

4) 製剤の管理

機構は、製剤の純度試験のうち、類縁物質の合計量は「■%以下」と設定されているものの、製剤の長期保存及び加速試験成績からは、いずれの保存条件においても保存期間における類縁物質の合計量が■%を超えていないことから、当該規格値を再検討することを求めた。

申請者は、以下のように回答した。

製剤の類縁物質の合計量の規格は、■では■%以下であるが、■及び国内においては、■%以下である。安全性を保証する毒性試験及び製剤の品質に基づくと、現行の類縁物質の規格は、適切であると考え。ただし、類縁物質の合計量の規格を■の承認規格である「■%以下」に変更することにする。■

■現在継続中である。なお、当該再評価の結果、■において類縁物質の合計量の規格を変更する場合には、国内においても、本剤の類縁物質の合計量の規格に対し、適切に一部変更承認申請を行う予定である。

機構は、類縁物質の合計量の規格については、実測値（■%未満）と大きな乖離があるものの、類縁物質の合計量の規格について再評価が継続中であることを踏まえて、現時点では再設定された規格「■%」は許容できると判断し、上記回答を了承した。ただし、当該規格については、今後、更に製造経験を得たのちに再評価し、速やかに変更を行う必要があると考える。

5) 製剤の安定性

機構は、添付文書の適用上の注意の項において「本剤の溶解及び希釈には日局生理食塩液のみを使用し、乳酸リンゲル液及びリンゲル液等のカルシウムを含有する溶液との配合を避けること。」と記載されているが、申請資料としてこれに関連するデータが提出されていないことから、上記の記載がなされた経緯・根拠について説明を求めた。

申請者は、以下のように回答した。

用法・用量に関連する使用上の注意の項では日局生理食塩液を用いて溶解及び希釈することを記載しているが、他の溶解液との適合性について検討する必要があると考え、以下の検討を行った。

ペメトレキセドを生理食塩液、注射用水、5%ブドウ糖液、2.5%ブドウ糖・0.45%塩化ナトリウム液、リンゲル液及び乳酸リンゲル液で溶解した液について適合性を検討した結果、リンゲル液及び乳酸リンゲル液では、リンゲル液に含まれる塩化カルシウムによる濁り又は沈殿を生じて適合性を示さなかった。さらに、生理食塩液、注射用水、5%ブドウ糖液、2.5%ブドウ糖・0.45%塩化ナトリウム液に再調製した溶液において、pH、溶状、不溶性微粒子、含量及び類縁物質を測定した結果、■℃及び■℃の条件では■時間において変化は認められなかった。

機構は、上記回答を了承した。

3. 非臨床試験に関する資料

3.1 薬理試験に関する資料

<提出された資料の概略>

本薬の効力を裏付ける試験として 3 報告書及び安全性薬理試験として 6 報告書が提出され、参考資料として公表論文を含む 30 の報告書が提出された。CDDP 製剤については、本薬の効力を裏付ける試験として「(2) 悪性胸膜中皮腫由来細胞の増殖抑制、CDDP の併用効果、アポトーシス誘導（未公表）」が提出された。

1) 効力を裏付ける試験

(1) 葉酸代謝酵素阻害、細胞内取り込み（Cancer Res 57: 1116-1123, 1997）

葉酸代謝酵素阻害

thymidylate synthase (TS)、dihydrofolate reductase (DHFR)、glycinamide ribonucleotide formyltransferase (GARFT)、aminoimidazole carboxamide ribonucleotide formyltransferase (AICARFT)、5,10-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase、10-formyltetrahydrofolate synthetase に対する本薬及びそのポリグルタミン酸塩の *in vitro* における阻害定数 (K_i , nmol/L) が検討され、本薬あるいはそのグルタミン酸塩はヌクレオチドの *de novo* 合成に重要な複数の葉酸代謝酵素を阻害すると考察されている。

