

ドキシル注 20mg

第2部 CTDの概要

2.4 非臨床試験の概括評価

ヤンセン ファーマ株式会社

目次

2.4	非臨床試験の概括評価.....	5
2.4.1	非臨床試験計画概略.....	5
2.4.2	薬理試験.....	7
2.4.3	薬物動態試験.....	10
2.4.4	毒性試験.....	13
2.4.5	総括及び結論.....	18
2.4.6	参考文献.....	20

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

JNS002 (塩酸ドキソルピシン* リポソーム注射剤; 以下, 本剤) は, 水素添加大豆ホスファチジルコリン(以下, HSPC), コレステロール及び *N*-(Carbonyl-methoxypolyethylene glycol 2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine sodium salt (Sodium MPEG-2000-Carbonyl-DSPE, 以下 MPEG-DSPE) (図 2.4.1-1) を [] として構成した脂質二重層 (リポソーム) 内にドキソルピシンを封入した静脈内投与製剤である。水性の核にドキソルピシンの [] として硫酸アンモニウムを, リポソーム外に [] として精製白糖を, [] として L-ヒスチジンを, 更に pH 調節剤として [] 及び [] を含んでいる (表 2.4.1-1)。通常のリポソームは網内系細胞に異物として認識され貪食されやすいが, 本剤の STEALTH® リポソーム (図 2.4.1-2) はその膜表面を被覆している MPEG-DSPE 由来の Methoxypolyethylene Glycol (以下, MPEG) により, 異物として認識されにくくなっているため貪食細胞によるリポソームの取り込みが抑制され, 血流中に留まり, 全身に循環する時間が延長される。本剤の STEALTH® リポソームの平均粒子径は 150 nm 以下であり, 透過性が異常に亢進した腫瘍内の毛細血管系を通じ, 腫瘍組織の間質に選択的に滲出する。腫瘍部位に蓄積した後, リポソーム膜が徐々に分解され, 腫瘍組織にドキソルピシンが放出されるものと考えられる。本剤はこのような機序により腫瘍部位への選択性を示すため, リポソームで封入していない塩酸ドキソルピシン製剤に比較し, 強い抗腫瘍効果を示すものと考えられる。更に, 本剤において血流中の遊離型ドキソルピシン濃度が抑えられるため骨髄抑制, 心毒性等の有害反応が塩酸ドキソルピシンに比較して低減しているものと考えられている。

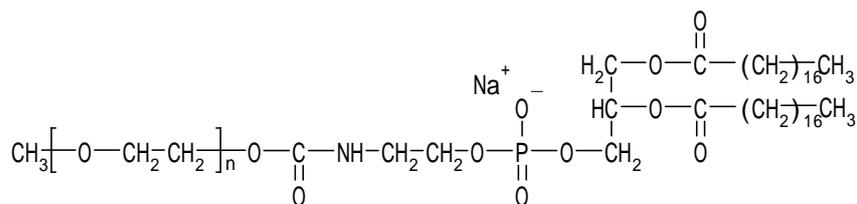


図 2.4.1-1 MPEG-DSPE の構造式

表 2.4.1-1 ドキシル注 20 mg の成分及び分量

配合目的	規格	成分	分量 (mg/vial)
有効成分	日局	塩酸ドキソルピシン	20
[]	[]	Sodium MPEG-2000-Carbonyl-DSPE (MPEG-DSPE)	31.9
[]	[]	HSPC	95.8
[]	[]	コレステロール	31.9
[]	[]	硫酸アンモニウム	20
[]	[]	精製白糖	940
[]	[]	L-ヒスチジン	15.5
pH 調節剤	[]	[]	適量
pH 調節剤	[]	[]	適量
[]	[]	注射用水	適量

