2.4 非臨床試験の概括評価

KalVista Pharmaceuticals

目次

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 8
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 8
2.4.2.2 副次的薬理試験 9
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 11
2.4.3 薬物動態試験 11
2.4.3.1 分析方法 11
2.4.3.2 吸収 11
2.4.3.3 分布 12
2.4.3.4 代謝 12
2.4.3.5 排泄 13
2.4.3.6 薬物相互作用 14
2.4.4 毒性試験 15
2.4.4.1 単回投与毒性試験 15
2.4.4.2 反復投与毒性試験 15
2.4.4.3 遺伝毒性試験 20
2.4.4.4 がん原性試験 20
2.4.4.5 生殖発生毒性試験 22
2.4.4.6 局所刺激性 22
2.4.4.7 その他の毒性試験 23
2.4.4.8 所見と薬物動態との関係 23
2.4.5 総括及び結論 25
2.4.6 参考文献 28

表一覧

表 1: ヒト最大臨床用量 3 x 300 mg に対するセベトラルスタットの血漿中の曝露量比 24

略語一覧

略語	英語	日本語
ACTH	adrenocorticotrophic hormone	副腎皮質刺激ホルモン
ADME	absorption, distribution, metabolism, and excretion	吸収・分布・代謝・排泄
ALT	alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
aPTT	activated partial thromboplastin time	活性化部分トロンボプラスチン時間
AST	aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	area under the concentration versus time curve	濃度-時間曲線下面積
BCRP	breast cancer resistance protein	乳癌耐性タンパク質
BK	bradykinin	ブラジキニン
BLQ	below the limit of quantification	定量限界未満
C1-INH	complement component 1 inhibitor	C1 インヒビター
cHK	cleaved high molecular weight kininogen	切断型高分子キニノーゲン
C_{max}	maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
CNS	central nervous system	中枢神経系
CPE	carrageenan-induced paw edema	カラゲニン誘発足浮腫
CYP	cytochrome P450	シトクロム P450
ECAC	Executive Carcinogenicity Assessment Committee	がん原性評価委員会
EFD	embryo-fetal development	胚・胎児発生
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
FEED	fertility and early embryonic development	受胎能及び初期胚発生
FVIIa	Factor VIIa	第 VIIa 因子
FXa	Factor Xa	第 Xa 因子
FXIa	Factor XIa	第 XIa 因子
FXII	Factor XII	第 XII 因子
FXIIa	Factor XIIa	第 XIIa 因子
GLDH	glutamate dehydrogenase	グルタミン酸脱水素酵素
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
HAE	hereditary angioedema	遺伝性血管性浮腫
HAV	hepatitis A virus	A 型肝炎ウイルス

略語	英語	日本語
hERG	human ether-à-go-go-related gene	ヒト *ether-à-go-go* 関連遺伝子
HK	high molecular weight kininogen	高分子キニノーゲン
HPGA	hypothalamic-pituitary-gonadal axis	視床下部-下垂体-性腺軸
HPMC	hydroxypropylmethylcellulose in water	ヒドロキシプロピルメチルセルロース
IC_{50}	half-maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICH	International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
Ki	inhibitory constant	阻害定数
KKS	Kallikrein-kinin system	カリクレイン-キニン系
k_{off}	dissociation constant	解離定数
k_{on}	association constant	結合定数
LC-MS/MS	liquid chromatography with tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法
LK	low molecular weight kininogen	低分子キニノーゲン
LOAEL	lowest observed adverse effect level	最小毒性量
Lys-BK	Lys bradykinin	リジン型ブラジキニン
MATE	multidrug and toxin extrusion transporters	多剤毒素排出トランスポーター
MEC	molar extinction coefficient	モル吸光係数
MTD	maximum tolerated dose	最大耐量
NHP	non-human primate	非ヒト霊長類
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
NOEL	no observed effect level	無影響量
NRU	neutral red uptake	ニュートラルレッド取り込み法
OAT	organic anion transporters	有機アニオントランスポーター
OATP	organic anion transporting polypeptides	有機アニオン輸送ポリペプチド
OCT	organic cation transporters	有機カチオントランスポーター
P-gp	P-glycoprotein	P 糖タンパク質
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
PKa	plasma kallikrein	血漿カリクレイン
PPB	plasma protein binding	血漿タンパク結合率
PPND	pre- and post-natal development	出生前及び出生後の発生並びに母体の機能
PT	prothrombin time	プロトロンビン時間

略語	英語	日本語
PWG	pathology working group	病理ワーキンググループ
QWBA	quantitative whole-body autoradiography	定量的全身オートラジオグラフィー
ROS	reactive oxygen species	活性酸素種
T_{max}	time to maximum plasma concentration	最高血漿中濃度到達時間
TPGS	D-α-tocopherol polyethylene glycol 1,000 succinate	D-α-トコフェロールポリエチレングリコール 1000 コハク酸エステル
TT	thrombin time	トロンビン時間

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

セベトラルスタット（KVD900とも呼ばれる）（以下、「本薬」という）は、成人及び12歳以上の青年における遺伝性血管性浮腫（HAE）発作の経口治療薬として開発された、ヒト血漿カリクレイン（PKa）に対する新規低分子阻害薬である。本薬はヒト PKa の強力で競合的な可逆的阻害薬であり、HAE 発作時に生じる浮腫のメディエーターであるブラジキニン（BK）の生成を減少させる。本薬は経口投与後に迅速に吸収され、15分という短時間でPKa活性をほぼ完全に抑制する。本薬は、発作を認識した時点で患者が速やかに服用することを意図したものである。

効力を裏付ける試験を、単離したPKa及び血漿ベースのアッセイを用いて*in vitro*で実施し、PKaの酵素活性、内因性の PKa 基質である高分子キニノーゲン（HK）の切断（BK 生成の代替マーカー）、及び血漿プレカリクレイン（酵素前駆体）の活性化による PKa 生成に対する本薬の阻害効果を評価した。

HAEの自発的発作の全ての側面を再現する非臨床疾患モデルは確立されていないことから、本薬の*in vivo*試験では、HAE発作時の組織腫脹のモデルとして、カラゲニン誘発足浮腫（CPE）モデルを使用した。

副次的薬理試験は、受容体、トランスポーター、イオンチャネル及び酵素の市販パネル（セリンプロテアーゼ酵素パネルなど）を使用して、オフターゲット作用の可能性を評価するために実施した。

安全性薬理試験は、本薬の単回投与後に、中枢神経系（CNS）、末梢神経系、呼吸器系及び心血管系の機能への影響を評価して実施した。

毒性試験で使用した非臨床動物種及びヒトで、本薬の吸収・分布・代謝・排泄（ADME）を調べた。

本薬の安全性薬理及び潜在的毒性の評価計画及びその試験デザインは、医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイドラインに基づいて設定した。

安全性薬理試験及びピボタルな毒性試験は全て、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）を適用して実施した。GLP 適用の毒性試験及び安全性薬理試験の一環として、バリデートされた生体試料中薬物濃度分析法を使用して本薬のトキシコキネティクスを評価した。薬理試験はGLP適用試験としてではなく、試験実施施設の実験作業を定める標準作業手順書に従って実施した。薬物動態（PK）試験は GLP 適用試験ではなかったが、試験実施中の作業及び手順はGLPの原則に準拠するものであった。

全ての試験で使用した本薬は、遊離塩基である。ピボタルな非臨床試験に使用した原薬バッチをモジュール 2.6.7.4 に示す。

げっ歯類及び非げっ歯類を使用して反復投与毒性を評価した。げっ歯類としてはラット（Crl:WI(Han)ラット、Han-Wistar ラットとも呼ばれる）、非げっ歯類としては非ヒト霊長類（NHP、モーリシャス産のカニクイザル）を使用した。非臨床毒性試験に使用したげっ歯類としてラットを使用することについては、ラットとヒトとのPKa配列に相同性があること（約75%）、本薬の*in vitro* PKa阻害効果がラットとヒトにおいて同等であること、及び代謝物が定性的に類似したパターンであることを根拠として判断した。非げっ歯類については、イヌでは消化管に対する影響により本薬に対する忍容性が欠如していたこと、よって高用量の本薬の毒性評価には不適

切であることが明らかになったため、NHP を選択した。NHP の選択は、ヒトとの PKa 配列相同性が 90%以上であり、*in vitro* における本薬の代謝プロファイルがヒトと NHP で定性的に類似していることからも妥当と考えられた。

ラットにおける最長 26 週間の反復投与試験を含む全ての試験、並びに NHP における 35 日間及び 13 週間の反復投与試験では、本薬を連日経口投与した。NHP では、35 日間及び 13 週間の反復投与試験における無毒性量（NOAEL）は 50 mg/kg/日であった。両試験では高用量群で毒性変化が認められたことから、それ以降の 13 週間及び 26 週間の反復投与試験は週 2 回投与により実施した。この間欠的投与は臨床投与レジメンに近いものであることに加え、この用法により連日投与に比べより高用量（最大 300 mg/kg）での投与が可能になった。高用量での間欠投与の結果、本薬への週当たりの曝露量（濃度-時間曲線下面積［AUC］）は連日投与試験の NOAEL における曝露量と同等に維持され、急性曝露量（最高血漿中濃度［C_{max}］）が増加した。間欠投与の妥当性については、米国食品医薬品局（FDA）との Type C Meeting（2020 年 3 月）で同意が得られている。この用法は意図する臨床投与パターン（オンデマンド投与レジメン）と一致する。

ラット 13 週間反復投与試験で生じた全ての所見について可逆性が確認されたことから、ラット 26 週間反復投与試験では本薬投与によりみられた影響の可逆性については評価しなかった。NHP を使用した反復投与試験では全試験で回復試験群を設けた。

本薬の遺伝毒性を *in vitro* 及び *in vivo* で、がん原性をラット（Crl:WI(Han)）及びトランスジェニックマウス（CbyB6F1/Tg rasH2）を用いて評価した。

生殖発生毒性試験として、ラットを用いた受胎能及び初期胚発生（FEED）に関する試験、出生前及び出生後の発生並びに母体の機能（PPND）に関する試験、並びに妊娠したラット（Crl:WI(Han)）及びウサギ（ニュージーランドホワイト種）を用いた胚・胎児発生（EFD）に関する試験を実施した。

本薬の光毒性は、活性酸素種（ROS）アッセイ及び細胞ベースの *in vitro* アッセイを用いて評価した。

当初の毒性試験では、本薬の調製薬液の溶媒として 20% D-α-トコフェロールポリエチレングリコール 1000 コハク酸エステル（TPGS）を使用した。その後、0.5%ヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）水溶液には TPGS よりも広範囲にわたる背景データ（特に長期非臨床試験データ）があることから、HPMC に溶媒を変更した。この溶媒変更を裏付けるためのブリッジング試験を、ラット、ウサギ及び NHP を用いて実施した。これらの試験結果は調製方法の変更の妥当性を支持するものであったため、28 日間及び 35 日間の反復投与試験の後、ピボタルな生殖発生毒性試験の前に溶媒変更を実施した。

毒性試験に使用した本薬のバッチの不純物プロファイルには、臨床試験に使用したバッチや市販用製品の規格よりも高い濃度の不純物が含まれていた。したがって、本薬の原薬不純物は、非臨床安全性試験において適切に安全性が確認されている。ICH Q3 に従って追加の適格性評価が必要とされた不純物（モジュール 3.2.S.3.2）は、PPP7584（PPP7584 S とも呼ばれる）及び PPP758 デスフルオロ（KVD900 デスフルオロとも呼ばれる）の 2 化合物であった。両不純物について 2 種類の *in vitro* アッセイで評価したところ、いずれも遺伝毒性はないことが確認された。

本薬 300 mg フィルムコーティング錠の処方に使用が予定されている添加剤は従来より使用されているもので、その量は医薬品で一般的に使用される量である。したがって、添加剤に関する特定の毒性試験を実施する必要はなかった。この組成の詳細をモジュール 3.2.P.1 に示す。

本薬に関する非臨床試験の概略を以下に示す。概要文及び概要表をモジュール 2.6 に記載し、非臨床試験報告書をモジュール 4 に収載する。

ピボタルな毒性試験で得られた曝露量比をモジュール 2.4.4.8 に示す。

2.4.2 薬理試験

本薬の PKa 活性阻害の力価、作用機序、BK 生成阻害能（内因性基質 HK の切断のモニタリングによる）について評価を行うために、一連の非臨床薬理試験を実施した。

また、本薬の副次的薬理及び安全性薬理を評価するために、*in vitro* 試験及び非臨床動物種を使用した試験を実施した。

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

PKa はセリンプロテアーゼの一種であり、HK を切断して BK を生成させ、その結果 BK 受容体が活性化されて血管透過性が亢進する。また、PKa は第 XII 因子（FXII）を切断して第 XIIa 因子（FXIIa）を生成させることで、カリクレイン-キニン系（KKS）を、ポジティブフィードバックを介して活性化する。HAE 発作時に PKa 活性が制御されないと、HK の切断による BK の生成と、KKS 活性化のさらなる増幅が生じ、血管透過性が亢進して血管浮腫が引き起こされる。