	rhTS	rhDHFR	rmGARFT	rhC1-S*	rhC1-S**	hAICARFT
ペメトレキセド	109±17.2 (n=4)	7.0±3.3 (n=3)	9300± 1197 (n=3)	9500±900 (n=3)	364000 (n=1)	35800 (n=1)
ペメトレキセド・トリグルタミン酸塩	1.6±0.3 (n=3)	7.1±2.8 (n=3)	380±160 (n=3)	3700 (n=1)	25000 (n=1)	480 (n=1)
ペメトレキセド・ペンタグルタミン酸塩	1.3±0.5 (n=3)	7.2±0.7 (n=3)	65±27.8 (n=3)	5000 (n=1)	1600 (n=1)	260 (n=1)

平均値±標準偏差

*5,10-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase of hrC1 tetrahydrofolate synthase

**10-formyltetrahydrofolate synthetase of hrC1 tetrahydrofolate synthase

細胞増殖抑制の特徴

ヒト白血病由来細胞 CCRF-CEM、ヒト結腸癌由来細胞 GC3/C1 及びヒト大腸癌由来細胞 HCT-8 を用いて本薬の細胞増殖抑制の特徴について、MTT 法により検討された。チミジンとヒポキサンチンの併用により、本薬の細胞増殖抑制が消失したことから、本薬の主な標的は TS であるが、高濃度では DHFR 活性も抑制していると考察されている。

細胞株	本薬の IC ₅₀ (nmol/L)			
	本薬	本薬 チミジン	本薬 ヒポキサンチン	本薬 チミジン・ヒポキサンチン
CCRF-CEM	25	137	137	40000 超
GC3/C1	34	637	637	40000 超
HCT-8	220	3104	1077	40000 超

チミジン 5µmol/L、ヒポキサンチン 100µmol/L

グルタミン酸化、細胞内取り込み

CCRF-CEM を用いて細胞増殖抑制に及ぼす本薬のグルタミン酸化の影響について検討された。CCRF-CEM 野生株に対する本薬の細胞傷害性について、IC₅₀ は 25.4nmol/L であったが、folypoly-glutamate synthetase 活性が野生株の約 1/10 に低下している lometrexol 耐性 CCRF-CEM の CR15 株に対する IC₅₀ は 2200000nmol/L 超であった。

また、ヒト乳癌由来細胞 ZR-75-1 を用いて本薬の還元型葉酸キャリア (RFC) と葉酸結合型膜タンパク質 (FBP) による取り込みについて細胞増殖抑制を指標として検討された。その結果、本薬は主に RFC により細胞内に取り込まれるが、一部は葉酸に基質特異性を有する FBP により取り込まれると考察されている。

細胞株	RFC	FBP	IC ₅₀ (nmol/L)
ZR-75-1 野生株	+	—	110.2
AA6-FR+株	+	+	22.7
メトトレキサート耐性株	—	—	429.9
メトトレキサート耐性 BB3-FR+株	—	+	11960.6

(2) 悪性胸膜中皮腫由来細胞の増殖抑制、CDDP の併用効果、アポトーシス誘導 (未公表) 細胞増殖抑制 (*in vitro*)

ヒト悪性胸膜中皮腫由来細胞 MSTO-211H の増殖に及ぼす本薬と CDDP の単独の影響及び併用効果について、MTT 法により検討された。本薬及び CDDP 単独の IC₅₀ は 24 時間曝露では各々 30 及び 820nmol/L、72 時間曝露では各々 25 及び 670nmol/L であった。本薬 10~50nmol/L と CDDP (濃度は本薬の 4 倍又は 8 倍) を同時に 72 時間曝露した場合、combination index (Synergism and Antagonism in Chemotherapy, pp61-102, Academic Press, 1991) は、殆どの検討濃度において 1 未満となり、細胞増殖抑制作用は相乗的であったと考察されている。一方、本薬単独 24 時間曝露後 CDDP 単独 72 時間曝露、並びに同曝露条件で CDDP に続き本薬を曝露した場合、ともに低濃度の検討において combination index は 1 以上の拮抗的效果を示したが、高濃度における combination index はともに 1 未満であり、細胞増殖抑制作用は相乗的であったと考察されている。

