ザズベイカプセル 30 mg

第 2 部 (モジュール 2) : CTD の概要 (サマリー)

2.4 非臨床試験の概括評価

塩野義製薬株式会社

目次

略号及び用語定義一覧表 4
2.4 非臨床試験の概括評価 6
2.4.1 非臨床試験計画概略 6
2.4.2 薬理試験 7
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 7
2.4.2.2 副次的薬理試験 10
2.4.2.3 安全性薬理試験 10
2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験 12
2.4.3 薬物動態試験 13
2.4.3.1 吸収 13
2.4.3.2 分布 13
2.4.3.3 代謝 13
2.4.3.4 排泄 14
2.4.3.5 薬物動態学的相互作用 14
2.4.4 毒性試験 18
2.4.4.1 単回投与毒性試験 18
2.4.4.2 反復投与毒性試験 19
2.4.4.3 遺伝毒性試験 23
2.4.4.4 がん原性試験 23
2.4.4.5 生殖発生毒性試験 23
2.4.4.6 局所刺激性試験 30
2.4.4.7 その他の毒性試験 30
2.4.4.7.1 抗原性 30
2.4.4.7.2 免疫毒性 30
2.4.4.7.3 薬物乱用及び依存性 31
2.4.4.7.4 代謝物 33
2.4.4.7.5 不純物 33
2.4.4.7.6 光毒性 33
2.4.5 総括及び結論 33
2.4.6 参考文献 34

表

表 2.4-1 安全性薬理コアバッテリー試験の結果及び血漿中曝露量と申請用法用量での血漿中曝露量との比 11
表 2.4-2 ズラノロンによる各 CYP 阻害作用のまとめ 15

表 2.4-3 ズラノロンによる各トランスポーター阻害作用のまとめ 16
表 2.4-4 M117 (SGE-02369) による各 CYP 阻害作用のまとめ 17
表 2.4-5 M135 (SGE-03632) による各 CYP 阻害作用のまとめ 17
表 2.4-6 M136 (SGE-03633) による各 CYP 阻害作用のまとめ 17
表 2.4-7 ラット概略の致死量でのズラノロンの曝露量及び臨床との曝露比 19
表 2.4-8 イヌ概略の致死量でのズラノロンの曝露量及び臨床との曝露比 19
表 2.4-9 ズラノロンの反復経口投与毒性試験における無毒性量とズラノロンの血漿中曝露量及び臨床との曝露比 21
表 2.4-10 ラット及びイヌを用いた主要な毒性試験における鎮静の曝露量-反応関係と鎮静のみられた曝露量と臨床曝露量との比 22
表 2.4-11 ズラノロンの生殖発生毒性試験での主な毒性所見及び無毒性量 29
表 2.4-12 ズラノロンの生殖発生毒性試験における無毒性量でのズラノロンの血漿中曝露量と臨床曝露量との比 30

略号及び用語定義一覧表

略号	英語	日本語
AUC	area under the (plasma) concentration-time curve	(血漿中) 濃度–時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}inf}$	area under the (plasma) concentration-time curve from time 0 to infinity	時間 0 から無限大時間までの (血漿中) 濃度–時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}24hr}$	area under the (plasma) concentration-time curve from time 0 to 24 hours post-dose	時間 0 から投与後 24 時間までの(血漿中) 濃度–時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}\tau}$	area under the (plasma) concentration-time curve from 0 to τ	投与間隔における (血漿中) 濃度-時間–曲線下面積
AUC_{last}	area under the concentration-time curve from 0 to the time of the last quantifiable concentration	時間 0 から濃度測定可能最終時点までの濃度–時間曲線下面積
BCRP	breast cancer resistance protein	乳がん耐性タンパク質
BSEP	bile-salt export pump	胆汁酸排出トランスポーター
C_{max}	maximum (plasma) concentration	最高 (血漿中) 濃度
$C_{max,u}$	unbound maximum (plasma) concentration	非結合型の最高 (血漿中) 濃度
CYP	cytochrome P450	シトクロム P450
EC_{50}	half maximal effective concentration	50%効果濃度
EEG	electroencephalography	脳波
E_{max}	maximum effect/potentiation	最大増強効果
F1		
FeSSIF	fed state simulated intestinal fluid	摂食時人工腸液
GABA	gamma-aminobutyric acid	γ-アミノ酪酸
$GABA_A$	gamma-amino butyric acid type A (receptor)	γ-アミノ酪酸 (GABA) のイオンチャネル型受容体 ($GABA_A$ 受容体)
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)
hERG	human ether-à-go-go related gene	ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子
HPβCD	hydroxypropyl-beta-cyclodextrin	ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン
IC_{50}	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
I_{gut}	-	消化管における濃度

Ki	inhibitory constant	阻害定数
MATE	multidrug and toxin extrusion	(有機カチオン/H+交換輸送体)
MRHD	maximum recommended human dose	最大推奨臨床用量
NAS	neuroactive steroid	神経活性ステロイド
NOAEL	non observed adverse effect level	無毒性量
OAT	organic anion transporter	有機アニオントランスポーター
OATP	organic anion transporting polypeptide	有機アニオントランスポーターポリペプチド
OCT	organic cation transporter	有機カチオントランスポーター
PAM	positive allosteric modulator	ポジティブアロステリックモジュレーター
P-gp	P-glycoprotein	P 糖タンパク質
PTZ	pentylenetetrazole	ペンチレンテトラゾール
PVP-VA	polyvinylpyrrolidone-vinyl acetate	ポリビニルピロリドン-酢酸ビニルコポリマー
QD	quaque die/ once daily	1 日 1 回
QTc	corrected QT interval	補正 QT 間隔
TBPS	tert-butylbicyclophosphorothionate	*t*-ブチルビシクロホスホロチオネート
TK	oxicokinetic	トキシコキネティクス
T_{max}	time to maximum (plasma) concentration	最高 (血漿中) 濃度到達時間
TRPV1	transient receptor potential cation channel subfamily V member 1	一過性受容体電位カチオンチャネルサブファミリーV メンバー1

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

脳では興奮性及び抑制性神経細胞により複数の脳領域を結ぶ神経ネットワークが形成されている．脳の高次機能 (認知，記憶，感情等) は，神経の興奮/抑制の均衡及び協調的な神経ネットワーク活動によって制御されている．うつ病の発症メカニズムは完全には解明されていないが，うつ病態時は神経の興奮/抑制の均衡及び神経ネットワーク活動の調節不全状態にあると考えられている [1-5]．そのため，神経ネットワーク活動の調節不全状態を改善することにより，うつ病に対する治療効果が得られると考えられる [6-8]．うつ病発症のメカニズムの一つであるモノアミン仮説では，脳内神経細胞終末での神経伝達物質であるノルアドレナリンやセロトニン等のモノアミン量の減少により神経伝達が低下することで，脳内の神経ネットワーク活動が調節不全状態になると考えられている [9]．そのため，既存の抗うつ薬は，モノアミンの再取り込み阻害作用や，モノアミンの自己受容体遮断作用により神経細胞間隙でのモノアミン量を増やすことで脳内の神経ネットワーク活動の調節不全状態の改善を図るものである．一方，うつ病態時には抑制性神経伝達物質である γ-アミノ酪酸 (GABA) 及び GABA 受容体の機能亢進作用を持つ神経活性ステロイドであるアロプレグラノロンの低下が報告されており [10]，GABA やアロプレグラノロン量を増やすことで，神経の興奮/抑制の均衡及び神経ネットワーク活動の調節不全状態が改善すると考えられる [10, 11]．ズラノロン (別名：S-812217，SGE-217, SGE-797 又は SGE-00797) は, Sage Therapeutics 社 (現 Supernus Pharmaceuticals, Inc.) によって開発され，2023 年 8 月に米国で産後うつに対する経口治療薬として承認された新規合成神経活性ステロイド (NAS) であり，日本においては塩野義製薬株式会社が導入，開発を行っている．ズラノロンの標的分子である GABA のイオンチャネル型受容体 ($GABA_A$ 受容体) はクロライドイオン透過型イオンチャネルであり，ヒト中枢神経系での抑制性神経伝達物質である GABA の結合によりクロライドイオンの透過を亢進させ，GABA 誘発電流を発生し神経の興奮/抑制の均衡及び神経ネットワーク活動を制御する．ズラノロンは，$GABA_A$ 受容体に対する選択的なポジティブアロステリックモジュレーター (PAM) であり，シナプス直下及びシナプス領域外に発現している $GABA_A$ 受容体での一過性及び持続性 GABA 誘発電流を増強する．$GABA_A$ 受容体の機能増強作用を介して，ズラノロンはうつ病態における神経の興奮/抑制の均衡及び神経ネットワーク活動を制御し，神経ネットワーク間の情報伝達の調節不全を改善することで，抗うつ効果を示すと考えられる．

非臨床試験では，薬理評価 (マウス及びラット) 及び毒性評価 (ラット，ウサギ及びイヌ) に一般的に用いられる動物を用いた．ヒトの血漿中総曝露の 1%以上を占める代謝物は，一般毒性試験で用いたラット又はイヌ，あるいはその両方で曝露が確認されており，代謝の面でもこれらの動物種で評価することは適切であると判断した．また，in vivo 試験の投与経路は，基本的に臨床予定投与経路である経口投与で実施し，一部の試験において静脈内投与及び腹腔内投与で実施した．ズラノロンは親油性 (LogP = 4.3) で，水に対する溶解性が低い (0.1 mg/mL 以下) ため (3.2.S.1.3 項参照)，ラットを用いる場合は 30% Labrasol (PEG-8 カプリル酸/カプリン酸グリセリド) 又は 2%ポリビニルピロリドン-酢酸ビニルコポリマー (PVP-VA)，イヌを用いる場合は 30% Kleptose® (ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン [HPβCD]) 又は 2% PVP-VA を媒

体として用いた.

効力を裏付ける試験として，in vitro 評価では，$GABA_A$ 受容体に対する結合親和性，複数の代表的なヒト $GABA_A$ 受容体サブタイプを介した GABA 誘発電流の増強作用，げっ歯類の脳スライス標本を用いた GABA 誘発電流の増強作用を評価した．げっ歯類の脳スライス標本を用いた評価では, GABA 誘発電流に対する急性作用 ($GABA_A$ 受容体に対する PAM としての作用) に加え持続性作用 (細胞膜上での $GABA_A$ 受容体発現に対する影響) も評価した．In vivo 評価では，ズラノロンのストレス誘発性うつモデルマウスでの抗うつ様作用，マウスペンチレンテトラゾール (PTZ) 誘発発作に対する抗痙攣作用，ラット難治性てんかん重積状態における抗痙攣作用，ラット脳波 (EEG) パワースペクトル解析，マウス及びラット高架式十字迷路試験並びにラット Vogel コンフリクト試験による抗不安様作用，ラットレセルピン誘発舌突出及び咀嚼様顎運動に対する抗口腔ジスキネジア作用，及びマウス自発運動量の低下並びに運動協調性障害による鎮静作用を評価した.

副次的薬理試験として，各種受容体/核内受容体，酵素，及びトランスポーターに対する阻害作用について評価した.

安全性薬理試験として，標準的なコアバッテリー試験である中枢神経系，呼吸系及び心血管系に及ぼす影響を評価した.

ズラノロンと他の $GABA_A$ 受容体ポジティブモジュレーターとの薬力学的相互作用試験として，in vitro 評価ではヒト $GABA_A$ 受容体発現細胞を用いた GABA 誘発電流の増強作用，in vivo 評価ではマウス PTZ 誘発発作に対する抗痙攣作用及びラットリチウム-ピロカルピン誘発てんかん重積状態モデルによる脳波パワースペクトル解析による併用効果を評価した.

薬物動態試験として，ズラノロンの吸収，分布，代謝，排泄及び薬物動態学的薬物相互作用について，毒性試験に用いた同一の動物種であるラット及びイヌを使用して in vitro 及び in vivo 評価を行った.

毒性試験として, ラットを用いた 26 週及びイヌを用いた 39 週までの反復経口投与毒性試験, 遺伝毒性試験 (不純物を含む), ラット, ウサギ及びマウスを用いた生殖発生毒性試験, 幼若ラット反復投与毒性試験，ラットを用いた 104 週及び rasH2 トランスジェニックマウスを用いた 26 週間反復投与がん原性試験及び in vitro 光毒性試験を実施した．ズラノロンの標的分子である $GABA_A$ 受容体は，薬物乱用リスクが報告されている受容体の一つであるため [12,13]，ラット依存性試験も実施した．主要な安全性薬理試験及び毒性試験は，Good Laboratory Practice (GLP) 適用下で実施した.

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

ズラノロンの標的分子である $GABA_A$ 受容体は，ヒト中枢神経系での抑制性神経伝達物質である GABA の結合によりクロライドイオンの透過を亢進させ，GABA 誘発電流を発生し神経の興奮/抑制の均衡及び協調的な神経ネットワーク活動を制御する．ズラノロンは $GABA_A$ 受容体に PAM として作用し，うつ病態時にみられる気分，不安及び睡眠に関与する脳の神経の興奮/抑制の均衡及び協調的な神経ネットワーク活動の調節不全を改善し，抗うつ作用を示すと考え

られる．

ズラノロンの $GABA_A$ 受容体に対する結合親和性について，ラット大脳皮質膜において [^{35}S]-*t*-ブチルビシクロホスホロチオネート (TBPS) の $GABA_A$ 受容体への結合阻害から評価した結果，その阻害定数 (Ki) は 3.9～6.0 nmol/L (1.6～2.5 ng/mL) であった．[^{14}C]-ズラノロンを用いて実施したヒトマスバランス試験で同定されたズラノロンの血漿中代謝物のうち 4 種 (M117 [SGE-02369], M125 [SGE-07672], M135 [SGE-03632] 及び M136 [SGE-03633]) について，$GABA_A$ 受容体への結合親和性を評価した．ラット大脳皮質膜における TBPS の $GABA_A$ 受容体への結合阻害の結果，代謝物 M117 の Ki は 140 nmol/L であり，ズラノロン (Ki: 3.9～6.0 nmol/L) と比較して 20 分の 1 以下であった．代謝物 M135 及び M136 の Ki はそれぞれ 2800 nmol/L 及び 2200 nmol/L であり，ズラノロンと比較して 360 分の 1 以下であった．代謝物 M125 は 10 μmol/L まで TBPS の $GABA_A$ 受容体への結合を阻害しなかった．