本薬によるヒト PKa 活性阻害について、公表された方法に基づいて、種々の PKa 調製物を使用して *in vitro* 及び *ex vivo* で試験した。これらの中には、健康被験者及び HAE 患者から採取した活性化ヒト血漿におけるヒト PKa の活性阻害評価も含まれた。

これらの試験の詳細をモジュール 2.6.2 に示す。また、これらの試験で得られた主な所見の概要を以下に記載した。

本薬は、単離したヒト PKa の競合的かつ可逆的阻害剤であることが示されており、阻害定数（Ki）は 3.02 nmol/L である。酵素動態定数、すなわち結合定数（k_{on}）及び解離定数（k_{off}）は、本薬が、PKa と極めて速やかに結合し、解離する速効性の阻害剤であることを示している。

血漿ベースのアッセイでは、活性化因子を血漿に直接添加して KKS を活性化することで、HAE 発作をシミュレートした。

活性化ヒト血漿における本薬の PKa 活性阻害効果は、健康被験者の血漿（平均 IC_{50} 54.4 nmol/L）を使用した場合と HAE 患者の血漿（平均 IC_{50} 47.5 nmol/L）を使用した場合で同等であった。この活性化全血漿アッセイ系で生成された高濃度の PKa は、はるかに低い PKa 濃度で実施された単離酵素アッセイで測定された IC_{50} 6 nmol/L と比較して、本薬の IC_{50} が予測どおり高値となる要因となった（Duckworth 2022）。

本薬の PKa の内因性基質 HK の切断を阻害し、BK の生成を減少させる能力については、イムノアッセイで HK 及び切断型高分子キニノーゲン（cHK）をモニターすることにより実証されている。cHK は、血漿中の半減期が約 30 秒と極めて短い BK を測定するための有用な代替手段としてモニターされている（Marceau 2020）。

本薬の、血管浮腫の主な促進物質である BK の生成に対する影響に加え、ポジティブフィードバックによる KKS 活性の増幅への影響を、活性化ヒト血漿試料中のプレカリクレイン、FXII 及び FXIIa の濃度についてモニターすることで調べた。PKa は、FXII を切断することによっても

FXIIa を生成させ、これが酵素前駆体プレカリクレインを活性化して、PKa を増加させる。したがって、FXII 及び PKa の濃度は KKS 活性化の指標となる。本薬による PKa 阻害は、FXIIa 及び PKa の生成がともに抑制されるために、KKS の増幅を低減させる。

HAE 発作が認識された時点で本薬を投与するという臨床的使用法を模倣するために、血漿が活性化された*後に*、本薬の酵素活性阻害能の評価を行った。その結果、本薬は PKa 活性を迅速かつ濃度依存的に阻害することが明らかになった。興味深いことに、本薬濃度が 300 nmol/L 以上の場合には、PKa の内因性阻害因子である補体 C1 インヒビター（C1-INH）の治療濃度 3,000 nmol/L（1.2 IU）よりも阻害開始が速く、本薬の k_{on} が 2 桁速いことと一致した。

第 1 相及び第 2 相臨床試験では、他の探索的薬力学データが得られており、それらについてはモジュール 2.7.2 及びモジュール 2.5 に記載した。

効力を裏付ける薬力学試験及び毒性試験に使用する動物種の選択をサポートするために、複数の非臨床動物種について本薬の PKa 酵素阻害を評価し、本薬の種間交差反応性について検討した。得られた PKa IC_{50} 値をヒトの IC_{50} と比較しところ、ラット及び NHP（カニクイザル）を非臨床毒性試験の動物種として使用することが妥当であることが裏付けられた。

HAE 発作を再現できる動物モデルは確立されていないことから、本薬の *in vivo* 活性の試験にはラット CPE モデルを使用した。このモデルは、キニンのほか、炎症誘発性サイトカイン、ヒスタミン、5-ヒドロキシトリプタミン、プロスタグランジンなどのいくつかのメディエーターが関与する、一般的な急性炎症による浮腫のモデルとして汎用されており（Morris 2003）、PKa 阻害剤である抗体ラナデルマブ（DX-2930）（Kenniston 2014）及び二環性ペプチド（Teufel 2018）の *in vivo* 有効性を説明するために用いられている。足へのカラゲニン注射の前に本薬を経口投与したところ、CPE が用量依存的に抑制された。本薬 300 mg/kg を投与したところ、全ての測定時点（カラゲニン注射後 2、4、6 時間）でカラゲニン誘発反応を有意に抑制し（Student の t 検定で $p<0.05$）、6 時間後の有効性は陽性対照（インドメタシン）と同等（ともに 39%の抑制）であった（CPE-KPL-2 試験）。

2.4.2.2 副次的薬理試験

本薬のオフターゲット活性の可能性について、広範囲の受容体及び酵素（PKa と密接に関係するセリンプロテアーゼのパネルを含む）に対して評価した。

本薬は、PKa と密接に関係するプロテアーゼ酵素、すなわち第 VIIa 因子（FVIIa）、第 Xa 因子（FXa）、第 XIa 因子（FXIa）、第 XIIa 因子（FXIIa）、プラスミン、トリプシン、組織カリクレイン 1 及びトロンビンと比較して、ヒト PKa に対して作用が選択的であることが示された（ヒト PKa に対する選択性は全ての比較において 1,500 倍超）（057_KV123900_PH_2016 試験及び AB31416 試験）。

ヒト及びマウスのプレカリクレイン欠乏症に関する文献に基づくと、PKa が強く阻害されると FXIIa の生成が減少し、FXIIa による内因性凝固カスケードの開始に影響が生じ、活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）が延長すると推測される。ヒトではプレカリクレイン（血漿カリクレインの前駆体であるチモーゲン）欠乏症が 81 例報告されており（Girolami 2010、Girolami 2018）、この疾患の最も顕著な特徴は、正常人に比べ aPTT が大幅に延長していることである。しかし、プロトロンビン時間（PT）及びトロンビン時間（TT）は影響を受けない。このような患者には関連する臨床症状がないようで、出血亢進や他の注目すべき症状は認められていない。血漿カリクレインノックアウト（*klkb1*-/-）マウスでも出血時間の延長を伴わない同様の aPTT 延長が認められている（Bird 2012）。本薬は、単離酵素アッセイにおいて、最大 40,000 nmol/L の

濃度で、内因性凝固因子 FXIIa も FXIa も直接阻害しないこと（阻害は 50%未満）が示されている。しかし、本薬による長期間の PKa 阻害が aPTT に及ぼす潜在的影響を確認するために、毒性試験及び臨床試験でこの影響をモニターした。

外因性凝固カスケード因子 FXa、FVIIa 及びトロンビンに対する本薬の選択性に関するデータも、PT 又は TT への影響がないことと符合した。毒性試験でこれらのパラメータのモニタリングを定期的に行った結果、本薬を高用量（300 mg/kg/日以上）で投与した後には PT 及び aPTT の軽微な延長が認められたが（NHP を使用した 35 日間反復投与試験でそれぞれ 1.3 倍、1.6 倍の延長）、低用量の長期投与試験では延長は認められなかった。

HAE 発作時には、PKa を介する HK 切断により BK が生成される一方で、組織カリクレイン 1 による低分子キニノーゲン（LK）の切断よって、リジン型ブラジキニン（Lys-BK）が生成され、その後、生理的条件下では BK に異化される。これに関しては、組織カリクレイン 1 により生成された BK は、BK 受容体（B2 及び B1）（De Maat 2018）との相互作用を介して、心臓、腎臓及び免疫系に有益な作用を及ぼすとする説が提唱されている（Girolami 2021、Monteiro 2007）。本薬の PKa に対する選択性は組織カリクレイン 1 に対する選択性の 6,623 倍を超えているため、いずれかの BK 受容体によって介される BK の他の機能に干渉する可能性は低い。

選択性については、市販の安全性スクリーンを用い、広範囲の酵素、受容体、イオンチャネル及びトランスポーターを結合標的として試験を行った。本薬は、試験した全ての標的に対し 10 µmol/L の濃度で 50%未満の阻害を示した。これは、PKa の IC_{50}（6 nmol/L）と比較すると、選択性が 1,656 倍超の余裕を持つことを示している（AB31416 試験）。

本薬は強力な選択的 PKa 阻害剤であると考えられており、重要なオフターゲット薬理活性を有する可能性は低いと思われる。

2.4.2.3 安全性薬理試験

ラットへの 100、350 又は 1,000 mg/kg の単回経口投与後に、行動及び生理学的評価項目（Irwin 試験）を用いて評価したところ、本薬の CNS 及び末梢神経系機能に対する影響は認められなかった（モジュール 2.6.2.4.2）。NOAEL における曝露量を最大臨床用量 2 × 300 mg 投与後の予測曝露量と比較すると、AUC は 37 倍、C_{max} は 6.4 倍と推定された（表 1）。

本薬 100、350、1,000 mg/kg を単回投与した後、無拘束ラットの呼吸パラメータ（全身気圧プレチスモグラフィーで測定）に対する影響は認められなかった（モジュール 2.6.2.4.3）。NOAEL におる曝露量を最大臨床用量 2 × 300 mg 投与後の予測曝露量と比較すると、AUC は 37 倍、C_{max} は 6.4 倍と推定された（表 1）。

心血管系に対する影響を *in vitro* 及び *in vivo* で評価した。HEK293 細胞におけるヒト *ether-à-go-go* 関連遺伝子（hERG）試験では、本薬による hERG テール電流振幅の抑制が高濃度 30 µmol/L（名目値、実際の濃度は 37.6 µmol/L）で 10%未満であったことから、パッチクランプ法では hERG テール電流に対する有意な影響は認められなかった（モジュール 2.6.2.4.1）。

テレメトリー装置を装着した NHP では、本薬 30、100、300 mg/kg の単回経口投与により、投与後 20 時間以上にわたり動脈圧、心拍数及び心電図パラメータに対する影響は認められなかった。試験した最高用量 300 mg/kg における曝露量を最大臨床用量 2 × 300 mg 投与後の予測曝露量と比較すると、AUC1.6 倍、C_{max} は 1.0 倍であった（8362593 試験）。NHP を用いた反復投与試験（35 日間及び 13 週間の連日投与試験、13 週間及び 26 週間の間欠投与試験）では、心電図関連評価項目（心電図、血圧、心拍数）に対する影響は試験したいずれの用量でも認められなかった。NHP

で曝露量が最高となった用量は、26 週間間欠投与毒性試験における 300 mg/kg/回であった（モジュール 2.6.2.4.1）。健康被験者を対象とした QT/QTc 評価試験（KVD900-109 試験）の結果をモジュール 2.7.2 に示す。

2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験

試験は実施していない。

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 分析方法

GLP 適用下に実施された反復投与毒性試験、生殖発生毒性試験及びがん原性試験で採取したマウス、ラット、ウサギ、イヌ及び NHP のトキシコキネティクス評価用試料の分析には、バリデートされた分析法を用いた（モジュール 2.6.5.2）。液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法（LC-MS/MS）を用いて分析を実施し、全てのアッセイで内部標準として D_8-重水素化した本薬（KV126341）を使用した。全ての動物種についてキャリブレーション範囲は適切と考えられ、血漿濃度-時間プロファイルが適切に特定され、キャリブレーション範囲に収めるために希釈が必要な試料は多くなかった。

ピボタルな反復投与毒性試験、生殖毒性試験及びがん原性試験では、低用量を投与した場合に投与後 24 時間の濃度が定量限界未満（BLQ）となった例があったが、より高用量では、24 時間後の濃度は定量可能であった。ただし、26 週間マウスがん原性試験（20235986 試験）では、試験 1 及び 180 日の全ての用量群における 24 時間後の濃度が BLQ であった。これは、マウスでは本薬の半減期が短いことに起因するものと考えられた（0.33 時間、068_KV123900_PK_2017 試験）。

GLP 適用試験のトキシコキネティクス試料は全て、バリデートされた凍結保存安定期間内に分析した。全ての動物種について Incurred Sample Reanalysis を実施し、基準を満たすことを確認した。必要に応じて別施設で確立した場合にも分析は適切に実施した。