アポトーシス誘導

MSTO-211H 細胞の細胞周期に及ぼす影響について、フローサイトメトリー法により検討された。本薬 30nmol/L の 24 時間曝露により細胞は G1/S 期に集積し、48 時間曝露後にはアポトーシス細胞を示す sub-G1 期のピークが認められた。フローサイトメトリー・TUNEL 法による解析の結果、アポトーシス陽性細胞の割合は 56% であった。また、ELISA 法による解析では、本薬によるアポトーシス誘導は 31nmol/L で最大値を示し、より高濃度では細胞内プリンヌクレオチドの低下に伴うと考えられるアポトーシス誘導能の減弱傾向が認められた。

なお、当該報告書においては、ヒト悪性胸膜中皮腫由来細胞 NCI-H28 及び NCI-H2052

の増殖に対する本薬 72 時間曝露での IC₅₀ は 209 及び 180nmol/L であったことを米国 Eli Lilly and Company に所属する著者が確認している旨の記載がなされていたが、NCI-H28 及び NCI-H2052 に関するデータについて、申請者は確認できなかったと説明している。

(3) *in vivo* 腫瘍増殖抑制（未公表）

ヒト乳癌由来細胞 MX-1、ヒト膀胱癌由来細胞 BxPC-3、ヒト非小細胞肺癌由来細胞 LX-1 及びヒト大腸癌由来細胞 VRC5 より作成した腫瘍片をヌードマウスに皮下移植し、移植 7 日後より本薬 25、50、100 及び 300mg/kg を通常飼料摂取下で 1 日 1 回 10 日間腹腔内投与し、薬剤投与開始から 14 日後の腫瘍重量を指標に本薬の腫瘍増殖に及ぼす影響が検討された。当該試験成績を含む *in vivo* 及び *in vitro* の検討結果より、本薬は様々な腫瘍に対して抗腫瘍活性を有しているとされている。

細胞株	投与量 (mg/kg/日)	腫瘍増殖抑制率 (%)	毒性による死亡動物
MX-1	100	44	0/8
	300	79	0/8
BxPC-3	100	37	0/10
	300	65	0/10
LX-1	100	62	0/10
	300	75	0/10
VRC5	25	64	0/10
	50	80	0/10

(4) 参考資料として提出された報告書（未公表）

ビタミン補充の影響 (*in vivo*)

本薬の毒性及び腫瘍増殖抑制に及ぼすビタミン補充の影響が検討された。MX-1 より作成された腫瘍片をヌードマウスに移植し、移植後 7～11 日及び移植後 14～18 日までの計 10 回、本薬 100 及び 150mg/kg が 1 日 1 回腹腔内投与された。葉酸 6 及び 60mg/kg は本薬と同様のスケジュールで経口投与、ビタミン B₆ 100mg/kg、ビタミン B₁₂ 165mg/kg も同様のスケジュールで腹腔内投与された。毒性の指標として投与前の体重に対する観察期間終了後の相対変化量 (%) 及び腫瘍増殖遅延（対照群と試験群における最終観察日の腫瘍体積から算出した腫瘍体積が 1000mm³ となるまでの期間の差）が検討された結果、検討用量の葉酸、ビタミン B₆ 及びビタミン B₁₂ はいずれも本薬の腫瘍増殖抑制に影響せず、また体重増加にも影響は認められなかったとされている。

体重変化量 (%)

薬 剤	併用薬剤				
	—	葉酸 6mg/kg	葉酸 60mg/kg	ビタミン B ₆	ビタミン B ₁₂
コントロール	4.8±3.1	6.0±2.5	3.6±1.6	1.1±7.3	11.5±2.0
本薬 100mg/kg	6.0±2.5	11.3±4.7	12.7±4.9	-4.2±6.0	4.3±3.5
本薬 150mg/kg	3.6±1.6	2.2±2.0	12.3±4.7	5.9±6.5	1.1±6.6

