3. 安全性薬理試験**

安全性薬理試験において，UC の治療を目的とした臨床推奨用量における総 $C_{max}$ の約 858 倍（ラット）および約 376 倍（イヌ）の曝露量において，エトラシモドは中枢神経系，呼吸系または心血管系の機能に影響を及ぼさなかった。

エトラシモドの心血管系，中枢神経系または呼吸系への影響を，標準的な安全性薬理コアバッテリー試験で評価した。In vitro における hERG 試験において，エトラシモドは濃度依存的に $I_{Kr}$ 電流を増加させ，1 µmol/L および 3 µmol/L でそれぞれ 31.4%および 58.9%増加した。このときの濃度は，UC 治療に対する臨床推奨用量である 2 mg/日における非結合型 $C_{max}$ に対する約 193 倍および約 578 倍であった。hERG チャネル電流への作用に関しては阻害ではなく，hERG チャネル電流の増加のみが認められたため，エトラシモドの hERG 電流阻害に対する $IC_{50}$ 値は得られなかった。健康被験者を対象に実施した thorough QT 試験（APD334-008 試験）では，エトラシモドによる QT 延長のリスクは認められなかった。さらに，単離ヒト心房心筋細胞における G タンパク依存性内向き整流性カリウム（GIRK）電流に対するエトラシモドの作用を検討し，エトラシモドによる活性化能を S1P と比較した。$I_{KACh}$ チャネルは GIRK1 および GIRK4 の 2 つのサブユニットで構成され，Gβγ と相互作用することでカリウムチャネルが活性化される[26]。G タンパク質シグナル伝達は心臓細胞の GIRK $I_{KACh}$ チャネル活性化を惹起し，S1P 受容体調節薬の初回投与時にみられる一過性の心血管系への影響の原因と考えられる[12,20,25]。初代ヒト心房心筋細胞においてエトラシモドは $I_{KACh}$ を活性化したが，S1P およびエトラシモドによる $I_{KACh}$ の活性化の経時変化に差は認められなかった。S1P は $I_{KACh}$ を強力に活性化し，最大電流はカルバコールにより惹起される電流の約 90%まで増加した。一方，エトラシモドの活性は S1P より弱く，最大活性はやや低値であった（カルバコールにより惹起される電流の 80%）。S1P による $I_{KACh}$ 電流惹起作用の $EC_{50}$ 値は 2.1 nmol/L であり，エトラシモドによる $EC_{50}$ 値は 29.9 nmol/L（S1P の 1/10）であった。なお，同様の in vitro 試験系において，エトラシモドは ozanimod およびフィンゴリモドと比べて $I_{KACh}$ 活性化の程度は低かった。

テレメトリーを装着したビーグル犬を用いた試験では，いずれの用量においても，心拍数，体温または心電図パラメータ（定性または定量的）にエトラシモドに関連した影響は認められなかった。選択的 $S1P_1$ 調節薬を初期投与後にヒトで認められる心拍数および房室伝導に対する一過性の影響は種特異的であり，エトラシモドをイヌに投与したときに心拍数への影響は認められなかったことは想定内である[27,28]。本試験の NOAEL における曝露量は UC の治療を目的とした臨床推奨用量における総 $C_{max}$ の約 376 倍である。心拍数低下は，洞房結節細胞で $I_{KACh}$ が活性化され，心臓活動電位の立ち上がりが遅延することに起因すると考えられており，特定の非臨床動物種（モルモット，サル）では認められるが，イヌ，マウスおよびラットでは認められないことが明らかにされている[27]。

ラットを用いた GLP 適用の神経行動学的機能および呼吸機能に関する試験で雄ラットに最大 350 mg/kg のエトラシモドを単回経口投与したとき，中枢神経系または呼吸系機能に対する影響は認められず，ラットを用いた 4 週間経口投与毒性試験の曝露量に基づくと，このときの曝露量は UC の治療を目的とした臨床推奨用量における総 $C_{max}$ の約 858 倍である。

安全性薬理試験の詳細は M2.6.2.4 に示す。

### 3. 薬物動態試験

薬物動態学的薬物相互作用の可能性および PK/PD の検討を含む，エトラシモドの広範な吸収，分布，代謝および排泄に関する非臨床試験でエトラシモドの薬物動態を評価した。

### 3.1. 分析法

［$^{14}$C］エトラシモドを用いたラットおよびイヌの試験について，組織，体液および装置からすべての残留放射能を回収するための方法を開発した。全身オートラジオグラフィーに供する組織は凍結し，40 µm の切片を作製した後，［$^{14}$C］エトラシモドを添加した血液標準品とともに放射線画像解析装置で放射能を測定した。

FDA ガイダンス（FDA 2001[22], FDA 2018[23]）および EMA ガイドライン（EMA 2012a[24]）に基づき，マウス，ラット，ウサギおよびイヌ血漿中のエトラシモドを定量するために，LC-MS/MS を用いた高感度かつ特異的な分析法を開発し，バリデートした。これらの方法を用いて，マウス，ラット，ウサギおよびイヌの TK 解析（GLP 適用）で用いる血漿中エトラシモド濃度を測定した。内標準物質としてエトラシモドの構造類似化合物（AR436434）または $d_9$-エトラシモドを使用した。

GLP 非適用試験では，バリデートされた分析法と同様の適切な LC-MS/MS 法を，バリデーションを行わずに試験ごとに用いた。GLP 非適用試験では，各試験報告書に方法および試験実施施設を記載した。

分析法の詳細は，M2.6.4.2 に示す。

### 3.2. 吸収

標準的な in vitro および in vivo 試験において，エトラシモドの吸収に関する薬物動態を検討した。Caco-2 細胞単層膜を用いて，エトラシモドの双方向の膜透過性を評価したところ，$P_{appAB}$ は $20.6 \times 10^{-6}$ cm/s 以上の高値を示した。この結果と一致して，評価した動物種（BALB/c マウス，Sprague Dawley ラット，ビーグル犬およびカニクイザル）への単回経口および静脈内投与試験に基づくエトラシモドの経口バイオアベイラビリティは中等度から高度であり，43.8%～約 100%であった。ヒトマスバランス試験（APD334-107 試験）におけるエトラシモドの吸収は良好で，ヒトにおいても高いバイオアベイラビリティを示す可能性が示された（M2.7.2.2, M2.7.2.3）。これらのことから，エトラシモドの吸収は良好で，中等度または高度の初回通過効果を受ける可能性は低いと考えられた。

非臨床試験に用いた動物種では，単回静脈内投与後の血漿中 $t_{1/2}$ は，8 時間（ラットおよびサル）～31.1 時間（イヌ）であった。単回経口投与後の $T_{max}$ は，マウス，ラットおよびイヌでは同程度で約 7～8 時間，サルではより短く約 3 時間であった。単回経口投与後の CD-1 マウス（2～300 mg/kg/日），Sprague Dawley ラット（2～500 mg/kg/日）およびビーグル犬（0.02～15 mg/kg/日）のいずれにおいても，エトラシモドの曝露量は概ね用量比例的に増加した。一方，ビーグル犬に 20 mg/kg 以上を投与したときの曝露量に用量比例性は認められなかった。試験，動物種および用量を通して，単回経口投与後の血漿中エトラシモド濃度に一貫した性差は認められなかった。

CD-1 マウス，Sprague Dawley ラット，妊娠 New Zealand White ウサギおよびビーグル犬を用いた反復経口投与毒性試験の TK から反復投与時の血漿中エトラシモド濃度について検討した。エトラシモドを反復投与したところ，雌雄 Sprague Dawley ラット，雌雄ビーグル犬および妊娠雌 New Zealand White ウサギの曝露量は概ね用量比例的に増加したが，雌雄マウスの曝露量は用量比を下回った。ラットでは曝露量に性差が認められ，特に 182 および 364 日間の反復投与後の雌で最も高い蓄積性が認められた。いずれの動物種においても，検討した用量範囲における累積係数（AI）は雌雄ともに 0.67～3.76 の範囲であった。以上の結果から，非臨床動物種およびヒトにおいてエトラシモドの高い吸収性が示された。

吸収の詳細は，M2.6.4.3 および M2.7.2.2 に示す。

### 3.3. 分布

In vitro 血漿蛋白結合率は，エトラシモドは非臨床動物種の血漿中で 95%超と高く，ヒト血漿中では 97.9%の蛋白結合率を示した。エトラシモドは主に血漿コンパートメントに分布し，血球成分への結合率は低いことが示された。エトラシモドは，ヒト血清アルブミン（結合率 99%超）および$\alpha_1$-酸性糖蛋白質（結合率 98.5～98.9%）と高い結合率を示した。Sprague Dawley ラットおよび Long-Evans ラットで，放射能は消化管，消失器官（肝臓・腎臓），心筋，分泌腺，褐色脂肪および脳室周囲以外の中枢神経系組織（脊髄，小脳，大脳，延髄および嗅脳）を含む複数の臓器で認められた。Long-Evans（有色）ラットでは，メラニン含有組織への顕著な放射能の蓄積は認められなかった。Sprague Dawley ラットおよび Long-Evans ラットのいずれにおいても，［$^{14}$C］エトラシモド由来放射能は血液脳関門，血液精巣関門および血液卵胞関門を通過した。エトラシモドの分布容積はすべての動物種で総体液量と同等かそれ以上（$V_{ss}$：0.43～1.93 L/kg），またヒトでも中等度（Vz/F：50～103 L）であり，全身への分布が示唆された。