2.4.3.2 吸収

非臨床動物種を使用した PK 試験では、本薬は迅速に吸収され、通常、最高血漿中濃度到達時間（T_{max}）は 1.5 時間以内であったが、一部の高用量では T_{max} が遅れることがあった（モジュール 2.6.5.3）。これらの PK 試験で用いた調製薬液の処方は、薬物の溶解性を高めることを意図したもので、毒性試験及び臨床製剤を反映したものではなかったが、毒性試験でも概して迅速な T_{max} が認められ（高用量の一部を除く、モジュール 2.6.7.3）、最終的な臨床剤形においても、ヒト被験者で迅速な T_{max} が認められた（KVD900-108 試験、投与 C、T_{max} 中央値は 0.99 時間）。

試験した非臨床動物種では、経口バイオアバイラビリティは中程度であった（23～67%、モジュール 2.6.5.3）。[^{14}C]セベトラルスタット投与後の代謝プロファイリングでは糞便中に排泄された未変化体の量は少なかったことから（モジュール 2.6.5.9）、ラット、NHP 及びヒトにおける経口投与後の吸収率は高い（70%以上）と推定された。糞便中にみられる代謝物の生成には、腸内細菌叢による腸内での生体内変換が寄与した可能性があるが、糞便中の主な代謝物は血漿中でも認められ、酸化的性質を持っていた。ラット（胆汁中の抱合を含む）、NHP 及びヒトで、本薬の直接的な第 2 相抱合は認められていないことから、胆汁中に排出された抱合型の本薬が分解されても、糞便中に排泄される本薬の量に寄与する可能性は低い。

トキシコキネティクス評価用試料を採取した全ての試験において、トキシコキネティクス分析によって血漿中の本薬の曝露量を求めた（モジュール 2.6.7.3）。血漿中の曝露量は概して用量に比例するか用量比を上回った。NHP では、血漿中の曝露量に一貫した性差は認められなかった。ラットでは、単回投与後は概して雄よりも雌の方が曝露量が高かった。反復投与後は雄の曝露量が高くなったが、最終採取時のトキシコキネティクス評価用試料で C_{max} 及び AUC にみられた性差は概して 2 倍未満であった。したがって、曝露量比の計算にあたっては、雌雄合算した反復投与後の曝露量を用いた。上述の雄ラットの事例を除き、いずれの動物種についても反復投与後の本薬の曝露量に顕著な性差は認められなかった。

2.4.3.3 分布

本薬の *in vitro* 血漿タンパク結合率（PPB）は、ヒト（非結合率 0.232）及び試験に使用した非げっ歯類では中程度であったが、マウス及びラット（非結合率 0.039～0.059）ではより高かった（モジュール 2.6.5.6）。げっ歯類でさえ結合率が 99%（極めて高い結合率）に達しなかったことから、曝露量比の計算は総血漿濃度に基づいて行うことが適切と考えられた。本薬 300 mg をヒトに投与した後に到達する血漿中濃度の代表値、約 2,500 ng/mL の血漿濃度で PPB の評価を実施した（300 mg 錠として投与した場合、平均 C_{max} は 3,075 ng/mL であった［KVD900-110_A110-1-ad hoc 試験、n=18］）。ヒト血漿中における結合が中程度であったことは、血漿中で本薬が他の薬物などで置換されることで遊離分画が大幅に増加する可能性が低いことを示唆するものである。

定量的全身オートラジオグラフィー（QWBA）により、[^{14}C]セベトラルスタットを白色及び有色ラットに経口投与後、組織（脳／CNS 以外）への放射能の迅速かつ広範な分布が認められた（モジュール 2.6.5.5）。組織中の放射能濃度はピークに達した後に速やかに低下した。最も高い濃度は概して排泄器官で認められた。有色雄ラットのメラニン含有組織（有色の皮膚や眼構成組織など）における放射能濃度は白色ラットに比べ高かったことから、メラニンに対する親和性が示唆されるが、結合量は少なく可逆的であった。メラニン結合に伴う毒性のリスクは一般に低いとされている（例えば眼毒性：Leblanc et al 1998）。さらに、本薬はオンデマンド投与を予定していることから、慢性的な投与が必要とされる治療に比べ蓄積のリスクは低いと考えられる。

交配済の雌アルビノラットでは、QWBA 分析による胎児全体の放射能濃度測定が可能であったのは、[^{14}C]セベトラルスタット経口投与の 1 時間後のみであり、次の時点（24 時間後）では検出限界未満であった（モジュール 2.6.5.5）。妊娠雌ラットへの [^{14}C]セベトラルスタット投与後の胎児中の放射能濃度が低いことは、胎盤移行組織分布試験でも確認された（モジュール 2.6.5.7）。

2.4.3.4 代謝

[^{14}C]セベトラルスタットをヒトに投与すると、濃度が比較的低い様々な代謝物への広範な生体内変換がみられた（KVD900-103 試験）。ただし、本薬が尿及び糞便中の主な薬物関連成分であり（尿中と糞便中でそれぞれ投与量の 9%、13%）、排泄物中で認められた個々の代謝物の濃度は、投与量の 12%未満であった。排泄物中に最も多く含まれていた代謝物は、二重酸化／二重水素化生成物 M34 及びピリジル基からの脱メチル生成物 M3 であった（尿と糞便を併合した値は、それぞれ投与量の 11.3%、10.7%）。同様に、血漿中でも本薬が主要成分であり、薬物関連物質の $AUC_{0\text{-}24}$ の 64.1%を占めた。血漿中に複数の代謝物が認められたが、平均で $AUC_{0\text{-}24}$ の 8%を超えるものはなかった。最も量が多かった血漿中の代謝物は、デス-[メチル-フルオロ-メチル-ピリドン]（分解生成物、M19）（平均で薬物関連物質の $AUC_{0\text{-}24}$ の 7.1%）であった。

[^{14}C]セベトラルスタットをラット及び NHP に投与したところ、ヒトと極めて類似した代謝パターンが認められた（モジュール 2.6.5.9 及びモジュール 2.6.5.11）。いくつかのヒト代謝物の構

造が明確に決定され、それらがラット及び NHP にも存在することが示された（M19、M6、M3、M10 など）が、ヒトの他の代謝物、たとえば二重酸化／二重水素化生成物 M34 及び M38 は、生体内変換部位が分子中の正確な位置ではなく、分子構造中の一部分にあった。ラット及び NHP でも、生体内変換部位がヒトと同じ分子部位にある代謝物が認められた。ヒト、ラット及び NHP から採取した血漿について LC-MS/MS により代謝物スクリーニング試験を行った（YDS/082 試験）。この試験では、血漿中の全ての主要なヒトの代謝物について、同じ構造を持つ代謝物がラット及び NHP に存在することが共クロマトグラフィーで証明された。このことから、全く同じ代謝物がこれらの動物種に存在するという確信が得られた。ただし、[^{14}C]セベトラルスタット投与後にヒト血漿で認められた主要な代謝物（M19）は、LC-MS/MS スクリーニングでラット及び NHP には認められなかった。これはイオン化が不十分であったためか、マトリックスのイオン抑制成分と共溶出したためと思われる。ラット及び NHP の毒性試験で NOAEL 用量投与後に採取した血漿試料中の M19 の定量を、バリデートされたアッセイを使用して実施したところ、600 mg の本薬投与後にヒトで認められた M19 曝露量と同等（雌雄の NHP、雌ラット）かそれよりも高い曝露量（雄ラット）で存在することが示された（モジュール 2.6.5.9）。

ヒト血漿中に最も多く存在する代謝物である M19 は、ヒト被験者における薬物関連物質の $AUC_{0\text{-}24}$ に占める割合は平均して 10%未満であったこと、M19 は薬理学的活性を欠くこと（IC_{50} が 100 µmol/L 超、182_KV124020_PH_2021 試験）、本薬は臨床で間欠的に投与されることから、ラット及び NHP における M19 の曝露量に基づくと、ヒト血漿中の代謝物には特異的又は量的に不均衡と分類されるものはないと考えられる。ラット及び NHP における本薬の生体内変換はヒトと類似していることから、これらの動物種が代謝の面からも毒性試験に適していることが確認された。

ヒトでは、[^{14}C]セベトラルスタット投与後、総放射能濃度の血漿中終末相半減期は、本薬の半減期と比較して長かった（KVD900-103 試験）。これは、この試験では比較的高い放射能線量を使用したため、放射能の方が定量可能な時間が長かったことが理由のひとつであると考えられるほか、循環血中では代謝物の方が半減期が長い可能性があることも理由として考えられる。投与後 24 時間時点の血漿プールのラジオクロマトグラムでピークが明らかだった薬物関連物質は本薬のみであったことから、これ以降の時点における循環血中の放射能は低濃度の複数の成分を反映したものであり、血漿中に持続的にみられる重要な代謝物は一切存在しないことが示唆される。加えて、後期の時点で薬物関連物質が血漿タンパク質と極めて強固に結合することが、血漿中の総放射能の半減期が長い一因であると思われる。しかし、総放射能のこの長い終末消失相が出現するのは約 24 時間後であるため、終末相が始まるのは平均血漿放射能濃度がすでに極めて低くなった時点である（24 時間時点における平均血漿放射能濃度は C_{max} 時点の濃度の 3%未満であった）。後期の時点では循環血中の総放射能濃度の絶対値が低いこと、放射能が排出物中に迅速かつ定量的に回収されること、及び本薬の投与法が間欠的であることを勘案すると、放射能の終末相半減期が長いことでリスクが生じる可能性は極めて低いと考えられる。

2.4.3.5 排泄

[^{14}C]セベトラルスタットをラット、NHP 及びヒトに経口投与した後、放射能は迅速かつ完全に回収された（モジュール 2.6.5.13、KVD900-103 試験）。ラットでは排泄物中の総平均回収率は 99%に達し、主として糞便での回収であった（放射能線量の 91%）。同様に、NHP では、放射能の主な排出経路は糞便であった（総平均回収率 95%のうち 82%を占めた）。ヒトでは、ラット及び NHP より多くの放射能が尿中に回収された（排泄物中の平均総回収率 96%のうち 32%）が尿中にが、尿中に排出された未変化体は平均で投与量の 9%にすぎなかった。ヒトでは放射能の糞便への排泄は尿への排泄の 2 倍に上り、薬物関連物質は主に代謝物として排泄されたことを考慮すると、排出は主として肝臓の代謝によるもので、代謝物は主に胆汁を介して糞便に排出され、尿を

介する排出の程度はこれよりも低いことが示唆される。これは、胆管にカニューレを挿入した雄ラットに[^{14}C]セベトラルスタットを経口投与した後に得られた結果によって裏付けられており、胆汁で投与後48時間までに平均55%の放射能が主に代謝物として回収された（モジュール2.6.5.1及びモジュール2.6.5.9）。

授乳中の雌ラットに[^{14}C]セベトラルスタットを投与したところ、放射能は血漿中の放射能濃度よりわずかに高い濃度で母乳に分泌された（モジュール2.6.5.7）。この結果は、離乳前に児が母乳を介して薬物関連物質に曝露されることを示しているが、PPND試験では、F1世代の児の発達に対する影響は認められなかった（モジュール2.6.6.6.3）。投与後24時間には、ラット母乳中の放射性薬物関連物質の濃度は投与前の値に近くなった。

2.4.3.6 薬物相互作用

最適化されたインキュベーション条件を用いたシトクロムP450（CYP）酵素試験により、本薬は*in vitro*では主にCYP3A4により代謝されることが明らかになった（モジュール2.6.5.10）。本薬の生体内変換におけるCYP3A4の優位性は、強い、中程度、弱い作用を有するCYP3A4阻害剤及び誘導剤が本薬の薬物動態に及ぼす影響を評価した2件の臨床薬物相互作用試験（KVD900-106試験及びKVD900-112試験）において確認された。各試験の詳細な結果及び結論をモジュール2.7.2及びモジュール2.5に示す。

*In vitro*試験で、本薬は排出トランスポーターであるP糖タンパク質（P-gp）及び乳癌抵抗性タンパク質（BCRP）の基質であることが示された（モジュール2.6.5.15）。臨床薬物相互作用試験（KVD900-106試験）では、これらのトランスポーターの強力な阻害剤が本薬の薬物動態に及ぼす影響について評価した。BCRP阻害剤であるエルトロンボパグと併用投与した場合、本薬のAUCに影響は認められず、平均C_{max}の軽度な増加（12%）が認められた。P-gpの強力な阻害剤であるキニジンにより、本薬のAUC及びC_{max}が軽度に増加した（それぞれ14%、18%）。この試験の詳細な結果と結論をモジュール2.7.2及びモジュール2.5に示す。

本薬が*in vitro*で有機アニオントランスポーター（OAT）、有機カチオントランスポーター（OCT）、有機アニオン輸送ポリペプチド（OATP）、多剤毒素排出トランスポーター（MATE）（具体的にはOAT1、OAT3、OCT2、OATP1B1、OATP1B3、MATE1及びMATE2-K）の基質であるかどうかを試験した。本薬は、MATE2-Kを除いてこれらのトランスポーターの基質ではなかった。なお、MATE2-Kについては境界基質と分類された（モジュール2.6.5.15）。ヒトでは未変化体の平均腎排泄率はわずか9%であったことから、本薬はMATE2-Kの阻害剤が引き起こされる薬物相互作用の基質とはならないと考えられた。