平均値±標準誤差

腫瘍増殖遅延（日）

薬 剤	併用薬剤				
	—	葉酸 6mg/kg	葉酸 60mg/kg	ビタミン B ₆	ビタミン B ₁₂
コントロール	0±2.1	8.3±9.7	4.4±1.7	5±1.8	14.4±6.1
本薬 100mg/kg	8.8±5.6	16.6±2.9	14.9±2.3	7.8±1.8	12.7±1.8
本薬 150mg/kg	7.8±1.7	14.5±2.2	17.7±2.9	13.2±2.4	10.1±3.7

平均値±標準誤差

ポリグルタミン酸化、プリン合成経路

CCRF-CEMを本薬の存在下で72時間培養し、本薬と本薬のグルタミン酸塩の細胞内濃度がHPLC法で検討された。その結果、細胞内の本薬の90%以上はペンタ又はそれ以上のポリグルタミン酸塩であった。

チミジン5μmol/L及びヒポキサンチン100μmol/L存在下で増殖中のCCRF-CEMに本薬を72時間曝露し、¹⁴C標識ギ酸の細胞内アデノシン及びグアノシン塩基への取り込みを指標として、*de novo*プリン合成に及ぼす影響が検討された。その結果、本薬処理後の細胞では、ギ酸由来¹⁴Cのプリン塩基の取り込みが減少し、陽性対照であるGARFT阻害剤のLY309887よりも弱いものの、本薬でもGARFT阻害作用が認められた。

細胞内TSの経時変化

本薬曝露に伴う TS 量について、抗 TS 抗体の TS106 を用いて免疫組織的に検討された。ヒト結腸癌由来細胞 HCT-116 では、本薬存在下での培養時間に依存して TS106 免疫反応の増加が認められた。HCT-116 移植マウスの腫瘍では、本薬投与直後から 72 時間後まで腫瘍内 TS106 活性は経時的に上昇したが、その後は時間経過に伴い腫瘍内 TS106 免疫反応は減弱した。以上、本薬による TS 阻害は細胞内 TS を持続的又は一過性に増加させた。

耐性株に対する細胞増殖抑制の特徴

メトトレキサート耐性 CCRF-CEM の CEM-T 株及び CEM-R 株は各々薬剤の細胞内取り込み低下及び DHFR 過剰発現により耐性を示す。*in vitro*において、CCRF-CEM 野生株、CEM-T 株及び CEM-R 株の増殖に対するメトトレキサートの IC₅₀ は各々4.2、2916.8 及び 1847.5nmol/L、本薬は各々9.5、862.4 及び 508.4nmol/L であった。また、DHFR 過剰発現の CEM-R 株における本薬の細胞増殖抑制作用はチミジン 5μmol/L でほぼ消失したことより、本薬の細胞増殖抑制は DHFR を標的とするメトトレキサートよりも DHFR 依存性は低いと考察されている。

塩酸ドキソルビシンとの併用

*in vitro*において、ZR-75-1 の増殖に対する本薬と塩酸ドキソルビシンとの併用の影響が検討されたが、申請用法・用量である CDDP 以外の抗悪性腫瘍剤との併用に関する試験成績のため結果は省略する。

(5) 参考資料として提出された公表論文

Anticancer Res 18: 3235-3240, 1998、同 19: 437-444, 1999、Biochem Pharmacol 50: 391-398, 1995、Blood 94: 3121-3128, 1999、Br J Cancer 71: 914-924, 1995、同 78(Suppl 3): 27-34, 1998、同 82: 925-930, 2000、Cancer Chemother Pharmacol 39: 521-531, 1997、同 44: 105-110, 1999、同 44: 427-432, 1999、Cancer Res 59: 3671-3676, 1999、Clin Cancer Res 6: 3687-3695, 2000、7: 2114-2123, 2001、J Mol Biol 313: 813-829, 2001、Mol Pharmacol 48: 326-333, 1995、同 48: 459-471, 1995、Semin Oncol 26(Suppl 6): 68-73, 1999