* 第15改正日本薬局方ではドキソルピシン塩酸塩

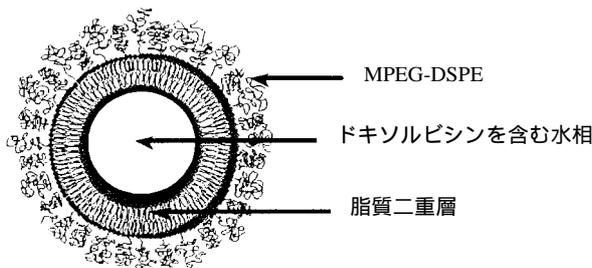


図 2.4.1-2 本剤(JNS002)の STEALTH[®]リポソームの構造

本剤の抗腫瘍剤としての開発に際して、米国での承認申請に用いた非臨床薬理、薬物動態及び毒性試験に加え、本邦の承認申請のために必要と考えられる試験を追加した。

効力を裏付ける試験として、ヒト卵巣癌細胞株の異種皮下移植モデルを用いて塩酸ドキシソルピシンと本剤の抗腫瘍効果を比較検討した。

安全性薬理試験においては、本剤及び本剤の有効成分であるドキシソルピシンを含まない STEALTH[®] プラセボリポソーム (SPL) の中枢神経系、心血管系及び呼吸系に対する作用並びに溶血性及び血液適合性を検討した。

非臨床試験での薬物動態試験として、単回及び反復投与試験を実施した。また、本剤の薬効標的的部位である卵巣への分布を含めた分布及び排泄試験に関する検討は 20███年に実施した。

非臨床毒性試験として、単回及び反復投与毒性試験、胚・胎児発生に関する試験、局所刺激性試験並びに抗原性試験を実施した。遺伝毒性試験及びがん原性試験は、本剤の有効成分である塩酸ドキシソルピシンが遺伝毒性及びがん原性を有することが明らかになっていることから、実施しなかった。

SPL については、本剤の反復投与毒性試験、胚・胎児発生に関する試験、局所刺激性試験並びに抗原性試験において溶媒対照群として投与して評価した。また、SPL の構成成分である MPEG-DSPE 及び HSPC については単回及び反復投与毒性試験を、並びに硫酸アンモニウムについては単回投与毒性試験を実施した。SPL 及び MPEG-DSPE については遺伝毒性試験を実施した。

なお、本剤の開発における初期製剤として、██████である硫酸アンモニウム濃度が低い Doxil-1 を用いて予備的な評価を行った。その後硫酸アンモニウム濃度を ███倍にし、██████として ████████を使用した Doxil-2 に処方を変更し、更に、██████を L-ヒスチジンに変更した JNS002 (Doxil-3) を最終製剤とした。JNS002 は、Doxil-2 と ████████が異なることを除いて同一の製剤である。Doxil-1、Doxil-2 及び JNS002 の組成比較を表 2.4.1-2 に示す。

表 2.4.1-2 Doxil-1、Doxil-2 及び JNS002 の組成比較 (mg/mL)

成分	Doxil-1	Doxil-2	JNS002 (Doxil-3, 本剤)
塩酸ドキシソルピシン	██████	██████	2.00
MPEG-DSPE	██████	██████	3.19
HSPC	██████	██████	9.58
コレステロール	██████	██████	3.19
硫酸アンモニウム	██████	██████	2
精製白糖	██████	██████	94
██████	██████	██████	NA
██████	██████	██████	NA
██████	██████	██████	NA
L-ヒスチジン	██████	██████	1.55
最終製剤の pH	██████	██████	6.5

NA：使用せず

2.4.2 薬理試験

効力を裏付ける試験として、本剤が抗腫瘍効果を示す投与スケジュールをマウス結腸癌細胞株 C26 の同系皮下移植モデルを用いて検討した。また、ヒト卵巣癌細胞株 HEY 及び A2780 由来アドリアマイシン(ドキソルビシン)耐性株 (A2780/AD)の異種皮下移植モデルを用いて Doxil-2 又は本剤と塩酸ドキソルビシンとの抗腫瘍効果の比較試験を行った。更に、ヒト前立腺癌細胞株 PC-3 を皮下移植したマウスを用い本剤の有効成分であるドキソルビシンの腫瘍への分布を共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて検討した。