ヒト $GABA_A$ 受容体サブタイプにおける GABA 誘発電流に対するズラノロンの影響を in vitro にて検討した結果，ズラノロンは，評価した全てのシナプス直下及びシナプス領域外の $GABA_A$ 受容体サブタイプに対し PAM として作用を示した．GABA 誘発電流に対するズラノロンの最大増強効果 (E_{max}) 及び 50%効果濃度 (EC_{50}) は，代表的なシナプス直下のヒト $GABA_A$ 受容体サブタイプ ($\alpha_1\beta_2\gamma_2$) においてそれぞれ 1041%及び 374 nmol/L (153 ng/mL) であり，シナプス領域外のヒト $GABA_A$ 受容体サブタイプ ($\alpha_4\beta_3\delta$) においてはそれぞれ 639%及び 163 nmol/L (67 ng/mL) であった．ズラノロンがシナプス直下及びシナプス領域外の $GABA_A$ 受容体に対して PAM として作用を示したことは，ズラノロンを含む $GABA_A$ 受容体機能増強作用を有する NAS が αβ サブユニットに結合するという報告[14-17] とも一致する．ラットの代表的な 2 種類の脳領域 (歯状回顆粒細胞及び小脳顆粒細胞) 由来の神経細胞において，ズラノロン (0.3～3 μmol/L；123～1229 ng/mL) は，一過性 (シナプス直下の γ サブユニットを含む GABA 受容体が担う応答) 及び持続性 (シナプス領域外の δ サブユニットを含む $GABA_A$ 受容体が担う応答) の GABA 誘発電流を増強した．一方，γ サブユニットを含む $GABA_A$ 受容体に結合するベンゾジアゼピン系薬物は，γ サブユニットを含まないシナプス領域外の $GABA_A$ 受容体に結合できず，持続性 GABA 誘発電流に対する作用は限定的であるという報告があり [18]，ズラノロンを含む $GABA_A$ 受容体機能増強作用を有する NAS との $GABA_A$ 受容体調節作用様式の違いと考えられる．また，げっ歯類の神経細胞において，ズラノロン (1 μmol/L；410 ng/mL) を wash-out した後においても，一過性並びに持続性 GABA 誘発電流の増強作用が持続したことから，細胞膜上での $GABA_A$ 受容体の発現量増加が示唆された．この結果は，$GABA_A$ 受容体機能増強作用を有する NAS が，細胞膜上での $GABA_A$ 受容体の発現を増加させることで GABA 誘発電流を増強するという報告[19, 20] とも一致する．一方，ベンゾジアゼピン系薬物では，細胞膜上の $GABA_A$ 受容体の発現を減少させることが報告されており [21, 22]，ズラノロンを含む $GABA_A$ 受容体機能増強作用を有する NAS との $GABA_A$ 受容体調節作用様式の違いが示唆された．

In vivo 評価において，ズラノロンは $GABA_A$ 受容体機能増強作用を介した抗うつ様作用，並びに濃度依存的な抗痙攣作用，抗不安様作用及び鎮静作用を示した．ストレス誘発性うつモデルマウスにおいて，ズラノロンは投与 1 日目から抗うつ様作用を示し，その効果は 1 日 1 回の反復投与を継続した 7 日間において，投与 1, 3, 7 日目で認められた．この結果は，$GABA_A$ 受容

体機能増強作用を有するアロプレグラノロンをストレス誘発性うつモデルマウスに投与したときに，投与 1 日目から抗うつ様作用を示した報告 [25] とも一致する．また，本モデルにおいて，既存の抗うつ薬は数週間の反復投与後に抗うつ様作用を示す[23-25] ことから，ズラノロン及びアロプレグラノロンは即効性の抗うつ様作用を有すると考えられる．PTZ 誘発痙攣発作モデルマウスにおいて，ズラノロンは 74 ng/mL 以上の血漿中濃度で強直性痙攣の発現までの時間を延長し抗痙攣作用を示した．マウス及びラット高架式十字路迷路試験及びラット Voegel コンフリクト試験における不安様行動に対し，ズラノロンは 206～352 ng/mL の血漿中濃度で抗不安様作用を示した．マウスロータロッド試験による運動協調性に対する影響では，ズラノロンは 1515 ng/mL を超える血漿中濃度で運動協調性を低下させ，鎮静作用を示した．マウスオープンフィールド試験による自発運動量に対する影響では，ズラノロンは 1508 ng/mL を超える血漿中濃度で自発運動量を低下させ，鎮静作用を示した．また，ズラノロンは，ベンゾジアゼピン系薬物に感受性を示さない口腔ジスキネジア及び難治性てんかん重積状態のモデルラットにおいても抗ジスキネジア作用及び抗痙攣作用を示した．

ラット EEG パワースペクトラム解析において，ズラノロンは β 波帯域及び θ 波帯域の EEG パワー (脳の活動により生じる微弱な電気信号) の増強作用を示し，この作用は 245 ng/mL 以上の血漿中濃度で観察された．臨床及び非臨床の先行研究より，β 波増強作用は，$GABA_A$ 受容体に対する PAM のバイオマーカーとして知られている [26-29]. $GABA_A$ 受容体機能増強作用を有する NAS は，β 波の EEG パワーをベンゾジアゼピン系薬物よりも最大で 2～3 倍大きく増加させることができる．薬物動態/薬力学試験では，$GABA_A$ 受容体機能増強作用を有する NAS の血中濃度と β 波増強作用の相関性について，二相性の応答が認められ，ベンゾジアゼピン系薬物の単相性の相関性とは大きく異なることが報告されている [10, 30, 31]．また，ズラノロンは θ 波帯域の EEG パワーに対し増強作用を示した．$GABA_A$ 受容体に対する PAM 作用を持つ NAS は，θ 波帯域の EEG パワーを増強させることが報告されており，この作用はベンゾジアゼピン系薬物の作用とは異なるため，シナプス領域外の $GABA_A$ 受容体の調節と関連しているものと考えられる[10, 25, 30, 31].

NAS の抗うつ作用メカニズム仮説として，扁桃体基底外側部 (BLA) におけるシナプス領域外の δ サブユニット含有 $GABA_A$ 受容体の機能増強及び BLA の θ 活動増強の寄与が報告されている[10, 25, 32, 33]. ストレス誘発うつ病モデルマウスにおいて，$GABA_A$ 受容体に対する PAM である NAS (SGE-516 及びアロプレグナノロン) を投与すると，BLA の θ 活動増強及び抗うつ様作用が認められた．この BLA の θ 活動増強及び抗うつ様作用は，シナプス領域外の δ サブユニットを欠損させたマウスでは認められなかった．一方，ベンゾジアゼピン系薬剤であるジアゼパムの投与では，BLA の θ 活動増強は認められず，抗うつ様作用も認められなかった．BLA のβ活動については, SGE-516 やアロプレグナノロン及びジアゼパムによる増強が認められた．以上より，ズラノロンを含む $GABA_A$ 受容体機能増強作用を持つ NAS は，BLA のシナプス領域外の δ サブユニット含有 $GABA_A$ 受容体の機能増強及び BLA の θ 活動増強を惹起し，BLA を含む協調的な神経ネットワーク活動の調節不全を改善することで抗うつ作用を示すと考えられる．

さらに複数の $GABA_A$ 受容体機能増強作用を有する NAS の作用機序について，臨床試験における治療効果と紐づけるため，Sage 社は健康志願者を対象に臨床開発しているズラノロン及び

ブレキサノロン注射剤 (ZULRESSO®，アロプレグナノロン製剤) を用いた複数の EEG 試験を実施してきた．これまでに実施した全ての臨床 EEG 試験において，$GABA_A$ 受容体機能増強作用を持つ NAS の投与後に θ 波及び β 波帯域における EEG パワーの増強が濃度依存的に認められている [33]．非臨床試験結果と併せて，θ 波及び β 波帯域の EEG パワーの増強は，それぞれシナプス領域外及びシナプス直下の $GABA_A$ 受容体機能的増強作用に関係することが示唆された．

以上の結果より，シナプス直下の $GABA_A$ 受容体に結合するベンゾジアゼピン系薬物と異なり，ズラノロンは，シナプス直下及びシナプス領域外の $GABA_A$ 受容体を介した一過性及び持続性 GABA 誘発電流を増強することで，神経の興奮/抑制の均衡及び協調的な神経ネットワーク活動の調節不全を改善し，即効性の抗うつ作用を示すと考えられる．

2.4.2.2 副次的薬理試験

$GABA_A$ 受容体に対するズラノロンの選択性は，94 種の標的分子 (受容体/核内受容体：88 種，酵素：2 種，トランスポーター：4 種) を含む in vitro リガンド結合アッセイ及び機能アッセイで評価した．その結果，ズラノロンは $GABA_A$ 受容体に対し高い選択性を示した．$GABA_A$ 受容体への結合以外に，ズラノロンはシグマ受容体に対して結合活性 (10 µmol/L [4096 ng/mL] でのリガンド置換率は 87%～89%) を，一過性受容体電位カチオンチャネルサブファミリーV メンバー1 (TRPV1) に対し見かけ上の機能的アンタゴニスト活性 (50%阻害濃度 [IC_{50}] は 12 µmol/L [4915 ng/mL]) を，プレグナン X 受容体に対しアゴニスト活性 (10 µmol/L [4096 ng/mL] で 2.3 倍のアゴニスト活性) を示した．

これらの受容体で影響がみられた濃度 (10～12 µmol/L [4096～4915 ng/mL]) は，ズラノロンの申請用法用量での定常状態における非結合型の最高血漿中濃度 ($C_{max,u}$: 0.3360 ng/mL [母集団薬物動態解析での C_{max} の中央値：67.2 ng/mL 及びタンパク結合率: 99.5%より算出]) に対して 12 200～14 600 倍であり，治療曝露量でオフターゲットによる有害作用が生じるリスクは低いと判断した．

2.4.2.3 安全性薬理試験

安全性薬理コアバッテリー試験として，ズラノロンの中枢神経系，心血管系及び呼吸系に及ぼす影響を検討した．安全性薬理コアバッテリー試験の概要及び血漿中曝露量と申請用法用量でのヒト血漿中曝露量との比を表 2.4-1 に示す．

表 2.4-1 安全性薬理コアバッテリー試験の結果及び血漿中曝露量と申請用法用量での血漿中曝露量との比

試験種	投与量/適用濃度	特筆すべき所見	無影響量における血漿中曝露 (C_{max})	ヒト血漿中曝露との比 [a]
ラット中枢神経系	3, 10, 22.5 mg/kg	≥ 3 mg/kg：軽度な歩行異常，閉眼及び/又は正向反射の消失 22.5 mg/kg：覚醒レベルの低下，後肢の開脚幅の増加，熱刺激に対する反応潜時の増加 (痛覚反応の低下)，姿勢異常，自発運動の低下	< 40.6 ng/mL[b]	< 0.60
hERG アッセイ	0.1, 0.3, 1, 3 μmol/L	IC_{50} = > 3 μmol/L (1229 ng/mL)	-	> 3660
イヌ心血管系	0.4, 1, 2.5 mg/kg	≥ 1 mg/kg：収縮期血圧低下，平均血圧低下 (投与後 5 時間まで) 2.5 mg/kg：体温低下 (最大 3℃，投与後 2-16 時間)	102 ng/mL (無影響量：0.4 mg/kg)[c]	1.52
ラット呼吸系	3, 10, 22.5 mg/kg	≥ 3 mg/kg：1 回換気量増加 (概ね対照群比 20%未満)，分時換気量増加 (対照群比 10%未満) 22.5 mg/kg：呼吸数減少 (概ね対照群比 10%未満)	< 40.6 ng/mL[b]	< 0.60

C_{max} = 最高血漿中濃度; hERG = ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子; IC_{50} = 50%阻害濃度
a 母集団薬物動態解析における患者集団での C_{max}: 67.2 ng/mL (中央値) を基に計算 (2.7.2.3.3 項参照)，ただし，hERG アッセイについては非結合型濃度: 0.3360 ng/mL (タンパク結合率: 99.5%)で計算
b 無影響量は求められず，ラット 2 週間反復投与毒性試験時の 3 mg/kg 投与群の 1 日目の C_{max}
c イヌ 2 週間反復投与毒性試験時の 0.4 mg/kg 投与群の 1 日目の C_{max}

ラットにおける中枢神経系及び呼吸系試験，並びにイヌ心血管系試験において，ラットでは 3 mg/kg 以上 (C_{max}: 40.6 ng/mL 以上)，イヌでは 1 mg/kg 以上 (C_{max}: 266 ng/mL 以上) の用量のズラノロン投与により，$GABA_A$ 受容体を介した薬理作用に関連したと考えられる中枢神経系，呼吸系及び心血管系への影響が認められたが，オフターゲットによると考えられる影響は認められなかった．ズラノロンは $GABA_A$ 受容体への選択性が高く，治療曝露量でオフターゲットによる副作用が生じるリスクは低いと考えられた．

ズラノロンの標的分子である $GABA_A$ 受容体を介した所見と考えられる鎮静に関連した一般状態の変化及び体温低下は，一般毒性試験においても認められた．イヌ心血管系試験及び一般毒性試験で認められた心血管系への影響 (血圧低下，心拍数増加，心拍数増加による二次的な心電図パラメータの変化 (PR 間隔，RR 間隔及び QT 間隔の短縮) に関して，麻酔薬やアルファキサロンなどの $GABA_A$ 受容体モジュレーターでは，ヒトで鎮静/麻酔状態において血圧低下と血圧低下による代償性の心拍数増加が認められることが報告されている [34]．これらの薬剤はイヌにおいても血圧低下や心拍数の一時的な増加を引き起こすことが報告されている [35-37]．イヌにおいて心拍数増加が認められた時間帯は血圧低下が認められた時間帯と一致すること及び心血管系への影響が認められた用量では中等度以上の鎮静が認められたことから，イヌにおいて認められた血圧低下及び心拍数増加並びに心拍数増加による心電図パラメータへの影響は

いずれもズラノロンの薬理作用の過剰な発現による変化であると考えられた．

イヌ心血管系試験の無影響量における曝露量 (C_{max}：102 ng/mL) 及び最小影響量の曝露量 (C_{max}：266 ng/mL) は，申請用法用量でのヒト曝露量 (C_{max}：67.2 ng/mL，母集団薬物動態解析の中央値) と比較して 1.52 倍及び 3.96 倍であった．しかしながら，これまでに実施した臨床試験において，血圧低下，心拍数増加及び心電図パラメータの異常は認められておらず (2.7.4.2 項参照)，ヒトにおいてズラノロン投与に起因した血圧低下や心拍数増加並びにその二次的変化である心電図パラメータの異常が認められる可能性は低いと考えられた．

ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子 (hERG) 導入細胞におけるカリウム電流に対する作用試験において，ズラノロンは 1 及び 3 μmol/L の濃度において濃度依存的な阻害作用 (3 μmol/L で約 23%阻害) がみられたが，IC_{50} は 3 μmol/L (1229 ng/mL) を超える濃度と推定された．hERG チャネルに対する IC_{50} は，申請用法用量での定常状態における非結合型 C_{max} (母集団薬物動態解析の C_{max}：67.2 ng/mL [中央値] 及び血漿タンパク結合率：99.5%から算出) に対し約 3660 倍の乖離があった．また，GLP 非適用下で実施した心筋イオンチャンネル試験において，ズラノロンは 30 μmol/L (12 287 ng/mL) の濃度まで，評価したいずれの心筋イオンチャネル (Nav1.5，hERG，KCNQ1/minK，Cav1.2，Kv4.3/KChIP2.2，Kv1.5，Kir2.1 及び HCN2) に対しても 50%を超える阻害を示さなかった．イヌ心血管系試験において，最高用量である 2.5 mg/kg の用量 (C_{max}：674 ng/mL 相当) まで，いずれの心電図波形にもズラノロン投与による直接的な影響は認められなかった．これらの結果から，治療曝露量でヒトにおいて補正 QT 間隔 (QTc) 延長やその他の心電図パラメータ異常及び不整脈が生じるリスクは低いと考えられた．

