

ベルケイド注射用 3 mg

CTD 第2部 資料概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

－ 毒性 －

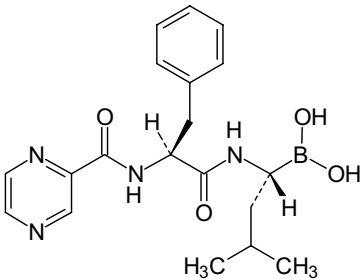
ヤンセン ファーマ株式会社

目次

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.6	毒性試験の概要文.....	7
2.6.6.1	まとめ.....	7
2.6.6.2	単回投与毒性試験.....	9
2.6.6.3	反復投与毒性試験.....	11
2.6.6.4	遺伝毒性試験.....	23
2.6.6.5	がん原性試験.....	26
2.6.6.6	生殖発生毒性試験.....	26
2.6.6.7	局所刺激性試験.....	29
2.6.6.8	その他の毒性試験.....	30
2.6.6.9	考察及び結論.....	34
2.6.6.10	図表.....	38
2.6.6.11	参考文献.....	39
2.6.7	毒性試験概要表.....	1

略語一覧表

略号又は略称	化学名又は一般名	構造式	由来
ボルテゾミブ (PS-341, JNJ-26866138)	{{(1 <i>R</i>)-3-Methyl-1-[(2 <i>S</i>)-3-phenyl-2-(pyrazine-2-carboxamido)propanamido]butyl} boronic acid		主薬

略語又は略称	名称及び内容
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ (alanine aminotransferase)
APTT	活性化部分トロンボプラスチン時間 (activated partial thromboplastin time)
ASA	能動的全身性アナフィラキシー (active systemic anaphylaxis)
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (aspartate aminotransferase)
AUC	0 時点から無限時間までの血中濃度-時間曲線下面積
AUC _(0→24)	0-24 時間の血中濃度-時間曲線下面積
BUN	血液尿素窒素(blood urea nitrogen)
CD16 ⁺	CD16 抗原を持ったリンパ球
CD2 ⁺	CD2 抗原を持ったリンパ球
CD20 ⁺	CD20 抗原を持ったリンパ球
CD4 ⁺	CD4 抗原を持ったリンパ球
CD8 ⁺	CD8 抗原を持ったリンパ球
CHO	チャイニーズハムスター卵巣 (Chinese hamster ovary)
C ₀	時間 0 における推定血漿中濃度
C _t	時間 t における血漿中濃度
DMSO	ジメチルスルフォキシド(dimethylsulfoxide)
GRP	グルコース調節蛋白質 (glucose-regulated protein)
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令 (good laboratories practice)
GT-1 細胞	マウス神経細胞株
HCT	ヘマトクリット(hematocrit)
HGB	ヘモグロビン (hemoglobin)
ICH	医薬品規制のハーモナイゼーション国際会議 (international conference on harmonisation)
LAMP	大脳辺縁系のニューロンに特異的に発現している膜蛋白質 (limbic system-associated membrane protein)
M : E	骨髄球系 : 赤血球系 (myelocyte :erythrocyte)

MCHC	平均赤血球血色素濃度 (mean corpuscular hemoglobin concentration)
MCV	平均赤血球容積 (mean corpuscular volume)
MHE	ヒト最大曝露量 (maximal human exposure)
MTD	最大耐量(maximum tolerated dose)
NF- κ B	免疫グロブリン κ L 鎖遺伝子のイントロンエンハンサーに結合する転写因子
PCA	受動的皮膚アナフィラキシー (passive cutaneous anaphylaxis)
PD	薬力学(pharmacodynamics)
PK	薬物動態(pharmacokinetics)
QWBA	定量的全身オートラジオグラフィー (quantitative whole body autoradiography)
RelA	NF- κ B のサブユニット
RBC	赤血球 (red blood cell)
S9	細胞のサイトゾル分画
$t_{1/2}$	消失半減期
TK	トキシコキネティクス (toxicokinetics)
T_{max}	最高血中濃度到達時間
TUNEL 法	アポトーシスを起こした細胞の検出を行う方法 (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated biotin-dUTP nick end labeling)
WBC	白血球 (white blood cell)

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6.1 まとめ

ボルテゾミブ（以下、本薬）の毒性試験は、主要な動物種に対する毒性の用量-反応、毒性の標的器官の特定、毒性所見の可逆性、曝露量と毒性所見との関連性、遺伝毒性及び生殖発生毒性の有無を検討し、重要な毒性の発現機序を明らかにすることを目的として実施した。ただし、がん原性試験は、本薬の臨床適用を考慮し、実施しなかった。また生殖発生毒性試験の受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験及び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ついては、本薬のラットにおける 26 週間静脈内投与試験で、精巣精上皮の変性/萎縮及び卵巣黄体の単細胞壊死がみられたこと、及び本薬が細胞毒性を有する抗がん剤であることを考慮し、実施しなかった。

単回投与毒性試験

本薬の単回投与での最大耐量 (MTD)^{注1)}を明らかにする目的で、ラット及びサルにおける単回静脈内投与毒性試験を実施した。

ラット及びサルで 0.30 mg/kg (1.80 及び 3.6 mg/m²)投与群に死亡がみられ、概略の致死量はラット及びサルともに 0.30 mg/kg (1.80 及び 3.6 mg/m²)とみなされた。ラットでは 0.30 mg/kg (1.80 mg/m²)投与群で消瘦、排糞減少、被毛の黄色化及び耳の蒼白化がみられた以外、一般状態観察に本薬投与に関連した変化はみられなかった。サルでは 0.30 mg/kg (3.6 mg/m²)投与群で死亡前に活動性低下が認められた以外、一般状態に異常な変化はみられなかった。

反復投与毒性試験

臨床での予定投与経路及び方法を用いた反復投与毒性試験として、ラットでは、週 2 回投与での 2 週間静脈内投与毒性試験及び 3 週間を 1 サイクル (週 2 回, 2 週間投与後, 1 週間休薬) とした 26 週間静脈内投与毒性試験 (14 週間中間屠殺群及び 8 週間回復性試験群を含む) を、サルでは、週 2 回投与での 4 週間静脈内投与毒性試験及び 3 週間を 1 サイクル (週 2 回, 2 週間投与後, 1 週間休薬) とした 38 週間静脈内投与毒性試験 (8 週間回復性試験群を含む) を実施した。

ラットでは、2 週間投与試験の MTD は 0.25 mg/kg/回 (1.50 mg/m²/回)、26 週間投与試験の MTD は 0.10 mg/kg/回 (0.60 mg/m²/回)であり、主要な標的器官は、消化管、造血器系及びリンパ系であった。サルでは、4 週間投与試験の MTD は 0.067 mg/kg/回 (0.80 mg/m²/回)、38 週間投与試験の MTD は 0.050 mg/kg/回 (0.6 mg/m²/回)であり、主要な標的器官は、消化管、造血器系、リンパ系、末梢神経系及び腎臓であった。

観察されたそれぞれの毒性に関して、休薬により回復あるいは回復傾向が認められた。なお、本薬の毒性はいずれの動物種においても特に違いは認められなかった。動物における本薬の毒性は立ち上がりの急な用量反応が特徴であり、MTD よりわずかに高い用量で死亡がみられている。

^{注1)} 動物に薬物を投与したとき、その動物が強い毒性症状を現さず、耐え得る (死亡しない) 最大用量。

遺伝毒性試験

細菌を用いた復帰突然変異試験，哺乳類培養細胞を用いた染色体異常試験，マウスを用いた小核試験を行った結果，Ames 試験及び小核試験においては遺伝毒性が陰性であったが，*in vitro* 染色体異常試験では染色体構造異常誘発性が示された。この所見は細胞周期に対する本薬の作用から予測されるものであり（2.6.2.2 の項参照），細胞毒性を有する抗がん剤として許容できる作用であるとみなされた。

がん原性試験

がん原性試験は実施していない。

生殖発生毒性試験

本薬は細胞毒性を有する抗がん剤であることを考慮し，生殖発生毒性試験として，胚・胎児発生に関する試験のみ実施した。

ラットの妊娠 6 日から 17 日に本薬を 0, 0.025, 0.050 及び 0.075 mg/kg/d (0, 0.15, 0.30 及び 0.45 mg/m²/d) の用量で連日静脈内投与した結果，本薬投与に関連した死亡及び剖検所見の変化は認められなかったが，0.075 mg/kg/d (0.45 mg/m²/d) で母動物の体重増加抑制及び摂餌量の減少が認められた。胎児においては本薬に起因する影響は認められなかった。以上より，無毒性量は母体の一般毒性においては 0.050 mg/kg/d (0.30 mg/m²/d)，生殖能及び胎児においては 0.075 mg/kg/d (0.45 mg/m²/d) と推察した。

ウサギの妊娠 7 日から 19 日に本薬を 0, 0.010, 0.025 及び 0.050 mg/kg/d (0, 0.11, 0.28 及び 0.55 mg/m²/d) の投与量で連日静脈内投与した結果，0.050 mg/kg/d (0.55 mg/m²/d) で死亡例，流産，母動物の体重増加抑制及び摂餌量の減少並びに胃の暗色巣及び幽門部壁の肥厚が認められた。胎児検査においては，0.050 mg/kg/d (0.55 mg/m²/d) の投与群で吸収胚数の増加とそれに伴う生存胎児数の減少及び胎児体重の低値がみられた。以上から母動物の一般毒性に対する無毒性量及び生殖機能に対する無毒性量は 0.050 mg/kg/d (0.55 mg/m²/d) の投与群で母動物に死亡及び流産がみられたことからいずれも 0.025 mg/kg/d (0.28 mg/m²/d) とみなされた。また，胎児に対する無毒性量は，0.050 mg/kg/d (0.55 mg/m²/d) の投与群で胎児毒性がみられたことから，0.025 mg/kg/d (0.28 mg/m²/d) とみなされた。

局所刺激性試験

本薬の局所刺激性試験として，ウサギを用いて血管周囲，静脈内，筋肉内及び皮下投与における影響を検討した。皮下投与を除いたいずれの投与経路においても軽度な組織刺激性がみられたのみであり，投与 72 時間後には回復が認められた。

その他の毒性試験

抗原性試験

モルモットを用いた抗原性試験の結果，全身性アナフィラキシー反応(ASA)及び受動的皮膚アナフィラキシー反応(PCA)ともに陰性であった。

免疫毒性試験

本薬のマウスにおける免疫毒性試験において、0.6 mg/kg/回 (1.8 mg/m²/回)までの用量では、免疫毒性作用を示さなかった。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

本薬の単回投与での MTD を明らかにする目的で、ラット及びサルを用いた静脈内単回投与試験を実施した。

(1) ラットにおける単回投与毒性試験及びトキシコキネティクス試験

評価資料 4.2.3.1.2

【試験方法】

SD ラット (1 群雌雄各 5 例) に本薬の 0 (溶媒対照: 生理食塩液/0.1% L-アスコルビン酸及び 2% エタノール含), 0.03, 0.10 及び 0.30 mg/kg (0, 0.18, 0.60 及び 1.80 mg/m²) を単回静脈内投与した。試験期間中は死亡及び一般状態観察, 体重及び摂餌量測定, 血液学的検査及び血液生化学的検査 (試験第 2, 8 及び 16 日) を実施した。試験第 16 日に屠殺し, 剖検, 器官重量測定及び病理組織学的検査 (対照群及び高用量群の副腎, 結腸, 空腸, 回腸, 肝臓及び脾臓) を実施した。これらは, 予め実施した定量的ラット全身オートラジオグラフィ (QWBA) において, ラベルした本薬が高濃度認められたことにより標的器官と考えられ, 検査を実施した (2.6.4.4 (1) 2) の項参照, QWBA/MB Rat)。サテライト群 (各群雌雄 6~9 例) を同用量で設け, 試験第 1 日目の投与前及び投与後 10 分, 30 分, 1 時間, 3 時間, 24 時間に血液を採取し, トキシコキネティクス (TK) を実施した (概要表 2.6.7.5.2A)。

【用量設定の根拠】

投与量は, ラットにおける単回投与予備試験 (参考資料 4.2.3.1.1) の結果から設定した。予備試験では, 1 群 6 例の雌 Lewis ラットに, 本薬を 0.01, 0.03, 0.10 及び 0.30 mg/kg (0.06, 0.18, 0.60 及び 1.80 mg/m²) の用量で単回静脈内投与した。その結果, すべての用量群で, 死亡例は認められず, 体重及び器官重量に本薬に関連した影響はみられなかった。この成績より, 投与量を 0, 0.03, 0.10 及び 0.30 mg/kg (0, 0.18, 0.60 及び 1.80 mg/m²) とした。

【試験結果】

0.30 mg/kg (1.80 mg/m²) 投与群で試験第 2 日に, 本薬の投与に関連した死亡が雌 2 例にみられたが, 一般状態観察, 剖検及び病理組織学的検査に異常は認められなかった。

生存例の一般状態観察では, 0.30 mg/kg (1.80 mg/m²) 投与群の雌雄各 1 例に消瘦, 排糞減少, 被毛の黄色化及び雌 1 例に耳の蒼白化がみられ, 雌雄各 1 例に, 体重及び摂餌量の減少がみられた。なお, すべての所見は試験第 16 日までに回復した。

0.30 mg/kg (1.80 mg/m²) 投与群では試験第 2 日に対照群と比較して, 血液学的検査で雌雄に平均赤血球色素濃度 (MCHC) 及び血小板の減少, 白血球 (WBC), 好中球の増加, 雄にリンパ球

及び単球の増加がみられ、血液生化学的検査で雄にグルコース及び雌にトリグリセリドの増加、並びに雌雄に総蛋白、アルブミン、グロブリン、ナトリウム及びクロールの減少あるいは減少傾向がみられた。更に、雌雄各 1 例に血液尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (雄のみ)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) あるいはアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) の上昇が認められた。これらの変化は試験第 8 日までに回復した。

全投薬群の雄で、脾臓重量増加が、0.30 mg/kg (1.80 mg/m²)投与群の雌で、副腎重量減少がみられた。

剖検及び病理組織学的検査には、本薬投与に関連した変化はみられなかった。

TK では、血漿中及び血液中の本薬濃度は、0.30 mg/kg (1.80 mg/m²)投与群を除き定量下限未満であった。C_{10min} が投与 10 分後の初回採血時点であったため、T_{max} は雌雄共に 10 分以内と推察した。C_{10min} は血液中より血漿中で高く、一方、AUC_(0→24)は血漿中より血液中でわずかに高かった。また、AUC_(0→24)及び C_{10min} が、概ね雌より雄でわずかに高かった。

以上の結果、0.30 mg/kg (1.80 mg/m²)投与群の雌 2 例の死亡及び一般状態所見により、ラットに本薬を単回静脈内投与した場合の MTD は、0.10 mg/kg (0.60 mg/m²) と判断した。この投与量は、予定臨床用量である 1.3 mg/m²/回の約 0.46 倍である。