分布の詳細は，M2.6.4.4，M2.7.2.2 および M2.7.2.3 に示す。

### 3.4. 代謝

ラットおよびイヌに［$^{14}$C］エトラシモドを経口投与したときの代謝物プロファイリングにより，P450 酵素による酸化および UGT 酵素と硫酸転移酵素による抱合反応の代謝経路が認められ，in vitro の肝細胞および肝ミクロソーム（いずれもヒトを含む）を用いた代謝試験で同定された代謝物プロファイルと in vivo における代謝物プロファイルの間に良好な相関性が認められた。ヒトのマスバランス試験では，血中に最も多く認められる代謝物は M3 および M6 であったが，いずれも総放射能の 10%未満であった。M3 および M6 はラットの血中にも存在していた。ヒト血中で最も多く認められた代謝物はヒト特異的ではなく，ラットでも認められたことから，毒性試験に用いた動物種はエトラシモドの安全性および忍容性を評価するのに適切であると考えられた。

In vitro 評価に基づき，エトラシモドの代謝に関与する P450 は，CYP2C8（38%），CYP2C9（37%）および CYP3A4（22%）で，また，これらより程度は低いものの CYP2C19 および CYP2J2 も関与すると考えられた。数種の組換えヒト UGT（UGT1A7，UGT1A1，UGT1A4，UGT1A9，UGT1A6，UGT1A3，UGT1A8 および UGT2B7）は，アシルグルクロニド代謝物である M1 の生成に関与すると考えられたが，[$^{14}$C]エトラシモドを投与した健康被験者で認められた M1 は血中および尿中で 1%未満であり，糞中では認められなかった。

代謝の詳細は，M2.6.4.5，M2.7.2.2 および M2.7.2.3 に示す。

### 3.5. 排泄

全身クリアランスは，ラットおよびイヌ（0.014～0.145 L/h/kg）ならびにヒト（1.13～1.70 L/h：0.7～2 mg の反復投与時）のいずれにおいても低値であった。[$^{14}$C]エトラシモドを用いた Sprague Dawley ラット，ビーグル犬およびヒトのマスバランス試験の結果から，エトラシモドの主な排泄経路は糞中排泄であると考えられた。ラットおよびイヌのいずれにおいても，放射能の排泄に性差は認められなかった。ラットでは，投与後 48 時間以内に投与放射能の 87%～89%，投与後 168 時間までに投与放射能の 95%超が回収されたが，尿中排泄の寄与は小さく，投与放射能の排泄は 1%未満であった。イヌでは，投与後 96 時間までに 68%超が回収され，投与後 168 時間までに投与放射能の 81%超が回収されたが，尿中排泄の寄与は小さく，投与放射能の排泄は 2%未満であった。ラットおよびイヌと同様に，ヒト健康被験者におけるエトラシモドの主な消失経路は肝代謝であり，投与された放射能の 82%が糞中に排泄され，腎排泄はわずかであった（M2.7.2.2，M2.7.2.3）。

排泄の詳細は，M2.6.4.6，M2.7.2.2 および M2.7.2.3 に示す。

### 3.6. 薬物動態学的薬物相互作用

エトラシモドは CYP1A2，CYP2B6，CYP2C9，CYP2C19，CYP2D6 または CYP3A4/5 を阻害しなかった。アモジアキンを用いた試験において，エトラシモドは CYP2C8 を可逆的に阻害し，$IC_{50}$ 値は 4.0 µmol/L であった。一方，エトラシモドは時間依存的阻害作用を示さなかった。メカニズムに基づく静的薬物速度論モデルを用いた評価では，エトラシモドが臨床的に意味のある CYP2C8 阻害を介した薬物相互作用を引き起こす可能性は低いと考えられた（AUCR < 1.25）。In vitro において，エトラシモドは UGT1A3，UGT1A4，UGT1A9，UGT2B7 および UGT2B17 を阻害しなかった。一方，エトラシモドは UGT1A1 および UGT1A6 の活性を可逆的に阻害し，検討した最高濃度（10 µmol/L）での阻害率はそれぞれ 28%および 48%であったが，そのときの評価濃度はエトラシモドを臨床推奨用量である 2 mg/日でヒトに投与したときの $C_{max}$ 0.247 µmol/L（113 ng/mL）を大幅に上回っていたことから，エトラシモドがこれら UGT 分子種に対して臨床的に意味のある阻害作用を起こす可能性は低いと考えられた。ヒト肝細胞を用いた mRNA の発現レベルに基づく評価では，エトラシモドは CYP1A2，CYP2B6，CYP3A4，CYP2C8，CYP2C9 および CYP2C19 を誘導しなかった。エトラシモドは P-gp，BCRP，OATP1B1/OATP1B3，OAT1/OAT3 および OCT1/OCT2 の基質とはならず，OATP1B3，OAT1/OAT3，OCT1/OCT2，MATE1，MATE2-K および BSEP を阻害しなかった。一方，in vitro において，エトラシモドは P-gp，BCRP および OATP1B1 を阻害したが，「投与量/250 mL（消化管における濃度）/$IC_{50}$ 値」または「非結合型 $C_{max}$/$IC_{50}$ 値」は，相互作用を引き起こすと考えられる閾値を下回っていた。

薬物動態学的薬物相互作用の詳細は，M2.6.4.5，M2.6.4.7 および M2.7.2.3 に示す。

### 3.7. 薬物動態と薬力学の関係

雄の BALB/c マウス，Sprague Dawley ラット，ビーグル犬およびカニクイザルを用いて，エトラシモドの血漿中濃度（PK）とエトラシモドによる血中リンパ球減少（PD）との関連性を検討した（M2.6.4.8.1）。PK/PD モデルから，雄のマウス，ラット，イヌおよびサルへのエトラシモド

経口投与により血中リンパ球数が用量依存的に減少することが明らかとなった。ヒトの PK/PD 解析結果は，M2.7.2.3 に記載した。

**4. 毒性試験**

探索的な用量設定試験ならびに CD-1 マウス，Sprague Dawley ラットおよびビーグル犬を用いて，それぞれ最長 13，26 および 39 週間反復経口投与した重要な毒性試験および TK 試験を実施した。その他，標準的な一連の in vitro および in vivo 遺伝毒性試験，CD-1 マウスおよび Sprague Dawley ラットを用いた長期がん原性試験，Sprague Dawley ラットおよび NZW ウサギを用いた生殖発生毒性試験，Sprague Dawley ラットを用いた幼若動物毒性試験ならびに in vitro 光毒性試験を実施した。また，エトラシモドに関連する不純物およびその代謝物について安全性の評価を行った。

UC 治療のための予定臨床用量は，エトラシモド 2 mg である。以下の非臨床安全性およびリスク評価の考察では，予定臨床用量における曝露量（$AUC_{24}$）である 2.163 μg·h/mL と比較した（APD334-002 試験）。

**4.1. 一般毒性**

一連の毒性試験で，マウス，ラットおよびイヌにそれぞれ 60，150 および 15 mg/kg/日を反復投与したとき，エトラシモドに関連した死亡・瀕死は認められず，用量制限毒性も認められなかった。各動物種における重要な毒性試験の用量は，より短期間の探索的な用量設定試験に基づき決定した。重要な試験の最高用量はそれぞれの探索的な用量設定試験における MTD または NOAEL に相当する。エトラシモドに関連した所見の多くは毒性学的意義の乏しいものと判断され，臨床でモニタリング可能であり，また投与中止により回復性を示した。動物種間を通して最も多く認められた毒性所見として，摂餌量の減少を伴う体重の低値または体重増加抑制が認められた。すべての動物種で認められた主要な標的臓器は，リンパ組織，肺および肝臓であった。さらに，イヌでは心臓が標的臓器として同定された。