*In vitro*において、本薬は10 µmol/L以上の濃度で用量依存的にCYP3A4を誘導したが、本薬は臨床ではオンデマンド投与され、CYP誘導にはその作用が最大に達するまでに一般に複数回の投与を必要とすることから、本薬がCYP3A4誘導による薬物相互作用の原因となることはないと考えられる（モジュール2.6.5.12）。

本薬は*in vitro*でCYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C19、CYP2D6を阻害しなかったが、CYP2C9及びCYP3A4に対しては非時間依存的な阻害を示した（IC_{50}はそれぞれ30.1 µmol/L及び120 µmol/L）（モジュール2.6.5.12）。本薬は、100 µmol/Lまでの濃度では*in vitro*におけるP-gp阻害はみられず、またBCRPに対しては弱い阻害剤であった（IC_{50}は82.3 µmol/L）。取り込みトランスポーターとともにインキュベートした場合、本薬はOAT1を阻害しなかったが、OATP1B1及びOATP1B3（IC_{50}はそれぞれ86.3 µmol/L、51.3 µmol/L）、並びにOAT3、OCT2、MATE1及びMATE2-K（IC_{50}は5.28～19.2 µmol/L）の阻害剤であった（モジュール2.6.5.15）。本薬が薬物相互作用を引き起こす可能性を*in vitro*で評価した追加の考察をモジュール2.5に記載している。本

薬はオンデマンド投与を予定しており、早期の T_{max} の後に血漿濃度が急速に低下することを考慮すると、本薬が CYP 及びトランスポーターを介した薬物相互作用の原因となる可能性は低いと考えられる。

2.4.4 毒性試験

ラット及び NHP を使用した最長 26 週間の経口反復投与毒性試験からなる一連の試験を実施した。ラットにおける試験並びに NHP における 35 日間及び 13 週間の反復投与試験では本薬を連日投与し、また、NHP における別の 13 週間及び 26 週間の反復投与試験では本薬を週 2 回投与した。各試験に使用した用量での標的臓器毒性を特定し、NOAEL を明らかにした。最長 13 週間までの全てのラットの反復投与試験及び全ての NHP の反復投与試験において、回復性試験群を追加し、投与期間終了後に休薬期間を設け、全ての所見について可逆性を調べた。その結果、13 週間投与試験（連日投与）で生じた全ての変化について可逆性が確認されたことから、ラット 26 週間投与試験（連日投与）では変化の可逆性については評価しなかった。

遺伝毒性については、*in vitro* 試験（2 試験）及び *in vivo* 試験（1 試験）を行い、本薬の変異原性及び染色体異常誘発性の可能性を評価した。また、がん原性については、トランスジェニックマウスにおける 26 週間の連日経口投与試験及びラットにおける 104 週間の連日経口投与試験を行い、がん原性の可能性について評価した。

生殖発生毒性については、ラットにおける FEED 試験及び PPND 試験、並びにラットとウサギにおける EFD 試験を経口投与により実施した。このほか、光毒性及び不純物に関する試験を実施した。

本薬のトキシコキネティクスプロファイルは、全てのピボタルな反復投与試験、がん原性試験及び生殖発生毒性試験（PPND 試験以外）において、適切にバリデートされた生体試料中薬物濃度分析法を用いて評価した。

2.4.4.1 単回投与毒性試験

単回経口投与による急性毒性試験は ICH M3(R2)ガイドラインに従うと不要であるため実施しなかった。急性毒性の可能性については、予備的な最大耐量（MTD）試験及び GLP 適用下に実施された反復投与毒性試験において評価した。ラットでは、最大 1,000 mg/kg/日を 7 日間連日投与した時及び反復投与毒性試験の初回投与後の忍容性は良好で、重要な臨床症状や試験期間中の死亡例は認められなかった（モジュール 2.6.7.6）。NHP では、1,000 mg/kg を単回投与（500 mg/kg を 6 時間間隔で 2 回投与）した時及び反復投与毒性試験の初回投与後、忍容性は良好で、毒物学的に意義のある所見は認められなかった。1,000 mg/kg/日の 3 日間投与によって凝固時間の延長（PT 及び aPTT の延長）が認められたが、死亡例はみられず、一般状態、体重、摂餌量への顕著な影響は認められなかった（モジュール 2.6.7.6）。

2.4.4.2 反復投与毒性試験

本薬の毒性は、ラット及び NHP に強制経口投与（最長 26 週間）を行うことにより評価した。13 週間及び 26 週間の反復投与試験でラットに認められた主な所見は肝臓、副腎、甲状腺及び卵巣の病理組織学的変化であったが、いずれの変化も毒性とは判断されず、両試験の NOAEL は 300 mg/kg/日と考えられた。NHP では、100 mg/kg/日以上の連日投与によって影響がみられた主な器官は肝臓であった。しかしながら、26 週間間欠（週 2 回）投与試験では、肝臓への影響は認められず、この試験の NOAEL は 300 mg/kg/週 2 回であった。肝臓への影響は、マウスにおける連日投与試験でも認められた（NOAEL は雄で 65 mg/kg/日、雌で 100 mg/kg/日）。

以上の主要な所見に加え、試験期間中にみられた死亡発生について以下に説明する。NOAEL、最小毒性量（LOAEL）及び無影響量（NOEL）、並びに予測される臨床曝露量に対する曝露量比をモジュール 2.4.4.8 及び表 1 に示す。

2.4.4.2.1 主要な所見

死亡発生

ラット 13 週間反復投与毒性試験では、2 日間（試験 14 日～15 日）でラット 13 例が死亡するか瀕死状態となった。これらの動物は投与群や性別を問わず均等に分布しており、全てが強制経口投与手技に関連する傷害が原因で瀕死状態となったことが病理組織学的に確認され、本薬投与とは関連がないことが明らかになった（モジュール 2.6.7.7.B）。ラット 26 週間試験でも、投与に伴う傷害により 2 例が死亡した。また、ラット 2 例（対照群の雄 1 例、300 mg/kg/日群の雌 1 例）で痙攣がみられたため、それぞれ試験 121 及び 142 日に安楽殺した。痙攣の発現頻度は、試験実施施設において同じ系統及び齢のラットで認められる背景データの頻度と一致したことから、本薬との関連はないと判断された（モジュール 2.6.7.7.C）。

35 日間（連日）反復投与試験で NHP に 300 mg/kg/日以上を投与したところ、忍容性の欠如がみられ、一般状態の悪化が認められた。瀕死状態の動物 3 例を早期に安楽殺した（500 mg/kg/日群の雄 1 例を試験 16 日に、500/300 mg/kg/日群の雌 1 例を試験 29 日に、300 mg/kg/日群の雄 1 例を試験 29 日に安楽殺）。これらの用量群の残りの動物は、一般状態の悪化のため試験 30 日に安楽殺した（500/300 mg/kg/日群の雄 2 例及び雌 2 例、300 mg/kg/日群の雄 2 例及び雌 3 例）。50 又は 100 mg/kg/日を投与した NHP では死亡例は認められなかった。血液生化学的検査値の変化及び病理組織学的所見に基づき、瀕死状態となった主因として肝毒性が特定された（モジュール 2.6.7.7.E）。

NHP における 26 週間間欠投与試験では、重篤な一般状態の悪化のため 3 例（15 mg/kg/回群の雄 1 例及び雌 1 例、150 mg/kg/回群の雌 1 例）をそれぞれ試験 71、108 及び 102 日に早期安楽殺した。安楽殺に至った所見には、体重減少、ボディコンディションスコア低下、脱水、液状便、活動性低下、円背姿勢などがあった。これらの所見は基礎的なストレス及び腸内細菌叢異常と一致し、本薬投与の結果ではないと結論された（モジュール 2.6.7.7.H）。13 週間の連日投与及び間欠投与試験では、死亡例や早期安楽殺はみられなかった。

肝毒性

反復投与毒性試験において、本薬投与後にラット、マウス及び NHP で肝臓への影響が認められた。肝臓重量の増加が、様々な病理組織学的所見及び肝臓関連の血液生化学検査値の変化とともに、動物種に共通する所見として認められた。

ラットでは、全ての期間（7 日間、28 日間、13 週間、26 週間）の試験において、肝臓重量の増加が用量依存的に、小葉中心性肝細胞肥大と関連して認められた。最小影響用量は、雌ラットの 26 週間投与試験における 100 mg/kg/日であった。28 日間投与試験では 1,000 mg/kg/日投与により、有糸分裂像の増加及び門脈周囲の空胞化が数件認められた。肝毒性を伴う血液生化学パラメータの変化は、コレステロールの軽微な増加に限られていた（28 日間試験では 300 mg/kg/日以上で 2.3 倍、13 週間試験では 300 mg/kg/日で 1.4 倍、26 週間試験では 300 mg/kg/日で 1.6 倍の増加）（モジュール 2.6.7.7）。ただし、変性を示す病理組織学的所見は認められなかったことから、ラットの肝臓所見は毒性とみなす必要はないと考えられた。26 週間投与試験における NOAEL は 300 mg/kg/日であった。

野生型マウス及びトランスジェニックマウスに、本薬をそれぞれ 28 日間及び 26 週間、連日投与したところ、200 mg/kg/日以上の投与により、肝臓重量の増加及び小葉中心性肝細胞肥大とともに、軽微／軽度の混合細胞浸潤、単細胞壊死及び色素蓄積（リポフスチン）が雌雄ともに認められた。300 mg/kg/日以上の 28 日間投与により、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）及びアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）の増加が認められ（それぞれ対照値の 13.2 倍及び 37 倍）、同時に病理組織学的所見も認められたことから、この肝臓の所見は毒性とみなす必要があると考えられた。26 週間投与試験では、血液生化学パラメータは評価しなかったが、200 mg/kg/日（雄）及び 300 mg/kg/日（雌）投与により肝臓に炎症性／壊死性変化が認められた。ただし、中用量（雄：65 mg/kg/日、雌：100 mg/kg/日）では認められなかったことから、影響閾値の存在が示唆された（モジュール 2.6.7.10.A）。

げっ歯類における肝細胞肥大を伴う肝臓重量の増加は、多くの場合、CYP や他の薬物代謝酵素誘導に伴う適応反応を示唆しており、明確な影響閾値の存在とともに単独で認められる場合には、毒性とみなす必要はないと考えられる（Maronpot et al 2010; Hall et al 2012; Palazzi et al 2016）。ラット及びマウスのトキシコキネティクス評価では、本薬が親化合物の代謝を亢進させたとする所見はなく、動物種や試験期間にかかわらず、各試験終了時における曝露量は試験 1 日と概ね同等かそれ以上であった。

ラットでは肝臓において上記以外の病理組織学的所見は認められなかったが、マウスでは混合細胞炎症、単細胞壊死及び色素蓄積が、雌雄とも 200 mg/kg/日以上の 28 日間投与及び 26 週間投与によりみられた。65 mg/kg/日以下の投与では、いずれの動物にも影響は認められなかったことから、明確な影響閾値がみられた。マウスでは本薬の消失は極めて急速で、半減期は 0.33 時間と、肝臓に対する代謝負荷が極めて高いことを示している。これが、ラットとの影響の大きさに差が生じた要因である可能性がある。なお、これらの所見は連日投与後に認められたものであるが、予定する臨床使用はオンデマンド投与である。

NHP では、35 日間反復投与毒性試験（用量 0、50、100、300、300/500 mg/kg/日）において、高用量（300 mg/kg/日以上）の連日投与により、肝細胞肥大、肝細胞壊死、胆管過形成、炎症性細胞浸潤、クッパー細胞及び肝細胞の色素沈着など、肝臓に様々な病理組織学的所見がみられた。これらの所見は血液生化学パラメータの増加（ALT 及びグルタミン酸脱水素酵素［GLDH］で最も顕著）を伴い、毒性とみなす必要があると考えられた。コレステロールは減少したが、ビリルビンには影響がみられなかった。肝臓の病変に関する NOEL は 100 mg/kg/日と判断された。しかし、100 mg/kg/日では体重減少及び一般状態悪化が認められたことから、試験全体としての NOAEL は 50 mg/kg/日と判断された（モジュール 2.6.7.7.E）。

NHP の 13 週間投与試験（2 試験）では、一般的な背景病変に対する解釈が一貫していなかったこと（13 週間連日投与試験）、及び 13 週間間欠投与試験に使用した動物が A 型肝炎ウイルス（HAV）に感染していたことから、肝毒性の評価に混乱が生じた。