(6) 作用機序に関する申請者の考察

上記の検討結果及び公表論文から、申請者は本薬の酵素阻害能（Cancer Res 57: 1116-1123, 1997）、*in vitro*における本薬の細胞増殖抑制に対するチミジン及びヒポキサンチンの影響（Cancer Res 57: 1116-1123, 1997、Anticancer Res 19: 437-444, 1999、Br J Cancer 82: 925-930, 2000、Semin Oncol 26(Suppl 6): 68-73, 1999 等）、細胞内取り込み機序（Clin Cancer Res 6: 3687-3695、Mol Pharmacol 48: 459-471, 1995）等の類薬との比較より、本薬のグルタミン酸塩の主要な標的酵素は TS、二次的な標的酵素は DHFR、GARFT であり、本薬の作用機序は DHFR を阻害するメトトレキサートや TS を阻害するラルチトレキセド（国内未承認）とは異なると結論されている。

2) 安全性薬理試験

(1) 中枢神経系に及ぼす影響

雄性マウスに本薬 60、200 及び 600mg/kg を静脈内投与し、一般症状、自発運動量、電撃痙攣、ペンチレンテトラゾール誘発痙攣、ヘキソバルビタール誘発睡眠、体温、握力、音刺激に対する驚愕反応、侵害受容に及ぼす影響が検討された。200 及び 600mg/kg では酢酸投与によるライジング回数は有意に抑制されたことを除き、他の検討項目では本薬の影響は認められなかった。なお、音刺激に対する驚愕反応は 200 及び 600mg/kg 投与で一過性に有意な変動が認められたが、薬剤との関連性はないものと考察されている。

(2) 呼吸器及び循環器系に及ぼす影響

麻酔下の雄性イヌに本薬 32 及び 105mg/kg を 10 分間静脈内投与し、心拍数、平均血圧、心拍出量、末梢血管抵抗、1 回拍出量、PR 間隔、QRS 間隔、QTc 間隔、呼吸数、1 回換気量、大腿血流に及ぼす影響が投与終了 60 分後まで検討された。心拍数、平均血圧、心拍出量、PR 間隔、QRS 間隔、QTc 間隔、呼吸数、1 回換気量及び大腿血流に対する影響はいずれの投与量においても認められなかった。末梢血管抵抗及び 1 回拍出量については、32mg/kg では影響は認められなかったが、105mg/kg では各々投与前値に比して最大で 8% 減少、19% 増加した。なお、対照群に対して有意な変化ではないが、32mg/kg 群の呼吸数

は投与前値から 20%低下しており、この変化は 32mg/kg 群の投与前の平均呼吸数 (8.2 回/分) が対照群 (5 回/分) 及び 105mg/kg 群 (4.5 回/分) より高かったことによるものと考えられている。

hERG 発現 HEK293 細胞の hERG 電流に及ぼす本薬 30、100 及び 300 μ mol/L の影響が電位固定法により検討され、いずれの濃度においても影響は認められなかった。

(3) 摘出平滑筋及び摘出心房に及ぼす影響

モルモット回腸、ラット輸精管、エストロゲン前処置ラット子宮平滑筋に対して、本薬 $1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-5}$ mol/L では収縮又は弛緩作用を示さず、摘出回腸並びに輸精管の電気刺激収縮及びモルモット摘出心房の収縮力及び心拍数に対しても $1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-5}$ mol/L の影響は認められなかった。本薬 1×10^{-5} mol/L では摘出回腸のアセチルコリン及びアンギオテンシン I 反応、子宮平滑筋のオキシトシン反応、摘出心房のイソプロテレノールによる陽性変力反応に影響を及ぼさなかったが、輸精管のノルエピネフリン反応を有意に増強し、また摘出心房のイソプロテレノールによる最大陽性変時反応は対照に対して有意に抑制された。