すべての動物種で摂餌量減少に関連する体重の低値および体重増加抑制が認められた。マウス，ラットおよびイヌの LOEL（それぞれ 200，25 および 2 mg/kg/日）は，臨床推奨用量である 2 mg/日でのヒト曝露量のそれぞれ 865/532 倍（雄/雌），76/125 倍（雄/雌）および 56 倍（雌雄合算値）であった。これらの体重パラメータの変化は概して用量依存的であり，主に投与初期に発現し，一過性であり，投与中止後に回復性を示した。体重および摂餌量への影響はエトラシモドの作用機序に起因すると考えられるが，中枢神経系における作用を介するものではないと考えられている。ラットにおける定量的全身オートラジオグラフィーでは脳内にエトラシモド関連放射能が検出されたにもかかわらず，体重および摂餌量の変化が認められた用量において，安全性薬理試験および一般毒性試験ではエトラシモドに起因する中枢神経系の所見（活動性低下，振戦，痙攣など）は認められなかった。さらに，エトラシモドを投与した動物で認められた体重および摂餌量への影響は，既承認の S1P 受容体調節薬（フィンゴリモド[29]，シポニモド[30]，ozanimod[31]，ponesimod[32]）の評価に用いられた非臨床動物種（マウス，Wistar ラット，ビーグル犬，カニクイザル）でも認められており，S1P 受容体調節薬のクラスエフェクトと考えられる。

すべての動物種で，エトラシモドに関連した末梢，一次および二次リンパ組織のリンパ球減少が認められた。マウス，ラットおよびイヌ（それぞれ 20 mg/kg/日以上，25 mg/kg/日以上および 0.02 mg/kg/日以上）において，臨床推奨用量である 2 mg/日投与時のヒト曝露量と比較してそれぞれ約 102 倍以上，約 76 倍以上および約 0.58 倍以上の曝露量でリンパ球数の減少が認められた。エトラシモドは $S1P_1$ を標的とし，リンパ節からのリンパ球移出の制限が主な薬力学的作用であることから，この作用は薬理作用に起因するものである可能性が高く毒性ではないと判断した。リンパ球数の減少が認められたものの，一般毒性試験では日和見感染を示唆する所見は認められなかったことから，エトラシモドを投与した動物においても免疫系が機能していることが示された。ラットを用いた毒性試験では，リンパ球への影響に明らかな用量依存性がみられなかったことから，薬理作用を示す用量を超える場合（実験的大腸炎のモデルマウスにおける有効用量の約 10 倍～約 330 倍）には $S1P_1$ への作用が飽和する可能性が示唆された。

ラットおよびイヌにおいて，腸間膜リンパ節および気管/気管支リンパ節に洞赤血球増加/赤血球貪食細胞が認められた。これらの所見は，既承認の S1P 受容体調節薬（フィンゴリモド[33]，シポニモド[34]）の評価に用いられたマウスで認められており，S1P 受容体調節薬の薬理作用に起因するクラスエフェクトと考えられる。

マウス，ラットおよびイヌに，臨床推奨用量である 2 mg/日におけるヒト曝露量のそれぞれ約 102 倍以上，約 76 倍以上および約 5.9 倍以上の曝露量となるエトラシモドを投与したときに肺重量の増加が認められた。マウスおよびイヌでは，肺重量の増加は肺胞組織球症を伴っており，そのときの曝露量は臨床推奨用量である 2 mg/日のヒト曝露量のそれぞれ約 211 倍以上および約 5.9 倍以上であった。イヌでは，エトラシモドに関連するものの毒性学的意義の乏しい肺胸膜の線維化が 2 mg/kg/日以上（臨床推奨用量である 2 mg/日を投与したときのヒト曝露量の約 50 倍以上）で認められ，これは投与中止により回復した。マウスでも，肺のフィブリン沈着が 20 mg/kg/日以上（臨床推奨用量である 2 mg/日を投与したときのヒト曝露量の約 102 倍以上）で認められた。肺重量および肺の変化は，既承認の S1P 受容体調節薬（フィンゴリモド[29]，シポニモド[30]，ozanimod[31]，ponesimod[32]）でも認められており，S1P 受容体調節薬のクラスエフェクトと考えられ，これらの所見は肺における血管透過性の亢進に起因すると考えられる[35]。エトラシモドに関連した肺への影響が認められたものの，低酸素状態に感受性の高い組織（脳など）に機能的な影響または形態学的変化は認められなかった。

肝臓の所見として，エトラシモドを投与したマウス，ラットおよびイヌで，肝重量の増加，小葉中心性/汎小葉性肝細胞肥大，肝細胞壊死，胆管過形成または総ビリルビン上昇が認められた。マウス，ラットおよびイヌで認められたこれらの所見は，臨床推奨用量である 2 mg/日を投与した時のヒト曝露量のそれぞれ約 102 倍，約 76 倍および約 402 倍の曝露量から認められた。ラットおよびイヌでは，血清中の肝酵素，コレステロール，総蛋白，グロブリンおよびアルブミンの値に変化が認められた。ラットおよびイヌのいずれにおいても，投与に関連した血液凝固パラメータ（APTT，PT）の延長が認められたが，止血に対する影響を示唆する所見は認められなかった。肝機能パラメータおよび凝固パラメータに対するエトラシモドの影響は，投与中止により概して回復性を示した。

イヌの心臓にエトラシモドに関連した毒性学的意義の乏しい血管壁肥厚および中膜過形成が認められたが（臨床推奨用量である 2 mg/日を投与したときのヒト曝露量の約 24 倍），テレメトリー装着イヌを用いた心血管系に関する評価（M2.6.2.4.1.2）ならびにイヌの 3 ヵ月間および

9 ヵ月間投与毒性試験ではこれに関連した心筋の変性または壊死，うっ血性心不全，心電図パラメータにおける定性的または定量的な変化は認められなかった。テレメトリー装着イヌにおけるエトラシモドに関連する変化として，40 mg/kg（最高用量）でのみ投与後 2～4 時間に収縮期血圧（11.7%），拡張期血圧（14.2%）および平均動脈圧（12.4%）の一過性かつ軽度の上昇（対照群との比較）が認められたが，脈圧への影響はみられなかった。いずれの用量においても，心拍数，体温または心電図パラメータ（定性または定量的）にエトラシモドに関連した影響は認められなかった。イヌに 40 mg/kg を投与したときの $C_{max}$ は，臨床推奨用量における総 $C_{max}$（0.113 µg/mL）の約 376 倍であった。

一般毒性試験の NOAEL および臨床推奨用量である 2 mg/日におけるヒト曝露量に対する曝露量比を Table 1 に示す。いずれの動物種においても，長期間の反復投与による NOAEL の低下，あるいは所見の発現頻度または重症度の上昇は認められなかった。

一般毒性試験の詳細は，M2.6.6.3 に示す。

**Table 1.　重要な反復投与毒性試験におけるエトラシモドの NOAEL および曝露量比**

| 毒性試験 | NOAEL (mg/kg/日) | AUC (µg·h/mL)[a] | | 曝露量比[b] | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | M | F | M | F |
| マウス | | | | | |
| 91 日間 | 20 | 331 | 220 | 153 | 102 |
| ラット | | | | | |
| 4 週間 | 150 | 700 | 1290 | 324 | 596 |
| 3 ヵ月間 | 200 | 1010 | 1730 | 467 | 800 |
| 6 ヵ月間 | 150 | 1440 | 3180 | 666 | 1470 |
| イヌ | | | | | |
| 4 週間 | < 20 | 925 | 910 | 428 | 421 |
| 3 ヵ月間 | 15 | 1030 | 1000 | 476 | 462 |
| 9 ヵ月間 | 15 | 879 | 861 | 406 | 398 |

a. AUC は反復投与毒性試験の平均血漿中濃度から算出した。試験終了時または試験終了時付近の値を示す。
b. 曝露量比は，毒性試験における $AUC_{24}$ または $AUC_{last}$（M2.6.7.3 Table 3）および健康被験者にエトラシモド 2 mg を 1 日 1 回投与したときの定常状態における $AUC_{24}$（2.163 µg·h/mL，APD334-002 試験）から算出した。

### 4.2. 遺伝毒性試験

細菌を用いる in vitro 復帰突然変異試験，HPBL を用いた in vitro 染色体異常試験および雌雄ラットを用いた in vivo 小核試験において，エトラシモドの遺伝毒性を評価した。ICH S2(R1)ガイドラインに準拠し，各試験の最高用量を決定し評価した。エトラシモドは，復帰突然変異試験ではすべての試験菌株において代謝活性化系の存在下および非存在下のいずれにおいても変異原性陰性であり，in vitro 染色体異常試験では評価したすべての条件下において染色体の構造異常誘発性/異数性誘発性陰性と考えられた。In vivo 小核試験では，MTD である最高用量（300 mg/kg/日）の雌ラットにおける骨髄小核誘発性は弱陽性と判断された。

骨髄細胞を用いた in vivo 小核試験においてエトラシモド 300 mg/kg/日を雌ラットに投与したとき，陽性基準を満たす統計学的に有意な反応が認められたが，OECD ガイドライン 474[36]「哺乳