NHP における 13 週間連日投与試験（用量 0、10、25、50 mg/kg/日）では、単核細胞浸潤、並びに軽度から中等度の ALT 及び GLDH の増加（それぞれ最大で対照値の 10.9 倍及び 7.2 倍）が認められたほか、肝細胞壊死／変性及びクッパー細胞や肝細胞の色素沈着が少数例みられた。当初の病理組織学的検査では全ての用量で認められた所見が毒性とみなされたことから、試験実施施設は NOAEL を設定しなかった。しかし、酵素値の増加が病理組織学的所見とは相関せず、対照群の動物でもこれらの所見が高頻度にみられたことから、試験依頼者はこれらの所見を毒性と判断するには説得力に欠けると考えた。このため、これらの所見について確度の高い解釈を得るために、肝臓及び／又は NHP に関する専門知識を有する経験豊富な病理学者 5 名で構成する病理ワーキンググループ（PWG）が招集され、肝臓の所見について独立した詳細な分析及び肝臓所

見の包括的評価を行い、より確実な解釈を導き出すこととなった。PWG は、単核細胞浸潤が認められるものの病変が軽度／軽微であること、用量依存性がみられないこと、及び対照群を含む全ての群で認められたことを考慮し、この所見は毒性作用に起因するものではなく、背景病変の増悪であると結論付けた。50 mg/kg/日を投与した雌 1 例で肝細胞壊死、クッパー細胞肥大／過形成及び肝細胞色素がみられたが、対照群の雄 1 例でも同様の所見が認められた。PWG はこれらの肝臓の所見は本薬投与によるものではないと判断し、NOAEL が 50 mg/kg/日であることを全会一致で確認した（モジュール 2.6.7.7.F）。

NHP における 13 週間間欠投与試験（用量 0、50、100、200、300 mg/kg/回を週 2 回）では、「炎症」と表現される病理学的所見が認められた。この所見は、先の NHP 試験で報告された肝臓の変化（単核炎症細胞の浸潤及びクッパー細胞の過形成／肥大）と類似のパターンを示し、同時に軽度の変性病変（肝細胞の変性／単細胞壊死及び空胞化）が認められた。しかし、動物 42 例中 10 例で影響が認められたものの、用量依存性はみられず（50 mg/kg/回の低用量群でも過度の影響が認められた）、対照群でも 3 例に同様の所見が認められたことも異常であった。この試験の期間中、軽度から顕著な肝細胞酵素の増加（ALT、GLDH 及び／又は AST）が 1 測定時点以上で、対照群の雄 1 例及び雌 3 例、50 mg/kg/回群の雌 3 例、200 mg/kg/回群の雌雄各 1 例に認められた。これらの増加の一部は異常に大きく（最大で背景データの 16 倍）、投与開始前にも 2 例でみられたほか、投与期間中には増加が認められていなかった 1 例で回復期間中に認められた。これらの所見は肝臓における毒性反応に典型的なものではなく、用量、曝露量及び時間との間に明確な関連は認められなかった。したがって、本薬投与以外の要因がこれらの変化を引き起こし、データの解釈を混乱させている可能性が示唆された。仮説のひとつとして感染が考えられたことから、この異常な肝臓への影響のパターンを調べるために、試験終了時に採取して瞬間凍結した肝臓試料について肝炎ウイルスの有無を検査した。B、C、E 型肝炎ウイルス検査は全ての動物で陰性であった。一方、動物 42 例中 20 例の試料は HAV 陽性であり、HAV の存在は血清 ALT、GLDH の増加及び／又は肝細胞変性／壊死との強い関連がみられた。この結果を踏まえて上記の病理組織学的所見を再評価したところ、肝臓の所見は HAV 感染によるものであり、本薬投与に起因するものではないことが明らかになった（Powell et al 2024）（モジュール 2.6.7.7.G）。

26 週間投与のピボタルな試験では、NHP に HAV ワクチンを接種し、別の試験施設において、間欠（週 2 回）投与レジメン（用量 0、15、50、150、300 mg/kg/回）により試験を実施した。この試験では投与群にも対照群にも単核細胞浸潤は認められず、先の NHP 試験で認められた肝細胞変性やクッパー細胞色素沈着はみられなかった。一部の動物に肝臓に関連する血液生化学パラメータの一過性の増加がみられたが、試験実施施設でみられる正常な生物学的変動と一致しており、本薬の投与によるものではなかった（モジュール 2.6.7.7.H）。

NHP に 300 mg/kg/日以上を 35 日間投与した後に肝臓で認められた毒性変化は、より低用量での長期連日投与試験や間欠投与試験ではみられなかった。13 週間投与試験で認められた炎症細胞浸潤の発現頻度及び重症度は対照群で通常みられる範囲のものであり、血液生化学パラメータ（ALT、AST 及び／又は GLDH）の増加は散発的で用量依存性はなく、肝臓の病理組織学的所見との一貫した関連は認められなかった。35 日間投与試験において高用量（300mg/kg/日以上）で認められたコレステロールの軽度な増加を除き、肝毒性に関連する他のパラメータ（ビリルビン、トリグリセリドなど）への影響はいずれの試験においてもみられなかった。なお、35 日間投与後の 28 日間回復期間終了時には、肝臓の所見は完全に回復していた。間欠（週 2 回）投与レジメンによる 26 週間反復投与試験では、高用量（300 mg/kg/回）で肝臓への影響は認められなかった。NOAEL（300 mg/kg/回を週 2 回）における曝露量を最大臨床用量 2 × 300 mg 投与後に予測される曝露値と比較すると、AUC は予測臨床曝露量の 2.2 倍、C_{max} は 1.7 倍であった（表 1）。

本薬の臨床試験では、肝臓に関連する酵素のモニタリングを綿密に行ってきたが、臨床的に重要な変動は認められていない（モジュール 2.5）。

血液学的検査値

ラットにおける 28 日間の反復投与毒性試験では、主に 1,000 mg/kg/日投与により、赤血球ターンオーバーの亢進を示す赤血球パラメータの軽微な変化として、ヘモグロビン及び赤血球数の減少、網状赤血球絶対数の増加、赤血球分布幅の及びヘモグロビン分布幅の増加がみられた。これらの所見は、脾臓重量の増加及び病理組織学的検査で認められた脾臓の赤血球産生亢進を伴っていた。13 週間及び 26 週間の投与後、300 mg/kg/日で網状赤血球の増加が、13 週間の投与後には細胞ヘモグロビンの軽微な減少及び赤血球分布幅の軽微な増加が認められたが、脾臓に対する影響はみられなかった（モジュール 2.6.7.7）。ラットでは休薬により所見の回復が認められ、NHP 及びマウスでは同様の影響は認められなかった。

内分泌系

ラット反復投与毒性試験では、300 mg/kg/日以上の用量の最長 26 週間投与により、内分泌機能を有する多くの臓器に影響が認められた（モジュール 2.6.7.7）。

全てのラット反復投与試験で副腎皮質の所見が認められ、皮質肥大又は皮質空胞化が、束状帯における微小血管の空胞を特徴としてみられた。この所見は、いずれの試験においても副腎重量の増加とともに認められた（最大で対照値と比較して 59%の増加）。これらの所見は、生理的ストレス反応として生じる副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）による副腎の刺激亢進と符合しており、ラットの毒性試験で認められることが多い（Harvey and Sutcliffe 2010）。28 日間投与試験では、300 mg/kg/日以上の用量で副腎に炎症細胞浸潤が数例認められたが、より投与期間の長い試験（13 週間及び 26 週間、最大用量 300 mg/kg/日）では再現されなかったことから、適応反応による病変が、慢性的なストレスによって、より明確な毒性反応（壊死など）に進行しなかったことを示している。したがって、認められた影響は副腎に対する本薬の直接的な影響の結果ではなく、毒性とみなす必要はないと結論付けられた。この影響はストレスに対する反応としてラットの試験においてしばしば認められる所見であることから、ヒトへの外挿性の乏しい変化と考えられる。

13 週間及び 26 週間の反復投与試験では、300 mg/kg/日を投与した雌ラットにおいて、卵巣間質細胞肥大（軽微から軽度）が一貫して認められた。28 日間試験では、1,000 mg/kg/日投与で、黄体の肥大及び発情期間の異常を伴って認められたた。しかし、本薬の投与期間を 13 週間及び 26 週間に延長しても、これらの追加所見は再現されず、間質細胞肥大の重症度や発現頻度は増加しなかった。本薬投与により認められた副腎の微小血管空胞化も、ステロイド生合成における適応性の変化に続発する影響であることが多く、卵巣間質のステロイド産生細胞の空胞化との関連がみられることがある（Brändli-Baiocco et al 2018）。結論として、卵巣への影響も適応反応と考えられ、毒性とみなす必要はないとされており、ヒトへの外挿性の乏しい変化と考えられる。

ラットでの 7 日間、28 日間及び 26 週間の反復投与試験では、対照群と比較して甲状腺の濾胞細胞肥大の重症度及び発現頻度の増加がみられたが、13 週間の投与試験ではこの所見は認められなかった。28 日間、13 週間及び 26 週間の試験で甲状腺重量の増加が認められた。この種の甲状腺の変化は、本薬を投与したラットで認められ、肝臓肥大に続発して生じることがある。これは、甲状腺ホルモン代謝の亢進と、それに伴う機能的な必要性の結果として肥大反応が起きる。ラットは、ヒトを含む他の動物種とは異なり、血漿中の T3/T4 比の変動を緩和する甲状腺結合グロブリンを欠くため、甲状腺ホルモンのクリアランス亢進に対する感受性が特に高い（Döhler et al 1979）。したがって、これらの適応性の変化は間接的な影響とみなされ、毒性とみなす必要のない変化で、ヒトへの外挿性の乏しい変化と考えられる（Palazzi et al 2016）。

ラットにおける 13 週間投与試験では、内分泌関連の所見は、4 週間の回復期間後には全て回復した。全体として、全ての内分泌器官で認められた所見は、13 週間及び 26 週間の反復投与試験の高用量群（300 mg/kg/日）のみでみられ、投与期間の延長によっても重症度や発現頻度の増加はみられず、機能障害を引き起こすこともなかったことから、適応性のもので、毒性変化とみなす必要はなく、ヒトへの外挿性の乏しい変化と考えられる（Kale et al 2022）。ラットの 26 週間投与試験では、NOAEL における曝露量を最大臨床用量 2 × 300 mg 投与後の予測曝露量と比較すると、AUC は 50 倍、C_{max} は 17 倍であった（表 1 参照）。

2.4.4.3 遺伝毒性試験

本薬の遺伝毒性は、一連の *in vitro* 試験（細菌を用いる変異原性試験及びマウスリンフォーマ試験）及び *in vivo* 試験（ラット小核試験）により評価した（モジュール 2.6.7.8 及びモジュール 2.6.7.9）。

試験は全て陰性であったことから、本薬には遺伝毒性はないことが確認された。

2.4.4.4 がん原性試験

本薬のがん原性について、トランスジェニックマウスにおける 26 週間投与試験（モジュール 2.6.7.10）及びラットにおける 2 年間試験（モジュール 2.6.7.10）において、連日経口投与により評価した。各試験に使用した本薬の用量は FDA（がん原性評価委員会［ECAC］）の合意を得たもので、雄マウスでは 0、20、65、200 mg/kg/日、雌マウスでは 0、30、100、300 mg/kg/日、雌雄ラットでは 0、30、100、300 mg/kg/日とした。対照群には溶媒（0.5% HPMC 水溶液）を投与した。両動物種の高用量の設定に際しては、先に実施した試験でみられた体重増加量の減少に大まかに基づいた。

マウス

本薬は、26 週間の投与後、RasH2 トランスジェニックマウスにおいてがん原性を示さなかった。陽性対照群（N-ニトロソメチル尿素）では明らかな腫瘍の発生が認められたことから、この試験は化学的がん原性物質を検出する感度を有することが確認された。本薬による生存期間及び体重への影響は認められなかった。腫瘍発生に関する NOAEL における曝露量を最大臨床用量 2 × 300 mg 投与後の予測曝露量と比較すると、雌（300 mg/kg/日）では AUC は 2.5 倍、C_{max} は 5.7 倍、雄（200 mg/kg/日）では AUC は 1.3 倍、C_{max} は 3.0 倍であった（表 1 参照）。

マウスで認められた非腫瘍性所見（肝毒性）についてはモジュール 2.4.4.2.1 で考察する。

ラット

104 週間のがん原性試験において、ラットに本薬を投与したところ、投与に関連する悪性腫瘍の増加は認められなかった。卵巣の悪性顆粒膜細胞腫が 1 例認められたが、背景データの範囲内であり、投与に関連する所見とはみなされなかった。