(2) サルにおける 24 時間持続静脈内投与用量設定試験

評価資料 4.2.3.1.4

【試験方法】

カニクイザル (1 群雌雄各 1 例) に本薬を 0, 0.0042 及び 0.0125 mg/kg/h の投与量で、24 時間持続静脈内投与した。総投与量は、それぞれ 0.10 及び 0.30 mg/kg (1.2 及び 3.6 mg/m²)であった。対照群 (雌雄各 1 例) は、投与群と同じ投与速度 0.23 mL/kg/h で溶媒 (生理食塩液/0.1% L-アスコルビン酸及び 2% エタノール含) を投与した。一般状態観察、体重及び体温測定、臨床病理学的検査 (投与前、試験第 2, 5 及び 8 日の血液学的及び血液生化学的検査並びに血液凝固検査) を行った。剖検及び病理組織学的検査は試験第 8 日に行った。

【用量設定の根拠】

投与量は、サルにおける単回静脈内投与用量設定試験 (参考資料 4.2.3.1.3) の結果から設定した。この用量設定試験では、雌雄各 1 例のカニクイザルに、本薬を試験第 1 日に 0.1 mg/kg (1.2 mg/m²)、更に試験第 8 日に 0.3 mg/kg (3.6 mg/m²)を、1.0 mL/kg の容量で静脈内単回急速投与した。その結果、0.3 mg/kg (3.6 mg/m²)の投与後およそ 6 時間で 2 例とも瀕死状態により屠殺したため、MTD は 0.1 mg/kg (1.2 mg/m²)と判断した。この結果をもとに、本薬を 24 時間持続投与したときの忍容性を検討するため、総投与量を 0, 0.1 及び 0.3 mg/kg (0, 1.2 及び 3.6 mg/m²)とした。

【試験結果】

0.30 mg/kg (3.6 mg/m²)投与群で試験第 2 日に、本薬投与に関連した死亡 (雌雄各 1 例) が、活動性低下の後にみられた。0.10 mg/kg (1.2 mg/m²)投与群では、一般状態観察、体重及び体温に本薬投

与に関連した変化はみられなかった。

血液学的検査で、0.10 mg/kg (1.2 mg/m²)投与群の雄に好中球及び単球の増加、雌に投与前値と比べ赤血球 (RBC) の減少、WBC、好中球及び単球の増加がみられた。しかし、試験第3日にカテーテル留置部の感染により対照群の雌を安楽死させており、カテーテル挿入に関連した局部炎症がWBCの増加の一因となっている可能性も考えられた。血液生化学的検査では、0.30 mg/kg (3.6 mg/m²)投与群の雌に活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) の延長及びフィブリノーゲン分解産物濃度の上昇、並びに総蛋白、アルブミン及びグロブリンの減少がみられた。

剖検及び病理組織学的検査では、本薬投与に直接関連した変化はみられなかった。0.30 mg/kg (3.6 mg/m²)投与群の死亡例では、死亡前における活動性低下と、瀕死状態におけるストレスとの関連と思われる病理組織学的所見 (肺静脈塞栓、肺のうっ血、脾臓及びリンパ節におけるリンパ系組織壊死、巣状心筋変性、巣状肝細胞壊死、骨格筋出血、肺水腫及び組織球浸潤) がみられた。

以上の結果、0.30 mg/kg (3.6 mg/m²)投与群で死亡がみられたことにより、カニクイザルに本薬を24時間持続静脈内投与した場合のMTDは0.10 mg/kg (1.2 mg/m²)とみなされた。この投与量は、予定臨床用量 1.3 mg/m²/回の約0.92倍である。

2.6.6.3 反復投与毒性試験

本薬の静脈内投与による反復投与毒性試験を、ラット及びサルを用いて実施した。また、マウスを用いた腹腔内投与による予備試験もあわせて実施した。

(1) マウス及びラットにおける反復投与予備試験

参考資料 4.2.3.1.1

げっ歯類を用いて、連日投与又は間欠投与により、一連の予備試験を実施した。

雄 C57BL/6 マウスを用いて、10～14日間の連日腹腔内投与試験を、0.03～10 mg/kg/d (0.09～30.0 mg/m²/d) の投与量で実施した結果、3.0 mg/kg/d (9.0 mg/m²/d)以上の投与群で死亡がみられ、MTDは1.0 mg/kg/d (3.0 mg/m²/d)とみなされた。

雌 Lewis ラットを用いて7日間連日静脈内投与試験を、0.01～0.3 mg/kg/d (0.06～1.8 mg/m²/d)の投与量で実施した結果、0.25 mg/kg/d (1.5 mg/m²/d)以上の投与群で死亡がみられ、MTDは0.15 mg/kg/d (0.90 mg/m²/d)とみなされた。

雌 Lewis ラットに、0.01～0.3 mg/kg/回 (0.06～1.8 mg/m²/回)の投与量で14日間、隔日静脈内投与した結果、0.2 mg/kg/回 (1.2 mg/m²/回)以上の投与群で死亡がみられ、MTDは0.1 mg/kg/回 (0.6 mg/m²/回)とみなされた。

雄 SD ラットに、0.01～0.35 mg/kg/回 (0.06～2.10 mg/m²/回)の投与量で、週2回、2週間 (投与回数: 4回) 静脈内投与した結果、0.25 mg/kg/回 (1.5 mg/m²/回)以上の投与群で死亡がみられ、MTDは0.20 mg/kg/回 (1.20 mg/m²/回)とみなされた。

雌 Lewis ラットに、0.03, 0.10 及び 0.30 mg/kg/回 (0.18, 0.60 及び 1.80 mg/m²/回)の投与量で、週1回、8週間静脈内投与した結果、0.30 mg/kg/回 (1.80 mg/m²/回)投与群で死亡がみられ、MTDは0.10 mg/kg/回 (0.60 mg/m²/回)とみなされた。

以上の結果より、本薬の反復投与毒性試験は、週 2 回投与で実施するのが適切と考えられた。

(2) ラットにおける週 2 回投与による 2 週間静脈内投与毒性試験

評価資料 4.2.3.2.1

【試験方法】

本薬を、生理食塩液（2%エタノール及び 0.1%L-アスコルビン酸を含む）にて調製し、SD ラット（1 群雌雄各 10 例）に、0（溶媒対照）、0.10、0.20 及び 0.25 mg/kg/回（0、0.60、1.20 及び 1.50 mg/m²/回）の投与量で週 2 回（試験第 1 日、第 5 日、第 8 日及び第 12 日に投与）、2 週間静脈内投与した。投与量は、初回投与日には 0、0.10、0.20 及び 0.25 mg/kg/回（0、0.60、1.20 及び 1.50 mg/m²/回）投与群でそれぞれ 8.0、3.2、6.4 及び 8.0 mL/kg/回、残りの投与日は 6.9、2.8、5.6 及び 6.9 mL/kg/回とした。また、一般状態観察、体重測定、臨床病理学的検査（試験第 13 日及び第 28 日の血液学的及び血液生化学的検査）を実施した。1 群雌雄各 5 例の動物を投与終了後の試験第 13 日に屠殺し、残りの動物は回復群として 15 日間休薬し、試験第 28 日に屠殺した。

【用量設定の根拠】

投与量は、先に実施した雄 SD ラットにおける反復投与予備試験（2.6.6.3 (1)の項参照）において、雄ラットに 0.01～0.35 mg/kg/回（0.06～2.10 mg/m²/回）の投与量で、週 2 回、2 週間静脈内投与した結果、0.25 mg/kg/回（1.50 mg/m²/回）以上の投与群で死亡がみられた。したがって、本試験の最高用量として、死亡発現が予想される、0.25 mg/kg/回（1.50 mg/m²/回）を設定し、以下、0.20 及び 0.10 mg/kg/回（1.20 及び 0.60 mg/m²/回）を設定した。

【試験結果】

本薬投与に関連する死亡及び一般状態の変化はみられなかった。

0.20 及び 0.25 mg/kg/回（1.20 及び 1.50 mg/m²/回）投与群の雄の平均体重は、試験第 12 日に、対照群と比較して軽度ながら有意な低値が認められた。

血液学的検査では、試験第 13 日に、好中球の有意な増加が 0.20 mg/kg/回（1.20 mg/m²/回）以上の投与群の雌雄で、血小板の有意な減少が雄の全投薬群及び 0.25 mg/kg/回（1.50 mg/m²/回）投与群の雌で認められた。

血液生化学的検査では、試験第 13 日に、APTT の延長が 0.20 mg/kg/回（1.20 mg/m²/回）以上の投与群の少数例の動物に観察された。これらの変化は 2 週間の回復期間後には回復した。しかし、試験第 28 日には、0.25 mg/kg/回（1.50 mg/m²/回）投与群の雌雄で平均赤血球容積(MCV)の有意な増加及び 0.20 mg/kg/回（1.20 mg/m²/回）以上の投与群の雄に網状赤血球の増加を伴う RBC の軽度の減少が認められた。

試験第 13 日の剖検では、0.20 mg/kg/回（1.20 mg/m²/回）以上の投与群で、胃拡張（雌、雄）及び 0.20 mg/kg/回（1.20 mg/m²/回）投与群で斑紋状腎（雄 1 例）、0.25 mg/kg/回（1.50 mg/m²/回）投与群で腎盂拡張（雄 1 例）及び腎退色（雌 1 例）が認められた。

本薬に関連した病理組織学的所見として、腎臓の変化（尿細管上皮の巨大核、尿細管上皮の再

生、尿管拡張、鉍質沈着及び細胞浸潤)が全投薬群で認められた。0.25 mg/kg/回 (1.50 mg/m²/回)投与群の雌雄で腸間膜リンパ節の出血及び雄で組織球過形成が、0.20 mg/kg/回 (1.20 mg/m²/回)以上の投与群の雄でリンパ系細胞減少がみられた。また、0.25 mg/kg/回 (1.50 mg/m²/回)投与群で、胸腺のリンパ系細胞減少が雌雄各 1 例に、結腸の浮腫及び慢性炎症が雄のみに、膀胱の浮腫及び急性炎症が雌 1 例に認められた。腎臓の剖検及び病理学的所見は、休薬後には回復を示したが、完全には回復しなかった。

以上の結果から、全投薬群で本薬に関連した腎臓の変化がみられたため、本試験における無毒性量は求められなかった。0.25 mg/kg/回 (1.50 mg/m²/回)投与群において本薬に関連した死亡及び重篤な毒性は認められなかったことから、MTD は 0.25 mg/kg/回 (1.50 mg/m²/回)とみなされた。この用量は、週 2 回投与での予定臨床用量である 1.3 mg/m²/回の約 1.15 倍である。

(3) ラットにおける 26 週間静脈内投与毒性試験：14 週間中間報告

評価資料 4.2.3.2.2

【試験方法】

本薬を生理食塩液にて調製し、SD ラット (1 群雌雄各 30 例) に 0 (溶媒対照), 0.05, 0.10 及び 0.20 mg/kg/回 (0, 0.30, 0.60 及び 1.20 mg/m²/回)の投与量で、3 週間を 1 サイクル (週 2 回, 2 週間投与後, 1 週間休薬) として 9 サイクル (26 週間) にわたって静脈内投与した。ただし、高用量群では投与初期から死亡がみられたため、試験第 28/29 日に投与量を 0.20 mg/kg/回 (1.20 mg/m²/回)から 0.15 mg/kg/回 (0.90 mg/m²/回)に減量した。各群の動物を雌雄各 10 例ずつの 3 つのサブセットに分け、第 1 のサブセットは 5 サイクル (14 週間) 後に、第 2 及び第 3 のサブセットは、9 サイクル (26 週間) 後あるいは 8 週間の回復期間後に、それぞれ剖検した (2.6.6.3 (4)の項参照)。各群につき雌雄各 12 例のサテライト動物をおき、TK の評価に用いた。本薬の影響を、一般状態観察、詳細な身体検査、体重測定、摂餌量測定、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検、器官重量測定、骨髓細胞検査、病理組織学的検査、神経病理学的検査及び TUNEL 法による免疫組織化学的検査により評価した。TK は、試験第 1 日、第 14 週及び第 26 週に実施した。本項は 14 週間中間屠殺群について記載した。

【用量設定の根拠】

先に実施したラット 2 週間静脈内投与毒性試験 (2.6.6.3 (2)の項参照) において、0.10 mg/kg/回 (0.60 mg/m²/回)以上の投与群で毒性変化が認められた。したがって、より低い 0.05 mg/kg (0.30 mg/m²/回)を低用量、0.20 mg/kg/回 (1.20 mg/m²/回)を高用量とし、両者の中間の 0.10 mg/kg/回 (0.60 mg/m²/回)を中用量と設定した。

【試験結果】

本薬に関連した死亡又は切迫屠殺は、0.20/0.15 mg/kg/回 (1.20/0.90 mg/m²/回)投与群の雄 2 例、雌 4 例で、試験第 5, 22, 23, 26 又は 73 日にみられた。

主な一般状態の変化として、0.05 mg/kg/回 (0.30 mg/m²/回)投与群の雄に流涎、雌雄に泌尿生殖

器領域の被毛湿潤/黄色化, 0.10 mg/kg/回 (0.60 mg/m²/回)以上の投与群の雌雄で試験第8~14週に流涎, 立毛及び泌尿生殖器領域の被毛湿潤/黄色化が試験第6週以降に認められた。その他, 0.20/0.15 mg/kg/回 (1.20/0.90 mg/m²/回)投与群では, 活動性低下, 身づくろい欠如, 眼瞼下垂, 眼脂, 散瞳, 下痢, 軟便 (ときに粘液状物質を伴う), 過敏, 非持続性痙攣, 蒼白, 冷触感, 脱水状態, 衰弱及び横臥位が観察された。

体重の増加抑制が0.20/0.15 mg/kg/回 (1.20/0.90 mg/m²/回)投与群にみられた。試験第4週から第14週にかけて, 雄の体重は対照群の87~94%であった。また, 同群では, 試験第1週から第14週までの雄の体重増加量が対照群と比較して17%低値を示した。休薬期間の体重増加は対照群と同等又はそれ以上であった。本薬に関連した摂餌量の減少は, 対照群と比較して0.20/0.15 mg/kg/回 (1.20/0.90 mg/m²/回)投与群の雄で, 投与期間中にみられたが, 休薬期間には回復が認められた。

眼科学的検査では, 本薬投与に関連した変化は認められなかった。

血液学的検査では, 血小板の減少及び赤血球パラメータ (RBC, ヘモグロビン(HGB)及びヘマトクリット(HCT)) の減少あるいは減少傾向が, 全投薬群の雌雄に認められ, 赤血球分布幅の増加が0.05 mg/kg/回 (0.30 mg/m²/回)以上の投与群の雌雄及び平均血小板容積が0.10 mg/kg/回 (0.60 mg/m²/回)以上の投与群の雌雄で増加がみられ, また, MCHC の減少が雌雄で極軽度にもみられた。0.10 mg/kg/回 (0.60 mg/m²/回)以上の投与群の雌雄で, 極軽度から軽度のフィブリノーゲンの増加あるいは増加傾向及びWBCの増加あるいは増加傾向が認められた。WBCの増加は, 主として好中球の増加によるものであり, リンパ球及び単球の関与は少なかった。フィブリノーゲン及びWBCの増加は, 共に炎症反応を示唆するものであるが, 病理組織学的には炎症性的変化は認められなかった。