安全性薬理試験においては、本剤及び本剤の有効成分であるドキソルビシンを含まないリポソーム (SPL) の中枢神経系、心血管系及び呼吸系に対する作用をラット及びイヌを用いて検討した。また、本剤及び SPL の溶血性及び血液適合性を調べた。更に SPL のみを用いて、中枢神経系に対する作用及び反復投与における心血管系への影響及びヒスタミン拮抗薬の影響を調べた。

表 2.4.2-1 本剤 (JNS002) に関する薬理試験(評価資料)の一覧表

試験の種類	試験系	投与方法	投与量	記載箇所
効力を裏付ける試験				
アドリアマイシン耐性ヒト卵巣癌細胞株 A2780/AD 移植マウスにおける抗腫瘍効果	マウス	静脈内	本剤：10 mg/kg	4.2.1.1.3
安全性薬理試験				
中枢神経系に対する作用 ^a (一般症状及び神経行動学的機能に及ぼす影響)	ラット	静脈内	本剤：1, 3, 9 mg/kg SPL：5 mL/kg	4.2.1.3.1
心血管系に対する作用 ^a (無麻酔, テレメトリー法)	イヌ	静脈内	本剤：1, 3 mg/kg SPL：2 mL/kg	4.2.1.3.2
呼吸系に対する作用 ^a (無麻酔)	イヌ	静脈内	本剤：1, 3 mg/kg SPL：2 mL/kg	4.2.1.3.2
溶血試験及び血液適合性(沈殿・凝集) ^a	ヒト全血, 血清, 血漿	<i>in vitro</i>	本剤：2 mg/mL 及びそれに相当する量の SPL と, 等量の血液若しくは血清又は血漿を混和	4.2.1.3.4
SPL の中枢神経系に対する作用 ^a (一般症状及び神経行動学的機能に及ぼす影響)	ラット	静脈内	SPL：原液として 1.5, 7.5, 15 mL/kg	4.2.1.3.5
SPL の心血管系に対する作用 ^a (無麻酔, テレメトリー法)	イヌ	静脈内	SPL：1 mL/kg 投与速度 0.25, 0.5, 1.0 mL/min	4.2.1.3.6

a：GLP 適合試験

表 2.4.2-2 本剤 (JNS002) 又は Doxil-2 に関する薬理試験(参考資料)の一覧表

試験の種類	試験系	投与方法	投与量	記載箇所
効力を裏付ける試験				
マウス結腸癌細胞株 C26 移植マウスにおける抗腫瘍効果	マウス	静脈内	本剤：1.5, 3.0, 6.0 mg/kg 週 1 回又は 2 回投与	4.2.1.1.1
ヒト卵巣癌細胞株 HEY 移植マウスにおける抗腫瘍効果	マウス	静脈内	Doxil-2：6 及び 9 mg/kg 塩酸ドキソルピシン ：6 及び 9 mg/kg	4.2.1.1.2
ヒト前立腺癌 PC-3 に対する抗腫瘍効果及びドキソルピシンの腫瘍組織への分布	マウス	静脈内	Doxil-2：6 及び 9 mg/kg 塩酸ドキソルピシン ：6 及び 9 mg/kg	4.2.1.1.4
薬力学的薬物相互作用試験				
ヒト卵巣癌細胞株 A2780 由来シスプラチン耐性細胞を移植したマウスにおける本剤及びゲムシタピン併用の抗腫瘍効果	マウス	静脈内	本剤：5 mg/kg/day, 7 日毎 3 回 ゲムシタピン：20 mg/kg/day 3 又は 4 日毎(腹腔内投与)	4.2.1.4.1

(1) 効力を裏付ける試験

本剤の抗腫瘍作用の検討に先立ち、正常の Balb/c マウスを用いて、耐用量の検討を行った。その結果、週 1 回静脈内投与では 12 mg/kg 以上で、週 2 回では 9 mg/kg 以上で有意な体重減少が認められた。この結果に基づき、マウス結腸癌細胞株 C26 を皮下移植したマウスに 1.5 ~ 6.0 mg/kg の本剤を週 1 回又は 2 回投与し、腫瘍増殖抑制作用及び生存期間の延長作用を調べたところ、6.0 mg/kg を週 1 回 3 週間投与した群に最も顕著な抗腫瘍効果が認められた。マウスにおいては前回の投与の毒性から回復するために 1 週間という期間が必要であると思われる、週 1 回の投与スケジュールを設定した。