肝臓（雌）、下垂体（雄）及び精巣で軽度であるものの良性腫瘍の統計的に有意な増加が認められ、甲状腺（雄）及び卵巣に統計的に有意ではない良性腫瘍の増加が認められた。これらの病変の増加は 300 mg/kg/日投与でのみ認められた。例外として、ライディッヒ細胞腫は 100 mg/kg/日投与でも認められた。病理組織学的には、投与群で認められた腫瘍の細胞学的特徴及び構造が対照群で認められた腫瘍と概して同じであったことから、*de novo* 発がんによるものではなく、自然発生の腫瘍の増加が示唆される。これらの所見について、各器官（肝臓、下垂体、卵巣、副腎及び甲状腺）における対応する非腫瘍性所見と考え合わせると、肝臓の適応反応（モジュール

2.4.4.2.1 の考察を参照）及び軽度のホルモンの乱れを示唆するものであり、これは視床下部-下垂体-性腺軸（HPGA）における正常な恒常性フィードバック機構を妨げる可能性がある。これらの所見とラットにおいて確立されているがん原性発生機序との関係について考察する。

げっ歯類の生涯試験では、小葉中心性肝細胞肥大は肝細胞腺腫の発生に随伴することが多く、酵素誘導に続発する適応反応であることと認識されている。細胞毒性を伴わないラットの良性肝腫瘍誘発の非遺伝毒性的機序は十分に明らかにされており、ヒトへの外挿性は乏しいと考えられている（Felter et al 2018; Lake et al 2018; Yamada et al 2021）。

甲状腺腫瘍は、同時対照と比較して統計的に有意に増加してはいないものの、甲状腺濾胞細胞肥大の重症度及び発生率の増加との関連は明らかであった（モジュール 2.4.4.2.1 でも説明）。これは、ラットの肝臓における甲状腺ホルモン代謝と排出の亢進に起因する、確立された腫瘍形成の機序と符合する（Foster et al 2021）。ラットは甲状腺結合グロブリンを欠いていることから、ヒトを含む他の種と比較して甲状腺ホルモンの恒常性に乱れを特に起こしやすい（Savu et al 1991）。

下垂体腺腫は、老齢 Wistar ラットによくみられる、発生率が最大 60%の自然発生腫瘍であり（Carlus et al 2013）、飼料の量や質を含む様々な要因の影響を受ける（Spady et al 1999）。また、循環血中のエストロゲン濃度の変化などの HPGA の乱れとの関連が報告されている（Shi et al 2023; Greaves 2012）。この試験では、腫瘍発生率の増加は雄の 300 mg/kg/日投与でのみ認められ、下垂体前葉の限局性の肥大及び空胞化の発現頻度増加を伴っていた。

良性卵巣腫瘍は、老齢 Wistar ラットで自然発生する（最大 5%）（Taylor and Mowat 2020）。腫瘍誘発の機序として、HPGA の乱れによる非遺伝毒性的機序が報告されている。すなわち、循環血中のゴナドトロピンの増加により持続的な刺激及び細胞増殖が生じることで、腫瘍発生が増加する可能性があるというものである（Long et al 2001）。ヒトでは循環血中のゴナドトロピン濃度の増加と卵巣腫瘍の発生率増加との間に、このような関連があるようにはみえない（Weiss and Hill 1996）。

精巣の良性ライディッヒ細胞腫はラットの一般的な自然発生腫瘍であり、循環血中の黄体ホルモンの増加を引き起こす外因性物質により誘発されることがある（Clegg et al.1997; Cook et al.1999）。この機序は一般にヒトへの外挿性は乏しいと考えられている（Steinbach et al 2015）。ラットのモデルでは、肝臓での代謝酵素の誘導とライディッヒ細胞腫との関連は、テストステロンのクリアランスと生合成の変化に起因するとされている（Klaunig et al 2003）。

HPGA の乱れは、副腎皮質刺激ホルモン、ゴナドトロピン、黄体ホルモン、エストロゲンなどのホルモンの恒常性を変化させることで様々な臓器に影響を及ぼす可能性があり、ストレスに対する反応として生じることもある（Harvey and Sutcliffe 2010）。ラットにおける最長 26 週間反復投与毒性試験では、副腎、甲状腺、卵巣及び下垂体に本薬に関連する所見が認められたが、いずれも適応性で毒性とする必要のないもので、ヒトへの外挿性の乏しい変化と考えられた。NHP における慢性毒性試験では、同様の所見は認められなかった。ラットにおける全ての期間の反復投与試験で、酵素誘導を示唆する肝臓の変化が認められている。上記を総合して考えると、これらの所見は、ラットで報告されている外因性物質による肝臓の代謝酵素の誘導やステロイド産生の変化と符合している（You 2004）ほか、内分泌ホルモンのクリアランス速度の変動との関連性が報告されていることとも符合しており、これらの変化については十分に説明されている（Vansell 2022; Wong et al 2005; Coulson et al 2003）。

全体として、この試験で認められた内分泌系（下垂体、甲状腺、副腎）及び生殖系（精巣、卵巣、子宮）の腫瘍性及び非腫瘍性の変化は、HPGA に対して潜在的作用を有し、これらの器官の一部で腫瘍の発生率の増加につながる、軽度のホルモンの乱れを示唆するものであった。ラットで認

められたこの種の変化は、外因性物質による肝臓の肥大及び酵素誘導に関連した内分泌ホルモン代謝の変化の結果として一般的にみられるものであり、ヒトへの外挿性は乏しいと考えられる。

この試験では、良性腫瘍形成に関する NOEL は雄で 30 mg/kg/日、雌で 100 mg/kg/日と判断された。NOEL における曝露量を最大臨床用量 2 × 300 mg 投与後の予測曝露量と比較すると、AUC 及び C_{max} は、雌（100 mg/kg/日）ではそれぞれ 21 倍及び 14 倍、雄（30 mg/kg/日）ではそれぞれ 3.8 倍及び 4.0 倍であった（表 1 を参照）。

2.4.4.5 生殖発生毒性試験

広範な生殖発生毒性試験を実施した。

FEED 試験では、雌雄ラットに最大 600 mg/kg/日を投与したところ（雄は交配前 14 日間及び交配期間中に投与、雌は交配前 14 日間、交配期間中、及びその後妊娠 6 日まで投与）、受胎能及び妊娠パラメータに対する影響は認められなかった。NOAEL は高用量の 600 mg/kg/日と判断された（モジュール 2.6.7.12）。同様に、PPND 試験で雌ラットに最大 450 mg/kg/日を妊娠 6 日から授乳 20 日まで投与したところ、妊娠パラメータ及び F1 世代に対する本薬に関連する影響は認められなかった。したがって、NOAEL は 450 mg/kg/日と判断された。PPND 試験ではトキシコキネティクスの評価は行わなかった。NOAEL より低い用量（300 mg/kg/日）における妊娠ラットの曝露量を最大臨床用量 2 × 300 mg 投与後の予測曝露量と比較すると、AUC 及び C_{max} についてそれぞれ 26 倍及び 7.7 倍であった（表 1 及びモジュール 2.6.7.14 参照）。

ラットにおけるピボタルな EFD 試験では、高用量 600 mg/kg/日で母体毒性が認められ、着床後胚損失率の増加及び 1 腹当たりの生存胎児数の軽度な減少がみられた。この用量では発生毒性も認められ、軽度及び重大な胎児異常が増加し、特に口蓋裂及び心室中隔欠損の発生率の増加が顕著であった。発生毒性がみられた用量では、母体毒性の科学的根拠も併せて認められたが、重大な奇形の特異性から、これらの異常が非特異的な母体毒性に起因するとは言い難いと考えられた。胎児への影響に関する NOAEL は、用量設定試験でも本試験でも中用量の 300 mg/kg/日と判断された。NOAEL（300 mg/kg/日）における曝露量を最大臨床用量 2 × 300 mg 投与後の予測曝露量と比較すると、AUC は 26 倍、C_{max} は 7.7 倍であった。LOAEL（600 mg/kg/日）における曝露量については、AUC で 105 倍、C_{max} で 26 倍であった（表 1 及びモジュール 2.6.7.13.A を参照）。

ラットにおける EFD 試験とは対照的に、ウサギにおけるピボタルな EFD 試験では、主たる試験でもそれに先行する用量設定試験でも胚・胎児に関係する懸念の徴候は認められなかった。なお、主たる試験では最大用量 300 mg/kg/日で軽微な母体毒性が認められた。用量設定試験で投与した最高用量 400 mg/kg/日は母体毒性が強すぎて主たる EFD 試験には使用できなかった。NOAEL（300 mg/kg/日）における曝露量を最大臨床用量 2 × 300 mg 投与後の予測曝露量と比較すると、AUC は 18 倍、C_{max} は 11 倍であった（表 1 及びモジュール 2.6.7.13.B を参照）。

本薬が予定臨床用量で催奇性や胎児毒性を示す可能性は低いが、妊娠可能な女性は有効な避妊法を用いることが推奨される。

2.4.4.6 局所刺激性

ラット、マウス、NHP を用いた試験では、消化器における刺激性の科学的根拠はなかった。イヌの短期間投与試験で認められた影響は、ヒトへの外挿性が乏しいと考えられる。

2.4.4.7 その他の毒性試験

2.4.4.7.1 光毒性試験

光毒性の可能性に関する評価を ICH S10 に従って段階的に実施した。本薬は自然光の範囲（290～700 nm）内の光を吸収し、モル吸光係数（MEC）は 1,000 L/mol/cm を超えることから、ROS アッセイで評価した。ROS アッセイでは沈殿が認められたため、本薬の光反応性について確定的な結果は得られなかった。その後、潜在的な光毒性をさらに評価するために、最大 100 µg/mL（最新のガイドラインで要求される最高用量）を用いて *in vitro* 3T3 線維芽細胞試験を行った。その結果、本薬は光毒性の徴候を示さなかった（モジュール 2.6.7.17）。

2.4.4.7.2 免疫毒性試験

ラット及び NHP における反復投与試験では、免疫系に関連する器官や免疫機能に対する特異的な影響、及び投与に関連する易感染性は認められなかった。したがって、特定の免疫毒性試験は実施しなかった。

2.4.4.7.3 不純物に関する試験

本薬の不純物の適格性評価の詳細をモジュール 3.2.S.3.2.1 に示す。第 3 相試験で評価した本薬の最大用量（2 x 600 mg）では、本薬に関連する 2 種の不純物（PPP7584 及び PPP758 デスフルオロ）が 1 mg/日を上回る濃度で含まれることがわかり、ICH Q3A に従って追加の適格性評価の実施が必要となる可能性があると考えられた。各不純物について *in vitro* 遺伝毒性試験（Ames 試験及び *in vitro* 小核試験）を実施したところ、結果は陰性であった。実際のところ、最終的に予定されている最大臨床用量では、各不純物の量は 1 mg/日未満になる。

PPP7584 及び PPP758 デスフルオロなどの不純物を含有する本薬を用いて、マウス、ラット及び NHP における反復投与毒性試験を実施した。これらの不純物の含有量は、臨床試験で使用した濃度、及び／又は原薬規格で規定される濃度よりも高かった。これにより、不純物のさらなる適格性が確保されたことから、いずれの不純物についても独立した *in vivo* 一般毒性試験は不要と判断された。

したがって、実施された毒性試験は、ICH Q3A に基づき、全ての不純物について適切に適格性を確保するものであることから、追加の試験は不要と考えられた。

2.4.4.8 所見と薬物動態との関係

トキシコキネティクス評価の結果、曝露量（AUC 及び C_{max}）は概して用量に比例するか用量比を上回った。NHP では、血漿中の曝露量に一貫した性差は認められなかった。ラットでは、単回投与後は概して雄よりも雌の方が曝露量が高かった。反復投与後は、雄の曝露量が高くなったが、トキシコキネティクス評価の最終採取時点の試料で C_{max} 及び AUC にみられた性差は概して 2 倍未満であった。ラットの雄を除き、いずれの動物種においても、本薬の曝露量に反復投与期間の延長に伴う顕著な差は認められなかった。

ピボタルな毒性試験から得られた曝露量の、最大ヒト用量 2 × 300 mg における曝露量に対する曝露量比を表 1 に示す。この曝露量比は、最長期間（26 週間）の毒性試験、ピボタルな生殖発生毒性試験、マウスの 26 週間がん原性試験及びラットの 104 週間がん原性試験、並びに単回投与安全性薬理試験から得たものである。

600 mg（300 mg×2 錠）の単回投与時の薬物動態は、算術平均 C_{max} は 5,640 ng/mL、算術平均 AUC_{0-inf} は 19,500 h•ng/mL であった（KVD900-108 パート C）。