血液生化学的検査では, 全投薬群の雌雄に, グルコースの軽度から中等度の増加が認められた。

骨髄検査では, 0.20/0.15 mg/kg/回 (1.20/0.90 mg/m²/回)投与群で造血細胞の減少/壊死 (雄2/8, 雌3/6) が認められた。同群の雌雄にみられた血小板の減少に関連する巨核球の量的又は質的な変化は認められなかった。

器官重量の変化としては, 全投薬群の雌雄における肝臓重量の増加あるいは増加傾向並びに0.20/0.15 mg/kg/回 (1.20/0.90 mg/m²/回)投与群の雌雄における胸腺重量の減少が認められた。

剖検における異常所見は主として死亡・切迫屠殺例に観察され, 主な所見は, 胃拡張, 小腸の粘液状又は水様内容物, 肝臓腫大, 肝臓の変色であった。投与期間終了時屠殺例では, 0.10 mg/kg/回 (0.60 mg/m²/回)以上の投与群の雌及び0.20/0.15 mg/kg/回 (1.20/0.90 mg/m²/回)投与群の雄で飼料による胃拡張が, 0.20/0.15 mg/kg/回 (1.20/0.90 mg/m²/回)投与群の雌で肝臓腫大がみられた。

主な病理組織学的所見は, 全投薬群における極軽微又は極軽度の肝細胞肥大及び色素沈着, 0.10 mg/kg/回 (0.60 mg/m²/回)以上の投与群における極軽微又は極軽度の肝細胞空胞化, 極軽微から重度のリンパ系組織萎縮又は単細胞壊死, 極軽微から中等度の腸管膜リンパ節の組織球増加, 結腸の拡張, 極軽微から極軽度の直腸の単細胞壊死, 極軽微から極軽度の消化管粘膜過形成及び下顎唾液腺粘液細胞肥大, 並びに0.20/0.15 mg/kg/回 (1.20/0.90 mg/m²/回)投与群における極軽度の涙腺上皮の単細胞壊死が認められた。死亡・切迫屠殺例では, 上記の標的器官における所見は全体的により強く観察され, 更に骨髄, 胃, 心臓, 腎臓, 乳腺, 卵巣及び副腎にも変化が認められた。中枢及び末梢神経系, 骨格筋の神経病理学的検査及び脊髄の免疫組織化学的検査では, 本薬に関

連した変化は認められなかった。

TKでは、試験第1週及び第14週ともに、 $AUC_{(0\rightarrow 24)}$ 及び $C_{0.5h}$ は用量依存的に増加が認められた。 $C_{0.5h}$ の増加は $AUC_{(0\rightarrow 24)}$ の増加と比例した。

以上の結果から、全投薬群で臨床病理学的及び病理組織学的変化が認められたことから、無毒性量は求められなかった。しかし、最低投与量である0.05 mg/kg/回 (0.30 mg/m²/回)投与群では、極軽度のRBCの減少、グルコースの増加、極軽微から極軽度の肝細胞の肥大、空胞化及び色素沈着がみられたのみであった。0.20/0.15 mg/kg/回 (1.20/0.90 mg/m²/回)投与群で死亡がみられたことから、MTDは0.10 mg/kg/回 (0.60 mg/m²/回)とみなされた。これは予定臨床用量である1.3 mg/m²/回投与の約0.46倍である。

(4) ラットにおける26週間静脈内投与毒性試験: 最終報告

評価資料 4.2.3.2.3

【試験方法】

本薬を、生理食塩液により調製し、SDラット(1群雌雄各30例)に0(溶媒対照)、0.05、0.10及び0.20 mg/kg/回(0、0.30、0.60及び1.20 mg/m²/回)の投与量で、3週間を1サイクル(週2回、2週間投与後、1週間休薬)として9サイクル(26週間)にわたって静脈内投与した。ただし、高用量群では投与初期から死亡がみられたため、試験第28/29日に投与量を0.20 mg/kg/回(1.20 mg/m²/回)から0.15 mg/kg/回(0.90 mg/m²/回)に減量した。各群の動物を雌雄各10例ずつの3つのサブセットに分け、第1のサブセットは5サイクル(14週間)後に(2.6.6.3(3)の項参照)、第2及び第3のサブセットは、9サイクル(26週間)後にあるいは8週間の回復期間後に、それぞれ剖検した。本項は主群及び回復群について記載した。

【用量設定の根拠】

先に実施したラット2週間静脈内投与毒性試験(2.6.6.3(2)の項参照)において、0.10 mg/kg/回(0.60 mg/m²/回)以上の投与群で毒性変化が認められた。したがって、より低い0.05 mg/kg/回(0.30 mg/m²/回)を低用量、0.20 mg/kg/回(1.20 mg/m²/回)を高用量とし、両者の中間の0.10 mg/kg/回(0.60 mg/m²/回)を中用量と設定した。

【試験結果】

本薬関連の死亡又は切迫屠殺が0.20/0.15 mg/kg/回(1.20/0.90 mg/m²/回)投与群の雄2例、雌3例で、試験第23、72、110又は180日にみられた。

一般状態の変化としては、0.05 mg/kg/回(0.30 mg/m²/回)以上の投与群で流涎が試験第5週以降に、泌尿生殖器領域の被毛湿潤/黄色化が試験第7週以降に、0.10 mg/kg/回(0.60 mg/m²/回)以上の投与群で立毛が試験第7週以降に、便の異常(下痢、軟便、粘液便)及び活動性低下が試験第11週以降に、それぞれ認められた。回復期間中は一般状態の変化は観察されなかった。

対照群と比較して体重の増加抑制が0.10 mg/kg/回(0.60 mg/m²/回)以上の投与群の雄でみられ、全投与期間中の体重増加量は、対照群と比較して13%~17%低値を示した。各サイクルの休薬期

間中における体重増加量は対照群と同等又はそれ以上であったが、回復期間終了時の体重は対照群と比較して7~10%低値を示した。

極軽度から軽度の摂餌量の減少が、0.20/0.15 mg/kg/回 (1.20/0.90 mg/m²/回)投与群の雄で大部分の投与期間中に認められたが、各サイクルの休薬期には回復した。その他の群では摂餌量への影響はみられなかった。回復期間中は、全投薬群の雌雄とも摂餌量は対照群と同等であった。

眼科学的検査では、本薬関連の影響は認められなかった。

血液学的検査で、血小板の減少あるいは減少傾向、平均血小板容積の増加あるいは増加傾向、赤血球パラメータ (RBC, HGB 及び HCT) の減少あるいは減少傾向、赤血球分布幅の増加並びに WBC の増加あるいは増加傾向 (0.20/0.15 mg/kg/回 (1.20/0.90 mg/m²/回)投与群の雌を除く) が全投薬群の雌雄で観察された。また、MCHC の減少が 0.10 mg/kg/回 (0.60 mg/m²/回)以上の投与群で、網状赤血球率の増加が 0.05 mg/kg/回 (0.30 mg/m²/回)以上の投与群の雄で、並びに MCV の増加が 0.20/0.15 mg/kg/回 (1.20/0.90 mg/m²/回)投与群の雄で認められた。WBC の増加は、主として好中球の増加によるものであり、リンパ球、単球又は大型非染色球の関与は少なかった。0.05 mg/kg/回 (0.30 mg/m²/回)以上の投与群の雄並びに 0.05 及び 0.10 mg/kg/回 (0.30 及び 0.60 mg/m²/回)投与群の雌で、極軽度から中等度のフィブリノーゲンの増加傾向がみられた。回復期間終了時では、0.20/0.15 mg/kg/回 (1.20/0.90 mg/m²/回)投与群で血小板は完全ではないものの回復傾向が認められており、数例に平均血小板容積の軽度増加傾向を示す例がみられた。赤血球パラメータは、0.20/0.15 mg/kg/回 (1.20/0.90 mg/m²/回)投与群の雄を除いては対照群と同等であった。WBC、リンパ球、好中球及び大型非染色球は、0.05 及び 0.10 mg/kg/回 (0.30 及び 0.60 mg/m²/回)投与群の少数例を除いては、対照群と同等であった。その他の項目は、回復期間終了時には対照群と同等であった。

血液生化学的検査では、全投薬群の雌雄でグルコースの増加あるいは増加傾向、並びに AST 及び ALT の減少あるいは減少傾向、全投薬群の雄でコレステロールの減少あるいは減少傾向、0.20/0.15 mg/kg/回 (1.20/0.90 mg/m²/回)投与群の雄でリンの増加、並びに総蛋白、アルブミン及びグロブリンの減少あるいは減少傾向、0.10 mg/kg/回 (0.60 mg/m²/回)以上の投与群の雄でカリウムの減少がそれぞれ認められた。さらに 0.20/0.15 mg/kg/回 (1.20/0.90 mg/m²/回)投与群の雄 2 例を除いて、全投薬群で BUN の減少が認められた。血清蛋白電気泳動では、0.10 mg/kg/回 (0.60 mg/m²/回)以上の投与群の雌雄でアルブミンの減少傾向、0.20/0.15 mg/kg/回 (1.20/0.90 mg/m²/回)投与群の雄で α_1 分画及び γ グロブリンの減少、全投薬群の雌で α_1 分画及び β グロブリンの増加並びに γ グロブリンの減少が、それぞれ認められた。回復期間終了時には、全投薬群の雄で極軽度から軽度のグルコースの増加が認められた。

尿検査では、0.10 mg/kg/回 (0.60 mg/m²/回)以上の投与群の雄で中等度のリンの増加、0.20/0.15 mg/kg/回 (1.20/0.90 mg/m²/回)投与群でクレアチニンの減少が、それぞれ観察された。回復期間終了時には、尿検査の結果は対照群と同等であった。

骨髄検査では、0.20/0.15 mg/kg/回 (1.20/0.90 mg/m²/回)投与群で赤血球系細胞の増加による骨髄球系：赤血球系 (M:E) 比の低下がみられた。これは赤血球パラメータの変化と関連したものであった。血小板の減少と関連する巨核球の変化は観察されなかった。

器官重量では、肝臓の重量の増加あるいは増加傾向が、全投薬群の雌雄に認められた。胸腺の

重量の減少傾向が 0.20/0.15 mg/kg/回 (1.20/0.90 mg/m²/回)投与群で観察された。0.10 mg/kg/回 (0.60 mg/m²/回)以上の投与群の雌で腎臓の重量の増加がみられた。0.20/0.15 mg/kg/回 (1.20/0.90 mg/m²/回)投与群の雄で精巣上体の重量減少が認められた。

剖検及び病理組織学的検査において、本薬に関連する変化として全投薬群で肝細胞の肥大、空胞化及び 0.05 mg/kg/回 (0.30 mg/m²/回)投与群の雄を除き色素沈着、消化管粘膜過形成並びに唾液腺粘液細胞のびまん性肥大が認められた。0.10 mg/kg/回 (0.60 mg/m²/回)以上の投与群で、腎尿細管拡張、胸腺及びリンパ器官の軽微から重度のリンパ系組織の萎縮、鼻涙管の上皮細胞の過形成性/化成/炎症、雄に消化管粘膜固有層の単細胞壊死、涙腺の単細胞壊死、造血細胞密度低下あるいは単細胞壊死が観察された。また、0.20/0.15 mg/kg/回 (1.20/0.90 mg/m²/回)投与群で脾臓の単細胞壊死がみられた。更に 0.10 mg/kg/回 (0.60 mg/m²/回)以上の投与群の雌で、腎尿細管上皮細胞肥大、腎間質性炎症及び好酸性沈着物、並びに 0.05 mg/kg/回 (0.30 mg/m²/回)以上の投与群の雌では、卵巣黄体の単細胞壊死が認められた。0.10 mg/kg/回 (0.60 mg/m²/回)以上の投与群の雄では、脂肪組織の炎症が認められた。0.20/0.15 mg/kg/回 (1.20/0.90 mg/m²/回)投与群の雄に眼房前部又は後部ブドウ膜炎がみられた。死亡・切迫屠殺動物では、上述の標的器官により重篤な所見が認められ、更に心臓、鼻腔、眼、副腎、腸、乳腺、卵巣及び脊髄に状態悪化に伴う所見が観察された。8 週間の回復期間後の病理組織学的所見は、脾臓では 0.20/0.15 mg/kg/回 (1.20/0.90 mg/m²/回)投与群の雄、肝臓では 0.05 mg/kg/回 (0.30 mg/m²/回)投与群の雌及び 0.20/0.15 mg/kg/回 (1.20/0.90 mg/m²/回)投与群の雌を除く投与群、また、0.10 mg/kg/回 (0.60 mg/m²/回)以上の投与群における雄の腎臓に認められた。更に 0.20/0.15 mg/kg/回 (1.20/0.90 mg/m²/回)投与群では、骨髄、雄のみで鼻涙管、生殖器官、胸腺及び雌のみで盲腸にも認められた。回復期間後には完全な回復はみられなかったが、回復傾向が認められた。

末梢神経及び骨格筋の神経病理学的検査並びに脊髄の神経病理学的及び免疫組織化学的検査では、本薬に関連した影響は認められなかった。

試験第 1, 14 及び 26 週の TK では、AUC_(0→24)及び C_{0.5h}は用量依存的な増加を示し、性差は認められなかった。試験第 1 週と比較して、試験第 26 週では、AUC_(0→24)及び C_{0.5h}の増加が認められたが、試験第 14 週とは同等であった。C_{0.5h}の増加は AUC_(0→24)の増加と比例した。

以上の結果から、全投薬群で臨床検査値の変動及び病理組織学的所見が認められたことから、無毒性量は求められなかった。しかしながら、0.05 mg/kg/回 (0.30 mg/m²/回)投与群では軽度の所見がみられたのみであり、状態の悪化はみられず、回復期間終了時には所見は消失していたことから、この投与量での忍容性が認められた。また、0.20/0.15 mg/kg/回 (1.20/0.90 mg/m²/回)投与群で死亡がみられたことから、MTD は 0.10 mg/kg/回 (0.60 mg/m²/回)とみなされた。これは予定臨床用量である 1.3 mg/m²/回投与の約 0.46 倍である。回復期間終了時、8 週間の回復期間においてすべての所見に回復は認められなかったが、投与期間中にみられた大部分の所見は回復傾向を示した。

(5) サルにおける 14 日間静脈内投与用量設定試験

参考資料 4.2.3.2.5

【試験方法】

本薬を生理食塩液 (2%エタノール及び 0.1%L-アスコルビン酸を含む) で調製し, 0 (溶媒対照), 0.045, 0.067 及び 0.100 mg/kg/d (0, 0.54, 0.80 及び 1.20 mg/m²/d)の用量で, 1 群雌雄各 2 例 (対照群は雌雄各 1 例) のカニクイザルに最長 14 日間, 連日静脈内投与して毒性を検討すると共に, 24 日間の回復性試験 (0.045 mg/kg/d (0.54 mg/m²/d)投与群のみ) も行った。