2.4.2.4　　薬力学的薬物相互作用試験

$GABA_A$ 受容体には複数のモジュレーター結合部位が存在しているため，文献では異なるクラスの GABA 作動薬間における薬力学的薬物相互作用の可能性が報告されている [38-47]．このため，ズラノロンと他の GABA 作動性化合物 (ジアゼパム，プロポフォール又はペントバルビタール) との薬力学的薬物相互作用を検討した．In vitro でホールセルパッチクランプ法を用いて検討したところ，ズラノロンは，ジアゼパム及びペントバルビタールとは正の薬力学的薬物相互作用の可能性を示し，プロポフォールとは負の薬力学的薬物相互作用の可能性を示した．In vivo では，ズラノロンとジアゼパムを 2 種類のげっ歯類痙攣モデルに併用投与したところ，正の薬力学的薬物相互作用の可能性が認められた．217-CLP-116 臨床試験 (2.7.2.2.4.4 項参照) において，ベンゾジアゼピン系薬物であるアルプラゾラムをズラノロンと併用した際の神経認知機能への影響並びにズラノロン及びアルプラゾラムの体内動態への影響を検討した．その結果，ズラノロン及びアルプラゾラムの血漿中曝露は，それぞれの単独時と比較して変動はなく，薬物動態学的相互作用はみられなかった．一方，神経認知機能に関しては，ズラノロン及びアルプラゾラムの併用により，それぞれの単独投与時と比べ認知機能の低下がみられ，正の薬力学的薬物相互作用を示した．このため，GABA 作動薬を併用する際には注意が必要であると考えられる．

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 吸収

ズラノロンをマウス，ラット及びイヌに単回静脈内投与 (bolus) したときの血漿クリアランスは，マウス及びイヌでは肝血流量の 10%以下～28%，ラットでは肝血流量の 10%以下～57%であり，げっ歯類及びイヌにおいて，ズラノロンの定常状態分布容積は 1～3 L/kg であった．ズラノロンを溶液状態 (シクロデキストリン溶媒に溶解) で経口投与したときの絶対的バイオアベイラビリティは，マウスで 60% (10 mg/kg)，ラットで 32%～58% (3～20 mg/kg)，イヌで 68% (3.72 mg/kg)であった．ズラノロンをラットに 2～20 mg/kg の用量 (コポビドン懸濁液状態)で経口投与したときのバイオアベイラビリティは 18%～53%であった．経口投与後の最高血漿中濃度到達時間 (T_{max}) は，全ての動物種及び製剤を通じて約 1～8 時間であり，終末相消失半減期 ($t_{1/2}$) はげっ歯類で約 2～9 時間，イヌでは約 4～13 時間であった．

ラット及びイヌを用いた反復経口投与毒性試験におけるズラノロン (コポビドン, Labrasol 又は HPβCD 製剤のいずれか) のトキシコキネティクス (TK) 評価では，1 日 1 回反復経口投与したとき，いずれの動物種においてもズラノロンの血漿中曝露は，概ね用量比あるいは用量比以下で増大し，反復投与によるズラノロンの顕著な蓄積は認められなかった．マウス及びイヌではズラノロンの曝露量に性差は認められなかったが，ラットでは全身曝露量 (血漿中濃度–時間曲線下面積 [AUC] 及び C_{max}) に顕著な性差が認められ，雌では雄に比べてズラノロンのクリアランスが低く，曝露量が高かった．妊娠ラットにおける血漿中ズラノロンの TK パラメータは，同様の用量を投与した成熟ラットで報告された TK パラメータと概ね同程度であった．幼若雄性ラットにおけるズラノロンの曝露量 (AUC 及び C_{max}) は，成熟雄性ラットに 1 日 1 回反復経口投与したときと同程度であった．生後 7 日及び生後 20 日における曝露量に性差は認められなかったが，生後 34/35 日では，成熟ラットと同様，雌の AUC は雄に比べて高かった．

2.4.3.2 分布

ズラノロンの血漿タンパク結合率は，マウス，ラット，イヌ及びヒトにおいて約 99%であり，種差は認められなかった．また，血中の細胞成分への選択的な分布は認められなかった．ズラノロンを経口投与後のマウス及びラットの血漿に対する脳の AUC 比は，それぞれ 1.4 及び 3.2～3.8 と，血液脳関門を透過することが示された．血漿及び脳中濃度の T_{max} 及び $t_{1/2}$ は概ね同程度であり，脳中濃度は血漿中濃度とパラレルに推移していることが確認された．雌雄のアルビノラット及び雄性有色ラットを用いた定量的全身オートラジオグラフィ試験において，[^{14}C]-ズラノロンに関連した放射能は，組織及び臓器に広く分布した．最高組織中放射能濃度は概ね投与 4～8 時間後に観察され，排泄に関与する組織 (肝臓や腎臓) で高い放射能濃度が確認された．有色ラットにおける分布はアルビノラットに類似し，[^{14}C]-ズラノロンに関連した放射能のメラニン含有組織への選択的な結合は認められなかった．

2.4.3.3 代謝

ヒト，イヌ及びラットの凍結肝細胞を用いてズラノロンの代謝プロファイルを確認したところ，種差は認められなかった．雌雄のマウス，ラット及びイヌに [^{14}C]-ズラノロンを単回経口投

与 (投与量 : マウス 5，雄ラット 10, 雌ラット 1.5，及びイヌ 1 mg/kg) した後の血漿中代謝物を検討した結果，主な成分は未変化のズラノロンであったが，その他多くの代謝物が検出され，広範に代謝を受けることが確認された．また，げっ歯類では代謝プロファイルに性差が認められた．ラット及びイヌの尿，糞及び胆汁の代謝物を検討した結果，ラットにおけるズラノロンの主要な消失経路は酸化的代謝であり，イヌではズラノロンは未変化体の腎及び糞中排泄並びに代謝を含む複数の経路により排泄されることが示された．ヒトに[^{14}C]-ズラノロンを単回経口投与した後の血漿中代謝物を検討した結果，主な代謝経路は，ステロイド基の水酸化，シアノピラゾール基の酸化，並びに二次的な硫酸酸抱合及びグルクロン酸抱合であり，ほとんどの代謝物は複数の代謝反応を経たものであった．広く代謝を受けるものの，ズラノロン関連の血漿中総曝露量の 10%を超える代謝物は検出されなかったことから，毒性評価が必要なヒト代謝物はないと判断した．ヒトとラット又はイヌの代謝を比較評価したところ，ヒトの血漿中総放射能の 1%を超える血漿中代謝物の全ては，ラット及び/又はイヌの血漿中でも検出されていることが確認された．選択的シトクロム P450 (CYP) 阻害剤を用いてヒトでのズラノロンの代謝に関与する CYP 分子種を検討した結果，ズラノロンの代謝には主に CYP3A が関与することが示された．ヒト in vivo 代謝物検索試験では，単回及び複数回の酸化を受けた代謝物が多く認められ，さらに二次的なグルクロン酸抱合や硫酸抱合を受けた代謝物も認められたため，ズラノロンの代謝には CYP3A 以外にも複数の代謝酵素が関与するものと推定された．

2.4.3.4 排泄

ズラノロンの排泄については，[^{14}C]-ズラノロンを投与したラット及びイヌを用いて検討した．ラットでは，ズラノロン由来の放射能の主な消失経路は糞中 (投与量の 76.9%～85.7%) であり，尿中排泄は少なかった (投与量の 9.08%～15.2%)．胆管カニュレーションを施したラットでは，ズラノロン由来の放射能は主に胆汁中に排泄された (投与量の 81.6%～83.0%)ことから，ラットにおける主排泄経路は胆汁を介した糞中排泄であると考えられた．

イヌにおける排泄経路はラットと同様であり，ズラノロン由来の放射能の主な消失経路は糞中排泄 (投与量の 54.9%～68.3%) であった．

2.4.3.5 薬物動態学的相互作用

ズラノロンが併用薬の体内動態を変化させる可能性について，ズラノロンの CYP 阻害及び誘導，並びにトランスポーター阻害作用，加えてズラノロン代謝物の CYP 阻害に関する in vitro 試験結果を踏まえて検討した．

In vitro 試験においてズラノロンの CYP (CYP1A2，CYP2B6，CYP2C8，CYP2C9，CYP2C19，CYP2D6 及び CYP3A) 阻害能を評価した結果，ズラノロンはいずれの CYP 酵素に対しても時間依存的又は代謝依存的な阻害作用を示さなかったものの，CYP2C8 (IC_{50} : 14 µmol/L) 及び CYP3A (IC_{50} : 16 µmol/L [ミダゾラム], 29 µmol/L [テストステロン]) に対し可逆的阻害を示した．この結果を踏まえ，本邦の薬物相互作用ガイドライン [48], FDA ガイダンス [49] 及び EMA ガイドライン [50] に従い，申請用法用量である 30 mg を 1 日 1 回反復投与したときの母集団解析から得た C_{max} の中央値及び血漿タンパク結合率を基に，ズラノロンが各基質薬の血漿中濃度

に及ぼす影響を考察した (表 2.4-2). その結果，いずれの CYP 分子種に対して AUC 比は 1.25 よりも低く，ズラノロンは申請用法用量で CYP 酵素の阻害を介して薬物相互作用を引き起こす可能性は低いと考えられた.

表 2.4-2　　ズラノロンによる各 CYP 阻害作用のまとめ

CYP isoform	可逆阻害		AUC 比 [c]	臨床 DDI 試験の必要性 (AUC 比>1.25)
	IC_{50} (μmol/L)	Ki (μmol/L)[a,b]		
CYP1A2	>3	>1.5	1.01	No
CYP2B6	>20	>10	1.00	No
CYP2C8	14	7	1.00	No
CYP2C9	>3	>1.5	1.01	No
CYP2C19	>3	>1.5	1.01	No
CYP2D6	>3	>1.5	1.01	No
CYP3A (Midazolam)	16	8	1.17	No
CYP3A (Testosterone)	29	14.5	1.10	No

AUC = area under the concentration-time curve; CYP = cytochrome P450; DDI = drug-drug interaction; IC_{50} = 50% inhibitory concentration.; Ki = inhibition constant
a　Ki estimated (IC_{50}/2)
b　If half-maximal inhibition was not reach and no IC_{50} value determined, a conservative estimate of potency was used (one-half of the top concentration for Ki)
c　Estimated using the following parameters: Imax = 67.2 ng/mL ; fu plasma = 0.01
AUC Ratio were calculated using fm_{CYP} (contribution ratio of CYP on clearance) as follows;
CYP3A (fm_{CYP}=0.93, Fg = 0.57 based on midazolam) [51], the other CYP isoform (fm_{CYP} =1, Fg = 1).

In vitro 試験においてズラノロンの CYP (CYP1A2，CYP2B6 及び CYP3A4) 誘導能を評価した結果，CYP2B6 及び CYP3A4 の mRNA 発現及び/又は酵素活性を誘導する可能性が示された. そのため，CYP2B6 及び CYP3A4 の誘導能については，217-CLP-102 臨床試験を実施した結果，臨床的に意味のある CYP2B6 又は CYP3A4 の誘導作用は認められなかった (2.7.2.2.4.1 項参照).

ズラノロンの P-糖タンパク質 (P-gp)，breast cancer resistance protein (BCRP)，有機アニオントランスポーターポリペプチド (OATP)1B1, OATP1B3, 有機カチオントランスポーター (OCT)1, OCT2，有機アニオントランスポーター (OAT)1，OAT3，multidrug and toxin extrusion (MATE)1, MATE2-K 及び bile salt export pump (BSEP) に対する阻害作用を in vitro 試験で評価した結果，ズラノロンはいずれのトランスポーターに対しても，評価した濃度範囲で 50%以上の阻害を示さなかった. この結果を踏まえ，本邦の薬物相互作用ガイドライン [48], FDA ガイダンス [49] 及び EMA ガイドライン [50] に従い，申請用法用量である 30 mg を 1 日 1 回反復投与したとき母集団薬物動態解析から得た C_{max} の中央値及び血漿タンパク結合率を基に，ズラノロンが各基質薬の血漿中濃度に及ぼす影響を考察した (表 2.4-3). なお，P-gp 及び BCRP の阻害作用を考察する際に用いる消化管における濃度 (I_{gut}) は，通常総投与量を 250 mL の液体内容物で除して算出する. しかし，ズラノロンの摂食時人工腸液 (FeSSIF) における最大溶解度は [redacted] μg/mL ([redacted] μmol/L) であり (モジュール 3.2.S.1.3 参照)，申請用量である 30 mg のズラノロンは 250 mL の腸液には完全には溶解しないと考えられるため，I_{gut} を FeSSIF における最大溶解度と仮定した. また，P-gp 及び BCRP は，阻害評価した最高濃度 (6.3 μmol/L) において 50%以上の阻害は示さなかったが，保守的に IC_{50} を 6.3 μmol/L として判定値を計算し，ズラノロンの P-gp 及び

BCRP の阻害能を介した相互作用リスクを評価した．その結果，カットオフ値である 10 よりも低い[redacted] と算出され，ズラノロンが P-gp 又は BCRP の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．その他のトランスポーターに関して，判定式より求めた値はいずれもカットオフ値より低い値であったため，これらのトランスポーターの阻害を介した薬物相互作用を引き起こす可能性も低いと考えられた．

表 2.4-3　　ズラノロンによる各トランスポーター阻害作用のまとめ

Transporters	IC_{50} (μmol/L)	Cutoff value	Value	臨床 DDI 試験の必要性
P-gp	> 6.3	$I_{gut}/IC_{50} \geq 10$	[redacted][a]	No
BCRP	> 6.3	$I_{gut}/IC_{50} \geq 10$	[redacted][a]	No
OATP1B1	> 3	$1 + [I]_h/IC_{50} \geq 1.1$	1.00	No
OATP1B3	> 2.5	$1 + [I]_h/IC_{50} \geq 1.1$	1.00	No
OCT1	> 2.5	本邦の薬物相互作用ガイドライン，FDA: No criterion	-	-
		EMA: $[I]_h/IC_{50} \geq 0.04$	0.004	No
OCT2	> 2.5	$1 + C_{max,u}/IC_{50} \geq 1.1$	1.00	No
OAT1	> 2.5	$1 + C_{max,u}/IC_{50} \geq 1.1$	1.00	No
OAT3	> 3	$1 + C_{max,u}/IC_{50} \geq 1.1$	1.00	No
MATE1	> 2.5	$1 + C_{max,u}/IC_{50} \geq 1.02$	1.00	No
MATE2-K	> 2.5	$1 + C_{max,u}/IC_{50} \geq 1.02$	1.00	No
BSEP	> 3	本邦の薬物相互作用ガイドライン，FDA: No criterion	-	-
		EMA: $C_{max,u}/IC_{50} \geq 0.02$	0.001	No

BCRP = breast cancer resistance protein; BSEP = bile salt export pump; DDI = drug-drug interaction; IC_{50} = 50% inhibitory concentration;MATE = multidrug and toxin extrusion transporter; OAT = organic anion transporter; OATP = organic anion transporting polypeptide; OCT = organic cation transporter; P-gp = P-glycoprotein

a　value was calculated based on the maximum solubility concentration on FeSSIF ([redacted] μg/mL [[redacted] μmol/L]) and IC_{50}.

ヒトマスバランス試験で同定されたズラノロンの血漿中代謝物のうち 4 種 (M117 [SGE-02369]，M125 [SGE-07672]，M135 [SGE-03632] 及び M136 [SGE-03633]) に対し，in vitro CYP 阻害能及び薬物相互作用の可能性について，本邦の薬物相互作用ガイドライン [48]，FDA ガイダンス [49] に従い，考察した．その結果，いずれの代謝物においても CYP 酵素の可逆的阻害を介して薬物相互作用を引き起こす可能性は低いと考えられた．また，M135 及び M136 では CYP3A に対する代謝依存的阻害を示したが，217-CLP-102 臨床試験の結果，CYP3A 基質薬のシンバスタチンの体内動態が変化することはなく，ズラノロン及び代謝物による CYP3A 基質に対する臨床薬物相互作用がないことが確認された(2.7.2.2.4.1 項参照).