類赤血球小核試験」に記載される明らかな小核誘発性と判定する 3 つの基準すべてを満たしていなかった。OECD ガイドライン 474 に基づくと，以下 a~c の全てに該当する場合に，被験物質は明らかに陽性と判定される。a) 少なくとも 1 つの投与群で，小核含有幼若赤血球の出現頻度が同時陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加を示しており，b) この増加を適切な傾向検定で評価した場合に，少なくとも 1 つの試料採取時点で用量依存性が見られ，c) 当該結果は陰性対照の背景データの分布（例：ポアソン分布に基づく 95%管理限界）から外れている。当該試験において傾向検定は実施しなかったが，300 mg/kg/日群の雌で認められた小核細胞の発現頻度は陰性対照の 95%管理限界の範囲内であり，試験施設の過去の背景データの範囲内であった。

エトラシモドは in vitro 遺伝毒性試験で遺伝毒性陰性であること，および in vivo 小核試験の高用量（300 mg/kg/日）における骨髄毒性が認められたことに基づく科学的根拠の重要度（weight of evidence）評価から，エトラシモドはラットに遺伝毒性を示さず，ヒトに遺伝毒性リスクを示す可能性も低いと考えられた。

遺伝毒性試験の詳細は，M2.6.6.4 に示す。

**4.3. がん原性**

マウスおよびラットを用いた 2 つの長期（104 週間）がん原性試験を実施し，エトラシモドのがん原性を評価した。これらの試験では，ICH S1C(R2)ガイドラインに従い，マウスを用いた 13 週間毒性試験およびラットを用いた 26 週間毒性試験の所見および MTD に基づき用量を設定した。

マウスを用いた 104 週間経口投与がん原性試験（報告書番号 APD334.TOX.003）では，6 mg/kg/日以上の雌雄で血管腫および血管肉腫の発現頻度の上昇が認められた。本試験における血管肉腫および血管腫に対する NOEL は 2 mg/kg/日（臨床曝露量の 19 倍）であり，LOEL は 6 mg/kg/日（臨床曝露量の 42 倍）であった。血管腫および血管肉腫は，既承認の S1P 受容体調節薬（フィンゴリモド[29]，シポニモド[30]，ozanimod[31]，ponesimod[32]）のクラスエフェクトと一致しており，マウスのみで認められた。

2 年間のマウスがん原性試験で認められた同様の所見の LOEL に基づく安全域の比較を Table 2 に示す。フィンゴリモドと ozanimod については，それぞれ腫瘍の所見（悪性リンパ腫も認められる）が異なる，および動物モデル（Tg.rasH2 マウス，26 週間）が異なることから除外した。なおフィンゴリモドの米国添付文書に基づき，LOEL である 0.025 mg/kg/日における曝露量は，ヒト推奨用量（0.5 mg/kg）を投与したときの曝露量よりも低い（体表面積換算，mg/m$^2$）ことが示されている。

血管肉腫および血管腫に対するエトラシモドの安全域（15 倍）は，シポニモド（5 倍）または ponesmod（12 倍）よりも広いことが示された（Table 2）。さらに，エトラシモドとは異なり，シポニモドおよび ponesmod を用いた 2 年間マウスがん原性試験では，血管肉腫および血管腫に対する NOEL は得られなかった。

**Table 2.　S1P 受容体調節薬による血管肉腫および血管腫に対する安全域**

| S1P 受容体調節薬 | LOEL (mg/kg/日) | HED ($mg/m^2$) | RHD (mg/日) | RHD ($mg/m^2$) | 安全域 [a] | 曝露量比 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| シポニモド [30] | 2 | 6 | 2 | 1.23 | 5 | NA[b] |
| ponesmod[32] | 50 | 150 | 20 | 12.33 | 12 | 5 |
| エトラシモド | 6 | 18 | 2 | 1.23 | 15 | 42 |
| エトラシモド | 2[c] (NOEL) | 6 | 2 | 1.23 | 5 | 19 |

HED：ヒト等価用量，RHD：臨床推奨用量
a. 安全域の算出: HED ($mg/m^2$) ÷ RHD ($mg/m^2$).
b. シポニモドを用いた 104 週間マウスがん原性試験では AUC を算出していない（シポニモド M2.6.7.2）。
c. マウス 104 週間がん原性試験における血管肉腫および血管腫に対する無作用量（報告書番号 APD334.TOX.003）

マウスにおける血管肉腫および血管腫のクラスエフェクトは，ヒトに外挿されない種特異的な分子メカニズムを介したものであることが示唆されている[37]。シポニモドを用いたラット 3 ヵ月間およびマウス 9 ヵ月間の in vivo メカニズム検討試験では，経口投与後に血管内皮細胞の活性化が認められた。しかし，マウスでのみ血管内皮細胞の増殖および血中 PLGF2 の持続的な増加が認められた。このことから，血管内皮細胞の持続的活性化，有糸分裂誘発，および PLGF2 刺激により，血管新生が持続し，血管肉腫または血管腫形成に至る可能性が高いとの仮説が提唱されている。そこで，マウス，ラットおよびヒトの初代内皮細胞を用いて，この仮説を検証する in vitro 試験が実施され，シポニモドによりマウス血管内皮細胞では増殖および PLGF2 の放出が認められたが，ラットおよびヒトの血管内皮細胞では認められなかった [37]。これらの結果から，ヒト血管内皮細胞では in vivo において S1P 受容体調節薬に対する増殖反応は起きないこと，マウスで認められた血管腫または血管肉腫は臨床に外挿されないことが示唆された。

この考察を裏付ける結果として，エトラシモド（0，2，6 または 20 mg/kg/日）をラットに最長 91 週間経口投与したとき，評価したいずれの用量においても発がん性は認められなかった。非腫瘍性病変として局所性の視床の鉱質沈着が全用量の雌雄に認められた。この所見は関連する壊死またはその他の組織損傷は認められなかったことから，毒性変化ではないと考えられた。エトラシモドを用いた 104 週間マウスがん原性試験および既承認の S1P 受容体調節薬を用いたラットがん原性試験では，同様の所見は認められなかった。ラットでは，検討した最高用量である 20 mg/kg/日における曝露量は，臨床推奨用量である 2 mg/日をヒトに投与した時の曝露量の約 80 倍（雄）～179 倍（雌）高かった。

以上のように，マウスで認められた血管腫または血管肉腫はヒトへ外挿されないと考えられるが，当該事象については添付文書案（1.8.1）にて注意喚起を行っている。

臨床試験および市販後における血管腫／血管肉腫の発現状況については，M2.7.4 を参照のこと。

がん原性試験の詳細は，M2.6.6.5 に示す。

**4.4. 生殖発生毒性**

ラットおよびウサギを用いた生殖発生毒性試験を実施し，ICH S5(R3)ガイドラインで規定される生殖発生のすべてのステージを評価した。すなわち，雌雄ラットを用いた受胎能および着床までの初期胚発生試験，雄ラットの精子形成に対する影響を評価する試験，ラットおよびウサギを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験および重要な試験，ラットを用いた出生前および出生後の発生に関する試験を実施した。これらの試験では，ICH S5(R3)ガイドラインに基づき用量を設定した。

評価したいずれの用量においても，雄の精子形成または受胎能ならびに雌の初期胚発生に対するエトラシモドの影響は認められなかった。受胎能および初期胚発生に関する NOAEL は雄で 200 mg/kg/日，雌で 4 mg/kg/日と考えられ，そのときの曝露量は臨床推奨用量である 2 mg/日におけるヒト曝露量のそれぞれ約 467 倍および約 21 倍であった（Table 3）。

ラットおよびウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験で器官形成期にエトラシモドを投与したところ，いずれの動物種においても着床後胚損失率の上昇および生存胎児数の低下が認められた。ラットでは，4 mg/kg/日以上で胎児の全身性浮腫，胎児の局所性浮腫，髄膜ヘルニア，短尾および二分脊椎の外表奇形が認められたが，2 mg/kg/日で胎児の外表奇形はみられなかった。内臓検査では，1 mg/kg/日以上でエトラシモドに関連する胎児の大動脈弓，大動脈肺動脈中隔欠損，および心室中隔欠損症の内臓奇形，ならびに内臓変異として腕頭動脈短小が認められた。ウサギでは，10 mg/kg/日以上でエトラシモドに関連する大動脈弓の内臓奇形および骨格変異が認められ，20 mg/kg/日および 25 mg/kg/日ではそれぞれ胸骨分節癒合および屈曲手の骨格奇形も認められた。しかしながら，2 mg/kg/日ではエトラシモドに関連する奇形または発生変異は認められなかった。これらの結果に基づき，ラットおよびウサギの胚・胎児発生に関する NOAEL は，それぞれ 1 mg/kg/日未満および 2 mg/kg/日と考えられた。ラットおよびウサギの胚・胎児発生に関する NOAEL における母動物の AUC は，臨床推奨用量である 2 mg/日におけるヒト曝露量の 5 倍未満および 0.8 倍であった。ラットおよびウサギの母動物に関する NOAEL はそれぞれ 4 mg/kg/日および 20 mg/kg/日であり，そのときの母動物の曝露量は臨床推奨用量である 2 mg/日におけるヒト曝露量の約 21 倍および約 11 倍に相当する（Table 3）。ラットおよびウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験において低曝露量域で認められた胎児の死亡および催奇形性は既承認の S1P 受容体調節薬（フィンゴリモド[29]，シポニモド[30]，ozanimod[31]，ponesimod[32]）でも認められており，S1P 受容体調節薬のクラスエフェクトと考えられる。なお，$S1P_1$受容体が血管発達および神経発達を含む胚形成に重要な役割を果たすことが報告されている[38]。このことから，妊婦または妊娠している可能性のある女性は投与禁忌とし，ラットおよびウサギで胚・胎児発生への影響が認められたことについて，添付文書案（1.8.1）にて注意喚起を行っている。