【用量設定の根拠】

先に実施したカニクイザルを用いた単回静脈内投与用量設定試験 (参考資料 4.2.3.1.3) 及び 24 時間静脈内持続投与試験 (評価資料 4.2.3.1.4) において, いずれも 0.10 mg/kg (1.20 mg/m²)が MTD であり, この用量で雌雄に好中球及び単球増加がみられた (2.6.6.2 (2)の項参照)。したがって, 0.100 mg/kg/d (1.20 mg/m²/d)を本試験の高用量とし, 以下, 0.067 及び 0.045 mg/kg/d (0.80 及び 0.54 mg/m²/d)を設定した。

【試験結果】

0.100 mg/kg/d (1.20 mg/m²/d)投与群の雄 1 例及び雌 2 例, 0.067 mg/kg/d (0.80 mg/m²/d)投与群の雄 2 例並びに 0.045 mg/kg/d (0.54 mg/m²/d)投与群の雄 1 例を, 投与第 6, 8, 12 又は 14 日に, 瀕死状態のため切迫屠殺した。これらの動物で切迫屠殺前にみられた一般状態の変化は, 無排便, 嘔吐, 呼吸音, 努力呼吸, 湿性肺音, 赤色鼻汁, 衰弱, 活動性低下, 脱水状態, 冷触感, 円背位, 腹部軟化, うめき声及び粘膜退色であった。

投与第 8 日から 0.067 mg/kg/d (0.80 mg/m²/d)以上の投与群で体重減少がみられ, また, 0.067 mg/kg/d (0.80 mg/m²/d)以上の投与群で摂餌量の減少が散発的に認められた。

全投薬群で投与第 2 週に, 投与前の値と比較して血小板及びリンパ球の減少が認められた。0.067 mg/kg/d (0.80 mg/m²/d)以上の投与群で, 総蛋白及びアルブミンの減少が, 投与第 2 週に観察された。切迫屠殺例の屠殺時に行った骨髓細胞検査で, 全投薬群に異型巨核球が観察された。大部分の動物で一時的な好中球の減少が認められたが, 一部の動物では, 好中球増加又は骨髓細胞検査で骨髓過形成がみられた。0.045 mg/kg/d (0.54 mg/m²/d)投与群における血小板, リンパ球及び巨核球への影響には回復が認められた。

切迫屠殺例では, 剖検で肺, 胃, 皮膚又はリンパ節の赤色化巣又はびまん性発赤が認められ, これに関連して病理組織学的検査で, これらの組織で極軽微から中等度の出血が観察された。また, 中等度から高度の胸腺のリンパ球減少が, 0.067 mg/kg/d (0.80 mg/m²/d)投与群のみに観察された。

以上の結果から, 全投薬群で死亡がみられたことから, 無毒性量及び MTD は求められなかった。本試験の最低用量である 0.045 mg/kg/d (0.54 mg/m²/d)は, 予定臨床用量である 1.3 mg/m²/回の約 0.42 倍である。

(6) サルにおける4週間静脈内投与毒性試験

評価資料 4.2.3.2.6

【試験方法】

本薬を生理食塩液（2%エタノール及び0.1% L-アスコルビン酸を含む）で調製し、カニクイザル（1群雌雄各5例）に、0（溶媒対照）、0.045、0.067及び0.100 mg/kg/回（0、0.54、0.80及び1.20 mg/m²/回）の投与量で、週2回、4週間静脈内投与を行った。各群の雌雄各3例を投与期間終了時に、残りの雌雄各2例を2週間の回復期間後に剖検した。一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、呼吸数及び直腸温、心電図検査、血圧、眼科学的検査、臨床検査（血液学的検査、血液生化学的検査）、剖検、器官重量測定、骨髄検査及び病理組織学的検査により毒性を評価した。

【用量設定の根拠】

先に実施したカニクイザルにおける14日間静脈内投与用量設定試験（2.6.6.3（5）の項参照）では、0.045 mg/kg/回（0.54 mg/m²/回）以上で切迫屠殺例がみられたことから、連日投与では忍容性が低いと考えられた。したがって、本試験では週2回投与とし、24時間持続静脈内投与用量設定試験（2.6.6.2（2）の項参照）でのMTDである、0.100 mg/kg/回（1.20 mg/m²/回）を高用量とし、以下、0.067及び0.045 mg/kg/回（0.80及び0.54 mg/m²/回）を設定した。

【試験結果】

0.100 mg/kg/回（1.20 mg/m²/回）投与群の雄1例を、試験第26日に瀕死状態のため切迫屠殺した。

投与期間中、本薬に関連した一般状態の変化としては、0.100 mg/kg/回（1.20 mg/m²/回）投与群の雄で、嘔吐（5/5）、水様便/粘液便（3/5）が高頻度でみられ、全投薬群で排糞減少、摂餌量減少又は無摂食がみられた。後肢皮膚の発赤は投与部位と関連しており、投与日に高頻度でみられた。一方、消化管毒性の症状（嘔吐、排便減少及び摂餌量減少/無摂食）は投与翌日に高頻度に認められた。回復期間中は、本薬に関連した嘔吐及び便の所見は観察されなかった。

体重及び摂餌量に対する影響として、0.100 mg/kg/回（1.20 mg/m²/回）投与群の雄に体重減少がみられた。0.100 mg/kg/回（1.20 mg/m²/回）投与群の雄の切迫屠殺例でも状態悪化を伴う体重減少（11.8%）がみられたが、他の動物ではわずかな体重減少のみで、これらの変化は投与期間中に回復した。また、摂餌量減少は全投薬群にみられ、0.100 mg/kg/回（1.20 mg/m²/回）投与群の雌に最も高頻度でみられた。また、摂餌量減少は、雄より雌が顕著であった。なお、回復期間中は対照群との差は認められなかった。

投与期間終了時屠殺例の呼吸数、直腸温、心電図、血圧及び眼科学的検査所見には、本薬に関連した影響は認められなかった。

臨床検査において、0.067 mg/kg/回（0.80 mg/m²/回）投与群の雄及び0.100 mg/kg/回（1.20 mg/m²/回）投与群の雌雄で中等度のリンパ球減少、0.067 mg/kg/回（0.80 mg/m²/回）投与群の雌及び0.100 mg/kg/回（1.20 mg/m²/回）投与群の雌雄で軽度から中等度の単球増加、0.100 mg/kg/回（1.20 mg/m²/回）投与群の雌雄で軽度から中等度の総蛋白の減少、0.067 mg/kg/回（0.80 mg/m²/回）以上の投与群の雌雄に中等度のフィブリノーゲンの増加が認められた。また、0.067 mg/kg/回（0.80 mg/m²/回）

以上の投与群の雄に軽度の HCT 減少または減少傾向がみられた。HCT, 単球, フィブリノーゲン及び総蛋白の変化は, 休薬により回復した。リンパ球の減少は, 0.100 mg/kg/回 (1.20 mg/m²/回) 投与群の雄 1 例を除いて回復した。

器官重量の変化として, 肝臓重量が, 0.067 mg/kg/回 (0.80 mg/m²/回)投与群の雌及び 0.100 mg/kg/回 (1.20 mg/m²/回)投与群の雌雄で有意に増加した。回復期間後は, 対照群と投与群の間に肝臓重量の差はみられなかった。0.100 mg/kg/回 (1.20 mg/m²/回)投与群の雌で, 卵巣重量の減少がみられた。

病理組織学的検査において, 0.100 mg/kg/回 (1.20 mg/m²/回)投与群の雄 2 例及び雌 1 例に, 尿細管上皮の変性 (しばしば単細胞壊死を伴う) を特徴とする軽度の尿細管変性がみられ, この所見に関連して亜急性炎症 (雌雄各 1 例) 及び極軽度な糸球体過形成 (雄 1 例) が認められた。回復群には腎臓の所見がみられなかったことから, 上記の変化は完全に回復したものと考えられた。0.100 mg/kg/回 (1.20 mg/m²/回)投与群の雄 1 例及び雌 2 例に, 極軽度な脾臓のリンパ球減少がみられ, 同群の雄 1 例に腸間膜リンパ節の極軽度なリンパ球減少が認められた。これらの所見については本薬の関与が示唆された。坐骨神経において, 極微から極軽度の軸索変性が, 0.100 mg/kg/回 (1.20 mg/m²/回)投与群の雄 1 例及び回復群の雌 1 例に認められた。0.100 mg/kg/回 (1.20 mg/m²/回)投与群の雄 2 例に副腎皮質の空胞減少がみられたが, 回復期間終了時では回復が認められた。0.067 mg/kg/回 (0.80 mg/m²/回)以下の投与群では病理組織学的な変化はみられなかった。

以上の結果から, 0.067 mg/kg/回 (0.80 mg/m²/回)投与群でリンパ球減少がみられたことから, 無毒性量は 0.045 mg/kg/回 (0.54 mg/m²/回)とみなされた。また, 0.100 mg/kg/回 (1.20 mg/m²/回)投与群で切迫屠殺例がみられたことから, MTD は 0.067 mg/kg/回 (0.80 mg/m²/回)とみなされた。MTD は予定臨床用量である 1.3 mg/m²/回の約 0.62 倍である。

(7) サルにおける 38 週間 (13 サイクル) 静脈内投与毒性試験

評価資料 4.2.3.2.7

【試験方法】

本薬を生理食塩液により調製し, カニクイザル (1 群雌雄各 3 例) に, 0 (溶媒対照), 0.050, 0.075 及び 0.100 mg/kg/回 (0, 0.6, 0.9 及び 1.20 mg/m²/回)の投与量で, 3 週間を 1 サイクル (週 2 回, 2 週間投与及び 1 週間の休薬) とした静脈内投与を 13 サイクル行った。更に, 0 及び 0.100 mg/kg/回 (0 及び 1.20 mg/m²/回)投与群には, 8 週間の回復群として 1 群雌雄各 3 例を設定した。しかしながら, 0.100 mg/kg/回 (1.20 mg/m²/回)投与群の雌 2 例を切迫屠殺したため, 2 例を無作為に選んで回復群に割り当てた。また, 0.050 mg/kg/回 (0.60 mg/m²/回)投与群の雌については, 毒性が認められたため, 3 例のうち 1 例を回復群とした。本薬の影響の評価は, 一般状態観察, 神経学的検査, 体重測定, 摂餌状態, 眼科学的検査, 臨床検査 (血液学的検査, 血液生化学的検査及び尿検査), 免疫学的検査, TK/PD, 心電図検査, 剖検, 器官重量, 骨髄検査, 病理組織学的検査, 神経病理学的検査並びに TUNEL 法による免疫組織化学的検査により毒性を評価した。

【用量設定の根拠】

先に実施したカニクイザルにおける週 2 回投与による 4 週間静脈内投与試験 (2.6.6.3 (6)の項参照) では、0.045 mg/kg/回 (0.54 mg/m²/回)が無毒性量であった。したがって、本試験において、これに近い 0.050 mg/kg/回 (0.60 mg/m²/回)を低用量、0.100 mg/kg/回 (1.20 mg/m²/回)を高用量とし、両者の中間の 0.075 mg/kg/回 (0.90 mg/m²/回)を中用量とした。

【試験結果】

0.075 mg/kg/回 (0.90 mg/m²/回)投与群の雌 1 例を試験第 179 日に、0.100 mg/kg/回 (1.20 mg/m²/回)投与群の雄 1 例を試験第 172 日に、雌 2 例を試験第 50 又は 197 日に、状態悪化により切迫屠殺した。

一般状態の変化としては、0.075 mg/kg/回 (0.90 mg/m²/回)以上の投与群で嘔吐、0.05 mg/kg/回 (0.60 mg/m²/回)投与群の雄を含む 0.075 mg/kg/回 (0.90 mg/m²/回)以上の投与群で軟便あるいは下痢、0.050 mg/kg/回 (0.60 mg/m²/回)以上の投与群で、活動性低下が投与期間中、用量依存的に観察され、0.100 mg/kg/回 (1.20 mg/m²/回)投与群の生存例の雄 5 例中 2 例に流涎が認められた。回復期間中には、本薬に関連した症状は観察されなかった。眼科学的検査、心電図検査、神経学的検査、体重及び摂餌量においては、本薬に関連した変化は認められなかった。

生存例の血液学的検査では、主として 0.100 mg/kg/回 (1.20 mg/m²/回)投与群に RBC 及び WBC の減少傾向、並びに血小板の顕著な減少が認められた。血液学的検査値の変化は、試験第 72～170 日の間に起こりそれ以降の悪化はみられなかった。更に、試験第 170 日 (第 9 サイクル) 以降、各投与群に極軽度なフィブリノーゲンの増加傾向が認められ、炎症過程の進行が示唆された。この変化は特定の動物で顕著にみられた^{注1)}。血液生化学的検査値には本薬に関連した変化はみられなかった。

8 週間の回復期間後、血液学的検査値には回復が認められたが、0.050 mg/kg/回 (0.60 mg/m²/回)投与群の雌 1 例及び 0.100 mg/kg/回 (1.20 mg/m²/回)投与群の雄 1 例では、RBC、HCT、HGB 及び血小板が対照群と比較して低値を示した。しかし、これらの動物では、赤血球系細胞の増加による網状赤血球率の上昇及び M:E 比の低下並びに病理組織学的所見での骨髓細胞の増加が観察され、回復傾向が示唆された。

尿検査では、0.050 mg/kg/回 (0.60 mg/m²/回)投与群の雌 1 例及び 0.075 mg/kg/回 (0.90 mg/m²/回)以上の投与群の雌雄に中等度から重度の尿潜血がみられ、また、0.075 mg/kg/回 (0.90 mg/m²/回)以上の投与群の雌雄で尿 pH の低下が投与期間中に認められた。回復期間中も、中等度の尿潜血が、0.100 mg/kg/回 (1.20 mg/m²/回)投与群の雄 1 例にみられた。尿潜血がみられたこれらの動物では、顕微鏡下において極微細な尿細管内漏出がみられた。

投与 12 サイクル後のリンパ球のフローサイトメトリーによる検査で、0.050 mg/kg/回 (0.60 mg/m²/回)以上の投与群で総リンパ球が減少し、CD2⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD16⁺ 及び CD20⁺ の減少がみられ、0.100 mg/kg/回 (1.20 mg/m²/回)投与群では著しく減少した。更に投与 13 サイクル後に

^{注1)} フィブリノーゲンの増加が、0.050 mg/kg/回 (0.60 mg/m²/回) (群の雄 1 例 (No.201) 及び 0.075 mg/kg/回 (0.90 mg/m²/回)群の雄 1 例 (No.313) でそれぞれ、投与前値と比較して 171%及び 146%に増加した (対照群における投与前値からの増加率の範囲は-9%～98%) (第 264 日の検査)。