ヒト卵巣癌 HEY を皮下移植したヌードマウスに対し、Doxil-2 又は塩酸ドキソルピシンの 6 mg/kg 又は 9 mg/kg を週 1 回静脈内投与し、腫瘍生着率及び腫瘍増殖抑制作用を調べた。Doxil-2 の 6 mg/kg 及び 9 mg/kg は、塩酸ドキソルピシン 6 mg/kg 及び 9 mg/kg に対し、それぞれ有意な腫瘍生着阻害及び増殖抑制作用を示し、Doxil-2 の方が高い有効性を有することが示唆された。更に、ヒト卵巣癌細胞株 A2780 由来のドキソルピシン耐性株 A2780/AD を皮下移植したヌードマウスに対し、本剤は腫瘍増殖抑制作用を示した。A2780/AD は P 糖タンパクを発現しており、ドキソルピシンに対し耐性を示すが、本剤は有効性を示した。

ヒト前立腺癌細胞株 PC-3 を皮下移植したヌードマウスを用い、Doxil-2 及び塩酸ドキソルピシンの抗腫瘍作用を調べ、両剤の有効成分であるドキソルピシンの腫瘍への集積性を比較した。Doxil-2 の 9 mg/kg は、塩酸ドキソルピシン 9 mg/kg と比較し有意な腫瘍生着阻害及び増殖抑制作用を示した。また、Doxil-2 の 9 mg/kg 投与群は移植後 64 日までに 19 匹中 18 匹生存していたが、塩酸ドキソルピシン 9 mg/kg 投与群では 20 匹中 19 匹が死亡したことからリポソームに封入することで塩酸ドキソルピシンの毒性は低下するものと考えられる。腫瘍内のドキソルピシン含有量を共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて定量すると、Doxil-2 投与群では塩酸ドキソルピシン投与群に比較して腫瘍内に長期に高濃度のドキソルピシン由来の蛍光が認められたことから、リポソームに封入することにより有効成分であるドキソルピシンを腫瘍内へ集積させることが確認された。塩酸ドキソルピシンに比べて、長期に腫瘍組織がドキソルピシンに暴露されることが抗腫瘍効果の向上に寄与しているものと推察される。

(2) 安全性薬理試験

本剤の 1, 3 及び 9 mg/kg をラットに単回静脈内投与したときの一般症状及び神経行動学的機能を FOB 法の変法を用いて観察し、中枢神経系に対する作用について検討した。本剤は 9 mg/kg まで一般症状及び神経行動学的機能に作用を示さなかったことから、中枢神経系に影響を及ぼさないことが示唆された。

本剤の1及び3 mg/kgを覚醒下のイヌに単回静脈内1時間持続投与したときの心血管に対する作用をテレメトリーシステムにより検討した。対照物質にはブドウ糖注射液及びSPLを用い被験物質と同様の方法で投与した。心血管系のパラメーターとして血圧、心拍数及び心電図に対する作用を検討した。本剤の1及び3 mg/kg並びにSPL投与群において、投与直後にすべての試験動物で、収縮期及び拡張期血圧の低下が観察された。血圧の低下は投与終了時までにはブドウ糖注射液投与群における血圧と同程度に回復する可逆的な反応であった。本剤の1及び3 mg/kg、SPL投与では、ブドウ糖注射液投与群と比較して心拍数に有意な変化はみられなかった。また、心電図の各解析ポイントにおいて心電図の波形に影響は認められず、ブドウ糖注射液投与群と比較して、PR間隔、RR間隔、QRS時間、QT間隔及びQTcに有意な変化はみられなかった。