(4) 水・電解質排泄に及ぼす影響

雌性ラットに本薬 60、200 及び 600mg/kg を静脈内投与し、投与後 5 時間蓄尿を用いて尿量、pH、電解質、クレアチニン及び浸透圧に及ぼす影響が検討された。本薬はいずれの投与量においても尿量及びクレアチニンに影響を及ぼさなかった。pH は 60mg/kg 群で低下が認められたが、200 及び 600mg/kg 群では影響は認められなかった。浸透圧は 200 及び 600mg/kg 群では対照群に対していずれも 1.3%上昇、総 K 排泄量は対照群に対して各々 51 及び 38%上昇、また総 Na 排泄量は 600mg/kg 群では対照群に対して 56%上昇した。尿中 Na 濃度は 200 及び 600mg/kg 群では対照群に対して各々 36 及び 64%上昇、尿中 K 濃度は 60 及び 200mg/kg 群で対照群に対して各々 54 及び 42%上昇、また尿中 Cl 濃度は 60mg/kg 群のみ上昇が認められた。尿中 Na 排泄率は 600mg/kg 群では対照群に対して 85%上昇した。以上より、水・電解質排泄に対する本薬の無影響量は 60mg/kg と考察され、また本薬はいずれの投与量においてもクレアチニークリアランスへの影響は認められなかったことから、電解質排泄への影響は糸球体ろ過量や腎機能への影響に起因するものではないと考察されている。

(5) 消化管輸送能に及ぼす影響

雄性マウスに本薬 60、200 及び 600mg/kg を静脈内投与し、消化管における炭末輸送に及ぼす影響が検討され、いずれの投与量においても影響は認められなかった。

3) 薬力学的薬物相互作用

(1) 参考資料として提出された報告書（未公表）

CDDP との併用効果 (*in vitro*)

*in vitro*において、腫瘍由来細胞の増殖に及ぼす本薬とCDDPとの併用効果が検討された。ヒト非小細胞肺癌細胞NCI-H23については、薬物相互作用モデル (Antiviral Res 14: 181-206, 1990) による解析の結果、本薬とCDDPの添加順序にかかわらず相加作用が認められた。ヒト卵巣癌由来細胞PA1、大腸癌由来細胞WiDr、非小細胞肺癌由来細胞A549及び乳癌由来細胞MCF7については、イソボログラム法 (Int J Radiat Oncol Biol Phys 5: 85-91, 1979) による解析の結果、本薬とCDDPとの同時曝露では、その作用は相加的 (PA1及びWiDr) 又は拮抗的 (A549及びMCF7) であった。本薬曝露後にCDDPを曝露した場合には、その作用は、相乗 (MCF7)、相加上 (A549及びPA1) 又は相加的 (WiDr)、CDDP曝露後に本薬を曝露した場合には、相加的 (WiDr) あるいは拮抗的 (A549、MCF7 及びPA1) であった。

CDDP以外の抗悪性腫瘍剤との併用 (*in vitro*)

PA1、WiDr、A549及びMCF7を用いて本薬とパクリタキセル又はドセタキセル水和物との併用についても検討が行われた。ヒト大腸癌由来細胞の増殖に及ぼすオキサリプラチン又は塩酸ゲムシタビンとの併用、また大腸癌、非小細胞肺癌、乳癌、卵巣癌等由来の71種類の細胞増殖に及ぼす塩酸イリノテカン又はその代謝物SN-38との併用についても検討がなされた。いずれも申請用法・用量であるCDDP以外の抗悪性腫瘍剤との併用に関する試験成績のため結果は省略する。

(2) 参考資料として提出された公表論文一覧

Int J Oncol 19: 833-835, 2001、同 21: 361-367, 2002、J Clin Oncol 18: 1748-1757, 2000、Int J Radat Oncol Biol Phys 52: 1318-1388, 2002