は、対照群を含む全群に、ストレスに関連すると思われる一時的な総リンパ球及び CD2⁺、CD4⁺ 及び CD8⁺ の中等度の減少が認められた。0.100 mg/kg/回 (1.20 mg/m²/回) 投与群では、投与 13 サイクル終了後、26 日間又は 55 日間の回復期間により、CD8⁺、CD16⁺ 及び CD20⁺ が対照群の値と同等まで回復した。しかし、CD2⁺ 及び CD4⁺ 並びに総リンパ球は完全には回復しなかった。

投与期間終了時、本薬に関連した器官重量の変化は、0.075 mg/kg/回 (0.90 mg/m²/回) 以上の投与群の雌雄及び 0.050 mg/kg/回 (0.60 mg/m²/回) 投与群の雄における肝臓重量の用量依存的増加並びに 0.050 mg/kg/回 (0.60 mg/m²/回) 以上の投与群の雄及び 0.075 mg/kg/回 (0.90 mg/m²/回) 以上の投与群の雌で腎臓重量の用量依存的増加がみられた。これらの器官重量の増加は 8 週間の回復期間後に回復した。投与期間終了時屠殺例にみられた本薬に関連した剖検所見は、腎臓の退色及び暗色巣であった。これらの所見は 8 週間の休薬後に回復した。

投与期間終了時、屠殺例における本薬に関連した病理組織学的所見は、0.050 mg/kg/回 (0.60 mg/m²/回) 投与群の雄 1 例又は 0.100 mg/kg/回 (1.20 mg/m²/回) 投与群の雌各 1 例に骨髄の造血細胞密度低下、0.075 mg/kg/回 (0.90 mg/m²/回) 以上の投与群では、リンパ系器官のリンパ系組織萎縮又は単細胞壊死がみられた。0.050 mg/kg/回 (0.60 mg/m²/回) 投与群の雌及び 0.075 mg/kg/回 (0.90 mg/m²/回) 以上の投与群の雌雄に末梢神経系における神経線維変性がみられた。また、0.075 mg/kg/回 (0.90 mg/m²/回) 以上の投与群で、腎臓の尿細管の変性/肥大又は糸球体腎炎 (0.075 mg/kg/回 (0.90 mg/m²/回) 投与群の雌を除く)、0.075 mg/kg/回 (0.90 mg/m²/回) 以上の投与群の雄に腸管の粘膜過形成及び肝臓の類洞内における WBC 増加又は 0.100 mg/kg/回 (1.20 mg/m²/回) 投与群の雄に胆管上皮の過形成及び門脈周囲の炎症がみられた。回復期間終了時屠殺例における本薬に関連した病理組織学的所見は、骨髄、リンパ組織、腎臓、胸腺及び末梢神経系に認められた。骨髄、リンパ節及び脾臓において増殖の所見が認められたことから、本薬に起因する所見は可逆的であることを示した。腎臓、胸腺及び末梢神経系に認められた所見は完全な回復はみられなかったが、回復傾向を示した。

試験第 1, 5, 37 及び 38 週の TK では、AUC_(0→24) 及び C₀ は用量依存的増加を示した。試験第 1 週から 5 週にかけて、AUC_(0→24) 及び C₀ の増加が認められたが、その後は同様の値を示した。また、性差は認められなかった。

以上の結果から、臨床検査、免疫学的検査、剖検、病理組織学的検査、器官重量及び骨髄検査において、全投薬群で影響が認められたことから、無毒性量は求められなかった。0.075 mg/kg/回 (0.90 mg/m²/回) 以上の投与量で、主として血液学的毒性による死亡がみられたことから、MTD は 0.050 mg/kg/回 (0.60 mg/m²/回) とみなされた。本薬投与による関連の所見のほとんどは 8 週間の回復期間後に回復を示し、腎臓、胸腺及び末梢神経系は回復傾向を示した。MTD は予定臨床用量である 1.3 mg/m²/回の約 0.46 倍である。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

細菌を用いた復帰突然変異試験，チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を用いた染色体異常試験及びマウスを用いた小核試験を実施して，本薬の遺伝毒性を評価した。

(1) ネズミチフス菌を用いる復帰突然変異試験

評価資料 4.2.3.3.1.1

【試験方法】

Salmonella typhimurium (TA98, TA100, TA1535, TA1537 及び TA1538) を用いて，Aroclor1254 で誘導したラット肝 S9 による代謝活性化系の存在及び非存在の条件下で復帰突然変異試験を実施した。本薬の溶媒にはジメチルスルフォキシド（DMSO）を用いた。

【用量設定の根拠】

TA100 を用いて，最高用量を 5000 µg/プレートとして実施した用量設定試験において，67 µg/プレート以上の用量で細胞毒性が認められた。したがって，本試験においては，333 µg/プレート（Assay 1：代謝活性化系存在及び非存在下，Assay 2：TA1538 における代謝活性化系非存在下での追加試験）あるいは 1000 µg/プレート（Assay 3：代謝活性化系の存在及び非存在下）を最高用量として設定した。

【試験結果】

各試験において 33 µg/プレート又はそれ以上の用量から細胞毒性がみられたが，すべての処理系列において，復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から，本試験条件下では本薬に復帰突然変異誘発性は認められないと判断した。

(2) ネズミチフス菌及び大腸菌を用いる復帰突然変異試験

評価資料 4.2.3.3.1.2

【試験方法】

Salmonella typhimurium (TA98, TA100, TA1535 及び TA1537) 並びに *Escherichia coli* (WP2uvrA) を用いて，Aroclor1254 で誘導したラット肝 S9 による代謝活性化系の存在及び非存在の条件下で復帰突然変異試験を実施した。本試験は，評価資料 4.2.3.3.1.1 (2.6.6.4 (1)の項参照) の繰り返し試験であり，*Escherichia coli* を菌株として加えることにより ICH ガイドラインに準拠したものである。

本薬の溶媒には DMSO を用いた。

なお，本薬調製液分析の結果，理由は不明であるが設定濃度に対して実濃度が低い事例が生じたが，代謝活性化系の非存在下の TA1535 並びに代謝活性化系の存在下の TA98 及び TA1535 を除き，細胞毒性がみられる用量もしくは ICH ガイドラインで規定された用量まで試験を行っている

ことから、本試験結果は評価可能であると判断した。用量については、実濃度と設定濃度の両方を記載した。

【用量設定の根拠】

(Assay 1) 最高用量を 840 µg/プレート (設定濃度：1000 µg/プレート) とし、初回予備試験を実施した。その結果、代謝活性化系の非存在下における TA100 及び WP2*uvrA* においては、陰性又は陽性対照群の異常値のため評価できなかった。更に、代謝活性化系の非存在下における TA1537 及び代謝活性化系の存在下における WP2*uvrA* は細胞毒性が認められなかった。これらの処理系列を除いて 100 µg/プレート又はそれ以上の用量で細胞毒性が認められた。

(Assay 2) 初回予備試験において評価できなかった処理系列及び細胞毒性が認められなかった処理系列については、最高用量を 4150 µg/プレート (設定濃度：5000 µg/プレート) とした 2 回目の予備試験を実施した。その結果、代謝活性化の非存在下における TA100 及び TA1537 では 50 又は 500 µg/プレート以上の用量で細胞毒性が認められたが、WP2*uvrA* は代謝活性化系の存在下及び非存在下ともに細胞毒性は認められなかった。

以上の 2 回の予備試験のいずれにおいても、復帰変異コロニー数については増加を認めなかった。

これらの結果をもとに、代謝活性化系の非存在下における TA100 及び TA1535、並びに代謝活性化系の存在下における、TA98, TA100, TA1535 及び TA1537 では 1500 µg/プレートを、それ以外の処理系列では 5000 µg/プレートをそれぞれ最高用量として設定し、試験を実施した。

【試験結果】

代謝活性化系の存在下における TA98 を除いて、最高用量を 1500 µg/プレートで実施した処理系列では、50 µg/プレート又はそれ以上の用量から細胞毒性が認められた。また、TA1535 については代謝活性化の存在下及び非存在下ともに陰性又は陽性対照群の異常値のため評価できなかった

(Assay 3)。したがって、これらの処理系列については最高用量を 2250 µg/プレート (設定濃度：5000 µg/プレート) と設定した追加確認試験 (Assay 4) を実施した。その結果、すべての用量で細胞毒性は認められなかった。

以上の 2 回の試験において、いずれの処理系列においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかったことから、本試験条件下では本薬に復帰突然変異誘発性はないものと判断した。

(3) チャイニーズハムスター卵巣細胞を用いる染色体異常試験

評価資料 4.2.3.3.1.3

【試験方法】

CHO 細胞を用いて、Aroclor1254 で誘導したラット肝 S9 による代謝活性化系の存在及び非存在の条件下で染色体異常試験を実施した。本薬の溶媒には DMSO を用いた。

【用量設定の根拠】

最高用量を 2142 $\mu\text{g}/\text{mL}$ として代謝活性化系の存在及び非存在の条件下で細胞毒性試験を実施した。代謝活性化系の非存在下の 4 時間処理及び 20 時間連続処理では 2142 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量で、一方、代謝活性化系の存在下の 4 時間処理では 642.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で、細胞毒性（50%以上の細胞増殖抑制）が認められた。したがって、染色体異常試験の用量は、いずれの処理系列においても 250, 500, 1000, 1500 及び 2142 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を設定した。しかしながら、いずれの処理系列においても分裂指数の著しい低下がみられたために、再度下記の用量を設定して染色体異常試験を行った。

表 2.6.6-1 試験デザイン

代謝活性化系	ボルテゾミブ処理時間 (h)	回復時間 (h)	用量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ^{a)}
-S9	4	16	3.125, (6.25), 12.5, (25), (50), 100 及び(200)
-S9	20	0	(1.56), (3.125), (6.25), (12.5), (25), (50)及び(100)
+S9	4	16	3.125, 6.25, 12.5, (25), (50), (100)及び(200)

^{a)}: ()内の用量は、標本の観察を行わなかった。

【試験結果】

代謝活性化系の非存在下で 4 時間処理においては、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量で評価可能な分裂中期の細胞が乏しかったため、この用量では評価を行わなかった。しかし、3.125 及び 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量では、群当たりの観察細胞数が 200 個よりも少なかったが評価を行った。12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量における分裂指数は溶媒対照値と比較して 19%低下していた。なお、代謝活性化系の非存在下の 20 時間処理については、4 時間処理で既に染色体構造異常誘発性を示唆する結果が得られたため、評価を行わなかった。一方、代謝活性化系の存在下においては、6.25 及び 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量では分裂中期の細胞が乏しかったため、これらの用量では評価を行わなかった。しかし、3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量では、群当たりの観察細胞数が 200 個よりも少なかったが評価を行った。なお、この 3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量における分裂指数は溶媒対照値と比較して 41%低下していた。

上述の染色体異常の評価を行ったすべての用量において、染色体構造異常を有する細胞の出現頻度に有意な上昇が認められた ($p \leq 0.01$ Fisher's exact test)。更に、代謝活性化系の非存在下では、用量依存性も認められた ($p < 0.05$ Cochran-Armitage test)。一方、数的異常を有する細胞の出現頻度に有意な上昇は認められなかった。

以上の結果から、本試験条件下では本薬は染色体構造異常誘発性を有すると判断した。

(4) マウスにおける小核試験

評価資料 4.2.3.3.2.1

【試験方法】

ICR マウス (1 群雌雄各 5 例) を用いて、0.25 (実用量: 0.2), 0.5 及び 1.0 mg/kg (0.75 (実用量: 0.6),

1.5, 3 mg/m²)の用量で単回静脈内投与した。また、溶媒対照群 (D-マンニトール添加生理食塩液) 及び陽性対照群 (cyclophosphamide 50 mg/kg) を設定した。投与容量はいずれも 10 mL/kg とした。また、投与後 24 (全群) 及び 48 時間 (溶媒対照群, 1 mg/kg (3 mg/m²)群) に骨髓塗抹標本を作製し、小核を有する多染性赤血球を計数した。

【用量設定の根拠】

試験に先立ち、1 群雌雄各 5 例の ICR マウスを用いて、0.5, 1, 5, 7.5 及び 10 mg/kg (1.5, 3, 15, 22.5 及び 30 mg/m²)の用量で単回静脈内投与した。その結果、5 mg/kg (15 mg/m²)以上の投与群で、投与後 2 日以内にすべての動物が死亡した。一般状態においては、1 mg/kg (3 mg/m²)以上の投与群で嗜眠及び立毛、5 mg/kg (15 mg/m²)以上の投与群で眼瞼下垂などが認められた。したがって、MTD と考えられた 1 mg/kg (3 mg/m²)を本試験の最高用量として設定した。

【試験結果】

死亡例は認められなかった。一般状態所見として、1 mg/kg (3 mg/m²)投与群で嗜眠及び眼瞼下垂がみられたが、その他の用量では異常は認められなかった。全赤血球に対する多染性赤血球の割合については、1 mg/kg (3 mg/m²)投与群では溶媒対照群と比較して 9~46%の低下を示したことから、本薬の骨髓細胞への曝露が証明された。一方、いずれの本薬投与群においても、小核を有する多染性赤血球の出現頻度に有意な上昇は認められなかった。

以上の結果から、本試験条件下では本薬に小核誘発性は認められないと判断した。

2.6.6.5 がん原性試験

「抗がん剤の臨床試験実施及び承認申請のために実施される毒性試験に関する Q & A について」¹⁾の抗がん剤の毒性試験に関する Q & A の Q8, A8 を参考にし、本薬が細胞毒性を有する抗がん剤であるため、がん原性試験は実施しなかった。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

本薬の胚致死作用及び催奇形性を含む胎児毒性を調べるため、ラット及びウサギを用いて静脈内投与による生殖発生毒性試験を実施した。

ただし、本薬は細胞毒性を有する抗がん剤であり、また、本薬がラットにおける 26 週間静脈内投与毒性試験 (2.6.6.3 (4) の項参照) で、精巣精上皮の変性/萎縮が雄の最高用量 (0.20/0.15 mg/kg/回 (1.20/0.90 mg/m²/回)) で 2/10 例観察され、また、卵巣黄体の単細胞壊死が雌の全用量 (0.05 mg/kg/回 (0.30 mg/m²/回)) 以上でそれぞれ 3/10, 4/10, 6/8 例にみられた。更に、予備試験として実施したラット胚・胎児発生毒性試験 (参考資料 4.2.3.5.2.1) において 0.10 mg/kg/d (0.60 mg/m²/d) 投与群で生存した 1 例に全胚吸収がみられたことから、「抗がん剤の臨床試験実施及び承認申請のために実施される毒性試験に関する Q & A について」¹⁾の抗がん剤の生殖発生毒性試験に関する Q & A の Q6, A6 並びに欧米におけるガイドランス²⁾及び論文³⁾をふまえて、受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、及び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を実施しなかった。