ラットを用いた重要な出生前および出生後の発生に関する試験では，4 mg/kg/日で分娩への影響が認められ，分娩中の重度の状態悪化により妊娠 22 日に F0 雌 1 例を安楽殺した。2 mg/kg/日および 4 mg/kg/日では授乳期間中の母動物の摂餌量が減少し，離乳前の出生児の体重の低値と関連していた。生後 0 日と 4 日の間に，2 mg/kg/日および 4 mg/kg/日のそれぞれ 8 例および 4 例が死産となり，2 mg/kg/日および 4 mg/kg/日のそれぞれ 12 例および 50 例の出生児が死亡発見された。これに伴い，2 mg/kg/日および 4 mg/kg/日で生存率が，4 mg/kg/日以上で哺育率が低下した。生後 7 日から 21 日では，エトラシモドを投与したすべての群で出生児の体重の低値が認められた。4 mg/kg/日の雄の出生児においては，離乳前に認められたエトラシモドの体重への影響

が離乳後も持続した。4 mg/kg/日の雌の出生児では着床数が対照群と比較して減少し，着床前胚損失率が上昇した。母体毒性に関する NOAEL は 4 mg/kg/日であり，そのときの曝露量は臨床推奨用量である 2 mg/日におけるヒト曝露量の約 24 倍であった。分娩に関する NOAEL は 2 mg/kg/日であり，そのときの曝露量は臨床推奨用量である 2 mg/日におけるヒト曝露量の約 10 倍であった。すべての用量で出生児の体重への影響（毒性学的意義のある変化）が認められたため，離乳前の F1 動物に関する NOAEL は得られなかった。さらに，離乳後の F1 動物に関する無毒性量は 2 mg/kg/日であり，そのときの曝露量は臨床推奨用量である 2 mg/日におけるヒト曝露量の約 5 倍であった。F0 動物および F1 動物で認められた所見は，既承認の S1P 受容体調節薬（フィンゴリモド[29]，シポニモド[30]，ozanimod[31]，ponesimod[32]）で認められた所見およびそのときの曝露量比と類似していたが，エトラシモドでは F1 動物における神経行動学的な影響は認められなかった。

生後 21 日の幼若ラットに最高 100 mg/kg/日のエトラシモドを 1 日 1 回 7 週間投与したとき，認められたエトラシモドに関連する所見は薬理作用に起因するものであり，成熟ラットを用いた反復投与毒性試験で認められた所見と一致していた。幼若ラットで認められた所見は，体重抑制および摂餌量減少，リンパ球数の減少およびそれに関連する血液学的所見ならびに脾臓重量の減少であった。幼若ラットにおけるエトラシモドの NOAEL は 100 mg/kg/日と考えられ，そのときの曝露量は臨床推奨用量である 2 mg/日におけるヒト曝露量の約 442 倍であった。

重要な生殖発生毒性試験におけるエトラシモドの NOAEL および曝露量比を Table 3 に示す。

生殖発生毒性試験の詳細は，M2.6.6.6 に示す。

**Table 3.　重要な生殖発生毒性試験におけるエトラシモドの NOAEL および曝露量比**

| 毒性試験 | NOAEL (mg/kg/日) | AUC (μg·h/mL)[a] | | 曝露量比[b] | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | M | F | M | F |
| **受胎能および初期胚発生** | | | | | |
| ラットの精子形成 | 200 | 1010[c] | NA | 467 | NA |
| **胚・胎児発生** | | | | | |
| ラットの母動物毒性 | 4 | NA | 45[d] | NA | 21 |
| ラットの胚・胎児発生 | < 1 | NA | < 11[d] | NA | < 5 |
| ウサギの母動物毒性 | 20 | NA | 24[e] | NA | 11 |
| ウサギの胚・胎児発生 | 2 | NA | 1.70[e] | NA | 0.8 |
| **出生前および出生後の発生** | | | | | |
| ラット母動物毒性 | 4 | NA | 51[f] | NA | 24 |
| ラット母動物の分娩 | 2 | NA | 22[f] | NA | 10 |
| ラット離乳前の発生 | < 0.4 | NA | < 2.4[g] | NA | < 1.1 |
| ラット離乳後の発生 | 2 | NA | 11[g] | NA | 5 |
| **幼若動物** | | | | | |
| 幼若ラットの毒性 | 100 | 631[h] | 957[h] | 292 | 442 |

**Table 3.　重要な生殖発生毒性試験におけるエトラシモドの NOAEL および曝露量比**

| 毒性試験 | NOAEL (mg/kg/日) | AUC (μg·h/mL)[a] | | 曝露量比[b] | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | M | F | M | F |

a. AUC は試験終了時または試験終了時付近の値を示す。
b. 曝露量比は，毒性試験における $AUC_{24}$ または $AUC_{last}$ および健康被験者にエトラシモド 2 mg を 1 日 1 回投与したときの定常状態における $AUC_{24}$（2.163 μg·h/mL，APD334-002 試験）から算出した。
c. ラット 3 ヵ月間投与毒性試験（報告書番号 TX[redacted]004）における試験 90 日の曝露量
d. 妊娠 17 日の母動物の曝露量（報告書番号 TX[redacted]017）
e. 妊娠 20 日の母動物の曝露量（報告書番号 TX[redacted]019）
f. 妊娠 17 日の母動物の曝露量（報告書番号 APD334.TOX.011）
g. 授乳 20 日の母動物の曝露量（報告書番号 APD334.TOX.011）
h. 試験 49 日の曝露量（報告書番号 APD334.TOX.009）

### 4.5. 光毒性

エトラシモドの紫外可視吸収スペクトル（M3.2.S.3.1.6.3）に基づき，紫外線の照射下および非照射下において BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞をエトラシモドで処理したときの相対細胞生存率によりエトラシモド L-アルギニンの光毒性を評価したところ，エトラシモドは光毒性を示さなかった。したがって，エトラシモドはヒトに対して光毒性を示す懸念はないと考えられる。

光毒性試験の詳細は，M2.6.6.8.2 に示す。

### 4.6. 代謝物の安全性

エトラシモドは，酸化および脱水素反応，ならびに硫酸抱合およびグルクロン酸抱合により広範に代謝される（M2.6.4.5.3）。マウスに 20 または 200 mg/kg/日を反復投与したとき，合計 31 種の代謝物が雌雄で認められ，代謝物プロファイルに性差は認められなかった。ラットに 10 mg/kg/日を単回および反復投与したマスバランス試験において，[$^{14}$C]エトラシモドは広範に代謝され，29 種の代謝物が生成された。イヌに 2 mg/kg の[$^{14}$C]エトラシモドを単回経口投与したとき，合計 18 種の代謝物が同定された。動物種間をとおして，肝細胞および肝ミクロソームにおける in vitro 代謝物プロファイルと，[$^{14}$C]エトラシモドを投与した時の in vivo 代謝物プロファイルの間に高い相関が認められた（M2.6.4.5）。

ヒトのマスバランス試験（APD334-107 試験）では，代謝物の非臨床安全性評価を必要とするヒト特異的または明らかに高い曝露量のエトラシモド代謝物は認められていない。ヒトにおいて最も多く認められた代謝物である M3 および M6 は，いずれも総放射能の 10%未満であった。

### 4.7. 不純物の安全性

ICH M7(R1)ガイドラインに従い，エトラシモド L-アルギニンおよびその類縁物質について in silico で DNA 反応性を評価した。エトラシモド原薬中に確認されたまたは生じる可能性がある不純物を，DEREK Nexus®および SARAH Nexus®システムを用いた（Q）SAR 分析，または既存の文献のレビューあるいは他の関連情報により評価した。M7 に基づく分類の結果を M3.2.S.3.2.2.2 に要約した。検討した原薬中に確認されたまたは生じる可能性がある不純物のうち，8 種（　　*不純物A　　，*不純物B，*不純物C，　　*不純物D　　，*不純物E　　，*不純物F，　　*不純物G　および *不純物H）が潜在的変異原性不純物であると同定された。これらの潜在的変異原性不純物のうち 7 種（　　*不純物A　　，