表 1:　ヒト最大臨床用量 2 × 300 mg に対するセベトラルスタットの血漿中の曝露量比

Key Studies	Dose (mg/kg)	AUC[a] (h•ng/mL)	C_{max}[a] (ng/mL)	AUC Margin	C_{max} Margin
Single Dose Safety Pharmacology Studies					
Rat CNS Irwin (6 males/dose)[b]					
8348817	1,000 (NOAEL)	718,000	36,200	37x	6.4x
Rat Respiratory (6 males/dose)[b]					
8348816	1,000 (NOAEL)	718,000	36,200	37x	6.4x
NHP Cardiovascular (4 males/dose)					
8362593	300 (NOAEL)	30,700	5,920	1.6x	1.0x
Longest Term Repeat Dose Toxicity Studies					
26-week toxicity study in rat (15/sex/dose)					
8418576	300 (NOAEL)	983,000	96,400	50x	17x
26-week twice weekly dosing toxicity study in NHP (4/6/sex/dose)					
20286942	300 (NOAEL)	42,400	9,710	2.2x	1.7x
Pivotal Reproduction Toxicity Studies					
EFD toxicity study in rat (20 females/dose)					
JAM0013	300 (NOAEL)	510,000	43,200	26x	7.7x
	600 (LOAEL)	2,050,000	147,000	105x	26x
EFD toxicity study in rabbit (22 females/dose)					
JAM0014	300 (NOAEL)	359,000	62,300	18x	11x
Fertility and early embryonic development toxicity study in rat (20/sex/dose)					
JAM0012	600 (NOAEL)	1,290,000	131,000	66x	23x
PPND toxicity study in rat (22 females/dose)					
JAM0060[c]	450 (NOAEL)	510,000	43,200	26x	7.7x

Key Studies	Dose (mg/kg)	AUC[a] (h•ng/mL)	C_{max}[a] (ng/mL)	AUC Margin	C_{max} Margin
Carcinogenicity Studies					
26-week carcinogenicity study in transgenic mouse (25/sex/dose)					
20196412	Male: 200 (NOAEL)	25,500	17,000	1.3x	3.0x
	Female: 300 (NOAEL)	48,800	32,200	2.5x	5.7x
104-week carcinogenicity study in rat (50/sex/dose)					
JAM0025	Male: 30 (NOEL)	74,200	22,500	3.8x	4.0x
	Female: 100 (NOEL)	413,000	77,500	21x	14x

Estimated human AUC and C_{max} of 19,500 h•ng/mL and 5,640 ng/mL respectively
NOAEL: No Observed Adverse Effect Level
LOAEL: Lowest Observed Adverse Effect Level (defined as the dose immediately above the NOAEL dose)
NOEL: No Observed Effect Level
[a] In repeat dose studies, AUC and C_{max} values are based on mean plasma concentrations at the end of the study
[b] Plasma sampling was not performed in these studies. Exposure margins are calculated to Day 1 exposure in male rats at 1,000 mg/kg in Study 8348815 (same dose level, dose vehicle and sex)
[c] Plasma sampling was not performed in the PPND study JAM0060. The NOAEL in this study was the highest dose level (450 mg/kg); exposure margins to a lower dose of 300 mg/kg in the same dose vehicle in Study JAM0013 (pregnant females) are presented in the table

2.4.5 総括及び結論

本薬は単離したヒト PKa に対する強力な競合的かつ可逆的阻害剤であり、速効性で、PKa の活性部位に速やかに結合して PKa を阻害することが示されている。*In vitro* 単離 PKa アッセイ及び活性化血漿ベースのアッセイで、本薬は PKa の酵素活性を用量依存的に阻害することが示されている。

血漿ベースのアッセイでは、未希釈ヒト血漿を活性化後に本薬を添加したところ（これは、急性 HAE 発作の治療における本薬の使用法を模倣）、迅速で用量依存的な酵素活性阻害が引き起こされた。本薬による阻害発現は、PKa の内因性阻害因子である C1-INH による阻害発現よりも迅速であり、このことは本薬の k_{on} が 2 桁高いことと一致する。

本薬は健康被験者及び HAE 患者の血漿中で PKa の酵素活性を阻害し、PKa による切断から、内因性基質 HK を用量依存的に保護した。その結果 cHK が減少し、HAE 発作時の浮腫のメディエーターである BK の生成が抑制される。

PKa は BK を生成するほか、FXII を FXIIa へと活性化し、FXIIa は血漿プレカリクレインを切断することにより、さらに PKa が生成され、KKS の活性化が増幅されてより多くの BK が生成される。本薬による PKa の阻害は、FXIIa の生成を抑制し、血漿プレカリクレインの切断を減少させることが示された。これは、本薬が上流の KKS の活性化の増幅も抑制し、HAE における浮腫のメディエーターである BK の生成をさらに減少させることを示すものである。

本薬は広範な酵素、受容体、イオンチャネル及びトランスポーターに対して高い選択性を有している。特に、生理学的に有益な BK を生成するための代替メカニズムである組織カリクレイン 1 に対する選択性が極めて高いことが重要である。これにより、受容体のサブタイプにかかわらず、非浮腫性の BK 機能に干渉する可能性は低いと思われる。

安全性薬理試験では、本薬の CNS、末梢神経系、呼吸器系、心血管系の機能に対する影響は、試験した最大用量でも認められなかった。

本薬の非臨床薬物動態は、ピボタルな毒性試験に使用した動物種（マウス、ラット、NHP）において、経口投与後の迅速な吸収及び中程度のバイオアバイラビリティを特徴としていた。肝臓血流と比較すると、げっ歯類におけるクリアランスは中程度であったが、NHP ではむしろ高く、試験した全ての種で半減期は短かった。トキシコキネティクス評価では、血漿曝露量の増加は概して用量に比例するか用量比を上回ることが明らかになった。

ラットでは、[^{14}C]セベトラルスタットを経口投与した後、脳及び CNS 以外の組織に放射能の迅速かつ広範な分布が認められた。本薬及び／又はその代謝物は授乳中のラットの乳汁中に分泌されたが、投与後 24 時間までに濃度は背景値に近くなった。薬物関連物質の胎盤への移行はごく限られていた。

本薬のヒトにおける生体内変換は主として CYP3A4 によって媒介された。本薬は全ての動物種において、血漿中の薬物関連物質の主な成分であったが、排出物全体に占める割合はかなり低かった（ヒトの尿中で投与量の 9%、糞便中で 13%）。本薬は多数の代謝物に代謝されたが、各代謝物は比較的少量で、排泄は主として糞便を介して行われた。ヒトの代謝物に不均衡又は特異的と分類されるものは認められなかった。代謝プロファイルはヒトとラット、ヒトと NHP の間で類似していることから、これらの動物種を毒性試験に使用することの妥当性が確認された。

本薬は CYP3A4 と排出トランスポーターP-gp 及び BCRP の基質であることから、CYP3A4、P-gp 及び BCRP の阻害剤及び／又は誘導剤による本薬の臨床薬物動態への潜在的な影響について検討した。本薬は *in vitro* では、CYP2C9 及び CYP3A4、並びに OAT1 以外の取り込みトランスポーターの阻害剤であるが、投与法としてはオンデマンド投与が予定されており、急速な吸収後に血漿中濃度は速やかに低下することから、本薬が CYP 及びトランスポーターを介した薬物相互作用の原因となる可能性は低いと考えられる。

最長 26 週間の反復投与試験では、ラット、マウス、NHP における主要標的臓器は肝臓であった。ラットでは、肝臓の所見はほぼ肝細胞肥大に限られ、毒性とみなす必要はないと考えられた。26 週間試験における NOAEL は 300 mg/kg/日であった。この用量における曝露量を最大臨床用量 2 × 300 mg 投与後の予測曝露量と比較すると、AUC は 50 倍、C_{max} は 17 倍であった（表 1）。

26 週間のがん原性試験でトランスジェニックマウスに本薬を連日投与したところ、肝臓への影響には明らかな閾値が認められた（肝腫大、軽微な混合細胞浸潤を伴う肝細胞肥大、単細胞壊死及び色素蓄積［リポフスチン］が 200 mg/kg/日以上の用量で認められた）。NOAEL は雄で 65 mg/kg/日、雌で 100 mg/kg/日と判断された。

NHP では、35 日間連日投与試験で本薬 300 mg/kg/日以上を投与した後に認められたいくつかの肝臓所見が有害とされた（肝細胞壊死、トランスアミナーゼの増加、胆管過形成、炎症細胞浸潤など）。しかしながら、これらの所見はより期間の長い試験では認められなかった。PWG は、13 週間連日投与試験を評価した後、単核細胞浸潤の病理組織学的所見は毒性とみなす必要のないもので、一般的な背景所見の増悪であると結論付けた。13 週間間欠投与試験で認められた肝臓に関連する所見は試験実施時には診断されていなかった HAV 感染によるものであった。26 週間間欠投与試験では病理組織学的変化は認められず、肝臓への影響を示唆する血液生化学的検査値の変化もみられなかった。26 週間投与試験における NOAEL は 300 mg/kg/回と判断された。この用量における曝露量を最大臨床用量 2 × 300 mg 投与後の予測曝露量と比較すると、AUC は 2.2 倍、C_{max} は 1.7 倍であった（表 1）。

本薬の肝臓に対する影響については特性が詳細に検討され、休薬による可逆性が確認されている。NHP における間欠投与試験は、本薬の臨床使用で予定されているオンデマンド投与のリスク評価

に最適していると考えられる。NHP における 13 週間及び 26 週間の間欠投与試験では、肝臓に毒性とみなす必要のある影響は認められなかった。

ラットで認められた副腎、甲状腺、腎臓及び卵巣におけるその他の所見は、全て適応性のもの又は毒性変化に起因しないものであり、ヒトへの外挿性は乏しいと考えられた。ラットでは高用量で赤血球ターンオーバーの亢進が認められたが毒性とみなす必要がある所見とは考えられず、マウス及び NHP では認められなかった。

本薬は、*in vitro* 及び *in vivo* の変異原性及び染色体異常誘発能の評価において陰性であったことから、遺伝毒性の危険性はないと考えられた。

本薬は 26 週間のトランスジェニックマウス試験でがん原性を示さなかった。腫瘍形成に関する NOAEL は雄で 200 mg/kg/日、雌で 300 mg/kg/日と判断された。ラットの 104 週間がん原性試験では、悪性腫瘍の発生率に本薬に関連する増加は認められなかった。本薬投与により肝臓、下垂体、甲状腺、精巣及び卵巣の良性腫瘍の軽微な増加が認められたが、適応反応及び軽度のホルモンの乱れの結果と考えられ、ヒトへの外挿性は乏しいと考えられた。この試験における良性腫瘍形成に関する NOEL は雄で 30 mg/kg/日、雌で 100 mg/kg/日と判断された。遺伝毒性、反復投与毒性及びがん原性試験の試験について実験データの重み付け評価をした結果から、本薬は予定されている用法・用量において、ヒトに対するがん原性のリスクをもたらすことはないと結論付けられた。

生殖発生毒性試験において、ラット FEED 試験では 600 mg/kg/日投与まで、ラット PPND 試験では 450 mg/kg/日投与まで、ウサギ EFD 試験では 300 mg/kg/日投与まで、本薬に関連する影響は認められなかった。これらの試験の NOAEL における曝露量を最大臨床用量 2 × 300 mg 投与後の予測曝露量と比較すると、ラット FEED 試験の AUC は 66 倍、C_{max} は 23 倍、ラット PPND 試験については AUC は 26 倍、C_{max} は 7.7 倍、ウサギ EFD 試験については AUC は 18 倍、C_{max} は 11 倍であった（表 1 参照）。

ラットの EFD 試験では、高用量の 600 mg/kg/日投与により口蓋裂及び心室中隔欠損などの重大及び軽微な胎児異常の増加が認められた。ラット EFD 試験の NOAEL における曝露量を最大臨床用量 2 × 300 mg 投与後の予測曝露量と比較すると、AUC は 26 倍、C_{max} は 7.7 倍であった（表 1 参照）。妊娠可能な女性は、本薬による治療中は有効な避妊法を用いることが推奨される。

本薬及び／又はその代謝物が授乳中のラットの乳汁中に排泄された。PPND 試験では F1 世代に毒性変化は認められなかった。本薬及び／又は代謝物のラット乳汁中の濃度は、ピーク濃度に達した後に急速に低下した。

本薬は光毒性を示さなかった。また、これまでに得られたデータでは、本薬の局所刺激性及び免疫毒性は確認されていない。

結論として、本薬の薬理、薬物動態／ADME 及び毒性の特性は、包括的な一連の非臨床試験により詳細に把握されている。本薬は強力で選択的かつ可逆的な PKa 阻害剤であり、速効性で、HAE 患者の血漿中の BK 生成を速やかに阻害する。毒性試験に用いた動物種では、肝臓が標的器官として特定された。ラット EFD 試験の結果に加え、妊娠ラットで本薬の胎盤移行が認められたことから、添付文書では、妊娠可能な女性が本薬を使用するにあたっては有効な避妊法を用いるよう推奨し、妊婦は本薬の使用を避けることが好ましいことを記載する。

したがって、本薬を添付文書に従って間欠的に使用する場合、非臨床試験データからは、ヒトに対する安全性に関する特別な懸念は示されていない。

2.4.6 参考文献

Babu YS, et al. A Simple, Sensitive and Selective Fluorogenic Assay To Monitor Plasma Kallikrein Inhibitory Activity Of BCX4161 In Activated Plasma. J Allergy Clin Immunol [Internet]. 2014;133(2):143. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2013.12.167.