(1) ラットにおける胚・胎児発生毒性試験

評価資料 4.2.3.5.2.2

【試験方法】

交尾成立した雌 SD ラット（1 群各 22 例）の妊娠 6 日から 17 日に、本薬の 0, 0.025, 0.050 及び 0.075 mg/kg/d (0, 0.15, 0.30 及び 0.45 mg/m²/d)を連日静脈内投与した。対照群には、D-マンニトール含有生理食塩液を投与した。試験期間中は一般状態を観察、体重及び摂餌量を測定し、妊娠 20 日に母動物を剖検し、子宮内の検査、及び胎児の形態学的（外形、内臓、骨格）検査を実施した。

【用量設定の根拠】

用量は、用量設定試験（参考資料 4.2.3.5.2.1）の結果から設定した。本薬の 0（溶媒対照）、0.05, 0.10, 0.15 及び 0.20 mg/kg/d (0, 0.30, 0.60, 0.90 及び 1.20 mg/m²/d)を 1 群 6 匹からなる交尾成立した雌 SD ラットの妊娠 6 日から 17 日に連日静脈内投与し、妊娠 20 日に剖検し、子宮内の検査を実施した。それに加え、TK 測定を行った。母動物では、0.10 mg/kg/d (0.60 mg/m²/d)投与群の 1 例を除き、0.10 mg/kg/d (0.60 mg/m²/d)以上の投与群で、すべての動物に死亡あるいは瀕死状態が認められた。0.10 mg/kg/d (0.60 mg/m²/d)投与群の生存例では、全胚吸収が認められた。0.05 mg/kg/d (0.30 mg/m²/d)投与群では、母動物及び胎児ともに本薬投与の影響は認められなかった。TK では、投与量の増加に伴い、AUC_(0→24)及び C_{0.5h}ともに増加し、0.15 mg/kg/d (0.90 mg/m²/d)以上の投与群では用量比以上の増加を示した。0.05 mg/kg/d (0.30 mg/m²/d)投与群では反復投与により AUC_(0→24)及び C_{0.5h}ともに増加した。以上の結果から、本試験の投与量は、0.05 mg/kg/d (0.30 mg/m²/d)と 0.10 mg/kg/d (0.60 mg/m²/d)との中間である 0.075 mg/kg/d (0.45 mg/m²/d)を高用量とし、以下 0.050 mg/kg/d (0.30 mg/m²/d)を中間用量、0.025 mg/kg/d (0.15 mg/m²/d)を低用量とした。

【試験結果】

本薬投与に関連した母動物の死亡及び剖検所見の変化は認められなかった。0.075 mg/kg/d (0.45 mg/m²/d)投与群の 1 例で妊娠 13 日から排糞の減少、妊娠 14 日以降に活動性の低下、脱水状態及び消瘦が認められた。0.075 mg/kg/d (0.45 mg/m²/d)投与群では、妊娠 6～12 日に体重増加量の減少が認められ、妊娠 9 及び 12 日に有意な低体重を示したが、その後回復して対照群とほぼ同推移を示した。また、0.075 mg/kg/d (0.45 mg/m²/d)投与群の摂餌量も妊娠 6～12 日に有意に減少が認められたが、その後は回復した。0.050 mg/kg/d (0.30 mg/m²/d)以下の投与群では体重及び摂餌量ともに本薬投与に関連した変化は認められなかった。黄体数、着床数及び着床前死亡率には、本薬投与の影響は認められなかった。

胎児では、生存胎児数、死亡胎児数、性比、着床後死亡率に対する本薬投与の影響は認められなかった。胎児体重も本薬投与群と対照群との間に差はなかった。外表、内臓及び骨格観察において、本薬投与に関連した変化は認められなかった。

以上の結果から、0.075 mg/kg/d (0.45 mg/m²/d)投与群で投与初期に母動物の体重及び摂餌量に一過性の影響が認められた。0.075 mg/kg/d (0.45 mg/m²/d)までの各用量には催奇形性を含む胎児毒

性は認められなかった。したがって、母動物の一般毒性学的無毒性量は 0.050 mg/kg/d (0.30 mg/m²/d)とみなされた。母動物の生殖機能に対する無毒性量及び胎児に対する無毒性量はいずれも 0.075 mg/kg/d (0.45 mg/m²/d)とみなされた。0.075 mg/kg/d (0.45 mg/m²/d)は予定臨床用量 1.3 mg/m²/回の約 0.35 倍である。

(2) ウサギにおける胚・胎児発生毒性試験

評価資料 4.2.3.5.2.4

【試験方法】

交尾成立した雌New Zealand White ウサギ(1群各22例)の妊娠7日から19日に、本薬の0, 0.010, 0.025 及び 0.050 mg/kg/d (0, 0.11, 0.28 及び 0.55 mg/m²/d)を耳介静脈内に投与した。対照群には、D-マンニトール含有生理食塩液を同様の方法で投与した。試験期間中は一般状態観察、体重及び摂餌量を測定した。妊娠 29 日に母動物を剖検し、子宮内の検査及び胎児の形態学的(外形、内臓、骨格)検査を実施した。

【用量設定の根拠】

用量設定は、New Zealand White ウサギの非妊娠雌を用いた用量設定試験(参考資料 4.2.3.2.4)と妊娠雌を用いた用量設定試験(参考資料 4.2.3.5.2.3)の結果から設定した。非妊娠雌を用いた用量設定試験では、本薬の0(溶媒対照群), 0.025, 0.050, 0.075 及び 0.100 mg/kg/d (0, 0.28, 0.55, 0.83 及び 1.1 mg/m²/d)を13日間、連日静脈内投与した。その結果、0.075 mg/kg/d (0.83 mg/m²/d)以上の投与群で死亡あるいは瀕死状態が認められ、その他 0.050 mg/kg/d (0.55 mg/m²/d)以上の投与群における主な変化として摂餌量の減少傾向、体重減少、網状赤血球の減少及び WBC の増加が認められた。以上のことから、次の妊娠雌を用いた用量設定試験では死亡が認められず、体重に影響が認められた 0.050 mg/kg/d (0.55 mg/m²/d)を高用量とし、以下の用量を 0(溶媒対照), 0.010, 0.025 及び 0.040 mg/kg/d (0, 0.11, 0.28 及び 0.44 mg/m²/d)として、妊娠7日から19日に連日静脈内投与し、妊娠 29 日に剖検し、胎児検査を実施した。それに加え、妊娠 7 日及び 19 日に TK を実施した。母動物では 0.050 mg/kg/d (0.55 mg/m²/d)投与群の 1 例に流産がみられたが、死亡、一般状態、体重、体重増加量、摂餌量及び剖検には本薬投与の影響は認められなかった。また、胎児検査においても本薬投与の影響は認められなかった。TK では、0.010~0.040 mg/kg/d (0.11~0.44 mg/m²/d)の投与群では投与量の増加に伴い、AUC_(0→24)及び C_{0.5h}も増加したが、0.050 mg/kg/d (0.55 mg/m²/d)では、いずれも 0.040 mg/kg/d (0.44 mg/m²/d)投与群と同程度であった。また、反復投与により、AUC_(0→24)及び C_{0.5h}ともに増加した(参考資料 4.2.3.5.2.3)。以上の結果から、本試験の投与量は、妊娠ウサギを用いた予備試験で 0.050 mg/kg/d (0.55 mg/m²/d)投与群の 1 例で流産が認められたこと、非妊娠ウサギの反復投与試験(参考資料 4.2.3.2.4)で 0.075 mg/kg/d (0.83 mg/m²/d)以上の投与群で死亡が発生したことを考慮して、0.050 mg/kg/d (0.55 mg/m²/d)を高用量として、以下 0.025 mg/kg/d (0.28 mg/m²/d)及び 0.010 mg/kg/d (0.11 mg/m²/d)を設定した。

【試験結果】

0.050 mg/kg/d (0.55 mg/m²/d)投与群の1例が妊娠17日に死亡した。また、0.050 mg/kg/d (0.55 mg/m²/d)投与群の4例に流産が観察された。0.050 mg/kg/d (0.55 mg/m²/d)投与群では、試験期間中に体重増加抑制が認められ、妊娠9日～17日の摂餌量に減少がみられた。流産した動物では妊娠7日～20日に体重の増加がみられず、流産する前の2日以上にわたって摂餌量が70g/日以下を示した。0.025 mg/kg/d (0.28 mg/m²/d)以下の投与群では体重及び摂餌量に影響は認められなかった。剖検では、0.025 mg/kg/d (0.28 mg/m²/d)以上の投与群で各群2例において胃に暗色巣又は暗色域がみられ、また、0.050 mg/kg/d (0.55 mg/m²/d)投与群の2例に幽門部壁の肥厚が認められた。0.050 mg/kg/d (0.55 mg/m²/d)投与群で吸収胚数及び着床後死亡率が増加したが、黄体数、着床数及び着床前死亡率には、本薬投与の影響は認められなかった。

胎児では、0.050 mg/kg/d (0.55 mg/m²/d)投与群で生存胎児数の減少、胎児体重の低値が認められた。大奇形の発現率には母動物及び胎児ともに、0.050 mg/kg/d (0.55 mg/m²/d)までの用量において本薬投与の影響は認められなかった。また、胎児検査（外表、内臓及び骨格）における小奇形の発現率も対照群と比較して有意な差はなかった。

以上のように、0.050 mg/kg/d (0.5 mg/m²/d)投与群で母動物の死亡例、体重増加抑制及び摂餌量の減少、並びに流産が認められた。胎児において0.050 mg/kg/d (0.55 mg/m²/d)投与群で、吸収胚数の増加とそれに伴う生存胎児数の減少及び生存胎児体重の低値が認められた。催奇形性はいずれの群においても認められなかった。したがって母動物の一般毒性学及び生殖機能に対する無毒性量、並びに胎児に対する無毒性量はいずれも0.025 mg/kg/d (0.28mg/m²/d)とみなされた。この用量は臨床用量1.3 mg/m²/回の約0.22倍に相当する。

2.6.6.7 局所刺激性試験**(1) ウサギにおける血管周囲、静脈内、皮下及び筋肉内投与による刺激性試験****評価資料 4.2.3.6.1****【試験方法】**

New Zealand Whiteウサギ（1群雄各6例）を用いて、血管周囲、静脈内、皮下及び筋肉内投与による刺激性を検討した。対照群は、生理食塩液を左耳下部静脈に急速投与、左耳上部血管周囲に投与、左後肢に筋肉内投与、左肩甲間部に皮下投与し、本薬投与群は、本薬の0.1 mg/kg (1.1 mg/m²)を1 mL/kgの容量で右耳下部静脈に急速投与、右耳上部血管周囲に投与、右後肢に筋肉内投与、右肩甲間部皮下投与し比較した。また、本薬の賦形剤であるD-マンニトールを含有した生理食塩液とD-マンニトールを含有しない生理食塩液を比較した群（6例）では、D-マンニトールを含有した生理食塩液を右耳下部静脈に急速投与、右耳上部血管周囲に投与、右後肢に筋肉内投与、右肩甲間部に皮下投与し、D-マンニトールを含有しない生理食塩液を左耳下部静脈に急速投与、左耳上部血管周囲に投与、左後肢に筋肉内投与、左肩甲間部に皮下投与して検討した。投与部位の評価は、紅斑／痂皮及び浮腫についてDraize法（スコア0-4）により投与前、投与直後、投与1、2、4及び6時間後、その後毎日2回観察した。投与24時間及び72時間後に各群3例を剖検し、投与部位の病理組織学的検査を実施した。

【試験結果】

試験期間中、死亡及び本薬投与に関連した一般状態変化は認められなかった。

D-マンニトール含有生理食塩液と生理食塩液との間には血管周囲、静脈内、皮下及び筋肉内のいずれの投与経路においても刺激性に差はなかった。

本薬の静脈内及び筋肉内投与では Draize 法による観察において、紅斑あるいは浮腫の発生がわずかに増加したが、投与 72 時間後までに部分的に消失した。血管周囲及び皮下投与において本薬の影響は認められなかった。

病理組織学的検査では、血管周囲投与では、極微から中等度の血管周囲の炎症及び浮腫、有棘層の角化細胞の壊死が認められた。筋肉内投与では、筋原線維の局所的な伸展、中等度の変性及び壊死が認められた。これらの病理組織学的変化は投与後 72 時間までに回復した。静脈内及び皮下投与の病理組織学的観察では本薬の影響は認められなかった。

以上の結果から、本薬 0.1 mg/kg (1.1 mg/m²) を、静脈内、血管周囲及び筋肉内投与した場合、軽度な組織刺激性があるものと考えられた。しかし、皮下投与では組織刺激性は認められなかった。本試験で使用した用量は予定臨床用量 1.3 mg/m²/回の約 0.85 倍であった。

2.6.6.8 その他の毒性試験**(1) 抗原性試験****評価資料 4.2.3.7.1.1****【試験方法】**

Hartley モルモット (1 群雄各 6 例) を用いた ASA 試験及び感作したモルモットから採取した血清を用いた同種 PCA 試験を行い、本薬の抗原性を評価した。

【試験結果】

本薬は、0.17 mg/kg/回 の用量で静脈内に 1 週間に 2 回、2 週間 (0, 3, 7, 10 日) で 4 回投与することにより感作した。ASA 試験では、28 日目 (最終感作後 18 日目) に本薬を 0.17 mg/kg の用量で単回静脈内投与して惹起したが、全身性のアナフィラキシー反応は認められなかった。

同種 PCA 試験では、上記の感作したモルモットから 25 日目 (最終感作後 15 日) に得た血清を別のモルモットに皮内投与し、4 時間後に本薬を 0.17 mg/kg の用量で静脈内投与して惹起した結果、PCA 陽性反応は認められなかった。

(2) 免疫毒性試験**参考資料 4.2.3.7.2.1****【試験方法】**

BALB/c マウス (1 群雌各 18 例) に本薬を 0, 0.3 及び 0.6 mg/kg/回 (0, 0.9 及び 1.8 mg/m²/回) の用量で 1 週間に 2 回、28 日間腹腔内投与した。1 群 6 例より、試験第 7 日、14 日及び 28 日に血液を採取し、そのうち 1 群 3 例については、リンパ系器官 (リンパ節、脾臓及び胸腺) を摘出し、それぞれのリンパ球サブセットを分析した。

【試験結果】

全血，リンパ節，脾臓及び胸腺のリンパ球サブセット分析に本薬の影響は認められなかった。

以上の結果から，本薬の免疫毒性に対する無毒性量は 0.6 mg/kg/回 (1.8 mg/m²/回)であった。この無毒性量は予定臨床用量 1.3 mg/m²/回の約 1.38 倍の用量であった。

(3) 類縁物質の一般毒性及び遺伝毒性

本薬に含まれる類縁物質のうち，原薬では安全性の確認の必要な閾値 0.15%^{注1)} を超える類縁物質は E, C, P, D, S, (G+H), (A+B), F, (M + N)及び K である (表 2.3.S.4-1)。一方，製剤では安全性確認の必要な閾値 1.0%^{注2)} を超える類縁物質は，(A+B)である (表 2.3.P.5-1)。したがって，安全性の確認が必要な類縁物質である E, C, P, D, S, (G+H), (A+B), F, (M + N)及び K について，毒性試験に用いた原薬または製剤中の実際の含量 (実測値) に基づき MTD 又は遺伝毒性が認められなかった最大用量における各類縁物質の曝露量を換算後，類縁物質の規格値 (原薬) から算出したヒト最大曝露量 (MHE)^{注3)} と比較した (表 2.6.6-2)。