上記の心血管系に対する本剤の作用を検討した試験において、同時に呼吸系に対する作用も検討した。すなわち、本剤の1及び3 mg/kgを覚醒下のイヌに単回静脈内1時間持続投与し、呼吸系のパラメーターとして呼吸数、動脈血pH、血液ガス分圧及びヘモグロビン酸素飽和度に対する作用を検討した。本剤の1及び3 mg/kg、SPL投与では、ブドウ糖注射液投与群と比較して呼吸数、動脈血pH、動脈血酸素分圧、動脈血炭酸ガス分圧及びヘモグロビン酸素飽和度に有意な変化はみられなかった。以上の結果より、呼吸系に対し本剤は影響を示さなかった。

SPLをイヌに反復静脈内投与し、心血管系に及ぼす影響を評価すると共に、SPLの血圧低下作用に対するヒスタミン拮抗薬の影響を調べた。9匹のイヌに1 mL/分の速度でSPLを投与したところ、投与開始後すぐに血圧と脈圧の低下が観察され、心拍数の増加も認められた。しかし、心拍数の変化は最低血圧と必ずしも同期して認められておらず、この反射性の頻脈は必ずしも投与に関連するものではないと考えられる。また、その7日後に投与速度を0.25、0.5、1.0 mL/分として、各群3匹のイヌにSPLを投与した。この範囲では投与速度の違いによる血圧の低下に差は認められなかった。また、初回のSPLの投与に比べ2回目の方が血圧の低下が大きかった。この血圧低下の機序を調べるために、ヒスタミンH₁及びH₂受容体拮抗薬の前処理を行った。この前処理により血圧の低下は生理食塩液前処理群よりも有意に軽減された。この血圧低下にはヒスタミン遊離が関与していると考えられたが、完全な血圧低下の抑制は示しておらず、心拍数の増加に対しては有意な低下は認められなかった。また、ヒスタミン拮抗薬前処理及び生理食塩液前処理群間で症状に明かな違いが認められず、紅潮などショック様症状などの所見はヒスタミン拮抗薬による前処理では軽減されなかった。

ヒト全血を用い、本剤及びSPLの溶血試験を実施したが、同容量の本剤及びSPLには溶血性は認められなかった。また、ヒト血清及び血漿を用い、本剤及びSPLの血液適合性についても調べたが、適合であると判断された。

(3) 薬力学的薬物相互作用試験

シスプラチン耐性ヒト卵巣癌細胞株A2780/CDDPをヌードマウスの皮下に移植したモデルに対する本剤の抗腫瘍効果及び代謝拮抗剤であるゲムシタピンと併用した際の抗腫瘍効果を Galloらの公表論文から引用し参考資料(4.2.1.4.1)とした。本剤とゲムシタピンを併用することにより、それぞれの単剤よりも強い抗腫瘍効果が認められた。

(4) まとめ

本剤は、SPLに塩酸ドキシソルピシンを封入することによりドキシソルピシンを腫瘍に集積させ、リポソームに封入されていない塩酸ドキシソルピシン製剤に比較して強い抗腫瘍効果を発現する。

安全性薬理試験において、本剤の中樞神経系及び呼吸系に対する影響は認められなかった。また、溶血性は認められず、血液適合性試験において適合であると判断された。心血管系に対し、本剤の投与直後より収縮期及び拡張期血圧の低下が観察されたが、この血圧低下は投与中に回復傾向が認められ、投与終了数時間後までに完全に回復する可逆的な反応であった。

2.4.3 薬物動態試験

動物における薬物動態試験の一覧を表 2.4.3-1 に示す。¹⁴C-塩酸ドキシソルピシンを STEALTH[®]リポソームに封入した JNS002 (¹⁴C-JNS002) 及び非標識体 (Doxil-1, Doxil-2 及び JNS002) を用い、JNS002 の薬物動態並びにドキシソルピシンの薬物動態に及ぼす STEALTH[®]リポソーム構成成分比及び平均粒子径の影響について検討した。また、いくつかの試験では塩酸ドキシソルピシンを用い、ドキシソルピシンの薬物動態に及ぼす STEALTH[®]リポソーム封入の影響についても検討した。