＊新薬承認情報提供時に置き換え

*不純物C，　*不純物D　，　*不純物E　，*不純物F，　*不純物G　および *不純物H）は，ICH M7(R1)ガイドラインに従い TTC 以下で管理されている。*不純物B は，ICH Q3A(R2)ガイドラインに基づき，細菌を用いる復帰突然変異試験において変異原性を示さなかったため，非変異原性不純物として管理されている。

エトラシモドの臨床推奨用量は 2 mg/日のため，ICH Q3A ガイドラインより安全性確認の必要な閾値は 0.15%（0.003 mg）または 1 日摂取量 1.0 mg のうち低い方と規定される。したがって，安全性確認の必要な閾値は 0.15%とした。市販用原薬ロットで検出可能な 2 つの不純物である *不純物I および *不純物J は，エトラシモド原薬において安全性確認の必要な閾値 0.15%を超え 0.5%以下で存在すると考えられる。また，エトラシモドの光学異性体不純物（*不純物K）は原薬中に 0.7%以下で認められ，安全性確認の必要な閾値である 0.15%を超えていた。 *不純物K は製剤中でも 0.7%以下で認められた。

*不純物I については，ラットおよびイヌを用いた 13 週間投与毒性試験（報告書番号 TX[redacted]004，TX[redacted]005），ラットを用いた 26 週間投与毒性試験（報告書番号 TX[redacted]009）およびイヌを用いた 39 週間投与毒性試験（報告書番号 TX[redacted]008）において，in vivo での安全性が確認され，エトラシモドを臨床推奨用量である 2 mg/日でヒトに投与したときのエトラシモド原薬中に *不純物I が最大 97.8%含まれる場合の安全性を支持している（Table 4）。ICH M7(R1)ガイドラインに従い実施した in silico 評価に基づき，DNA 反応性に関して *不純物I はクラス 5 の不純物に分類されている。そのため， *不純物I は非変異原性不純物として，ICH Q3A(R2)ガイドラインに従い管理されている。

*不純物J および *不純物K については，ラットおよびイヌを用いた 4 週間投与毒性試験（報告書番号 TX[redacted]010，TX[redacted]007）において，安全性が確認されている。いずれの動物種においても，3 ヵ月間以上の毒性試験に用いられたロットでは，この類縁物質は認められなかった。ラットおよびイヌを用いた 4 週間投与毒性試験は，エトラシモドを臨床推奨用量である 2 mg/日でヒトに投与したときのエトラシモド原薬中に *不純物J および *不純物K がそれぞれ最大 102.6%および 512.1%含まれる場合の安全性を支持している（Table 4）。ICH M7(R1)ガイドラインに従い実施した in silico 評価に基づき，DNA 反応性に関して *不純物J および *不純物K はクラス 5 の不純物に分類されている。そのため， *不純物J および *不純物K は非変異原性不純物として，ICH Q3A(R2)ガイドラインに従い管理されている。

不純物を用いた試験の詳細は，M2.6.6.8.1 に示す。

**Table 4.　ラットおよびイヌを用いた重要な反復投与毒性試験におけるエトラシモド原薬の不純物（*不純物I，*不純物J および *不純物K）**

| 不純物 | 毒性試験 | 原薬ロット | 不純物（%） | エトラシモド NOAEL (mg/kg/日) | 不純物 NOAEL (mg/kg/日)[a] | 不純物 NOAEL HED (mg/kg/日)[b] | 許容される最大不純物含有量（%）[c] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *不純物I | TX[redacted]004（ラット 3 ヵ月） | [redacted] | 0.1 | 200 | 0.200 | 0.0323 | 97.8 |

**Table 4.** ラットおよびイヌを用いた重要な反復投与毒性試験におけるエトラシモド原薬の不純物（*不純物I，*不純物J および *不純物K）

| 不純物 | 毒性試験 | 原薬ロット | 不純物（%） | エトラシモド NOAEL (mg/kg/日) | 不純物 NOAEL (mg/kg/日)[a] | 不純物 NOAEL HED (mg/kg/日)[b] | 許容される最大不純物含有量（%）[c] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | TX[redacted]009（ラット 6 ヵ月） | [redacted] | 0.1 | 150 | 0.150 | 0.0242 | 73.3 |
| | TX[redacted]005（イヌ 3 ヵ月） | [redacted] | 0.1 | 15 | 0.015 | 0.0083 | 25.3 |
| | TX[redacted]008（イヌ 9 ヵ月） | [redacted] | 0.1 | 15 | 0.015 | 0.0083 | 25.3 |
| *不純物J | TX[redacted]010（ラット 4 週間） | [redacted] | 0.14 | 150 | 0.210 | 0.0339 | 102.6 |
| | TX[redacted]008（イヌ 4 週間） | [redacted] | NA | NC | NA | NA | NA |
| | TX[redacted]007（イヌ 4 週間） | [redacted] | 0.38 | 2.0 | 0.008 | 0.0042 | 12.8 |
| *不純物K | TX[redacted]010（ラット 4 週間） | [redacted] | 0.7 | 150 | 1.05 | 0.169 | 512.1 |
| | TX[redacted]008（イヌ 4 週間） | [redacted] | NA | NC | NA | NA | NA |
| | TX[redacted]007（イヌ 4 週間） | [redacted] | 0.7 | 2.0 | 0.014 | 0.0078 | 23.6 |

HED：ヒト等価用量

[a] （被験物質の NOAEL）×（%不純物÷100）

[b] （不純物の NOAEL）÷［体表面積に基づく HED への変換係数 6.2（ラット）または 1.8（イヌ）］

[c] （不純物の NOAEL HED）÷［最大臨床推奨用量 2.0 mg ÷ 60 kg（ヒト）= 0.033 mg/kg］×100



＊新薬承認情報提供時に置き換え

**5. 総括及び結論**

新規の低分子 S1P 受容体調節薬であるエトラシモドは，$S1P_1$ に対する選択的かつ完全なアゴニスト活性，$S1P_{4,5}$ に対する部分アゴニスト活性を示し，$S1P_{2,3}$ に対して活性を示さないことが明らかにされ，S1P 受容体ファミリーにおいて特徴的な薬理学的プロファイルを示した。In vitro におけるエトラシモドによる $S1P_1$ 活性化試験（βアレスチン動員アッセイおよび GTPγS 結合アッセイ）では，他の S1P 受容体調節薬と比較して，エトラシモドは特徴的な活性バランスを示し，G タンパク質シグナル伝達よりもβアレスチン動員を優先的に活性化すると考えられる。エトラシモドの G タンパク質シグナル伝達に対する活性化能は，第 2 世代の S1P 受容体調節薬（シポニモドおよび ozanimod）よりも低かった。以上のことから，検討した他の S1P 受容体調節薬と比較して，エトラシモドは G タンパク質シグナル伝達経路（心臓細胞の GIRK $I_{KACh}$ チャネル活性化に伴う心拍数減少）よりもβアレスチン動員を介した経路（リンパ球の移出）を優先的に活性化すると考えられた [12,20,25]。

In vitro で認められたエトラシモドの有効性，選択性および機能的活性を in vivo で評価するために，健常マウスおよび免疫介在性炎症性疾患のげっ歯類モデルを用いて検討した。エトラシモドにより，想定された薬理作用および血中リンパ球数の減少が認められた。すなわち，これらのモデルにおいて，エトラシモドの予防的投与または治療的投与により，炎症反応の抑制，炎症性サイトカインおよび局所炎症の減少，局所リンパ節からのリンパ球移出の減少あるいは血中および炎症組織におけるリンパ球レベルの減少が認められた。以上のように，エトラシモドを用いた in vitro および in vivo の薬理試験において，in vitro で受容体の内在化を誘発する $S1P_1$ に対する強力な活性が認められ，in vivo の複数の異なる疾患モデルにおける抗炎症作用が認められた。

副次的薬理試験では，in vitro において 9 つの標的に対してエトラシモドは放射性リガンド結合を阻害した。これらに対する $K_i$ 値は 2.00 µmol/L（アデノシン $A_3$）～15.0 µmol/L（5-$HT_3$）であり，UC 治療に対する臨床推奨用量 2 mg/日における非結合型 $C_{max}$ の約 385 倍～2890 倍と考えられた。