その結果，反復投与毒性試験の MTD 及び遺伝毒性が認められなかった最大用量は，それぞれ類縁物質 E では，MHE の 3.6 倍 (ラット静脈内，週 2 回，2 週間) 及び 7.8 倍 (小核試験)，及び類縁物質 G+H では，MHE の 2.7 倍 (ラット静脈内，週 2 回，26 週間) 及び 7.9 倍 (小核試験) であった。また，類縁物質 F あるいは M+N については分離して測定していないため，実測値は F+M+N となる。すべて F あるいは(M+N)と仮定し換算すると，類縁物質 F では，MHE の 4.8 倍 (ラット静脈内，週 2 回，26 週間) 及び 36.7 倍 (小核試験)，類縁物質 (M+N) では，MHE の 2.4 倍 (ラット静脈内，週 2 回，26 週間) 及び 18.3 倍 (小核試験) であった。

注1) 平成 14 年 12 月 16 日 医薬審発第 1216001 号：新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドラインの改定について

注2) 平成 15 年 6 月 24 日 医薬審発第 0624001 号：新有効成分含有医薬品のうち製剤の不純物に関するガイドラインの改定について

注3) 患者の平均体重を 50 kg と仮定し，医薬品の 1 日最大投与量及び類縁物質の規格値 (原薬) を用いて計算した 1 日当りに曝露が予想される類縁物質の最大量 maximal human exposure の略。本薬の場合の計算式を以下に示す。1 日最大投与量は，用法・用量 (案) に基づき，ボルテゾミブ 1.8 mg とした。

$$\text{MHE 値} = \frac{\text{類縁物質の規格値 (原薬)} (\%) \times 1.8 (\text{mg})}{100 \times 50 (\text{kg})}$$

表 2.6.6-2 ボルテゾミブ類縁物質の一般毒性及び遺伝毒性における曝露量と MHE との比較

試験項目	投与量	類縁物質 (規格値)							
		E (■ %以下)		C (■ %以下)		P (■ %以下)		D (■ %以下)	
		実測値 (%)	比較 ^{a)}	実測値 (%)	比較 ^{a)}	実測値 (%)	比較 ^{a)}	実測値 (%)	比較 ^{a)}
反復投与毒性試験									
週 2 回 2 週間 ラット, 静脈内 (原薬 Lot Number: 5) [§]	MTD: 0.25 mg/kg/回 (1.50 mg/ m ² /回)	0.13	3.6	—	•	—	•	—	•
週 2 回 26 週間 ラット, 静脈内 (製剤 Lot Number: D2-1-1)	MTD: 0.10 mg/kg/回 (0.60 mg/ m ² /回)	<0.05	<0.6	0.06	0.4	<0.05	<0.7	ND	NC
週 2 回 4 週間 サル, 静脈内 (原薬 Lot Number: 5) [§]	MTD: 0.067 mg/kg/回 (0.80 mg/ m ² /回)	0.13	1.0	—	•	—	•	—	•
週 2 回 38 週間 サル, 静脈内 (製剤 Lot Number: D2-1-1)	MTD: 0.050 mg/kg/回 (0.6 mg/ m ² /回)	<0.05	<0.3	0.06	0.2	<0.05	<0.3	ND	NC
遺伝毒性試験									
小核試験 (製剤 Lot Number: 2133-00-258388)	静脈内最高用量: 1mg/kg (3.0 mg/ m ²)	0.07	7.8	0.35	24.3	0.11	15.3	<0.05	<6.9

— : 未測定 • : 該当せず[§] ND : 検出限界未満 NC : 算出できず

§ : 原薬 (Lot Number : 5) は, E, G+H, F のみ分析

a) 実測値より曝露量を求め, MHE との比率を示した。

表 2.6.6-2 ボルテゾミブ類縁物質の一般毒性及び遺伝毒性における曝露量と MHE との比較 (続き)

試験項目	投与量	類縁物質 (規格値)							
		S (■ %以下)		G+H (■ %以下)		A+B (■ %以下)		F ^{b)} (■ %以下)	
		実測値 (%)	比較 ^{a)}	実測値 (%)	比較 ^{a)}	実測値 (%)	比較 ^{a)}	実測値 (%)	比較 ^{a)}
反復投与毒性試験									
週 2 回 2 週間 ラット, 静脈内 (原薬 Lot Number: 5) [§]	MTD: 0.25 mg/kg/回 (1.50 mg/ m ² /回)	—	•	0.12	1.2	—	•	0.80	11.1
週 2 回 26 週間 ラット, 静脈内 (製剤 Lot Number: D2-1-1)	MTD: 0.10 mg/kg/回 (0.60 mg/ m ² /回)	ND	NC	0.67	2.7	<0.10	<0.3	0.86	4.8
週 2 回 4 週間 サル, 静脈内 (原薬 Lot Number: 5) [§]	MTD: 0.067 mg/kg/回 (0.80 mg/ m ² /回)	—	•	0.12	0.3	—	•	0.80	3.0
週 2 回 38 週間 サル, 静脈内 (製剤 Lot Number: D2-1-1)	MTD: 0.050 mg/kg/回 (0.6 mg/ m ² /回)	ND	NC	0.67	1.3	<0.10	<0.1	0.86	2.4
遺伝毒性試験									
小核試験 (製剤 Lot Number: 2133-00-258388)	静脈内最高用量: 1mg/kg (3.0 mg/ m ²)	0.15	10.4	0.20	7.9	2.36	65.6	0.66	36.7

— : 未測定 • : 該当せず[§] ND : 検出限界未満 NC : 算出できず

§ : 原薬 (Lot Number : 5) は, E, G+H, F のみ分析

a) 実測値より曝露量を求め, MHE との比率を示した, b) F+M+N の実測値

表 2.6.6-2 ボルテゾミブ類縁物質の一般毒性及び遺伝毒性における曝露量と MHE との比較 (続き)

試験項目	投与量	類縁物質 (規格値)			
		M + N (\blacksquare %以下)		K (\blacksquare %以下)	
		実測値 (%)	比較 ^{a)}	実測値 (%)	比較 ^{a)}
反復投与毒性試験					
週 2 回 2 週間 ラット, 静脈内 (原薬 Lot Number: 5) [§]	MTD: 0.25 mg/kg/回 (1.50 mg/ m ² /回)	—	•	—	•
週 2 回 26 週間 ラット, 静脈内 (製剤 Lot Number: D2-1-1)	MTD: 0.10 mg/kg/回 (0.60 mg/ m ² /回)	0.86 ^{b)}	2.4	<0.05	<0.6
週 2 回 4 週間 サル, 静脈内 (原薬 Lot Number: 5) [§]	MTD: 0.067 mg/kg/回 (0.80 mg/ m ² /回)	—	•	—	•
週 2 回 38 週間 サル, 静脈内 (製剤 Lot Number: D2-1-1)	MTD: 0.050 mg/kg/回 (0.6 mg/ m ² /回)	0.86 ^{b)}	1.2	<0.05	<0.3
遺伝毒性試験					
小核試験 (製剤 Lot Number: 2133-00-258388)	静脈内最高用量: 1mg/kg (3.0 mg/ m ²)	0.66 ^{b)}	18.3	0.12	13.3

— : 未測定 • : 該当せず^{a)}

§ : 原薬 (Lot Number : 5) は, E, G+H, F のみ分析

a) 実測値より曝露量を求め, MHE との比率を示した, b) F+M+N の実測値

これらの類縁物質はその化学構造が本薬と類似していることから, 類縁物質の 20S プロテアソーム活性阻害作用を本薬と比較した。その結果, 類縁物質 F 及び J の 20S プロテアソーム活性阻害作用は, 本薬より約 3~4 倍高いことが示唆された (本薬と類縁物質の 20S プロテアソーム活性阻害の比較 : 薬理試験の概要文 CTD 2.6.2.2 (5), 表 2.6.2-17 に記載)。しかし, 本薬 (純度 : >98%) と高純度の本薬 (純度 : >99%, 以下, 高純度ボルテゾミブ) における 20S プロテアソーム活性阻害作用の比較から, 本薬及び高純度ボルテゾミブにおける 20S プロテアソーム活性阻害作用はほぼ同程度であることが示唆された (薬理試験の概要文 CTD 2.6.2.2 (5), 表 2.6.2-18)。したがって, 本薬中に含まれる類縁物質が本薬の 20S プロテアソーム活性阻害作用に影響を及ぼす可能性は低いと推察された。

また, 本薬はホウ素を含む化学構造を示すが, 化学構造上でホウ素を含まない類縁物質 K 及び A の 20S プロテアソーム活性阻害作用を本薬と比較した結果, 本薬を 1 としたときの K 及び A のプロテアソーム活性阻害作用は 0.0004 未満 (薬理試験の概要文 CTD 2.6.2.2 (5), 表 2.6.2-17) であったことから, ホウ素を含まない化学構造を示す類縁物質の 20S プロテアソーム活性阻害作用は本薬よりも弱いことが示唆された。したがって, ホウ素を含まない類縁物質 C, D, S, B, L, M, N においても K 及び A と同様に 20S プロテアソーム活性阻害作用は本薬よりも弱いと推察される。

一方, 類縁物質 P はホウ素を含む化合物ではあるが, 本薬とは化学構造が異なり, また, 本薬と高純度ボルテゾミブにおける 20S プロテアソーム活性阻害作用の比較から, 類縁物質 P が本薬

の 20S プロテアソーム活性阻害作用に影響を及ぼす可能性は低いと推察された。

以上のことから、本薬中に含まれる類縁物質は本薬の 20S プロテアソーム活性阻害作用に影響を及ぼす可能性は低いと推察された。また、本薬の毒性は 20S プロテアソーム活性阻害作用に基づくと考えられることから、ヒトが類縁物質に曝露されたとしても類縁物質に起因した特異な毒性作用が発現する可能性は低いものと考えられる。

2.6.6.9 考察及び結論

本薬の非臨床毒性試験の目的は、遺伝毒性、生殖発生毒性、標的器官の特定、毒性所見の可逆性、曝露量と毒性所見との関連性、及び重要な毒性の発現機序を解明することであった。

また、毒性試験においては、重要な試験は GLP を遵守して実施した。

(1) 毒性の標的器官

1) 単回投与毒性

本薬の単回静脈内投与をラット及びサルを用いて検討した。本薬の単回静脈内投与における概略の致死量は、ラット及びサルでそれぞれ 0.30 mg/kg (1.80 mg/m²)及び 0.30 mg/kg (3.60 mg/m²)であった。また、MTD は、ラット及びサルでそれぞれ 0.10 mg/kg (0.60 mg/m²)及び 0.10 mg/kg (1.20 mg/m²)であり、動物種間で MTD と致死用量の間に大きな差はないと推察された。死亡の原因はこれらの試験では不明であった。

2) ラット反復投与毒性

ラットにおける主要な標的器官の変化は、消化管での用量依存的な粘膜過形成、血小板減少、リンパ系組織萎縮並びに肝細胞の肥大又は空胞化、肝臓重量の増加がみられ、ラット反復投与毒性試験における死亡又は瀕死による切迫屠殺の原因と考えられた。すべての所見は、回復期間中に、部分的又は完全に回復することが確認された。最も重要な標的器官の変化は消化管粘膜の増殖性変化であると考えられた。この変化は、組織における軽度のアポトーシス及びそれに関連する再生性過形成によるものと推察される。用量依存的な血小板減少の発現機序は不明であるが、病理組織学的検査において造血細胞密度低下が認められたことから、骨髄抑制に起因する可能性が考えられた。また、ラットの QWBA 試験において、消化管及びリンパ節に本薬由来の放射能濃度が高く認められたため、標的器官は消化管及びリンパ系組織と推定した (2.6.4.4. (1) の項参照)。

3) サル反復投与毒性

カニクイザルにおいて、骨髄抑制に関連した重篤な貧血及び血小板減少、消化管粘膜の過形成と関連性のある嘔吐及び下痢を特徴とする消化管毒性、循環リンパ球の減少及びリンパ系組織萎縮/単細胞壊死、腎尿細管変性/肥大又は糸球体腎症、並びに末梢神経の軸索変性を特徴とする末梢性ニューロパシーが認められた。8 週間の回復期間終了後、末梢神経、腎臓及びリンパ系組織における変化については、回復傾向はみられるが、完全な回復はみられなかった。38 週間反復投与試験において、全投薬群に血小板の減少が認められ、切迫屠殺例 4 例中 2 例は血小板の減少を伴

なう重篤な貧血により状態が悪化したものと考えられた。この変化の発現機序は、本薬の造血器系に対する影響と考えられる。なお、この造血器系に対する影響は、休薬によって回復が認められた。

また、消化管毒性は用量相関性が最も一貫してみられた毒性であり、ラットと同様に、消化管毒性に関連する組織学的変化は、消化管粘膜過形成であり、この組織における軽度のアポトーシス及び再生性過形成に起因する二次的変化と考えられる。

循環リンパ球の減少及びリンパ系組織の萎縮は、本薬の直接作用並びに骨髄及び二次リンパ器官の抑制に関連している可能性もあるが、影響のみられたすべての投与量で他に毒性変化もみられていることから、全身性ストレスによる二次的影響も考えられる。

腎尿細管の変性及び肥大並びに糸球体腎症が、主として 38 週間反復投与試験でみられた。これらの変化は腎機能障害を伴っておらず、8 週間の回復期間により、回復傾向がみられた。なお、この変化は、プロテアソーム阻害に関わる酸化ストレスによる影響⁴⁾も考えられるが、その作用機序は不明である。

4) プロテアソームと神経変性

プロテアソームは、細胞生理機能を維持する上で必須の細胞内酵素複合体であり、中枢神経系及び末梢神経系を含む全身の組織で非リソソーム的かつ制御的な蛋白質の加水分解を触媒している。プロテアソーム及びプロテアソーム活性は、中枢神経系全体のニューロン及びグリア細胞に認められている^{5), 6), 7)}。神経変性疾患のいくつかで、病理組織学的に細胞内封入体あるいは細胞外の蛋白質濃縮として認識されているポリユビキチン化した蛋白質の凝集体を伴っている^{6), 8), 9)}。したがって、これらの所見にユビキチン-プロテアソーム系が関与している可能性が推測される。