表 2.4-4 M117 (SGE-02369) による各 CYP 阻害作用のまとめ

CYP isoform	可逆阻害		AUC 比 [c]	臨床 DDI 試験の必要性 (AUC 比>1.25)
	IC_{50} (µmol/L)	Ki (µmol/L)[a,b]		
CYP1A2	>10	> 5	1.00	No
CYP2B6	>10	> 5	1.00	No
CYP2C8	6.3	3.15	1.00	No
CYP2C9	>10	> 5	1.00	No
CYP2C19	>10	> 5	1.00	No
CYP2D6	>10	> 5	1.00	No
CYP3A (Midazolam)	>10	> 5	1.00	No
CYP3A (Testosterone)	>10	> 5	1.00	No

AUC = area under the concentration-time curve; CYP = cytochrome P450; DDI = drug-drug interaction; IC_{50} = 50% inhibitory concentration.; Ki = inhibition constant

a Ki estimated (IC_{50}/2)

b If half-maximal inhibition was not reach and no IC_{50} value determined, a conservative estimate of potency was used (one-half of the top concentration for Ki)

c Estimated using the following parameters: Imax = 71.3 ng/mL (refer to Table 2.6.4.5-6) ; fu plasma = 0.01

AUC Ratio were calculated using fm_{CYP} (contribution ratio of CYP on clearance) as follows;

CYP3A (fm_{CYP}=0.93, Fg = 0.57 based on midazolam) [51], the other CYP isoform (fm_{CYP} =1, Fg = 1).

表 2.4-5 M135 (SGE-03632) による各 CYP 阻害作用のまとめ

CYP isoform	可逆阻害		AUC 比 [c]	臨床 DDI 試験の必要性 (AUC 比>1.25)
	IC_{50} (µmol/L)	Ki (µmol/L)[a,b]		
CYP1A2	>15	> 7.5	1.00	No
CYP2B6	14	7	1.00	No
CYP2C8	3.9	1.95	1.00	No
CYP2C9	>15	> 7.5	1.00	No
CYP2C19	13	6.5	1.00	No
CYP2D6	0.43	0.215	1.03	No
CYP3A (Midazolam)	>15	> 7.5	1.00	No
CYP3A (Testosterone)	>15	> 7.5	1.00	No

AUC = area under the concentration-time curve; CYP = cytochrome P450; DDI = drug-drug interaction; IC_{50} = 50% inhibitory concentration.; Ki = inhibition constant

a Ki estimated (IC_{50}/2)

b If half-maximal inhibition was not reach and no IC_{50} value determined, a conservative estimate of potency was used (one-half of the top concentration for Ki)

c Estimated using the following parameters: Imax = 53.6 ng/mL (highest value in estimated C_{max} of M135 in 2.6.5.9.5); fu plasma = 0.05

AUC Ratio were calculated using fm_{CYP} (contribution ratio of CYP on clearance) as follows;

CYP3A (fm_{CYP}=0.93, Fg = 0.57 based on midazolam) [51], the other CYP isoform (fm_{CYP} =1, Fg = 1).

表 2.4-6 M136 (SGE-03633) による各 CYP 阻害作用のまとめ

CYP isoform	可逆阻害		AUC 比 [c]	臨床 DDI 試験の必要性 (AUC 比>1.25)
	IC_{50} (µmol/L)	Ki (µmol/L)[a,b]		
CYP1A2	>15	> 7.5	1.00	No
CYP2B6	>15	> 7.5	1.00	No
CYP2C8	8.9	4.45	1.00	No
CYP2C9	>15	> 7.5	1.00	No
CYP2C19	>15	> 7.5	1.00	No
CYP2D6	>15	> 7.5	1.00	No
CYP3A (Midazolam)	>15	> 7.5	1.00	No
CYP3A (Testosterone)	>15	> 7.5	1.00	No

AUC = area under the concentration-time curve; CYP = cytochrome P450; DDI = drug-drug interaction; IC_{50} = 50%

inhibitory concentration.; Ki = inhibition constant
a Ki estimated (IC_{50}/2)
b If half-maximal inhibition was not reach and no IC_{50} value determined, a conservative estimate of potency was used (one-half of the top concentration for Ki)
c Estimated using the following parameters: Imax = 64.2 ng/mL (highest value in estimated C_{max} of M136 in 2.6.5.9.5); fu plasma = 0.048
AUC Ratio were calculated using fm_{CYP} (contribution ratio of CYP on clearance) as follows;
CYP3A (fm_{CYP}=0.93, Fg = 0.57 based on midazolam) [51], the other CYP isoform (fm_{CYP} =1, Fg = 1).

以上に示すとおり，in vitro 薬物相互作用試験及びズラノロンの臨床薬物相互作用試験の結果から，ズラノロンの申請用法用量では，ズラノロン及びその代謝物が併用薬の体内動態へ影響を及ぼす可能性は低いと考えられた．

併用薬によりズラノロンの体内動態が影響を受ける可能性を評価するため，ズラノロンの代謝酵素の同定及びトランスポーターの基質評価を in vitro 試験で実施した．

ヒトマスバランス試験の結果より，ズラノロンの代謝は主に酸化であり，二次的なグルクロン酸抱合及び硫酸抱合も確認された．ズラノロンの酸化は主に CYP3A によって行われ，程度は低いものの CYP2C8，CYP2C9 及び CYP2B6 の寄与も考えられた．217-CLP-106 臨床試験において，強い CYP3A 誘導薬であるリファンピシン及び強い CYP3A 阻害薬であるイトラコナゾールを併用した際のズラノロンの体内動態への影響を検討した．その結果，ズラノロン単独投与時と比較して，リファンピシン併用時のズラノロンの C_{max} 及び時間 0 から無限大時間までの血漿中濃度–時間曲線下面積 ($AUC_{0\text{-}inf}$) はそれぞれ 0.31 倍及び 0.15 倍に低下し，イトラコナゾール併用時のズラノロンの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}inf}$ は 1.25 倍及び 1.62 倍に増加した．強い CYP3A 阻害薬及び強い CYP3A 誘導薬との併用によりズラノロンの体内動態は影響を受けることが示された (2.7.2.2.4.2 項参照).

ズラノロンは OATP1B1，OATP1B3，P-gp 及び BCRP の基質ではなかったことから，これらのトランスポーターに対する阻害剤の併用がズラノロンの体内動態に及ぼす影響はないと考えられた．

2.4.4 毒性試験

2.4.4.1 単回投与毒性試験

ズラノロンの急性毒性は，ラット 5 日間反復経口投与毒性試験の投与初日の成績並びに GLP 非適用下で実施したラット及びイヌ単回経口投与毒性試験，イヌ 7 日間反復投与毒性試験の投与初日の成績をもとに評価した．

雄性ラットを用いた 5 日間反復経口投与毒性試験 (投与量 : 30，45，60 及び 100 mg/kg/日) において，45 mg/kg/日投与群で投与初日に死亡例が認められた．GLP 非適用下で実施したラットを用いた単回経口投与毒性試験 (雄の投与量 : 20, 25, 30, 35 及び 40 mg/kg，雌の投与量 : 2.5, 4, 5, 7.5 及び 10 mg/kg) では，5 mg/kg 以上の投与群の雌で瀕死例が認められたが，雄には死亡/瀕死例は認められなかった．全投与群において，鎮静，自発運動の低下，接触及び/又は音に対する反応性亢進，ミオクローヌス，振戦，眼球突出，姿勢を立て直すことができない状態及び/又は身体緊張の消失などが認められた．これらの結果を基に，ラットの概略の致死量は雄で 45 mg/kg，雌では 5 mg/kg と判断した (表 2.4-7).

表 2.4-7　　ラット概略の致死量でのズラノロンの曝露量及び臨床との曝露比

Study	Gender	Dose (mg/kg)	AUC (ng·hr/mL)	C_{max} (ng/mL)	Animal to Human Ratio	
					AUC[b]	C_{max}[b]
Repeated-dose (5 days)	Male	45	8010[a]	568[a]	8.49	8.45
Single-dose	Female	5	10 200	710	10.8	10.6

AUC = area under the plasma concentration-time curve; C_{max} = maximum plasma concentration
a: Systemic exposure (AUC and C_{max}) on Day1 of dosing in the 45 mg/kg/day group of rat 5-day repeated-dose toxicity study
b: Systemic exposure of zuranolone in Japanese subjects after administration of zuranolone at 30 mg QD based on the population pharmacokinetic analysis: $AUC_{0-\tau}$: 943.7 ng·hr/mL, C_{max}: 67.2 ng/mL

GLP 非適用下で実施したイヌ単回経口投与毒性試験 (投与量 : 1，1.5，2，2.5 及び 3 mg/kg) では，死亡/瀕死は認められなかった．1 mg/kg 以上の投与群で鎮静及び関連する一般状態の変化である平衡感覚の異常，自発運動の低下，振戦，半眼/閉眼 (両眼)，接触及び音に対する反応性亢進及び身体緊張の消失が認められた．GLP 非適用下で実施した雄性イヌを用いた 7 日間反復経口投与毒性試験 (投与量 : 3.5 mg/kg/日) の投与初日において，死亡/瀕死は認められなかったが，重度の鎮静，運動失調，自発運動の低下，側臥位/腹臥位，半眼/閉眼，意識消失，攣縮，振戦，パドリング，筋緊張亢進/低下，非持続性痙攣，呼吸数低下/増加及び体温低下などが認められた．これらの結果を基に，イヌの概略の致死量は雄では 3.5 mg/kg，雌では 3 mg/kg を超える量と判断した (表 2.4-8).

表 2.4-8　　イヌ概略の致死量でのズラノロンの曝露量及び臨床との曝露比

Study	Gender	Dose (mg/kg)	AUC (ng·hr/mL)	C_{max} (ng/mL)	Animal to Human Ratio	
					AUC[b]	C_{max}[b]
Repeated-dose (7 days)	Male	3.5	13 802[a]	1067[a]	14.6	15.9
Single-dose	Female	> 3	> 9620	> 764	> 10.2	> 11.4

AUC = area under the plasma concentration-time curve; C_{max} = maximum plasma concentration
a: Systemic exposure (AUC and C_{max}) on Day1 of dosing in the 3.5 mg/kg/day group of dog 7-day repeated-dose toxicity study
b: Systemic exposure of zuranolone in Japanese subjects after administration of zuranolone at 30 mg QD based on the population pharmacokinetic analysis: $AUC_{0-\tau}$: 943.7 ng·hr/mL, C_{max}: 67.2 ng/mL

2.4.4.2　　反復投与毒性試験

ラット 2 週間反復経口投与毒性試験 (雄の投与量 : 3，10 及び 22.5 mg/kg/日，雌の投与量 : 1，3 及び 8 mg/kg/日) において，雄は 10 mg/kg/日以上，雌は 8 mg/kg/日の用量でズラノロンの薬理作用の過剰発現に起因したと考えられる鎮静が認められた．鎮静の程度や持続時間には用量依存性が認められ，鎮静の程度や持続時間は反復投与によって軽減した．8 mg/kg/日投与群 (TK 群) の雌 1 例で死亡がみられた以外に毒性所見は認められず，無毒性量 (NOAEL) は雄で 22.5 mg/kg/日，雌では 3 mg/kg/日と判断した．

ラット 13 週間反復経口投与毒性試験 (雄の投与量 : 0.8，2.5，8 及び 30 mg/kg/日，雌の投与量 : 0.15，0.5，1.5 及び 5 mg/kg/日) において，雄の 0.8 mg/kg/日投与群を除き，全用量でズラノロンの薬理作用の過剰発現に起因したと考えられる鎮静が認められた．鎮静の程度や持続時間には用量依存性が認められ，鎮静の程度や持続時間は反復投与によって軽減した．5 mg/kg/日投

与群の雌 1 例において重度の鎮静に起因した死亡が認められた以外には毒性所見は認められず，NOAEL は雄では 30 mg/kg/日，雌では 1.5 mg/kg/日と判断した．

ラット 26 週間反復経口投与毒性試験 (雄の投与量：3，10 及び 30 mg/kg/日，雌の投与量：0.5，1.5 及び 5 mg/kg/日) において，雄の 10 mg/kg/日以上及び雌の 1.5 mg/kg/日以上の用量でズラノロンの薬理作用の過剰発現に起因したと考えられる鎮静が認められた．鎮静の程度や持続時間には用量依存性が認められ，鎮静の程度や持続時間は反復投与によって軽減した．30 mg/kg/日投与群 (TK 群) の雄 1 例において重度の鎮静に起因した死亡が認められた以外に毒性所見は認められず，NOAEL は雄で 10 mg/kg/日，雌で 5 mg/kg/日と判断した．

イヌ 2 週間反復経口投与毒性試験 (投与量：0.4，1 及び 2.5 mg/kg/日) において，全用量でズラノロンの薬理作用の過剰発現に起因したと考えられる鎮静がみられた．鎮静の程度，発現頻度や持続時間には用量依存性が認められた．ズラノロンの薬理作用に関連した変化以外の所見は認められず，NOAEL は 2.5 mg/kg/日と判断した．

イヌ 13 週間反復経口投与毒性試験 (投与量：0.06，0.2，0.6 及び 2 mg/kg/日) において，全用量でズラノロンの薬理作用の過剰発現に起因したと考えられる鎮静が認められた．鎮静の程度や持続時間には用量依存性が認められた．2 mg/kg/日投与群の雄 1 例において，投与 61 日目の投与前に退薬症候によると考えられる死亡が認められたため，NOAEL は 0.6 mg/kg/日と判断した．

イヌ 39 週間反復経口投与毒性試験 (投与量：0.6，1.2 及び 2.5 mg/kg/日) において，全用量でズラノロンの薬理作用の過剰発現に起因したと考えられる鎮静が認められた．鎮静の程度，発現頻度や持続時間には用量依存性が認められた．2.5 mg/kg/日投与群の雌 2 例において，それぞれ投与 30 日目の投与前及び休薬 3 日目に退薬症候と考えられる死亡/瀕死が認められたため，NOAEL は 1.2 mg/kg/日と判断した．

イヌ 29 又は 44 週間の間歇経口投与毒性試験 (投与量：1.2 及び 2.5 mg/kg/日 [29 週間間歇経口投与毒性試験は 14 日間の投与期間と 21 日間の休薬期間を 1 サイクルとして合計 6 サイクルで構成，44 週間間歇経口投与毒性試験では 14 日間の投与期間と 42 日間の休薬期間を 1 サイクルとして合計 6 サイクルで構成]) において，全ての用量でズラノロンの薬理作用の過剰な発現に起因したと考えられる鎮静が認められ，鎮静の程度，発現頻度及び持続時間には用量依存性が認められた．2.5 mg/kg/日投与群の雌雄各 1 例において，1 サイクル目の休薬期間中 (それぞれ休薬 2 日目及び休薬 4 日目) に退薬症候によると考えられる死亡又は瀕死が認められ，NOAEL は 1.2 mg/kg/日と判断した．退薬症候を含めいずれの一般状態の変化についても，投与サイクル間の休薬期間の違いによる影響は認められなかった．

ラット及びイヌ反復経口毒性試験での NOAEL における血漿中曝露量 (C_{max} 及び AUC) 並びに申請用法用量である 30 mg を 1 日 1 回 (QD) 反復投与したときの母集団薬物動態解析から得たヒト血漿中曝露量 (C_{max} 及び投与間隔における血漿中濃度-時間曲線下面積 [$AUC_{0-\tau}$]) との比を表 2.4-9 に示す．