エトラシモドの心血管系，中枢神経系または呼吸系への影響を，標準的な安全性薬理コアバッテリー試験で評価した。In vitro における hERG 試験において，エトラシモドは濃度依存的に $I_{Kr}$ 電流を増加させ，1 µmol/L および 3 µmol/L でそれぞれ 31.4%および 58.9%増加した。このときの濃度は，UC 治療に対する臨床推奨用量における非結合型 $C_{max}$ に対する約 193 倍および約 578 倍であった。hERG チャネル電流への作用に関しては，阻害ではなく，hERG チャネル電流の増加のみが認められたため，エトラシモドの hERG 電流阻害に対する $IC_{50}$ 値は得られなかった。健康被験者を対象に実施した thorough QT 試験（APD334-008 試験）では，エトラシモドによる QT 延長のリスクは認められなかった。さらに，初代ヒト心房心筋細胞においてエトラシモドは $I_{KACh}$ を活性化したが，S1P およびエトラシモドによる $I_{KACh}$ の活性化の経時変化に差は認められなかった。In vivo では，βアレスチン動員を介した $S1P_1$ の内在化による機能的アンタゴニスト作用がリンパ節からのリンパ球移出の減少を誘導するのに対し，G タンパク質シグナル伝達は心臓細胞の GIRK $I_{KACh}$ チャネル活性化を惹起し，S1P 受容体調節薬の初回投与時にみられる一過性の心血管系への影響の原因と考えられる [12,20,25]。テレメトリー装着イヌで認められた被験物質に関連する作用は，最高用量である 40 mg/kg でのみ認められ，投与後 2～4 時間に一過性でわずかな収縮期血圧，拡張期血圧および平均動脈圧の上昇（対照群との比較）が認められたが，

いずれの用量においても，心拍数，体温または心電図パラメータ（定性または定量的）にエトラシモドに関連した影響は認められなかった。イヌを用いた 4 週間投与毒性試験における曝露量に基づくと，最高用量かつ NOAEL である 40 mg/kg における曝露量は UC の治療を目的とした臨床推奨用量における総 $C_{max}$ の約 376 倍である。ラットに最大 350 mg/kg のエトラシモドを単回経口投与したとき，中枢神経系または呼吸系機能に対する影響は認められず，ラットを用いた 4 週間経口投与毒性試験の曝露量に基づくと，このときの曝露量は UC の治療を目的とした臨床推奨用量における総 $C_{max}$ の約 858 倍である。

評価した動物種（BALB/c マウス，Sprague Dawley ラット，ビーグル犬およびカニクイザル）への単回経口および静脈内投与試験に基づくエトラシモドの経口バイオアベイラビリティは，43.8%～約 100%であった。さらに，ヒトの血漿中エトラシモドと血漿中総放射能の $C_{max}$ を比較したところ，エトラシモドの大部分が未変化体として吸収されており（約 83%），初回通過効果が低いことが示された（M2.7.2.2）。エトラシモドの代謝に関与する主な酵素は，CYP2C8，CYP2C9 および CYP3A4 であり，これらより程度は低いものの CYP2C19 および CYP2J2 も関与している。また，複数のヒト UGT もエトラシモドの代謝に関与している。ヒトのマスバランス試験では，代謝物の非臨床安全性評価を必要とするヒト特異的または明らかに高い曝露量のエトラシモド代謝物は認められていない。[$^{14}$C]エトラシモドを用いた Sprague Dawley ラット，ビーグル犬およびヒトのマスバランス試験の結果から，エトラシモドの主な排泄経路は糞中排泄であると考えられた。In vitro において，エトラシモドは臨床的に意味のある濃度において P450 分子種またはトランスポーターの誘導および阻害を示さず，臨床的に意味のある薬物相互作用を引き起こす可能性は低いと考えられる。

エトラシモドに関連した所見の多くは毒性学的意義の乏しいものと判断され，臨床でモニタリング可能であり，また投与中止により回復性を示した。動物種間を通して最も多く認められた毒性所見として，摂餌量の減少を伴う体重の低値または体重増加抑制が認められた。これらの所見は，既存の S1P 受容体調節薬（フィンゴリモド[29]，シポニモド[30]，ozanimod[31]，ponesimod[32]）で認められた毒性と一致していた。すべての動物種で認められた主要な標的臓器は，リンパ組織，肺および肝臓であった。さらに，イヌでは心臓が標的臓器として同定された。ラットを用いた 6 ヵ月間投与毒性試験の NOAEL における曝露量（AUC）は，2 mg/日におけるヒト曝露量の 666 倍（雄）および 1470 倍（雌）であった。イヌを用いた 9 ヵ月間投与毒性試験の NOAEL における曝露量（AUC）は 2 mg/日におけるヒト曝露量の 406 倍（雄）および 398 倍（雌）であった。さらに，イヌの心臓にエトラシモドに関連した毒性学的意義の乏しい血管壁肥厚および中膜過形成が認められたが（臨床推奨用量である 2 mg/日を投与したときのヒト曝露量の約 24 倍），テレメトリー装着イヌを用いた心血管系に関する評価ならびにイヌの 3 ヵ月間および 9 ヵ月間投与毒性試験ではこれに関連した心筋の変性または壊死，うっ血性心不全，心電図パラメータの定性的または定量的な変化は認められなかった。体重，摂餌量およびリンパ球数への影響が幼若ラットでも認められ，NOAEL における曝露量は臨床推奨用量である 2 mg/日におけるヒト曝露量の約 442 倍であった。

エトラシモドは in vitro 遺伝毒性試験で遺伝毒性陰性であること，および in vivo 小核試験の高用量における骨髄毒性が認められたことに基づく科学的根拠の重要度（weight of evidence）評価から，エトラシモドはラットでは遺伝毒性を示さず，ヒトに遺伝毒性リスクを示す可能性も低いと考えられた。

エトラシモドはラットにおいてがん原性を示さなかったが，マウスにおいて血管肉腫または血管腫の発現率の上昇が認められた。これらの所見は，既存の S1P 受容体調節薬（フィンゴリモド[29]，シポニモド[30]，ozanimod[31]，ponesimod[32]）で評価したマウスで認められるクラスエフェクトであり，ヒトに外挿されない種特異的な分子メカニズムを介したものであることが示唆されている[37]。本試験における血管肉腫および血管腫に対する NOEL は 2 mg/kg/日（臨床曝露量の 19 倍）であった。エトラシモドを用いたラットがん原性試験では，同様の所見は認められず，検討した最高用量である 20 mg/kg/日における曝露量は，臨床推奨用量である 2 mg/日をヒトに投与した時の曝露量の約 80 倍（雄）～179 倍（雌）高かった。

受胎能および初期胚発生に関する試験では，評価したいずれの用量においても，雄の精子形成または受胎能ならびに雌の初期胚発生に対するエトラシモドの影響は認められなかった。受胎能および初期胚発生に関する NOAEL は雄で 200 mg/kg/日，雌で 4 mg/kg/日と考えられ，そのときの曝露量は臨床推奨用量である 2 mg/日におけるヒト曝露量のそれぞれ約 467 倍および約 21 倍であった。ラットおよびウサギの胚・胎児発生に関する試験では胚・胎児生存率低下および胎児奇形が認められ，胚・胎児発生に関する NOAEL（ラット：1 mg/kg/日未満，ウサギ：2 mg/kg/日）における母動物の AUC は，臨床推奨用量である 2 mg/日におけるヒト曝露量の 5 倍未満および 0.8 倍であった。発生に関する毒性所見は出生前および出生後の発生に関する毒性試験でも認められたが，最低用量である 0.4 mg/kg/日（2 mg/日におけるヒト曝露量の 1.1 倍に相当する曝露量）において，F1 動物の出生体重の低値が認められたことから，発生に関する NOAEL は得られなかった。さらに，2 mg/kg/日で出生児の生存率低下も認められ，そのときの曝露量は臨床推奨用量である 2 mg/日におけるヒト曝露量の約 10 倍であった。ラットおよびウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験において低曝露量域で認められた胎児の死亡および催奇形性は既承認の S1P 受容体調節薬（フィンゴリモド[29]，シポニモド[30]，ozanimod[31]，ponesimod[32]）でも認められており，S1P 受容体調節薬のクラスエフェクトと考えられる。なお，$S1P_1$ 受容体が血管発達および神経発達を含む胚形成に重要な役割を果たすことが報告されている[38]。生後 21 日の幼若ラットに最高 100 mg/kg/日のエトラシモドを 1 日 1 回 7 週間投与したとき，幼若ラットにおけるエトラシモドの NOAEL は 100 mg/kg/日と考えられ，そのときの曝露量は臨床推奨用量である 2 mg/日におけるヒト曝露量の約 442 倍であった。F0 動物および F1 動物で認められた所見は，既承認の S1P 受容体調節薬（フィンゴリモド[29]，シポニモド[30]，ozanimod[31]，ponesimod[32]）で認められた所見およびそのときの曝露量比と類似していたが，エトラシモドでは F1 動物における神経行動学的な影響は認められなかった。