プロテアソーム阻害剤は、ニューロン細胞株及び初代培養ニューロン細胞で直接的に細胞毒性を示し、その細胞死はアポトーシスによって起きることが報告されている^{10), 11), 12), 13), 14), 15)}。一方、細胞外カリウムの低値で誘発されるニューロン細胞のアポトーシスの場合、プロテアソーム阻害はカスパーゼを介するアポトーシス経路を阻害し、その結果として細胞を細胞死から保護することが報告¹⁶⁾されている。プロテアソームと神経変性の作用機序について明確な見解は得られていないが、ニューロン由来の細胞は条件の違いによってプロテアソーム阻害剤の直接的な細胞毒性作用に対する感受性を变化する。この細胞毒性は、2.6.2.6 の項で示した作用機序^{注1)}のうちの複数経路が関与している可能性も推察される。

本薬を用いた試験において、末梢神経変性が、カニクイザルの 4 週間（評価資料 4.2.3.2.6）及び 38 週間（評価資料 4.2.3.2.7）反復投与試験で認められた。病変は末梢神経系の軸索に限定され、解剖学的に感覚神経の通る部位のみに影響を与え、感覚神経軸索の神経細胞体には変性はみられなかった。8 週間の回復期間後には完全な回復はみられなかったが回復傾向は認められた。更に、背側根神経節に細胞死が観察されなかったことから、最終的には回復すると予想される。また、本薬投与に関連する病変は、中枢神経系では認められなかった。

注1) ①IL-6 の産生や細胞シグナルを阻害、②Bcl-2 の p53 の変調など、アポトーシス制御因子の欠陥を克服、等

本薬の臨床試験で報告された最も頻度の高い副作用にも末梢性ニューロパシーが含まれ、動物でみられた作用と重複している。しかし、観察されたすべての非臨床毒性所見には用量反応性がみられ、回復期間中に完全又は部分的に回復がみられており、臨床試験でも同様に回復が認められている。

現在、本薬の投与に関連する末梢性ニューロパシーの作用機序を検討する目的で、マウス GT-1 神経細胞を用い、*in vitro* における本薬の影響が検討されている¹⁷⁾。その結果、以下の知見が得られた。

- 本薬 50 nM~10 μ M を 48 時間作用させた場合 50%以上の死細胞（トリパンブルー染色にて判定）が認められたが、DNA laddering 及び TUNEL 法における評価においてアポトーシスはみられなかった。
- 本薬で処置した GT-1 神経細胞は、核周囲の領域で細胞質の収縮並びに F アクチン及び G アクチンの再配置により、表現型が変化した。
- 細胞骨格の再編成にもかかわらず、本薬はアクチンないしは α -、 β -及び γ -チューブリン蛋白量或いはユビキチン化状態に影響を与えなかった。
- しかし、本薬で処理した後、残りの細胞質蛋白質の多くは、ユビキチン化された。このことは、ユビキチン蛋白の発現増加や、ユビキチン蛋白の安定性により示されている。同様の結果はラクタシスチン処理した GT-1 神経細胞でもみられた。
- 本薬処置による GT-1 神経細胞は、ヒートショック蛋白質（ストレス蛋白質） hsp27, hsp70 及び α B-クリスタリンの発現を増加させた。
- 本薬で処置した GT-1 神経細胞を免疫組織学的に検討したところ、C-myc, γ -チューブリン、及び、ビメンチン蛋白質（プロテアソーム阻害により影響を受けることが知られている）が核周囲の細胞骨格の中心に蓄積した。
- RelA, GRP78, γ 1-アダプチン及び LAMP もまた蓄積したが、これらの蛋白質がプロテアソームにより代謝されるかは不明である。

以上、本薬で処理したマウス GT-1 神経細胞を用いて細胞の生育能力、細胞骨格の変化、蛋白質のユビキチン化及びストレス蛋白の発現を検討した結果、ユビキチン化蛋白質が核周囲へ蓄積したことから、軸索輸送に関与する蛋白質の恒常性維持を阻害、及び、小胞体における蛋白質の品質管理機構(quality-control mechanism)の阻害に関与し、これらの作用により細胞骨格の変化及びストレス応答を引き起こすことが考えられる。

なお、本薬の分子量は 384.24, $pK_{a1}=0.7$, $pK_{a2}=8.6$, 非イオン形の分配係数は 100.87, イオン形の分配係数は <0.1 である (2.3.S.1.3, 表 2.3.S.1-1 参照)。したがって、本薬を静脈内投与したとき、体内では本薬は、大部分がイオン形として存在していると考えられる。そのため、血液と組織との間に関門が存在する組織では、イオン形分子が関門を通過できず、これらの関門に対する本薬の透過性は低いと考えられている (2.6.4.9 (3)の項参照)。

以上の試験成績から、*in vitro* 試験において蛋白質のユビキチン化及びストレス蛋白の発現応答

などに本薬の影響が認められたことから、本薬投与による末梢神経変性は、これらの単独又は一連の反応により、神経細胞の軸索輸送に影響を与え、ニューロパシーの原因となったと推察された。なお、末梢に限定して発現しているのは、本薬が中枢神経系に分布しないためと考えられる。したがって、本薬が中枢神経系に及ぼす影響は少ないと考えられる。

(2) 安全域

非臨床試験及び臨床試験とも薬物動態試験及びトキシコキネティクス試験のデータ量が限られていることから、投与量を用いて安全域を解析及び推測した。一般的に、細胞毒性を有する抗がん剤の動物種間の安全域は MTD を用いて比較されている。

ラットに本薬を 26 週間 (9 サイクル) 投与したときの MTD は 0.10 mg/kg/回 (0.60 mg/m²/回)であった。また、サルに本薬を 38 週間 (13 サイクル) 投与したときの MTD は 0.050 mg/kg/回 (0.60 mg/m²/回)であった。多発性骨髄腫における予定臨床用量は 1.3 mg/m²/回である。非臨床試験及び臨床試験の MTD の比較により、用量に基づいて表した安全域は 1 未満である。非臨床試験の最終的な目的は臨床試験のための安全な投与開始用量を決めること、ヒトでの毒性発現の可能性を予測すること、毒性の標的器官の特定及び毒性所見の可逆性について検討を行うこと、非臨床所見とヒトでの事象との関連付けを行うこと及び重要な毒性の発現機序を明らかにすることである。本薬はヒトにおいてみられた副作用から判断すると、細胞毒性を有する化学療法剤として比較的高い忍容性を持つものと思われる。

ラットにおける 26 週間静脈内投与試験において、MTD である 0.10 mg/kg/回 (0.60 mg/m²/回)の投与 26 週における AUC_(0→24)及び C_{0.5h}はそれぞれ 134 ng・h/mL 及び 10.9 ng/mL であった。サルにおける 38 週間静脈内投与試験において、MTD は最低用量の 0.050 mg/kg/回 (0.60 mg/m²/回)で、投与 38 週における AUC_(0→24)及び C₀はそれぞれ 45.4 ng・h/mL 及び 48.2 ng/mL であった。また、ヒトにおける C₀に基づいた安全域は 1 未満であったが、ヒトの AUC をラット及びサルの MTD における AUC と比較すると、安全域はそれぞれ 2.5 及び 0.8 倍であった。

(3) 生殖発生毒性

ラット及びウサギを用いて胚・胎児発生毒性試験を実施した。本薬を器官形成期に連日投与した。ウサギの高用量で、母動物毒性並びに胚・胎児致死又は発育遅延が認められた。催奇形性はラット及びウサギともに認められず、また、母動物毒性が発現しなかった用量では、胚・胎児への影響もみられなかった。母動物の一般毒性に対する無毒性量は、ラットでは 0.050 mg/kg/d (0.30 mg/m²/d)、ウサギでは 0.025 mg/kg/d (0.28 mg/m²/d)であった。また、母動物の生殖機能及び胚・胎児に対する無毒性量はラットでは 0.075 mg/kg/d (0.45 mg/m²/d)、ウサギでは 0.025 mg/kg/d (0.28 mg/m²/d)であった。これらの用量は臨床用量 1.3 mg/m²/回の 0.35 倍及び 0.22 倍に相当する。

受胎能試験は実施していないが、一般毒性試験での生殖器官における病理組織学的検査結果では、ラットにおける 26 週間反復投与試験において、精巣及び卵巣に変性がみられている。このことは、本薬が雄あるいは雌の受胎能のいずれに対しても影響を与える可能性が考えられる。マウス、ラット、及びサルを用いた組織内分布試験 (2.6.4.4 の項参照)の結果、投与 1 時間後の精巣

及び卵巣組織内放射能濃度は低い。一方で、本薬の特徴は、ホウ素が化学構造に存在することである。0.1%未満であるが、ホウ素元素が不純物として存在する可能性があるが、ホウ素は天然に存在する元素であり、植物由来の食品を介してヒトは摂取する可能性がある。ホウ素は容易に吸収され、組織中の濃度は1日当たりの摂取量に依存している(2.6.4.4(1)4)の項参照)。ホウ酸及びホウ砂の無毒性量は、ラットにおける2年間毒性試験で23.3 mg/kg/d (350ppm)^{注1)}であった¹⁸⁾。その主な毒性は、78 mg/kg/d (1170ppm)^{注3)}で雄授胎能に対する作用がみられ、また発生に対する作用で、母動物の無毒性量は76 mg/kg/d、胎児の無毒性量は55 mg/kg/d、出生児の無毒性量は74 mg/kg/d、であった^{18), 19)}。オーストラリアで実施された試験によると、健康人における1日当たりのホウ素の平均摂取量は約2.2 mg/d、尿への排泄量は約1.9 mg/dであった²⁰⁾。本薬のホウ素部分は、本薬投与の2.81%であり、患者に1回当たりに投与されるホウ素量は合計50.6 µgとなる。この量は、ヒトでの1日当たりのホウ素の平均摂取量の約2.3%であり^{注2)}、動物試験で得られている無毒性量よりはるかに低く、毒性学的に意義はないと思われる。

(4) 遺伝毒性の評価

CHO細胞を用いた*in vitro*染色体異常試験において、本薬は検討した最低用量である3.125 µg/mL以上で構造的な染色体異常誘発性が認められた。100 µg/mL以上の濃度では細胞周期は停止状態にあり、評価可能な分裂中期の細胞がなかったことから、染色体の評価をすることができなかった。この所見は、プロテアソームの細胞周期調節に起因すると考えられる(2.6.2.2(1)の項参照)。マウスにおける小核試験では、MTDである1 mg/kg (3 mg/m²)の用量まで小核誘発性は認められなかった。なお、本薬に復帰突然変異誘発性は認められなかった。

以上の結果から、*in vitro*染色体異常試験で検討した最低用量から染色体構造異常誘発性が認められたものの、その他の遺伝毒性試験において陽性所見は認められなかったこと、並びに生殖発生毒性試験において催奇形性が認められなかったことから、臨床的には遺伝毒性を発現する可能性は低いと考えられる。

2.6.6.10 図表

本文中に記載した。

^{注1)} ラットの1日の摂餌量を20グラム、体重を300グラムとして換算した。

^{注2)} 患者の本薬の1日最大投与量は、用法・用量(案)に基づき、ボルテゾミブ1.8 mgとした。なお、ボルテゾミブの分子量は384.24、ホウ素の分子量は10.8として換算した。

2.6.6.11 参考文献

- 1)厚生労働省医薬食品局審査管理課 平成16年8月9日 事務連絡「抗がん剤の臨床試験実施及び承認申請のために実施される毒性試験に関するQ & Aについて」
- 2)欧州 : CPMP, Note for guidance on the pre-clinical evaluation of anticancer medicinal products, EMEA, CPMP/SWP/997/96, 23 July 1998
- 3)米国 : DeGeorge JJ, Ahn CH, Andrews PA, Brower ME, Giorgio DW, Goheer MA *et al.* Regulatory considerations for preclinical development of anticancer drugs, *Cancer Chemother Pharmacol* 1998; 41: 173-85.
- 4)Chade AR, Herrmann J, Zhu X, Krier JD, Lerman A, Lerman LO. Effects of proteasome inhibition on the kidney in experimental hypercholesterolemia. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 1005-12
- 5)Keller JN, Hanni KB, Markesbery WR. Impaired proteasome function in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2000; 75:436-9.
- 6)Ii K, Ito H, Tanaka K, Hirano A. Immunocytochemical co-localization of the proteasome in ubiquitinated structures in neurodegenerative diseases and the elderly. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56:125-31.
- 7)Ding Q, Keller JN. Proteasomes and proteasome inhibition in the central nervous system. *Free Radic Biol Med* 2001; 31:574-84.
- 8)Bence NF, Sampat RM, Kopito RR. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* 2001; 292:1552-5.
- 9) Keller JN, Gee J, Ding Q. The proteasome in brain aging. *Ageing Res Rev* 2002; 1:279-93.
- 10) Qiu JH, Asai A, Chi S, Saito N, Hamada H, Kirino T. Proteasome inhibitors induce cytochrome c-caspase-3-like protease-mediated apoptosis in cultured cortical neurons. *J Neurosci* 2000; 20:259-65.
- 11) Rockwell P, Yuan H, Magnusson R, Figueiredo-Pereira ME. Proteasome inhibition in neuronal cells induces a proinflammatory response manifested by upregulation of cyclooxygenase-2, its accumulation as ubiquitin conjugates, and production of the prostaglandin PGE₂. *Arch Biochem Biophys* 2000; 374:325-33.
- 12)Keller JN, Markesbery WR. Proteasome inhibition results in increased poly-ADP-ribosylation: implications for neuron death. *J Neurosci Res* 2000; 61:436-42.
- 13) Kikuchi S, Shinpo K, Takeuchi M, Tsuji S, Yabe I, Niino M *et al.* Effect of geranylgeranylacetone on cellular damage induced by proteasome inhibition in cultured spinal neurons. *J Neurosci Res* 2002; 69:373-81.
- 14) Snider BJ, Tee LY, Canzoniero LMT, Babcock DJ, Choi DW. NMDA antagonists exacerbate neuronal death caused by proteasome inhibition in cultured cortical and striatal neurons. *Eur J Neurosci* 2002; 15:419-28.
- 15) Lopes UG, Erhardt P, Yao R, Cooper GM. p53-Dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors. *J Biol Chem* 1997; 272:12893-6.
- 16) Canu N, Barbato C, Ciotti MT, Serafino A, Dus L, Calissano P. Proteasome involvement and accumulation of ubiquitinated proteins in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis. *J Neurosci* 2000; 20:589-99.

- 17) Csizmadia V. Effect of bortezomib on the cytoskeleton, cytosolic protein turnover, and induction in neuronal cells *in vitro*. *Millennium Pharmaceuticals Inc.* Toxicology Study Report RPT-00307 2004 (社内資料)
- 18) Weir RJ, Jr., Fisher RS. Toxicologic studies on borax and boric acid. *Toxicol Appl Pharmacol* 1972; 23: 351-64.
- 19) Price CJ, Strong PL, Marr MC, Myers CB, Murray FJ. Developmental toxicity NOAEL and postnatal recovery in rats fed boric acid during gestation. *Fundam Appl Toxicol* 1996; 32:179-93.
- 20) Samman S, Naghii MR, Lyons Wall PM, Verus AP. The nutritional and metabolic effects of boron in humans and animals. *Biol Trace Elem Res* 1998; 66: 227-35.