<機構における審査の概略>

機構は、以下の検討を行った結果、本薬とCDDPとの併用はヒト悪性胸膜中皮腫の増殖を抑制することが期待できるものと判断したが、悪性胸膜中皮腫移植マウスで認められた本薬の毒性増強の機序については、今後検討していく必要があると考える。

1) 悪性胸膜中皮腫由来細胞の増殖に及ぼす影響

機構は、今回の申請癌腫である悪性胸膜中皮腫の増殖に対する本薬とCDDPの影響について、移植モデル等を用いて *in vivo* で検討する必要があると判断した理由について説明を求めた。

申請者は、以下のように回答した。

ヒト悪性胸膜中皮腫由来細胞 MSTO-211H より作成した腫瘍片をヌードマウスに皮下移植し、移植 7 日後より生理食塩液又は本薬 37.5、75、150 及び 300mg/kg を 1 日 1 回 10 日間腹腔内投与、又は移植 7 日後に CDDP 2.5、5 及び 10mg を 1 回腹腔内投与し、移植後 16 日まで観察を行った（1 群 10 匹）。その結果、生理食塩液群及び CDDP 群には死亡や一般状態の悪化は認められず、最終観察日における生理食塩液群、CDDP 2.5、5 及び 10mg 群の平均腫瘍重量は各々 255.3、220.8、195 及び 163.1mg となり、CDDP 10mg/kg で有意な腫瘍重量の増加抑制が確認された。一方、本薬 37.5 及び 75mg/kg 群の最終観察日の腫瘍重量は各々 240.1 及び 213.6mg で増加抑制は認められなかった。さらに、本薬 150 及び 300mg/kg 群においては、平均体重は各々 12% 及び 18% 低下し、死亡は各々 2/10 例及び 6/10 例に認められた。死亡動物の剖検は実施していないため、死因は特定されていないが、用量依存的に死亡率が上昇しており、実験手技上の問題ではないと考える（機構注：当該試験成績は承認申請時には提出されておらず、機構からの照会に対する回答として提出された。）。過去に実施した同様の試験では、ヒト大腸癌由来細胞 GK3 及び GK3/TK-の移植モデルでは本薬 300mg/kg 群の死亡は各々 8/10 例及び 4/10 例という結果が得られているものの、これ以外の試験では GK3 及び GK3/TK-の移植モデルでの本薬 300mg/kg 群の死亡は各々 2/9 例及び 0/9 例（機構注：Anticancer Res 19: 437-444, 1999 に作成に用いられた試験成績の生データから申請者が死亡を確認した数値であり、当該公表論文の記載内容とは一致していない。）、また MX-1、BxPC-3 及び LX-1 移植モデルでは本薬 300mg/kg 群の死亡は各々 0/8 例、0/10 例及び 0/10 例であった（「3.1 (3) *in vivo* 細胞増殖抑制」の項参照）。加えて、同系のマウスにマウスリンパ腫細胞 L5178Y/TK-/HX-を移植した検討においては、本薬 1000mg/kg、1 日 1 回 10 日間反復投与でも死亡動物は認められていない（Anticancer Res 18: 3235-3240, 1998）。これらの結果は、移植する腫瘍の種類によりモデル動物の化合物に対する感受性が異なっていることを示しており、今回の薬理試験での用量設定は妥当なものであると考える。また、マウスでは、代謝拮抗剤の薬理作用を減弱させる血漿中チミジン及び葉酸濃度が高く、*in vivo* 試験では複数回の連日投与を行う必要があることから（Cancer Res 51: 5579-5586, 1991、同 53: 810-818, 1993）、更なる投与スケジュールの検討を行う余地は低く、加えて本薬 75mg/kg 群では腫瘍重量の増殖抑制は認められず、150mg/kg 群では死亡が認められていることから、150mg/kg 未満の投与量にて追加試験を実施しても有用な結果は得られないと考え、CDDP との併用に関しては未検討のまま当該試験を中止した。なお、他のヒト悪性胸膜中皮腫由来細胞株（H-MESO-1、H2373、JMN、ZL5 等）を使用した試験成績が報告されているが、これらの細胞株は市販されておらず入手困難であった。以上、本薬理試験は妥当な試験デザインで適切に実施されており、試験デザインの変更による再試験の実施可能性は極めて低いと考え、更なる検討は行わなかった。