表 2.4-9 ズラノロンの反復経口投与毒性試験における無毒性量とズラノロンの血漿中曝露量及び臨床との曝露比

Study Duration	Species	NOAEL (mg/kg/day)	AUC (ng·hr/mL)	C_{max} (ng/mL)	Animal to Human Ratio[a]	
					AUC	C_{max}
2 weeks	Rat	22.5 (M)	5050 (M)	502 (M)	5.35 (M)	7.47 (M)
		3 (F)	5270 (F)	392 (F)	5.58 (F)	5.83 (F)
13 weeks	Rat	30 (M)	4340 (M)	393 (M)	4.60 (M)	5.85 (M)
		1.5 (F)	3190 (F)	218 (F)	3.38 (F)	3.24 (F)
26 weeks	Rat	10 (M)	4560 (M)	350 (M)	4.83 (M)	5.21 (M)
		5 (F)	7590 (F)	564 (F)	8.04 (F)	8.39 (F)
2 weeks	Dog	2.5	11 100	731	11.8	10.9
13 weeks	Dog	0.6	1980	165	2.10	2.46
39 weeks	Dog	1.2	6400	409	6.78	6.09
29 or 44 weeks	Dog	1.2	4210	321	4.46	4.78

AUC = area under the plasma concentration-time curve; C_{max} = maximum plasma concentration; F = female; M = male; NOAEL = no observed adverse effect level.

a Systemic exposure of zuranolone in Japanese subjects after administration of zuranolone at 30 mg QD based on the population pharmacokinetic analysis: $AUC_{0-\tau}$: 943.7 ng·hr/mL, C_{max}: 67.2 ng/mL

ズラノロンの投与に関連して認められた主要な用量制限因子は鎮静であった．鎮静は，ズラノロンの標的分子である $GABA_A$ 受容体を介した薬理作用の過剰発現による予想される作用であり，同様の作用機序を有する他の天然及び合成 NAS でも認められている [52]．鎮静や鎮静に関連した一般状態の変化は，ラット及びイヌを用いた全ての毒性試験及び安全性薬理試験において認められた．鎮静の程度及び持続時間には概ね用量依存性が認められ，反復投与により所見の軽減や休薬による回復性が認められた．

非臨床試験における鎮静の評価は，4 段階尺度 (正常，軽度，中等度，重度) で評価した．ラット及びイヌを用いた主要な毒性試験の結果から，定常状態のズラノロンの血漿中曝露量と鎮静の程度の関係性，並びに申請用量用法におけるヒト C_{max} 及び $AUC_{0-\tau}$(それぞれ 67.2 ng/mL 及び 943.7 ng·hr/mL) に対する曝露比を表 2.4-10 に示した．

表 2.4-10　　ラット及びイヌを用いた主要な毒性試験における鎮静の曝露量-反応関係と鎮静のみられた曝露量と臨床曝露量との比

Sedation Descriptor	Characteristics	Rat[a]		Dog[b]	
		C_{max} Range (ng/mL)	AUC Range (ng·hr/mL)	C_{max} Range (ng/mL)	AUC Range (ng·hr/mL)
Normal	All functions are normal, unless altered directly by the experimental procedure.	33 – 168 (0.49-2.50)[c]	226 – 1950 (0.24-2.07)[c]	17 – 118 (0.25-1.76)[c]	193 – 1690 (0.20-1.79)[c]
Mild	Animal is conscious and has positional control/righting reflex intact and is able to move to food and water but may still show signs of sedation such as drowsiness, ataxia, or decreased activity.	79 – 295 (1.18-4.39)[c]	1230 – 4060 (1.30-4.30)[c]	55 – 190 (0.82-2.83)[c]	618 – 2490 (0.65-2.64)[c]
Moderate	Animal is semi-conscious, and all reflexes are present, but animal may not be able to control body position	266 – 564 (3.96-8.39)[c]	2820 – 7590 (2.99-8.04)[c]	165 – 409 (2.46-6.09)[c]	1980 – 6400 (2.10-6.78)[c]
Severe	Animal is unconscious and in lateral recumbency. Some reflexes are still diminished or absent	411 – 921 (6.12-13.7)[c]	6110 – 12 900 (6.47-13.7)[c]	304 – 731 (4.52-10.9)[c]	4100 – 11 100 (4.34-11.8)[c]

AUC = area under the plasma concentration-time curve; C_{max} = maximum plasma concentration.
a　Aggregate sedation and steady-state (last dose) plasma exposure data from pivotal 2-week (SSN-01028 [4.2.3.2-06] and SSN-01195 [4.2.3.2.-07]), 13-week (SSN-01403 [4.2.3.2-08]), and 26-week (SSN-02113 [4.2.3.2-09]) studies in rats.
b　Aggregate sedation and steady-state (last dose) plasma exposure data from pivotal 2-week (SSN-01029 [4.2.3.2-13]), 13-week (SSN-01404 [4.2.3.2-14]), and 39-week (SSN-01940 [4.2.3.2-15]) studies in Beagle dogs.
c　Systemic exposure of zuranolone in Japanese subjects after administration of zuranolone at 30 mg QD based on the population pharmacokinetic analysis: $AUC_{0-\tau}$: 943.7 ng·hr/mL, C_{max}: 67.2 ng/mL

重度の鎮静が認められた用量では，いずれか一方又は両動物種において，死亡/瀕死，浅/可聴/努力呼吸，平伏姿勢，一過性の体温低下，ペダリング，攣縮及び流涎が認められた．イヌ心血管系試験においても，2.5 mg/kg の用量（C_{max}：674 ng/mL）において重度の鎮静に伴う一般状態の変化や最大 3℃の体温低下が認められた（2.6.2.4.2.3 項参照）．また，ラット呼吸系試験において，22.5 mg/kg 投与群（C_{max}：285 ng/mL）で呼吸数の減少が認められた（2.6.2.4.3.1 項参照）．

体温低下及び/又は呼吸異常は，エトミデート，ベンゾジアゼピン系薬物及びプロポフォールなどの $GABA_A$ 受容体を介して薬理作用を発揮する薬物を含め，鎮静/麻酔作用を有する広範な薬物において副作用としてよく知られており［53］，$GABA_A$ 受容体の PAM であるズラノロンにおいても，薬理作用の過剰発現時に発現が予測される所見と考えられた．

動物において軽度の鎮静が発現する曝露域に対する申請用法用量でのヒト曝露量（C_{max} 及び $AUC_{0-\tau}$）比は，ラットで 1.18～4.39 倍及びイヌで 0.65～2.83 倍であり，重度の鎮静が認められる曝露域に対する申請用法用量でのヒト曝露量比はラットで 6.12～13.7 倍，イヌで 4.34～11.8 倍であった．これまでに実施した患者対象の国内臨床試験では，発現した鎮静は全て軽度であ

り，投与中止に至った鎮静はみられなかった (2.7.4.2.1.4.1 項及び 2.7.4.2.1.5.1.1 項参照)．また，体温低下及び呼吸異常は認められておらず (2.7.4.2 項参照)，これらの副作用が申請用量用法においてヒトで発現する懸念は低いと考えられた．

2.4.4.3 遺伝毒性試験

細菌を用いる復帰突然変異試験，ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験及びげっ歯類を用いる小核試験のいずれにおいても陰性であり，ズラノロンに遺伝毒性の懸念はないと判断した．

2.4.4.4 がん原性試験

ラットを用いた 104 週間試験及び rasH2 トランスジェニックマウスを用いた 26 週間試験では，最大耐量を基に設定した最高用量まで，がん原性を示唆する変化は認められなかったことから，ズラノロンにがん原性はないと判断した．

2.4.4.5 生殖発生毒性試験

生殖発生毒性試験で認められた主な毒性所見及び無毒性量を表 2.4-11，各試験における血漿中曝露量 (AUC 及び C_{max}) 並びに申請用法用量でのヒト血漿中曝露量との比を表 2.4-12 に示す．

ラットを用いた受胎能及び初期胚発生試験 (雄試験の投与量：3，10 及び 30 mg/kg/日，雌試験の投与量：1，3 及び 10 mg/kg/日) では，雌親動物において，10 mg/kg/日の用量で死亡，1 mg/kg/日以上の用量で，ズラノロンの薬理作用の過剰発現に起因したと考えられる鎮静が一過性に認められた．いずれの用量においても，ズラノロンを投与した雌において交尾能及び受胎能にズラノロン投与の影響は認められず，母体の剖検時の肉眼検査においても異常所見はなかった．雌親動物の一般毒性に関する NOAEL は 3 mg/kg/日，生殖機能及び初期胚発生に関する NOAEL は 10 mg/kg/日と判断した．生殖機能及び初期胚発生に関する NOAEL での $AUC_{0\text{-}\tau}$ は 11 000 ng·hr/mL，C_{max} は 940 ng/mL であり，申請用法用量でのヒト曝露量に対しそれぞれ 11.7 倍及び 14.0 倍であった (表 2.4-12)．雄親動物では，30 mg/kg/日の用量で死亡及び摂餌量減少を伴う体重減少，10 mg/kg/日以上の用量でズラノロンの薬理作用の過剰発現に起因したと考えられる鎮静が一過性に認められた．いずれの用量においても，投与期間終了後又は休薬期間終了後の交尾能，授胎能及び精子検査にズラノロン投与の影響は認められなかった．雄ラットの NOAEL は授胎能及び生殖機能に関して 30 mg/kg/日と判断した．授胎能及び生殖機能に関する NOAEL での $AUC_{0\text{-}\tau}$ は 3540 ng·hr/mL，C_{max} は 450 ng/mL であり，申請用法用量でのヒト血漿中曝露量に対しそれぞれ 3.75 倍及び 6.70 倍であった (表 2.4-12)．

ラットを用いた胚・胎児発生試験 (投与量：2.5，7.5 及び 22.5 mg/kg/日) の 22.5 mg/kg/日投与群では母動物の死亡，7.5 mg/kg/日以上の投与群では体重増加抑制，2.5 mg/kg/日以上の投与群では程度や発現頻度に用量依存性を伴う鎮静が認められ，母動物に対する NOAEL は 2.5 mg/kg/日と判断した．NOAEL での妊娠 17 日の時間 0 から濃度測定可能最終時点までの薬物濃度-時間曲線下面積 (AUC_{last}) は 3710 ng·hr/mL，C_{max} は 281 ng/mL であった．母体毒性の認められた 22.5 mg/kg/日投与群では早期吸収胚数の増加が認められ，関連して妊娠子宮重量の低値及び着床後

死亡率の高値が認められた．胚・胎児では，22.5 mg/kg/日投与群で胎児体重が低値（対照群比：－8%～－9%）を示した．22.5 mg/kg/日投与群において，10 例の胎児に形態異常が認められ，その内訳は，外脳（1 胎児），尾及び/又は尾椎の異常（2 腹の 3 胎児），仙椎の異常（2 腹の 2 胎児），臍帯ヘルニア及び潜在眼球（1 胎児），水晶体の欠損又は小型化（同腹の 2 胎児），並びに胸椎/腰椎/肋骨の異常（同腹児の 2 例の胎児）であった．また，対照群に比して後肢（足根骨，中足骨及び趾節骨）の骨化数減少も認められた．これらの形態異常の発生頻度は，試験施設又は既報 [54] の背景値の範囲内もしくはその上限と概ね同等であり，所見の質に一貫性はなく，様々な部位に低頻度で認められた．既知の催奇形性物質では，特定の催奇形メカニズムにより特定の所見又は発生が特定の部位に偏った複数の所見が認められる特徴が知られている [55, 56] が，本薬ではこの傾向はみられなかった．また，22.5 mg/kg/日投与群では母動物に死亡，重度の鎮静に加えて，摂餌抑制及び体重増加抑制が認められたことから，本薬の投与により，母動物が過度の中枢神経系抑制による呼吸抑制状態及び低酸素状態，並びにストレス状態下にあった可能性が考えられた．母体の呼吸抑制や母体ストレスは胎児の形態異常を増加させるという報告があり [57]，ラットにおいて母体毒性を伴う用量では胎児の肋骨（癒合，過剰，欠損，波状），椎骨（癒合，欠損，分離など），胸骨（欠損，癒合，配列異常），目の欠損，尾の異常や臍帯ヘルニア，水頭症等の非特異的な形態異常がみられ，特に，肋骨，胸骨及び椎骨の形態異常が頻発すると報告されている [58]．さらに，22.5 mg/kg/日投与群で様々な部位に低頻度で認められた胎児の形態異常所見は，個々の変化の質及び頻度としてはラットで背景的に認められる偶発性の変化と概ね同等であった．従って，22.5 mg/kg/日投与群で認められた各形態異常所見は，自然発生的に形態異常が起こるのと同様の機序又は母体毒性の影響との組み合わせの結果，二次的に生じた可能性があると考えた．

22.5 mg/kg/日投与群で認められた胎児の形態異常所見のうち，肋骨欠損，肋骨癒合，胸椎弓癒合及び胸椎欠損が，7.5 mg/kg/日投与群においても 2 母動物の 1 例ずつの胎児で認められたが，以下のとおり発生頻度が低く，自然発生性にも認められる変化であることから偶発性の変化と判断した．肋骨欠損及び胸椎欠損は，7.5 mg/kg/日投与群の 1 胎児でみられ，22.5 mg/kg/日群の 1～2 胎児でも認められたが，いずれの投与群でもの 発生頻度は試験施設又は既報 [54] における背景値と同程度と低かった．肋骨癒合及び胸椎弓癒合は，7.5 mg/kg/日投与群の 1 胎児で認められ，22.5 mg/kg/日投与群の 2～3 胎児でも認められたが，7.5 mg/kg/日投与群の発生頻度は試験施設又は既報 [54] の背景値と同程度であった．肋骨欠損，肋骨癒合，胸椎弓癒合，及び胸椎欠損を含む肋骨，胸椎及び腰椎（椎体及び椎弓を含む）の異常は，ラットにおいて自然発生性にしばしば認められる所見であり，これらの形態異常は試験施設でも背景的に認められる変化であった．

以上の結果から，胚・胎児発生に関する NOAEL は 7.5 mg/kg/日と判断した．胚・胎児発生に関する NOAEL での，妊娠 17 日の母動物の AUC_{last} 及び C_{max} はそれぞれ 9380 ng·hr/mL 及び 656 ng/mL であり，申請用法用量でのヒト血漿中曝露量に対しそれぞれ 9.94 倍及び 9.76 倍であった（表 2.4-12）．

ウサギを用いた胚・胎児発生試験（投与量：25，125 及び 500 mg/kg/日）の 500 mg/kg/日投与群で，母動物の死亡が認められた．25 mg/kg/日以上の投与群の母動物で，鎮静及び関連する一

般状態の変化が用量依存的な程度及び発現頻度で認められた．また，125 mg/kg/日以上の投与群で，母動物に摂餌量減少を伴う体重増加量の低値が認められた．その他，母体の生殖機能に関するパラメータには，いずれの投与群でもズラノロンに関連した影響は認められなかった．胚・胎児では，500 mg/kg/日投与群で軽度な胎児体重の低値が認められたが，胎児の外表，内臓及び骨格に異常は認められなかった．母体毒性に関する NOAEL は 25 mg/kg/日と判断し，NOAEL の妊娠 19 日の妊娠ウサギでの AUC_{last} は 291 ng·hr/mL，C_{max} は 11.0 ng/mL であった．胚・胎児発生に関して，NOAEL は 125 mg/kg/日と判断し，NOAEL の妊娠 19 日での AUC_{last} は 663 ng·hr/mL，C_{max} は 39.1 ng/mL であり，申請用法用量でのヒト血漿中曝露量に対しそれぞれ 0.70 倍及び 0.58 倍であった (表 2.4-12).