表 2.4.3-1 動物における薬物動態試験一覧

試験の種類	動物種	投与方法	投与製剤, 投与量, 雌雄	記載箇所
吸収				
単回投与： 血漿中ドキシソルピシン濃度	ラット	静脈内	JNS002 : 0.3, 1.0 mg/kg (雄)	4.2.2.2.1
単回投与： 血漿中ドキシソルピシン濃度	ラット	静脈内	Doxil-1 : 4.0, 8.0, 12.0 mg/kg (雄) Doxil-2 : 4.0, 8.0, 12.0 mg/kg (雄)	4.2.2.2.2
単回投与： 血漿中ドキシソルピシン濃度	ラット	静脈内	Doxil-250/Tris (JNS002) : 0.3 mg/kg (雄) Doxil-250/Histidine (JNS002) : 0.3 mg/kg (雄)	4.2.2.2.3
単回投与： 血漿中ドキシソルピシン濃度	ラット	静脈内	JNS002 : 1.0 mg/kg (雌雄) 塩酸ドキシソルピシン : 1.0 mg/kg (雌雄)	4.2.2.2.4
単回投与： 血漿中ドキシソルピシン濃度	ラット	静脈内	JNS002 : 1.0 mg/kg (雄)	4.2.2.2.5
単回投与： 血漿中ドキシソルピシン濃度	ウサギ	静脈内	JNS002 : 1.0 mg/kg (雄) 塩酸ドキシソルピシン : 1.0 mg/kg (雄)	4.2.2.2.6
単回投与： 血漿中ドキシソルピシン濃度	イヌ	静脈内	Doxil-1 : 1.5 mg/kg (雌雄) Doxil-2 : 1.5 mg/kg (雌雄)	4.2.2.2.7
反復投与： 血漿中ドキシソルピシン濃度	ラット	静脈内	JNS002 : 0.25, 1.0 mg/kg (雌雄) 塩酸ドキシソルピシン : 1.0 mg/kg (雌雄)	4.2.2.2.8
分布				
単回投与： 組織内ドキシソルピシン濃度	マウス	静脈内	JNS002 : 6.0 mg/kg (雄) 塩酸ドキシソルピシン : 6.0 mg/kg (雄)	4.2.2.3.1
単回投与： 組織内ドキシソルピシン濃度	マウス	静脈内	Doxil-2 : 0.9 mg/kg (不明) 塩酸ドキシソルピシン : 0.9 mg/kg (不明)	4.2.2.3.2
単回投与： 組織内ドキシソルピシン濃度	ラット	静脈内	JNS002 : 1.0 mg/kg (雌雄) 塩酸ドキシソルピシン : 1.0 mg/kg (雌雄)	4.2.2.3.3
単回投与： 組織内総放射能濃度	ラット	静脈内	¹⁴ C-JNS002 : 1.0 mg/kg (雌雄) ¹⁴ C-塩酸ドキシソルピシン : 1.0 mg/kg (雌雄)	4.2.2.3.4
反復投与： 組織内ドキシソルピシン濃度	ラット	静脈内	JNS002 : 0.25, 1.0 mg/kg (雌雄) 塩酸ドキシソルピシン : 1.0 mg/kg (雌雄)	4.2.2.3.5
反復投与： 組織内ドキシソルピシン濃度	イヌ	静脈内	JNS002 : 0.75, 1.0 mg/kg (雌雄)	4.2.2.3.6
代謝				
単回投与： 血漿中及び組織内代謝物濃度	ラット	静脈内	JNS002 : 1.0 mg/kg (雌雄) 塩酸ドキシソルピシン : 1.0 mg/kg (雌雄)	4.2.2.4.1
反復投与： 組織内代謝物濃度	ラット	静脈内	JNS002 : 0.25, 1.0 mg/kg (雌雄) 塩酸ドキシソルピシン : 1.0 mg/kg (雌雄)	4.2.2.4.2
反復投与： 組織内代謝物濃度	イヌ	静脈内	JNS002 : 0.75, 1.0 mg/kg (雌雄)	4.2.2.4.3
排泄				
単回投与： 尿中排泄 (非標識体)	ラット	静脈内	JNS002 : 1.0 mg/kg (雌雄) 塩酸ドキシソルピシン : 1.0 mg/kg (雌雄)	4.2.2.5.1
単回投与： 尿糞及び呼気中総放射能濃度	ラット	静脈内	¹⁴ C-JNS002 : 1.0 mg/kg (雌雄) ¹⁴ C-塩酸ドキシソルピシン : 1.0 mg/kg (雌雄)	4.2.2.5.2