Bird JE et al. Effects of plasma kallikrein deficiency on haemostasis and thrombosis in mice: Murine ortholog of the Fletcher trait. Thrombosis and Haemostasis. 2012;107(6):1141–1150. https://doi.org/10.1160/th-11-10-0682.

Blais C, et al. Contribution of angiotensin-converting enzyme to the cardiac metabolism of bradykinin: an interspecies study. Am J Physiol. 1997;273(5 Pt 2):H2263-71.

Borghoff SJ, Short BG, Swenberg JA. Biochemical mechanisms and pathobiology of alpha 2u-globulin nephropathy. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1990;30:349-67.

Brändli-Baiocco A et al. Nonproliferative and Proliferative Lesions of the Rat and Mouse Endocrine System. J Toxicol Pathol. 2018;31(3 Suppl):1S-95S.

Carlus M, Elies L, Fouque MC, Maliver P, Schorsch F. Historical control data of neoplastic lesions in the Wistar Hannover Rat among eight 2-year carcinogenicity studies. Experimental and Toxicologic Pathology. 2013;65(3):243-253.

Clegg ED, Cook JC, Chapin RE, Foster PMD, Daston GP. Leydig cell hyperplasia and adenoma formation: Mechanisms and relevance to humans. Reprod Toxicol. 1997;11:107–21.

Cook JC, Klinefelter GR, Hardisty JF, Sharpe RM, Foster PMD. Rodent Leydig cell tumorigenesis: A review of the physiology, pathology, mechanisms, and relevance to humans. Crit Rev Toxicol. 1999;29:169–261.

Coulson M, Gibson GG, Plant N, Hammond T, Graham M. Lansoprazole increases testosterone metabolism and clearance in male Sprague-Dawley rats: implications for Leydig cell carcinogenesis. Toxicol Appl Pharmacol. 2003;192(2):154-63.

Cugno M, et al. Haemostasis Contact System and Fibrinolysis in Hereditary Angioedema (Cl-Inhibitor Deficiency). J. Clin Chem Clin Biochem 1988:26;423-427.

David RM, Moore MR, Finney DC, Guest D. Reversibility of the chronic effects of di(2-ethylhexyl)phthalate. Toxicol Pathol. 2001 Jul-Aug;29(4):430-9. doi: 10.1080/01926230152500040. PMID: 11560248.

De Maat S, Hofman ZLM, Maas C. Hereditary angioedema: the plasma contact system out of control. Journal of thrombosis and haemostasis. 2018;16(9),1674–1685. https://doi.org/10.1111/jth.14209.

Döhler KD, Wong CC, von zur Mühlen A. The rat as model for the study of drug effects on thyroid function: consideration of methodological problems. Pharmacol Ther B. 1979;5(1-3):305-18.

Duckworth E et al. Pharmacological Suppression of the Kallikrein Kinin System with KVD900, an Orally Available Plasma Kallikrein Inhibitor for the On-Demand Treatment of Hereditary Angioedema. Clin Exp Allergy. 2022; 52(9): 1059-1070.

Everds NE et al. Interpreting stress responses during routine toxicity studies: a review of the biology, impact and assessment. Toxicologic Pathology. 2013;41:560-614.

Felter SP et al. Human relevance of rodent liver tumors: Key insights from a Toxicology Forum workshop on nongenotoxic modes of action. Regul Toxicol Pharmacol. 2018;92:1-7.

Foster JR, Tinwell H, Melching-Kollmuss S. A review of species differences in the control of, and response to, chemical-induced thyroid hormone perturbations leading to thyroid cancer. Arch Toxicol, 2021;95(3):807-836.

Fink E, et al. Cellular expression of plasma prekallikrein in human tissues. Biol Chem 2007;388:957–963.

Gao BB, et al. Extracellular carbonic anhydrase mediates hemorrhagic retinal and cerebral vascular permeability through prekallikrein activation. Nature Medicine 2007;13(2):181-188.

Girolami A et al. Congenital prekallikrein deficiency. Expert Rev Hematol, 2010;3(6): 685-695.

Girolami A et al. A structure–function analysis in patients with prekallikrein deficiency. Hematology. 2018;23(6):346–350. https://doi.org/10.1080/10245332.2017.1405572.

Girolami JP, Bouby N, Richer-Giudicelli C, Alhenc-Gelas F. Kinins and Kinin Receptors in Cardiovascular and Renal Diseases. Pharmaceuticals (Basel). 2021;Mar 8;14(3):240. doi: 10.3390/ph14030240. PMID: 33800422; PMCID: PMC8000381.

Greaves P. Histopathology of Preclinical Toxicity Studies Interpretation and Relevance in Drug Safety Evaluation. Chapter 13 – Endocrine Glands 4th Edition – 2012. Hardback ISBN: 9780444538567 978-0-444-53856–7 eBook ISBN: 9780444538611.

Gregorek H, et al. Concentration of C1 inhibitor in sera of healthy blood donors as studied by immunoenzymatic assay. Complement Inflamm. 1991;8(5–6):310–2.

Hall AP, Elcombe CR, Foster JR, et al. Liver Hypertrophy: A Review of Adaptive (Adverse and Non-adverse) Changes - Conclusions from the 3rd International ESTP Expert Workshop. Toxicol. Pathol. 2012;40:971-994.

Han ED, et al. Increased vascular permeability in C1 inhibitor–deficient mice mediated by the bradykinin type 2 receptor. J Clin Invest, 2002;109(8):1057-1063.

Harvey PW, Sutcliffe C. Adrenocortical hypertrophy: Establishing cause and toxicological significance. J Appl Toxicol. 2010;30:617-626.

Kale VP, Bebenek I, Ghantous H, Kapeghian J, Singh BP, Thomas LJ. Practical Considerations in Determining Adversity and the No-Observed-Adverse-Effect-Level (NOAEL) in Nonclinical Safety Studies: Challenges, Perspectives and Case Studies. Int J Toxicol. 2022 Mar-Apr;41(2):143-162.

Kaufman N et al. Alpha 2-macroglobulin-kallikrein complexes detect contact system activation in hereditary angioedema and human sepsis. Blood, 1991;77:12 (June 15) 2660-2667.

Kenniston JA et al. Inhibition of Plasma Kallikrein by a Highly Specific, Active Site Blocking Antibody. J Biol Chem. 2014; Aug 22;289(34):23596-23608.

Klaunig JE et al. PPARalpha agonist-induced rodent tumors: modes of action and human relevance. Crit Rev Toxicol. 2003;33(6):655-780.

Lake BG. Human relevance of rodent liver tumour formation by constitutive androstane receptor (CAR) activators. Toxicol Res (Camb). 2018;7(4):697-717.

Leblanc B, Jezequel S, Davies T, Hanton G, Taradach C. Binding of drugs to eye melanin is not predictive of ocular toxicity. Regul Toxicol Pharmacol. 1998;Oct;28(2):124-32. doi: 10.1006/rtph.1998.1243. PMID: 9927562.

Long GG, Cohen IR, Gries CL,Young, JK, Francis, PC, Capen CC. Proliferative Lesions of Ovarian Granulosa Cells and Reversible Hormonal Changes Induced in Rats by a Selective Estrogen Receptor Modulator. Toxicologic Pathology. 2001;29 (4):403–410,

Maas C, et al. Misfolded proteins activate Factor XII in humans, leading to kallikrein formation without initiating coagulation. J Clin Inv. 2008;118(9):3208-3218.

Mandle RJ, et al. Identification of prekallikrein and high-molecular-weight kininogen as a complex in human plasma. Proc Natl Acad Sci USA. 1976;73(11):4179-4183.

Marceau F et al. Measurement of Bradykinin Formation and Degradation in Blood Plasma: Relevance for Acquired Angioedema Associated With Angiotensin Converting Enzyme Inhibition and for Hereditary Angioedema Due to Factor XII or Plasminogen Gene Variants. Frontiers Medicine 2020;7:358. https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00358.

Maronpot RR, Yoshizawa K, Nyska A, et al. Hepatic Enzyme Induction: Histopathology. Toxicol. Pathol. 2010;38:776-795.

Monteiro AC et al. Bradykinin B2 Receptors of dendritic cells, acting as sensors of kinins proteolytically released by Trypanosoma cruzi, are critical for the development of protective type-1 responses. PLoS pathogens. 2007;3(11), e185. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030185.

Morris CJ. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. Methods Mol Biol. 2003;225:115–21.

Muller F, et al. Platelet Polyphosphates Are Proinflammatory and Procoagulant Mediators In Vivo. Cell. 2009;139:1143-1156.

Naudin C, et al. Factor XII Contact Activation. Seminars in Thrombosis and Hemostasis. 2017.

Otterness IG, Moore PF. Carrageenan foot edema test. Methods in Enzymology. 1988;320-7.

Palazzi X, Burkhardt JE, Caplain H, et al. Characterizing ‘‘Adversity’’ of Pathology Findings in Nonclinical Toxicity Studies: Results from the 4th ESTP International Expert Workshop. Toxicologic Pathol. 2016;44: 810-824.

Powell CJ, Kapeghian JC, Bernal JC, Foster JR. Hepatitis A Virus Infection in Cynomolgus Monkeys Confounds the Safety Evaluation of a Drug Candidate. Int J. Tox. 2024;43(4):368–376.

Sainz IM, et al. Fifty years of research on the plasma kallikrein-kinin system: From protein structure and function to cell biology and in-vivo pathophysiology. Thromb Haemost. 2007;98:77-83.

Savu L et al. A senescence up-regulated protein: the rate thyroxine-binding globulin (TBG). Biochim Biophys Acta. 1991;1097 (1)19-22.

Schapira M et al. Prekallikrein Activation and High-Molecular-Weight Kininogen Consumption in Hereditary Angioedema. The New England Journal of Medicine, 1983;308(18):1050-1053.

Sexton DJ et al. Approaches to Estimate Plasma Kallikrein Inhibition Levels Required for Attack Prophylaxis in HAE. European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress 2017;17–21 June, Helsinki, Finland.

Shi T et al. Acute exposure to microcystins affects hypothalamic-pituitary axes of male rats. Environ Pollut. 2023;318:120843.

Spady TJ et al. Modulation of estrogen action in the rat pituitary and mammary glands by dietary energy consumption. J Nutr. 1999;129(2S Suppl):587S-590S.

Steinbach TJ, Maronpot RR, Hardisty JF. Human relevance of rodent Leydig cell tumors. Hamilton & Hardy’s Industrial Toxicology, Sixth Edition. John Wiley & Sons. 2015;119.

Taylor I and Mowatt V. Comparison of longevity and common tumor profiles between Sprague-Dawley and Han Wistar Rats. J. Toxicol Pathol. 2020;33:189-196.

Teufel DP et al. Stable and Long-Lasting, Novel Bicyclic Peptide Plasma Kallikrein Inhibitors for the Treatment of Diabetic Macular Edema. Journal of Medicinal Chemistry. 2018;61(7):2823–2836. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01625.

Thoolen B, et al. Proliferative and Nonproliferative Lesions of the Rat and Mouse Hepatobiliary System. Toxicol Pathol 2010;38:5S-81S.

van der Graaf F, et al. The Contact Activation Mechanism in Human Plasma: Activation Induced by Dextran Sulfate. Blood. 1982;59(6):1225-1233.

Vansell NR. Mechanisms by Which Inducers of Drug Metabolizing Enzymes Alter Thyroid Hormones in Rats. Drug Metabolism and Disposition 2022 April;50(4):508-517.

Weiss NS, Hill DA. Postmenopausal estrogens and progestogens and the incidence of gynecologic cancer. Maturitas. 1996;23:235–239.

Wong H et al. Increased hepatobiliary clearance of unconjugated thyroxine determines DMP 904-induced alterations in thyroid hormone homeostasis in rats. Toxicol Sci. 2005;84(2):232-42.

Yamada T, Cohen SM, Lake BG. Critical evaluation of the human relevance of the mode of action for rodent liver tumor formation by activators of the constitutive androstane receptor (CAR). Crit Rev Toxicol. 2021;51(5):373-394.

You L. Steroid hormone biotransformation and xenobiotic induction of hepatic steroid metabolizing enzymes. Chem Biol Interact. 2004;147(3):233-46. doi: 10.1016/j.cbi.2004.01.006. PMID: 15135080.