マウスを用いた胚・胎児発生試験 (投与量：30，100 及び 300 mg/kg/日) において，30 mg/kg/日以上の投与群の母動物で，鎮静 (軽度～重度) や関連した一般状態への影響が認められた．300 mg/kg/日投与群では投与期間中の体重増加抑制が認められ，剖検時に妊娠子宮重量の低値も伴っており，毒性と判断した．胚・胎児に関して，300 mg/kg/日投与群で，母体毒性の二次的影響を疑う胎児体重の低値 (対照群比：−17.0%～−17.7%) が認められ，毒性と判断した．外表観察において，背景値範囲内 (母動物の発生頻度最大 25.0%，児の発生頻度最大 6.76%) の発生頻度であったが，口蓋裂が 300 mg/kg/日投与群の 3 腹の 10 胎児 (発生頻度：3.69% [児]，15.0% [母]) に認められ，骨格観察において関連する異常所見を伴っていた．口蓋裂がみられた胎児はいずれも著しい低体重及び/又は施設の胎児体重の背景値の下限を下回る低体重を示した．口蓋裂の発生機序に関して，ICH S5 (R3)「医薬品の生殖発生毒性評価に係るガイドライン」(令和 3 年 1 月 29 日薬生薬審発 0129 第 8 号) に記載のとおり，マウスはストレスに対する感受性が高い種として知られており，ストレス性変化や摂餌量減少がみられる母動物では胎児に口蓋裂が誘発されることが知られている [59,60]．さらに，低体重の胎児では口蓋裂の発現頻度が高まることが知られている [60,61]．以上から，口蓋裂は本薬による母体毒性又は胎児体重の低値の二次的影響によって生じたと考察した．

その他，胚・胎児の生存性，外表，内臓及び骨格観察において，300 mg/kg/日の用量まで，本薬に起因したと考えられる変化は認められなかった．以上の結果から，母動物の一般毒性及び胚・胎児発生に関する NOAEL はいずれも 100 mg/kg/日と判断した．NOAEL における妊娠 15 日の母動物の AUC_{last} 及び C_{max} はそれぞれ 5500 ng· hr/mL 及び 748 ng/mL であり，申請用法用量におけるヒト血漿中曝露量のそれぞれ 5.38 倍及び 11.1 倍であった (表 2.4-12).

ラットを用いた出生前/出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 (投与量：1，4 及び 10 mg/kg/日) では，妊娠期及び/又は哺育期に，4 mg/kg/日以上の投与群で，母動物の死亡，中等度又は重度の鎮静，反応性亢進，振戦，摂餌量減少などの母体毒性が認められた．10 mg/kg/日投与群では，母動物の死亡/瀕死及び全児死亡の発現頻度が高く，同投与群の全生存動物が哺育 8～10 日に安楽殺された．いずれの投与群でも，母動物の剖検時にズラノロンに関連した異常は認められなかった．4 mg/kg/日投与群では，生後 1～4 日に死亡発見された児動物，安楽殺された児動物又は食殺による死亡と推定された児動物の数が対照群に比べて増加し，生存性が低下した．また，生後 4，10 及び 14 日の児動物の体重低値が認められた (対照群の約 94%)．離乳後は，4 mg/kg/日以下の投与群の F1 世代に，ズラノロンに関連した死亡/瀕死又は一般状態の変化

は認められなかった．4 mg/kg/日投与群の F1 雄では，出生後 22～71 日における体重が減少し，出生後 22～43 日に摂餌量が一過性に減少した．4 mg/kg/日以下の投与群の F1 の雌雄では，性成熟，神経行動学的評価 (自発運動，音刺激に対する驚愕反応，馴化反応，学習及び記憶能) 又は生殖機能にズラノロンの影響は認められなかった．母動物及び出生児の発育及び発生に関する NOAEL はいずれも 1 mg/kg/日と判断し，NOAEL での妊娠 17 日の AUC_{last} は 2420 ng·hr/mL，C_{max} は 223 ng/mL であり，申請用法用量でのヒト血漿中曝露量に対しそれぞれ 2.56 倍及び 3.32 倍であった (表 2.4-12)．母動物の血漿中ズラノロン濃度に対する児動物の血漿中ズラノロン濃度は，1 及び 4 mg/kg/日投与群で，それぞれ哺育 4 日で約 0.6%～0.7%及び哺育 10 日で 0.3%～0.5%であった．

幼若ラット (投与開始時生後 22 日齢) を用いた 7 週間反復経口投与毒性試験 (投与量 : 3，10 及び 30 mg/kg/日 [雌は投与 15 日以降に 1，3 及び 10 mg/kg/日に減量]) では，ズラノロンを生後 22 日から 71 日まで経口投与し，その後 6 週間以上の休薬期間を設けた．雄の性成熟，眼科学的検査，音刺激に対する驚愕反応及び馴化反応，学習及び記憶能，生殖機能，骨長又は骨密度，血液検査項目又は病理検査項目には，いずれの用量においても雌雄共にズラノロンに関連した影響は認められなかった．30 mg/kg/日投与群の雄では，投与後 4 日以内に 12 例 (81 例中) が重度の鎮静や重度の鎮静に関連する一般状態の変化のため死亡又は瀕死のため安楽殺されたが，生後 25 日以降はズラノロンに関連した死亡は認められなかった．30 mg/kg/日投与群の雌では，生後 22 日から 35 日の間に 24 例 (81 例中) が重度の鎮静や重度の鎮静に関連する一般状態の変化のため死亡又は瀕死のため安楽殺に至ったが，用量を 10 mg/kg/日に減量した生後 36 日以降はズラノロンに関連した死亡は認められなかった．30/10 mg/kg/日投与群の雌で膣開口日の遅れが認められた (対照群 32.5 日に対して 35.8 日)．自発運動量では，生後 54 ± 2 日に，30 mg/kg/日投与群の雄で総微細行動の増加が認められ，30/10 mg/kg/日投与群の雌で総歩行数の増加，10/3 mg/kg/日及び 30/10 mg/kg/日投与群の雌で総微細行動の増加が認められた．休薬期間中には自発運動量への影響は認められなかった．以上のデータに基づき，生存性，一般状態，体重及び摂餌量，雌の性成熟，自発運動 (雄のみ) 及び生殖機能 (性周期，交尾能，受胎能) に対する NOAEL は，雄で 10 mg/kg/日，雌で 10/3 mg/kg/日と判断した．その他，血液検査項目，病理検査項目，雄の性成熟，眼科学的検査項目，音に対する驚愕反応並びに学習及び記憶能の NOAEL は，雄で 30 mg/kg/日及び雌で 30/10 mg/kg/日と判断した．雌の自発運動量に対する影響の NOAEL は 3/1 mg/kg/日と判断した．NOAEL での $AUC_{0\text{-}t}$ 及び C_{max} は，雄でそれぞれ 3740 ng·hr/mL 及び 506 ng/mL，雌でそれぞれ 2610 ng·hr/mL 及び 240 ng/mL であり，申請用法用量におけるヒトの血漿中曝露量に対して雄では 3.96 倍及び 7.53 倍，雌では 2.77 倍及び 3.57 倍であった (表 2.4-12)．

$GABA_A$ 受容体を含む GABA 受容体作動薬 (フェノバルビタール，ペントバルビタール，ジアゼパム，及びクロナゼパムなど) が出生後のラットに神経変性を引き起こす可能性が示されている [62]．GABA 受容体作動薬による影響を受けやすい脳発達の重要な段階の幼若ラット (ラットの出生後 0～14 日，ヒトでは妊娠第三期から生後数年に相当 [63]) にズラノロンを単回経口投与 (投与量 : 2.5 及び 7.5 mg/kg) したときの脳における神経変性リスクを検討した．生後 7 日齢のラットに陽性対照化合物 MK-801 を単回腹腔内投与したとき，投与後 24 時間で脳の複数の領域において神経細胞崩壊の増加がみられ，脳の広範にわたって神経変性が生じているこ

とが示唆された．生後 7 日目のラットに 7.5 mg/kg の用量でズラノロンを単回経口投与した場合には，文献 [62] 及び MK-801 投与群で認められた脳の広範にわたる神経変性とは対照的に，脳の単一領域 (海馬台) でのみ，対照群と比べ神経細胞崩壊の増加が確認された．一方，ズラノロンを 2.5 mg/kg の用量で単回投与したときには神経細胞崩壊の増加は認められず，ズラノロンによる神経変性に関する影響は認められなかった．AmCuAg 染色では非特異的な染色がよくみられる上に，発達段階の脳は可塑性が高く，生後 8 日目の脳における神経細胞のズラノロン投与による細胞死と生理的な神経細胞のアポトーシスの区別を評価することは難しいことを考慮すると，本試験において脳の一部の領域 (海馬台) に認められた程度の神経細胞崩壊の生物学的意義は不明であった．

以上のように，ラットを用いた生殖発生毒性試験において，母動物に毒性が認められた 22.5 mg/kg/日の用量 (AUC_{last} 及び C_{max} はヒトに 30 mg を投与した時の推定曝露量の 19.8 倍及び 18.0 倍に相当) では，着床後死亡率の高値及び胎児の形態異常が様々な部位に低頻度で認められた．そのうち一部の胎児の形態異常については，7.5 mg/kg/日の用量 (AUC_{last} 及び C_{max} はヒトに 30 mg を投与した時の推定曝露量の 9.94 倍及び 9.76 倍に相当) でも，試験施設又は既報 [54] の背景値の範囲内もしくはその上限と同程度の低頻度に認められ，これらの変化は偶発性と判断したものの，そのような所見が認められない用量は 2.5 mg/kg/日の用量 (AUC_{last} 及び C_{max} はヒトに 30 mg を投与した時の推定曝露量の 3.93 倍及び 4.18 倍に相当) であった．本薬がヒト胚・胎児の発生に及ぼす影響を否定しきれず，妊娠期間では他の治療選択肢が存在することも踏まえると，本薬は妊婦又は妊娠している可能性のある女性には投与しないことが妥当と考える．また，妊娠の可能性がある女性については，ズラノロンの半減期 (15～20 時間) に基づき，最終投与後 1 週間の避妊が必要であると考える．

ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験において，母動物に毒性が認められた 4 mg/kg/日以上の用量 ($AUC_{0\text{-}t}$ 及び C_{max} は申請用法用量である 30 mg をヒトに 1 日 1 回投与したときの定常状態の曝露量のそれぞれ 7.45 倍以上及び 7.44 倍以上に相当) において出生児の生存性や発育に影響が認められ，NOAEL は 1 mg/kg/日だった ($AUC_{0\text{-}t}$ 及び C_{max} は申請用法用量である 30 mg をヒトに 1 日 1 回投与したときの定常状態の曝露量の 2.56 倍及び 3.32 倍に相当) が，乳汁中ズラノロンによる児動物への影響は不明であった．また，7 日齢の幼若ラットを用いた単回投与試験では，7.5 mg/kg 投与群において，脳の 1 つの領域 (海馬台) でアポトーシス性神経変性の増加が認められた．本変化の生物学的意義は不明であるが，無影響量は 2.5 mg/kg であった．

ヒトにおいて，ズラノロンは母体投与量と比較するとごく微量ではあるが，母乳中に移行することが報告されている．授乳中の健康成人女性を対象に実施した乳汁移行評価試験 (217-CLP-114 試験) において，申請用量用法である 30 mg のズラノロンを授乳婦に 1 日 1 回 5 日間夕食後投与したときのズラノロンの乳汁移行性を検討したところ，母乳を介して乳児が摂取する 1 日用量は 0.00125 mg/kg/日とごく僅かであることが示された (2.7.2.2.1.3 項参照)．ラットの神経変性に関する試験で認められた無影響量 (2.5 mg/kg/日) は，投与量基準で申請用量用法での乳児のズラノロン摂取量と約 2000 倍の乖離がある．しかしながら，動物の授乳による児への影響やヒトにおける哺乳中の児における影響が不明であることから，授乳婦は治療上の有益性

及び母乳栄養の有益性を考慮し，授乳の継続又は中止を検討するか否かを検討すべきである．

表 2.4-11　　ズラノロンの生殖発生毒性試験での主な毒性所見及び無毒性量

動物種	試験種	投与経路	投与量 (mg/kg/日)	主な毒性所見と無毒性量
ラット	受胎能及び着床までの初期胚発生	経口	雄: 3，10，30 雌: 1，3，10	雄 30 mg/kg/日：死亡，鎮静 (重度)，鎮静に関連した一般状態の変化，摂餌量減少を伴う体重減少 無毒性量 一般毒性：10 mg/kg/日 生殖機能・初期胚発生：30 mg/kg/日 雌 10 mg/kg/日：死亡，鎮静 (中等度～重度)，鎮静に関連した一般状態の変化 無毒性量 一般毒性：3 mg/kg/日 生殖機能：10 mg/kg/日 初期胚発生：10 mg/kg/日
	出生前・出生後の発生並びに母体の機能	経口	1，4，10	母動物 ≥4 mg/kg/日：死亡，鎮静 (中等度～重度)，鎮静に関連した一般状態の変化，妊娠中及び哺育中の摂餌量減少 F1 出生児 ≥4 mg/kg/日：死亡率増加，体重低値 (雄のみ) 無毒性量 母動物・次世代の発生：1 mg/kg/日
	胚・胎児発生	経口	2.5，7.5，22.5	母動物 22.5 mg/kg/日：死亡，痙攣，摂餌量減少，体重減少 ≥7.5 mg/kg/日：鎮静 (中等度～重度)，筋攣縮，眼の赤色分泌物 胚・胎児 22.5 mg/kg/日：着床後死亡率増加，体重低値，形態異常 無毒性量 母動物：2.5 mg/kg/日 胚・胎児発生：7.5 mg/kg/日
ウサギ	胚・胎児発生	経口	25，125，500	母動物 500 mg/kg/日：死亡，筋攣縮，呼吸数減少 ≥125 mg/kg/日：体重増加抑制及び摂餌量減少 胚・胎児 500 mg/kg/日：体重低値 (軽度) 無毒性量 母動物：25 mg/kg/日 胚・胎児発生：125 mg/kg/日
マウス	胚・胎児発生	経口	30, 100, 300	母動物 300 mg/kg/日：鎮静 (軽度～重度)，攣縮，意識消失，立毛，体重増加抑制 胚・胎児 300 mg/kg/日：体重低値 無毒性量 母動物：100 mg/kg/日 胚・胎児発生：100 mg/kg/日

表 2.4-12 ズラノロンの生殖発生毒性試験における無毒性量でのズラノロンの血漿中曝露量と臨床曝露量との比

Study Type	Species	NOAEL (mg/kg/day)	AUC (ng·hr/mL)	C_{max} (ng/mL)	Animal to Human Ratio[a]	
					AUC	C_{max}
Fertility	Rat (M)	30[b]	3540	450	3.75	6.70
Fertility	Rat (F)	10[b]	11 000	940	11.7	14.0
Embryo-fetal development	Rat	7.5[c]	9380	656	9.94[h]	9.76[h]
Embryo-fetal development	Rabbit	125[c]	663	39.1	0.70	0.58
Embryo-fetal development	Mouse	100[c]	5500	748	5.83	11.1
Pre- and postnatal development	Rat	1[d]	2420	223	2.56	3.32
7-week juvenile tox	Rat (juvenile)	10 (M)[e] 3/1[f] (F)[g]	3740 (M) 2610 (F)	506 (M) 240 (F)	3.96 (M) 2.77 (F)	7.53 (M) 3.57 (F)

AUC = area under the plasma concentration-time curve; C_{max} = maximum plasma concentration; F = female; M = male; NOAEL = non observed adverse effect level.

a Systemic exposure of zuranolone in Japanese subjects after administration of zuranolone at 30 mg QD based on the population pharmacokinetic analysis: $AUC_{0-\tau}$: 943.7 ng·hr/mL, C_{max}: 67.2 ng/mL

b NOAEL for fertility and reproductive function.

c NOAEL for developmental toxicity.

d NOAEL for growth and development in the offspring.

e NOAEL for survival, growth, motor activity, and reproductive function (including mating and fertility).

f Female rats were administered 3 mg/kg/day from Postnatal (PND) 22 to PND 35, followed by a dose adjustment (due to tolerability) to 1 mg/kg/day from PND 36 through scheduled euthanasia on PND 71.

g NOAEL for motor activity. The NOAEL for survival, growth, female sexual maturation, motor activity (males only) and reproductive function in males and females was 10 and 10/3 mg/kg/day, respectively; the NOAEL for systemic toxicity, male sexual maturation, acoustic startle response and learning and memory was 30 and 30/10 mg/kg/day in the males and females, respectively.

h Exposure at 2.5 mg/kg/day, which did not result in the external, visceral, or skeletal malformations observed at 7.5 and 22.5 mg/kg/day in rat embryo-fetal development study, corresponded to 3.93-fold AUC and 4.18-fold C_{max} compared to human exposures at 30 mg QD.