ICH M7(R1)ガイドラインおよび ICH Q3A(R2)ガイドラインに従い，エトラシモドの代謝物および不純物の安全性を評価した。代謝物の非臨床安全性評価を必要とするヒトに特異的または明らかに高い曝露量のエトラシモドの代謝物は認められていない。 *不純物I については，ラットおよびイヌを用いた 13 週間投与毒性試験，ラットを用いた 26 週間投与毒性試験およびイヌを用いた 39 週間投与毒性試験において，in vivo での安全性が確認され，エトラシモドを臨床推奨用量である 2 mg/日でヒトに投与したときのエトラシモド原薬中に *不純物I が最大 97.8%含まれる場合の安全性を支持している。 *不純物J については，ラットおよびイヌを用いた 4 週間投与毒性試験において安全性が確認され，エトラシモドを臨床推奨用量である 2 mg/日でヒトに投与したときのエトラシモド原薬中に *不純物J が最大 102.6%含まれる場合の安全性を支持している。In silico 評価に基づき，DNA 反応性に関して *不純物I および *不純物J はクラス 5 の不純物に分類されている。ラットおよびイヌを用いた 4 週間投与毒性試験において， *不純物K の

in vivo での安全性が確認され，エトラシモドを臨床推奨用量である 2 mg/日でヒトに投与したときのエトラシモド原薬中に *不純物K が最大 512%含まれる場合の安全性を支持している。In silico 評価に基づき，DNA 反応性に関して *不純物K はクラス 5 の不純物に分類されている。

In vitro において，エトラシモドは紫外線の照射下および非照射下で光毒性を示さなかった。したがって，エトラシモドはヒトに対して光毒性を示さないと考えられる。

以上，ICH ガイドラインまたは GLP 規制に従って実施された一連の非臨床薬理，薬物動態および毒性試験により，エトラシモドの影響が評価されている。これらの非臨床試験の結果から，$S1P_{1,4,5}$ の選択的調節薬としてエトラシモドが UC 患者に有用である可能性が示され，エトラシモドの臨床使用が支持された。

## 6. 参考文献

1 Blaho VA, Hla T. An update on the biology of sphingosine 1-phosphate receptors. J Lipid Res. 2014;55(8):1596-608.

2 Hla T. Physiological and pathological actions of sphingosine 1-phosphate. Semin Cell Dev Biol. 2004;15(5):513-20.

3 Lee JF, Zeng Q, Ozaki H, et al. Dual roles of tight junction-associated protein, zonula occludens-1, in sphingosine 1-phosphate-mediated endothelial chemotaxis and barrier integrity. J Biol Chem. 2006;281(39):29190-200.

4 McVerry BJ, Garcia JG. In vitro and in vivo modulation of vascular barrier integrity by sphingosine 1-phosphate: mechanistic insights. Cell Signal. 2005;17(2):131-9.

5 Brinkmann V, Billich A, Baumruker T, et al. Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. Nat Rev Drug Discov. 2010;9(11):883-97.

6 Eksteen B, Miles AE, Grant AJ, et al. Lymphocyte homing in the pathogenesis of extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. Clin Med (Lond). 2004;4(2):173-80.

7 Kappos L, Fox RJ, Burcklen M, et al. Ponesimod Compared With Teriflunomide in Patients With Relapsing Multiple Sclerosis in the Active-Comparator Phase 3 OPTIMUM Study: A Randomized Clinical Trial. JAMA Neurol. 2021;78(5):E1-E10.

8 Kappos L, Radue EW, O'Connor P, et al. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. N Engl J Med. 2010;362(5):387-401.

[9] Sandborn WJ, Feagan BG, Wolf DC, et al. Ozanimod Induction and Maintenance Treatment for Ulcerative Colitis. N Engl J Med. 2016;374(18):1754-62.

[10] Vaclavkova A, Chimenti S, Arenberger P, et al. Oral ponesimod in patients with chronic plaque psoriasis: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. Lancet. 2014;384(9959):2036-45.

[11] Waeber C, Blondeau N, Salomone S. Vascular sphingosine-1-phosphate $S1P_1$ and $S1P_3$ receptors. Drug News Perspect. 2004;17(6):365-82.

[12] Camm J, Hla T, Bakshi R, et al. Cardiac and vascular effects of fingolimod: mechanistic basis and clinical implications. Am Heart J. 2014;168(5):632-44.

[13] Gräler MH, Bernhardt G, Lipp M. EDG6, a novel G-protein-coupled receptor related to receptors for bioactive lysophospholipids, is specifically expressed in lymphoid tissue. Genomics. 1998;53(2):164-9.

[14] Gräler MH, Bernhardt G, Lipp M. A lymphoid tissue-specific receptor, EDG6, with potential immune modulatory functions mediated by extracellular lysophospholipids. Curr Top Microbiol Immunol. 1999;246:131-6.

[15] Im DS, Heise CE, Ancellin N, et al. Characterization of a novel sphingosine 1-phosphate receptor, Edg-8. J Biol Chem. 2000;275(19):14281-6.

[16] Jenne CN, Enders A, Rivera R, et al. T-bet-dependent $S1P_5$ expression in NK cells promotes egress from lymph nodes and bone marrow. J Exp Med. 2009;206(11):2469-81.

[17] Terai K, Soga T, Takahashi M, et al. Edg-8 receptors are preferentially expressed in oligodendrocyte lineage cells of the rat CNS. Neuroscience. 2003;116(4):1053-62.

[18] Baeyens A, Fang V, Chen C, et al. Exit Strategies: S1P Signaling and T Cell Migration. Trends Immunol. 2015;36(12):778-87.

[19] Fang V, Chaluvadi VS, Ramos-Perez WD, et al. Gradients of the signaling lipid S1P in lymph nodes position natural killer cells and regulate their interferon-γ response. Nat Immunol. 2017;18(1):15-25.

[20] Sykes DA, Riddy DM, Stamp C, et al. Investigating the molecular mechanisms through which FTY720-P causes persistent $S1P_1$ receptor internalization. Br J Pharmacol. 2014;171(21):4797-807.

[21] Lukas S, Patnaude L, Haxhinasto S, et al. No differences observed among multiple clinical $S1P_1$ receptor agonists (functional antagonists) in $S1P_1$ receptor down-regulation and degradation. J Biomol Screen. 2014;19(3):407-16.

[22] FDA. Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Guidance for Industry. Published 2001.

[23] FDA. Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Guidance for Industry.. Published 2018.

[24] EMA. Guideline on bioanalytical method validation [EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2]. European Medicines Agency. Published 2012a.

[25] Taylor S, Gray JRJ, Willis R, et al. The utility of pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling in the discovery and optimization of selective $S1P_1$ agonists. Xenobiotica. 2012;42(7):671-86.

[26] Ivanova-Nikolova TT, Nikolov EN, Hansen C, et al. Muscarinic $K^+$ channel in the heart. Modal regulation by G protein βγsubunits. J Gen Physiol. 1998;112(2):199-210.

[27] Rey M, Hess P, Clozel M, et al. Desensitization by progressive up-titration prevents first-dose effects on the heart: guinea pig study with ponesimod, a selective $S1P_1$ receptor modulator. PLoS One. 2013;8(9):e74285.

[28] Yagi Y, Nakamura Y, Kitahara K, et al. Analysis of Onset Mechanisms of a Sphingosine 1-Phosphate Receptor Modulator Fingolimod-Induced Atrioventricular Conduction Block and QT-Interval Prolongation. Toxicol Appl Pharmacol. 2014;281(1):39-47.

[29] フィンゴリモド 塩酸塩 審査結果報告書，2011 年 8 月 30 日

[30] シポニモド フマル酸 審査結果報告書，2020 年 6 月 29 日

[31] CDER. Non-clinical review(s): Application number: 209899Orig1s000 (Zeposia, ozanimod). U.S. Food and Drug Administration.

[32] CDER. Non-clinical review(s): Application number: 213498Orig1s000 (Ponvory, ponesimod). U.S. Food and Drug Administration.

[33] CDER. Non-clinical review(s): Application number: 022527Orig1s000 (Gilenya, fingolimod). U.S. Food and Drug Administration.

[34] CDER. Non-clinical review(s): Application number: 209884Orig1s000 (Mayzent, siponimod). U.S. Food and Drug Administration.

[35] Sanna MG, Wang SK, Gonzalez-Cabrera PJ, et al. Enhancement of capillary leakage and restoration of lymphocyte egress by a chiral $S1P_1$ antagonist in vivo. Nat Chem Biol. 2006;2(8):434-41.

[36] OECD. Test No. 474: Mammalian erythrocyte micronucleus test. OECD Publishing. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.

[37] Pognan F, Mahl JA, Papoutsi M, et al. Induction of hemangiosarcoma in mice after chronic treatment with S1P-modulator siponimod and its lack of relevance to rat and human. Arch Toxicol. 2018;92(5):1877-91.

[38] Cartier A, Hla T. Sphingosine 1-phosphate: Lipid signaling in pathology and therapy. Science. 2019;366(6463):eaar5551.