機構は、申請癌腫由来細胞の増殖に対する本薬と CDDP の影響について、提出された参考資料（Cancer Chemother Pharmacol 44: 105-110, 1999）以外の非臨床の研究報告（*in*

vivo 及び *in vitro*) を検索するよう求めた。

申請者は、CDDP 単独での効果を検討した薬理試験が 10 件報告されていたが (Cancer Sci 97: 183-191, 2006、Surg Today 36: 135-139, 2006、Eur J Pharmacol 473: 83-95, 2003、Clin Cancer Res 7: 3199-3205, 2001、J Surg Oncol 67: 104-111, 1998、Cancer Chemother Pharmacol 40: 385-390, 1997、Anticancer Drugs 3: 687-694, 1992、In Vivo 5: 375-380, 1991、Cancer Res 48: 64-67, 1998、同 46: 1263-1274, 1986)、本薬単独での効果並びに本薬及び CDDP の併用による効果を検討した薬理試験の報告は見出せなかったと回答した。

機構は、MSTO-211H より作成した腫瘍片を移植したヌードマウスにおいて、本薬の毒性が強く発現した機序について説明を求めた。

申請者は、現時点では移植する細胞の種類によりモデル動物の化合物に対する感受性が異なる機序は不明であるが、当該試験で認められた本薬投与による毒性・死亡所見は過去に同種のマウスで実施した毒性試験で観察されたものと同様であり、新規の毒性所見は認められていないと回答した。

機構は、MSTO-211H から作成した腫瘍を移植したマウスにおいて、本薬の腫瘍縮小効果が確認できなかった理由やその試験結果の再現性は不明であり、追加試験を実施しても有用な結果は得られないとする申請者の判断の根拠は妥当なものではないと考える。また、当該薬理試験では、剖検は実施されていないため、新規の毒性所見は認められていないとする申請者の説明は推測であると考え。 *in vitro* で認められた本薬のヒト悪性胸膜中皮腫由来細胞の増殖抑制効果が *in vivo* においては薬剤の毒性発現のためとして確認されておらず、一部の癌腫においては本薬の治療域は極めて狭くなっている可能性も考えられる。したがって、移植する細胞・癌腫により本薬の毒性の程度が変化することに関しては、その機序や癌腫の特異性の有無について今後も非臨床において検討していく必要があると機構は考える。

2) 本薬の細胞傷害作用に及ぼすホリナートカルシウムの影響について

機構は、本薬の *in vitro* における腫瘍由来細胞の増殖抑制に対する 5-ホルミルテトラヒドロ葉酸 (ホリナート) の阻害作用は葉酸よりも強力であることが報告されていることを踏まえ (Anticancer Res 18: 3235-3240, 1998)、本薬の毒性軽減を目的にホリナートカルシウムを使用した場合の有効性及び安全性に及ぼす影響について説明を求めた。

申請者は、以下のように回答した。

葉酸及びホリナートは、ともに葉酸代謝拮抗剤の細胞内への取り込み、ポリグルタミン酸化、標的酵素への結合の各過程に対して葉酸代謝拮抗剤と競合する。葉酸及びホリナートは、各々葉酸結合型膜タンパク質 (FBP) 及び還元型葉酸キャリア (RFC) により細胞内に取り込まれるが、輸送効率 RFC の方が遙かに高く、還元型葉酸であるホリナートは葉酸よりも速やかに細胞に取り込まれる。また、葉酸代謝拮抗剤との競合には還元型葉酸が寄与しているため、*in vitro* においては培地に葉酸を添加した場合には細胞内で還元型に