2.4.4.6 局所刺激性試験

臨床適用経路における局所刺激性は反復経口投与毒性試験において評価したため，単独の局所刺激性試験は実施しなかった.

2.4.4.7 その他の毒性試験

2.4.4.7.1 抗原性

ラット (最長 26 週間) 又はイヌ (最長 39 週間) を用いた反復投与毒性試験において，抗原性を示す所見は認められなかったことから，独立したズラノロンの抗原性試験は実施しなかった.

2.4.4.7.2 免疫毒性

ラット (最長 26 週間) 又はイヌ (最長 39 週間) を用いた反復投与毒性試験において，免疫毒性を示す所見は認められなかったことから，ズラノロンの免疫毒性を検討する独立した試験は実施しなかった.

2.4.4.7.3 薬物乱用及び依存性

ズラノロンの主要な薬理作用は $GABA_A$ 受容体を介して発揮されるが，本受容体の活性化は薬物乱用リスクを有することが報告されているため [12, 13]，ズラノロンの薬物乱用及び身体依存性リスクについて，in vitro 特異性試験及び反復投与毒性試験，並びにラットを用いた薬物弁別試験，静脈内自己投与試験及び身体依存性試験により評価した (2.6.6.8.3 項参照).

In vitro 特異性試験において，ズラノロンは 10 μmol/L (4096 ng/mL) の濃度で薬物乱用に関連するとされるシグマ 2 受容体に結合能を示した．再現性は認められなかったものの，ズラノロンはグリシン受容体に対しても結合能を示した．これら受容体に結合能を示した濃度は，ズラノロンの申請用法用量での定常状態における非結合型の最高血漿中濃度 (非結合型 C_{max}: 0.3360 ng/mL [母集団薬物動態解析での C_{max} の中央値：67.2 ng/mL 及びタンパク結合率：99.5% より算出]) に対して約 12 200 倍であり，ヒトにおいてこれらの受容体を介した薬物乱用リスクが顕在化するリスクは低いと考えられた.

雌雄ラットを用いた薬物弁別試験において，ズラノロンがベンゾジアゼピン系薬物のミダゾラムと同様の内受容性感覚 (自覚効果) を有するかを検討した (それぞれ 2.6.6.8.3.1 項及び 2.6.6.8.3.2 項参照). その結果，ズラノロンは，C_{max} が 99～480 ng/mL となる用量でミダゾラムの自覚効果に対して部分般化を示し，C_{max} が 219 ng/mL (雄)，499 ng/mL (雌) となる用量では完全般化した．完全般化を示した用量では，$GABA_A$ 受容体を介した薬理作用の過剰発現による鎮静及びレバー押し速度の有意な低下も認められた．以上の結果から，ズラノロンは用量依存的にベンゾジアゼピン様の自覚効果を惹き起こし，レバー押し速度を低下させるような高用量 (申請用法用量である 30 mg をヒトに 1 日 1 回投与したときの定常状態の C_{max} [67.2 ng/mL] の 3.26～7.43 倍に相当する投与量) ではミダゾラムに対して完全般化することが示された．静脈内自己投与試験において，コカイン自己投与能を獲得した雌性ラットを用いて，コカイン自己投与能を獲得した雌性ラットを用いたズラノロンの強化効果を評価した (2.6.6.8.3.3 項参照). その結果，媒体 (陰性対照) 群及びズラノロン 0.05 mg/kg/注入群 (最後の薬物置換期での血漿中濃度が 94.9～870.9 ng/mL [群平均 323.1 ng/mL] で，ズラノロンの申請用法用量である 30 mg をヒトに 1 日 1 回反復投与したときの定常状態での C_{max} [67.2 ng/mL] の 4.81 倍に相当する投与量群) ではコカイン自己投与時に認められた強力な自己投与行動は維持されず，ズラノロンに明らかな強化効果は認められなかった．一方，ミダゾラム群では薬物置換期の終盤 2 回のセッションにおいてコカイン群と同程度の自己投与行動が認められた．雌雄ラットを用いて，ズラノロンの身体依存形成能を評価した (2.6.6.8.3.4 項及び 2.6.6.8.3.5 項参照). 陽性対照薬であるクロルジアゼポキシド投与群には，雌雄いずれにおいても，反復投与後の自然休薬により体重減少，自発運動及び神経行動学的変化 (咀嚼行動の増加，尾の位置の上昇及び立毛など) など，ベンゾジアゼピン系薬物においてみられる典型的な退薬症候の誘発がみられた．一方，雄のズラノロン投与群には，休薬後に生理学的，神経行動学的及び自発運動量パラメータに影響が認められなかったことから，ズラノロンは血漿中薬物濃度が 410 ng/mL (申請用法用量である 30 mg をヒトに 1 日 1 回投与したときの定常状態の C_{max} の 6.10 倍に相当) 以下の条件では退薬症候を誘発しないことが示唆された (2.6.6.8.3.4 項参照). 雌のズラノロン投与群では，0.5 及び 1.5 mg/kg/日の用量までは，休薬後に測定パラメータにズラノロンによる影響は認められず，ズラノロンの

血漿中薬物濃度が 325 ng/mL (申請用法用量である 30 mg をヒトに 1 日 1 回投与したときの定常状態の C_{max} [67.2 ng/mL] の 4.84 倍に相当) 以下の条件では，退薬症候を誘発しないことが示唆された (2.6.6.8.3.5 項参照). しかしながら，5 mg/kg/日の用量のズラノロン (投与 28 日目の C_{max} が 696 ng/mL となる用量) を反復投与した後に休薬した際には，クロルジアゼポキシドでみられた退薬症候に比べて軽度であったが，休薬期間中に摂餌量減少や体重減少などの退薬症候を示唆する変化が認められた.

退薬症候を示唆する一般状態の変化はイヌにおいても認められた. ズラノロンのイヌの 13 週間及び 39 週間反復投与毒性試験において，ズラノロンの高用量群 (2 mg/kg/日以上，$AUC_{last} \geq$ 6890 ng·h/mL，$C_{max} \geq$ 482 ng/mL；申請用法用量である 30 mg で 1 日 1 回投与したときの定常状態での C_{max} [67.2 ng/mL] の 7.17 倍以上) において，投与期間中 (投与後 29 日以降) の投与前及び/又は休薬期間 (休薬 4 日目) 中に，死亡/瀕死例及び/又は痙攣，一過性の虚脱，四肢硬直，異常発声, ハンドリングに対する攻撃行動がごく少数例に認められた (高用量群 12 例中 1 例 [3 ヵ月間試験] 又は 14 例中 1 例 [9 ヵ月間試験]). また，投与期間中の死亡/瀕死例では，死亡日直前又は投与日の投与前に痙攣が確認された.

イヌは痙攣感受性が高い種として知られている [64,65]. GABA モジュレーターについても，反復投与後に痙攣に代表される退薬症候が認められるとの報告があることから[66-69]，イヌはこれらの薬剤による退薬症候の感受性が高い可能性が考えられた. ジアゼパムでは，イヌに 1 mg/kg の用量を 1 日 3 回 1 週間反復投与した際に退薬症候が認められたとの報告があるが [67]，本用量を投与時のイヌにおけるジアゼパム及び主要活性代謝物であるデスメチルジアゼパムの曝露量 [67] は，臨床最大用量 [70] における推定ヒト曝露量 [71,72] を下回っていた.

ズラノロンのイヌ反復投与毒性試験において認められた死亡/瀕死/痙攣などの毒性所見は, 低頻度であったこと，長期投与後に発現すること (29 回以上投与)，発現する用量 (2 mg/kg/日以上，$AUC_{last} \geq$ 6890 ng·hr/mL，$C_{max} \geq$ 482 ng/mL；申請用法用量である 30 mg で 1 日 1 回投与したときの定常状態での C_{max} [67.2 ng/mL] の 7.17 倍以上に相当) 及び所見の発現時刻又は時期 (血漿中ズラノロン濃度が最低/トラフ濃度となる投与前又は休薬期間) が類似しており，みられた所見の種類も上述したイヌに GABA 受容体モジュレーターを投与した時の退薬症候と一致していることから，いずれも GABA 受容体モジュレーターを長期投与した際に認められる退薬症候であると考えられた.

本薬を臨床投与期間で繰り返し服薬した際の身体依存性形成リスクを検討するための特別な試験として実施したイヌ 44 週間間歇投与毒性試験の高用量群 (2.5 mg/kg/日； 申請用法用量である 30 mg で 1 日 1 回投与したときの定常状態での C_{max} の 8.93～10.3 倍に相当) においても，反復投与毒性試験で認められたのと同様の退薬症候 (痙攣及び/又は死亡) が認められた. 退薬症候は, 1 サイクル目の休薬期間にのみ認められ, イヌにおいて間歇投与による退薬症候の増悪は惹起されないことが示された.

以上の結果より，ズラノロンの薬物乱用及び身体依存性リスクは米国の物資規制法に基づくスケジュール IV のベンゾジアゼピン系薬物と同等以下であることが示唆された. なお，薬物依存ではない中枢神経系抑制薬の娯楽的使用者を対象に海外で実施した薬物嗜好性試験 (217-CLP-110) において，薬物乱用リスクはアルプラゾラム (スケジュール IV のベンゾジアゼピン

系薬剤) と同等以下であることが示された (2.7.4.5.6 項参照). 国内で実施した臨床試験において，これまでに薬物乱用や依存性の懸念を示唆する有害事象や離脱症状並びに反跳現象に関連する副作用は認められていない (2.7.4.5.6 項及び 2.7.4.5.7 項参照). 以上のことから，ズラノロンの薬物乱用リスクは既承認のベンゾジアゼピン系薬剤と同等以下であり，申請用法用量である(ズラノロン 30 mg を 1 日 1 回 14 日間反復投与では，ヒトで離脱症状及び反跳現象が生じる懸念は小さいと判断した.

2.4.4.7.4 代謝物

[^{14}C]-ズラノロンを用いたヒトマスバランス試験 (217-CLP-105 試験) を実施し，健康被験者に単回経口投与したときの代謝物の分布及び相対量を検討した. ズラノロンは広く代謝を受け，ラジオクロマトグラフィーではズラノロン関連の血漿中総曝露量の 10%を超えるヒト血漿中代謝物は認められなかったため (2.6.4.5.2.4 項参照)，ズラノロンの代謝物に関する独立した毒性試験は実施しなかった. ヒトの代謝物プロファイルをラット及びイヌの代謝物プロファイルと比較したところ, ヒトでズラノロン関連の血漿中総曝露量の 1%を超えて認められる全てのヒト血漿中代謝物は，ラット及び/又はイヌの血漿中においても検出されていることが確認された.

2.4.4.7.5 不純物

ICH M7 ガイドラインに基づき，ズラノロン原薬及び製剤に存在する，又はその製造工程中や保管中に発生する可能性がある 9 種の潜在的不純物について，GLP 適用下で細菌を用いる復帰突然変異原性試験を代謝活性化系 (S9 mix) の存在下及び非存在下で実施した. その結果，**化合物C** ， **不純物A** ， **不純物B** ， **不純物D** ， **不純物G** 及び **不純物H** の 6 種の不純物については，細菌を用いる復帰突然変異原性試験にて陰性， **不純物F** ， **不純物E** 及び **不純物C** の 3 種の不純物については，陽性であることが確認された.

2.4.4.7.6 光毒性

ズラノロンは 290 nm～700 nm の波長においてモル吸光係数が 1000 L/mol/cm を上回らないことから，ヒトで光毒性を引き起こす可能性は低いと判断した.

2.4.5 総括及び結論

ズラノロンの薬理学的，薬物動態学的及び毒性学的プロファイルを明らかにするために非臨床試験を実施した. 毒性試験はヒトの曝露よりも十分高い曝露で安全性評価が実施し，毒性試験の用量制限因子として，重度の鎮静と鎮静に関連した複数所見が認められた. 鎮静は，ズラノロンの標的分子である $GABA_A$ 受容体を介した薬理作用の過剰発現に起因すると考えられ，GABA 受容体モジュレーターや $GABA_A$ 受容体増強作用を有する NAS においても共通して認められる所見である. 重度の鎮静が認められる曝露域に対する申請用法用量のヒト曝露量はラットで 6.12～13.7 倍，イヌで 4.34～11.8 倍の乖離があり，これまでに実施した患者対象の国内臨床試験では投与中止に至った鎮静はみられなかった. 生殖発生毒性試験では，ラットで母動物に毒性が認められた 22.5 mg/kg/日の用量で着床後死亡率の高値，胎児体重の低値並びに低頻度

だが胎児の形態異常が認められたが，NOAEL での曝露量は申請用法用量のヒト血漿中曝露量の約 10 倍であったことを踏まえ，ズラノロンは投与禁忌とはしないが，妊婦又は妊娠している可能性のある女性には投与しないことが望ましいと考える．また，出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験において，母動物に死亡を含め強い母体毒性が認められた用量ではあるが，4 mg/kg/日以上の用量で出生児の発生や発育への影響が認められた．また，幼若ラットにおける神経変性に関する試験では，7 日齢ラットにズラノロンを 7.5 mg/kg の用量で単回投与したときに，生物学的意義は不明であるが，海馬台で神経細胞崩壊の増加が認められた．ズラノロンは，ヒトではごく微量だが母乳中への移行が確認されている．母乳を介して乳児が摂取する 1 日用量は 0.00125 mg/kg/日とごく微量であり，ラットの神経変性に関する試験で認められた無影響量 (2.5 mg/kg) は，投与量基準で考えると，申請用法用量を投与した母親からの母乳を介して乳児が摂取するズラノロン量と約 2000 倍の乖離があるが，動物の授乳による児への影響やヒトにおける哺乳中の児における影響が不明であることから，授乳婦は治療上の有益性及び母乳栄養の有益性を考慮し，授乳の継続又は中止を検討するか否かを検討すべきと考える．薬物乱用及び身体依存性に関する試験では，ズラノロンの薬物乱用及び身体依存性リスクはスケジュール IV のベンゾジアゼピン系薬物と同等以下であった．臨床試験において，ベンゾジアゼピン系薬物アルプラゾラムに比べて薬物乱用リスクは小さいこと，国内で実施した臨床試験において，これまでに薬物乱用や依存性が懸念される有害事象は報告されておらず，離脱症状並びに反跳現象に関連する副作用は認められていないこと (2.7.4.5.6 項及び 2.7.4.5.7 項参照) から，ズラノロンの薬物乱用リスクは既承認のベンゾジアゼピン系薬剤と同等以下であり，また，申請用法用量であるズラノロン 30 mg を 1 日 1 回 14 日間反復投与したときにヒトで離脱症状及び反跳現象が生じる懸念は小さいと判断した．

非臨床及び臨床薬物相互作用試験の結果より，ズラノロンは CYP3A 基質であり，CYP3A 誘導薬及び強い CYP3A 阻害薬と併用する場合にズラノロンの曝露が変動するため，併用に関する注意喚起が必要と考えられた．また臨床試験において，ベンゾジアゼピン系薬物のアルプラゾラムを併用したときに，薬力学的相互作用として認知機能の低下が確認されたため，併用に関する注意喚起が必要と考えられた．

ズラノロンにおけるヒトで注意すべき安全性は評価できており，非臨床評価として充足していると考える．

2.4.6　参考文献

1. Drevets WC. Functional anatomical abnormalities in limbic and prefrontal cortical structures in major depression. Prog Brain Res. 2000;126:413-31.
2. Phillips ML, Drevets WC, Rauch SL, Lane R. Neurobiology of emotion perception II: Implications for major psychiatric disorders. Biol Psychiatry. 2003;54(5):515-28.
3. Leistedt SJJ, Coumans N, Dumont M, Lanquart JP, Stam CJ, Linkowski P. Altered sleep brain functional connectivity in acutely depressed patients. Hum Brain Mapp. 2009;30(7):2207-19.
4. Northoff G, Wiebking C, Feinberg T, Panksepp J. The 'resting-state hypothesis' of major depressive disorder-a translational subcortical-cortical framework for a system disorder. Neurosci Biobehav Rev.