(1) 分析法

1) 非標識体

生体試料中ドキシソルピシン濃度は、有機溶媒で除たん白又は固相抽出による前処理後、蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフィー (HPLC-FLD) 又は分光蛍光光度計 (FLD) を用いて定量した。各動物種の血漿、尿及び糞を HPLC-FLD で測定した時の定量下限は、ラット (血漿、尿及び糞) で 0.005 ~ 0.01 µg/mL 及びイヌ (血漿) で 0.005 µg/mL であった。また、各動物種の血漿を FLD で測定したときの定量下限は、マウスで 0.05 µg/mL、ラットで 0.06 µg/mL、ウサギで 0.11 µg/mL 及びイヌで 0.22 µg/mL であった。なお、ドキシソルピシンとドキシソルピシノールの response factor はほぼ等しいため、生体試料中ドキシソルピシノール濃度はドキシソルピシンの検量線を用いて定量した。

2) 標識体

生体試料中の総放射能 (TR) 濃度は液体シンチレーションカウンターを用いて定量した。検出限界はバックグラウンドの 1.4 倍とした。標識体を用いた分布及び排泄試験は ¹⁴C-塩酸ドキシソルピシン又は ¹⁴C-JNS002 を用いた。

(2) 吸収

ラット、ウサギ及びイヌに Doxil-2 又は本剤を静脈内投与したとき、いずれの動物種においても血漿中ドキシソルピシン濃度は緩やかに消失した。一方、ラット及びウサギに塩酸ドキシソルピシンを静脈内投与したとき、両動物種とも本剤投与に比べて血漿中ドキシソルピシン濃度は極めて低く、かつ速やかに消失した。本剤投与後の消失相における分布容積 (V_z) は血液容量と同程度であったのに対し、塩酸ドキシソルピシン投与後の V_z は血液容量よりはるかに高値であった。また、投与された薬物量に対する血漿中薬物量の割合 (投与量率) を推定したところ、ラットに臨床ロットの本剤を静脈内投与した 2 ~ 3 分後の投与量率はほぼ 100% であり、少なくとも投与後 96 時間にわたって、大部分の血漿中ドキシソルピシンは STEALTH[®] リポソームに封入されていることが示された。これらのことから、ドキシソルピシンを STEALTH[®] リポソームに封入することより、組織分布が制限され、安定した状態で血中を循環していることが示唆された。

本剤の構成成分比及び平均粒子径を変えた製剤をラットに単回静脈内投与し、血漿中ドキシソルピシンの薬物動態について検討したところ、MPEG-DSPE 及びコレステロール含量はドキシソルピシンの血漿中薬物動態にほとんど影響を与えなかった。一方、 \blacksquare % 以上のリソホスファチジルコリン (LPC) を含む製剤 (臨床ロットは \blacksquare % 未満) では全身クリアランス (CL) 及び V_z の有意な増加が認められた。また、平均粒子径が大きくなるに伴い CL は増加したが、1.0 mg/kg の用量では平均粒子径が \blacksquare nm までは臨床ロットと比較して V_z に有意差は認められず、0.3 mg/kg の用量では \blacksquare nm 投与群と \blacksquare nm 投与群でほぼ同様の血漿中濃度推移を示した。これらのことから、本剤の構成成分比及び平均粒子径が大きく変わるとドキシソルピシンの体内動態が変わるものの、小さな変化はその体内動態にほとんど影響を及ぼさないことが示唆された。

硫酸アンモニウム濃度が異なる製剤 (Doxil-1 及び Doxil-2) をラット及びイヌに単回静脈内投与し、血漿中ドキシソルピシンの薬物動態について検討したところ、Doxil-2 投与群に比べて Doxil-1 投与群の CL 及び V_z は高値であり、消失半減期 ($t_{1/2}$) 及び平均滞留時間 (MRT) は有意に短かった。また、ラットの投与量率を推定したところ、投与 2 ~ 3 分後における割合は、Doxil-2 投与群では約 100% であったのに対し、Doxil-1 では約 80 ~ 96% であった。これらのことから、硫酸アンモニウム濃度は STEALTH[®] リポソームからのドキシソルピシンの放出に影響を与え、その放出は Doxil-2 に比べて Doxil-1 の方が速やかであることが示唆された。