2011;35(9):1929-45.
5. Germain A, Nofzinger EA, Kupfer DJ, Buysse. DJ. Neurobiology of non-REM sleep in depression: further evidence for hypofrontality and thalamic dysregulation. Am J Psychiatry 2004;161(10):1856-63.
6. Holtzheimer PE, Mayberg HS. Stuck in a rut: rethinking depression and its treatment. Trends Neurosci. 2011;34(1):1-9.
7. Brakowski J, Spinelli S, Dörig N, et al. Resting state brain network function in major depression - Depression symptomatology, antidepressant treatment effects, future research. J Psychiatr Res. 2017;92:147-59.
8. Arnone D. Functional MRI findings, pharmacological treatment in major depression and clinical response. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2019;91:28-37.
9. Karabin T, Biala G, Kruk-Slomka M. The monoamine theory of depression as a target to effective pharmacotherapy. Curr. Issues Pharm. Med. Sci., 2023; 36 (2): 108-13.
10. Antonoudiou P, Colmers PLW, Walton NL, et al. Allopregnanolone mediates affective switching through modulation of oscillatory states in the basolateral amygdala. Biol Psychiatry. 2022;91(3):283-93.
11. Pawluski JL, Lonstein JS, Fleming AS. The Neurobiology of Postpartum Anxiety and Depression. Trends Neurosci. 2017; 40 (2) :106-20.
12. Warneke LB. Benzodiazepines: abuse and new use. Can J Psychiatry. 1991;36(3):194-205.
13. Licata SC, Rowlett JK. Abuse and dependence liability of benzodiazepine-type drugs: GABAA receptor modulation and beyond. Pharmacol Biochem Behav. 2008;90(1):74-89.
14. Hosie AM, Wilkins ME, da Silva HM, Smart TG. Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. Nature. 2006;444(7118):486-9.
15. Hosie AM, Wilkins ME, Smart TG. Neurosteroid binding sites on GABAA receptors. Pharmacol Ther. 2007;116(1):7-19.
16. Hosie AM, Clarke L, da Silva H, Smart TG. Conserved site for neurosteroid modulation of GABA A receptors. Neuropharmacology. 2009;56(1):149-54.
17. Laverty D, Thomas P, Field M, et al. Crystal structures of a GABAA-receptor chimera reveal new endogenous neurosteroid-binding sites. Nat Struct Mol Biol. 2017;24(11):977-85.
18. Sigel E. Mapping of the benzodiazepine recognition site on GABAA receptors. Curr Top Med Chem. 2002;2(8):833-9.
19. Abramian AM, Comenencia-Ortiz E, Modgil A, et al. Neurosteroids promote phosphorylation and membrane insertion of extrasynaptic GABAA receptors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(19):7132-37.
20. Modgil A, Parakala ML, Ackley MA, et al. Endogenous and synthetic neuroactive steroids evoke sustained increases in the efficacy of GABAergic inhibition via a protein kinase C-dependent mechanism. Neuropharmacology. 2017;113(A):314-22.
21. Jacob TC, Michels G, Silayeva L, et al. Benzodiazepine treatment induces subtype-specific changes in GABAA receptor trafficking and decreases synaptic inhibition. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(45):18595-600.

22. Nicholson MW, Sweeney A, Pekle E, et al. Diazepam-induced loss of inhibitory synapses mediated by PLCδ/ Ca2+/calcineurin signalling downstream of GABAA receptors. Mol Psychiatry. 2018;23(9):1851-67.
23. Berton O, McClung CA, Dileone RJ, et al. EJ. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. Science. 2006;311(5762):864-8.
24. Tsankova NM, Berton O, Renthal W, Kumar A, Neve RL, Nestler EJ. Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. Nat Neurosci. 2006;9(4):519-25.
25. Takasu K, Yawata Y, Tashima R, et al. Distinct mechanisms of allopregnanolone and diazepam underlie neuronal scillations and differential antidepressant effect. Front Cell Neurosci. 2024;17:1274459.
26. Mandema JW, Danhof M. Electroencephalogram effect measures and relationships between pharmacokinetics and pharmacodynamics of centrally acting drugs. Clin Pharmacokinet. 1992;23(3):191-215.
27. Visser SA, Smulders CJ, Reijers BP, et al. Mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of concentration-dependent hysteresis and biphasic electroencephalogram effects of alphaxalone in rats. J Pharmacol Exp Ther. 2002;302(3):1158-67.
28. Visser SA, Wolters FL, Gubbens-Stibbe JM, et al. Mechanism-based pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of the electroencephalogram effects of GABAA receptor modulators: in vitro-in vivo correlations. J Pharmacol Exp Ther. 2003;304(1):88-101.
29. Visser SA, Huntjens DR, van der Graaf PH, Peletier LA, Danhof M. Mechanism-based modeling of the pharmacodynamic interaction of alphaxalone and midazolam in rats. J Pharmacol Exp Ther. 2003;307(2):765-75.
30. Gilles C, Schunck T, Erb G, et al. Human models as tools in the development of psychotropic drugs. Dialogues Clin Neurosci. 2002;4(4):377-87.
31. van Lier H, Drinkenburg WH, van Eeten YJ, Coenen AM. Effects of diazepam and zolpidem on EEG beta frequencies are behavior-specific in rats. Neuropharmacology. 2004;47(2):163-74.
32. Yawata Y, Tashima R, Aritomi H , et al. Differential effects of allopregnanolone and diazepam on social behavior through modulation of neural oscillation dynamics in basolateral amygdala and medial prefrontal cortex. Front Cell Neurosci. 2024; 18:1404603.
33. SAGE report: 神経活性ステロイド GABAA 受容体ポジティブアロステリックモジュレーターであるズラノロンによるうつ病治療の機構的根拠
34. Monagle J, Siu L, Worrell J, Goodchild CS, Serrao JM. A Phase 1c Trial comparing the efficacy and safety of a new aqueous formulation of alphaxalone with propofol. Anesth Analg. 2015;121(4):914-24.
35. Muir W, Lerche P, Wiese A, Nelson L, Pasloske K, Whittem T. Cardiorespiratory and anesthetic effects of clinical and supraclinical doses of alfaxalone in dogs. Vet Anaesth Analg. 2008;35(6):451-62.
36. Hall LW, Chambers JP. A clinical trial of propofol infusion anaesthesia in dogs. J Small Anim Pract. 1987;28(7):623-37.
37. Smedile LE, Duke T, Taylor SM. Excitatory movements in a dog following propofol anesthesia. J Am Anim Hosp Assoc. 1996;32(4):365-8.

38. Richards CD, White AE. Additive and non-additive effects of mixtures of short-acting intravenous anaesthetic agents and their significance for theories of anaesthesia. Br J Pharmacol. 1981;74(1):161-70.
39. Peters JA, Kirkness EF, Callachan H, Lambert JJ, Turner AJ. Modulation of the GABAA receptor by depressant barbiturates and pregnane steroids. Br J Pharmacol. 1988;94(4):1257-69.
40. DeLorey TM, Kissin I, Brown P, Brown GB. Barbiturate-benzodiazepine interactions at the gamma-aminobutyric acidA receptor in rat cerebral cortical synaptoneurosomes. Anesth Analg. 1993;77(3):598-605.
41. Rosow CE. Anesthetic drug interaction: an overview. J Clin Anesth. 1997;9(6 Suppl):27S-32S.
42. Norberg L, Bäckström T, Wahlström G. Anaesthetic effects of pregnanolone in combination with allopregnanolone, thiopental, hexobarbital and flurazepam: an EEG study in the rat. Br J Anaesth. 1999;82(5):731-7.
43. Lu Y-Q, Yu R. Synergistic protection of allopregnanolone and phenobarbital against maximal electroshock seizures in mice. Acta Pharmacol Sin. 2001;22(4):361-4.
44. Borowicz KK, Łuszczki J, Czuczwar SJ. Interactions between non-barbiturate injectable anesthetics and conventional antiepileptic drugs in the maximal electroshock test in mice--an isobolographic analysis. Eur Neuropsychopharmacol. 2004;14(2):163-72.
45. McMahon LR, France CP. Differential behavioral effects of low efficacy positive GABAA modulators in combination with benzodiazepines and a neuroactive steroid in rhesus monkeys. Br J Pharmacol. 2006;147(3):260-8.
46. Akk G, Li P, Manion BD, Evers AS, Steinbach JH. Ethanol modulates the interaction of the endogenous neurosteroid allopregnanolone with the α1β2γ2L GABAA receptor. Mol Pharmacol. 2007;71(2):461-72.
47. Li P, Bracamontes JR, Manion BD, et al. The neurosteroid 5β-pregnan-3α-ol-20-one enhances actions of etomidate as a positive allosteric modulator of α1β2γ2L GABAA receptors. Br J Pharmacol. 2014;171(23):5446-57.
48. 厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課. 医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン. 平成 30 年 7 月.
49. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for DrugEvaluation and Research. Guidance for Industry. In vitro Drug Interaction Studies-Cytochrome P450Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions. January 2020.
50. European Medicines Agency. Committee for Human Medicinal Products. Guideline on the Investigationof Drug Interactions. January 2013.
51. Obach RS, Walsky RL, Venkatakrishnan K, Gaman EA, Houston JB, Tremaine LM. The utility of in vitro cytochrome P450 inhibition data in the prediction of drug-drug interactions. J Pharmaco Exp Ther 2006;316(1):336-48.
52. Majewska MD, Harrison NL, Schwartz RD, Barker JL, Paul SM. Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. Science. 1986;232(4753):1004-7.
53. Tobias JD, Leder M. Procedural sedation: a review of sedative agents, monitoring, and management of complications. Saudi J Anaesth. 2011;5(4):395-410.

54. Kuwagata M, Sakai Y, S Tanaka S, et al. Historical control data on developmental toxicity studies in rats. Congenital Anomalies. 2019;59:125–31.
55. Christina DC. Value of the small cohort study including a physical examination for minor structural defects in identifying new human teratogens. Congenital Anomalies. 2011; 51:16-20.
56. Cassina M, Cagnoli GA, Zuccarello D, Di Gianantonio E, Clementi M. Human teratogens and genetic phenocopies. Understanding pathogenesis through human genes mutation. European Journal of Medical Genetics 2017;60:22-31.
57. Bychkova IY, Abduvosidov KA, Roginskiy VV. The role of hypoxia in the pathogenesis of congenital hyperplasia of blood vessels in the head and neck in children (literature review). Acta Biomedica Scientifica. 2022;7(1):37-4.
58. Khera KS. Maternal toxicity: a possible etiological factor in embryo-fetal deaths and fetal malformations of rodent-rabbit species. Teratology. 1985;31(1):129-53.
59. Barlow SM, McElhatton PR, Sullivan FM. The relation between maternal restraint and food deprivation, plasma corticosterone, and induction of cleft palate in the offspring of mice. Teratology. 1975;12(2):97-103.
60. Kalter H. Factors influencing the frequency of cortisone-induced cleft palate in mice. J Exp Zool. 1957;134(3):449-67.
61. DeSesso JM, Scialli AR. Bone development in laboratory mammals used in developmental toxicity studies. Birth Defects Res. 2018;110(15):1157-87.
62. Bittigau P, Sifringer M, Genz K, et.al. Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Nov 12;99(23):15089-94.
63. Clancy B, Finlay BL, Darlington RB, Anand KJ. Extrapolating brain development from experimental species to humans. 2007;28(5):931-7.
64. Authier S, Delatte MS, Kallman MJ, Stevens J, Markgraf C. EEG in non-clinical drug safety assessments: Current and emerging considerations. J Pharmacol Toxicol Methods. 2016;81:274-85.
65. Bassett L, Troncy E, Pouliot M, et al. Telemetry video-electroencephalography (EEG) in rats, dogs and non-human primates: methods in follow-up safety pharmacology seizure liability assessments. J Pharmacol Toxicol Methods. 2014;70(3):230-40.
66. McNicholas LF, Martin WR, Cherian S. Physical dependence on diazepam and lorazepam in the dog. J Pharmacol Exp Ther. 1983;226(3):783-9.
67. Löscher W, Honack D, Fassbender CP. Physical dependence on diazepam in the dog: precipitation of different abstinence syndromes by the benzodiazepine receptor antagonists Ro 15-178 and ZK 93426. Br J Pharmacol. 1989;97(3):843-52.
68. Fraser HF, Isbell H. Abstinence syndrome in dogs after chronic barbiturate medication. J Pharmacol Exp Ther. 1954;112(3):261-7.
69. Deneau GA, Weiss S. A Substitution Technique for Determining Barbiturate-like Physiological Dependence Capacity in the Dog. Pharmacopsychiatry 1968; 1(4): 270-5.
70. Roche Laboratories Inc. Valium® brand of diazepam tablets [Package insert]: Distributed by Nutley

(NJ): Roche Laboratories Inc. Revised. 2008.

71. Hillestad L, Hansen T, Melsom H. Diazepam metabolism in normal man. II. Serum concentration and clinical effect after oral administration and cumulation. Clin Pharmacol Ther. 1974;16(3):485-89.

72. Eatman FB, Colburn WA, Boxenbaum HG, et al. Pharmacokinetics of diazepam following multiple-dose oral administration to healthy human subjects. J Pharmacokinet Biopharm. 1977;5(5):481-94.