\blacksquare が異なる製剤 (Doxil-250/ \blacksquare 及び Doxil-250/Histidine) をラットに単回静脈内投与し、血漿中ドキシソルピシンの薬物動態について検討したところ、両投与群で有意差は認められず、 \blacksquare 及び Histidine の違いはドキシソルピシンの体内動態に影響を与えないことが示唆された。

ラットに本剤を 3 日に 1 回、13 回反復静脈内投与し、血漿中ドキシソルピシンの薬物動態について検討したところ、最終回投与直前と投与 72 時間後の血漿中濃度はほぼ同様であったことから、

最終回投与ではほぼ定常状態に達していることが示唆された。定常状態における分布容積 (V_{ss}) 及び V_z は初回及び最終回ともに同様の値を示したが、 $t_{1/2}$ 及び MRT は初回に比べて最終回で長く、CL は減少した。これらのことから、本剤を反復投与することにより、ドキソルビシンの体内からの消失は遅延することが示唆された。

(3) 分布

マウス結腸癌由来 C26 細胞を移植したマウスに本剤又は塩酸ドキソルビシンを単回静脈内投与し、組織内ドキソルビシン濃度を測定したところ、塩酸ドキソルビシン投与群に対する本剤投与群の組織内 AUC 比は、脾臓で 1.8、腎臓で 2.4、肝臓で 3.2、心臓で 3.8 及び腫瘍で 7.0 であった。また、ヒト前立腺癌由来 PC-3 細胞を移植したマウスに Doxil-2 又は塩酸ドキソルビシンを単回静脈内投与し、組織内ドキソルビシン濃度を測定したところ、塩酸ドキソルビシン投与群に対する Doxil-2 投与群の肝臓、腎臓及び腫瘍内濃度 (% of dose) 比は、投与 1 時間後ではそれぞれ 1.3、2.5 及び 3.0 であり、投与 24 時間後ではそれぞれ 10、3.0 及び 80 であった。これらのことから、塩酸ドキソルビシンを STEALTH[®] リポソームに封入して投与することにより、ドキソルビシンの腫瘍選択性が高まることが示された。

ラットに本剤又は塩酸ドキソルビシンを単回静脈内投与し、組織内ドキソルビシン濃度を測定したところ、本剤投与群の各組織内濃度は塩酸ドキソルビシン投与群に比べて遅延した推移を示し、投与後短時間では塩酸ドキソルビシン投与群に比べて本剤投与群の方が有意に低値であったが、投与後長時間経過すると有意に高値であった。これらの結果は、塩酸ドキソルビシン投与群に比べて本剤投与群で V_z が小さいこと及び $t_{1/2}$ が長いことと一致している。

ラットに ¹⁴C-JNS002 又は ¹⁴C-塩酸ドキソルビシンを単回静脈内投与した試験においても、非標識体と同様の結果が得られた。また、本剤は雄性生殖器より、雌性生殖器 (標的部位の卵巣を含む) に高濃度に分布することが示された。

ラットに本剤を 3 日に 1 回、13 回反復静脈内投与したとき、皮膚に損傷が認められ、損傷皮膚内ドキソルビシン濃度は正常皮膚に比べて高値であった。皮膚毒性は塩酸ドキソルビシンの持続投与時にもみられる毒性であり、ドキソルビシンを低濃度で長時間曝露することにより発症すると考えられている¹⁾。

(4) 代謝

ドキソルビシンは、肝臓でカルボニル還元酵素により主代謝物であるドキソルビシノールに代謝されるが²⁾、ラットに本剤又は塩酸ドキソルビシンを単回又は 3 日に 1 回、13 回反復静脈内投与したとき、血漿中及び組織内ドキソルビシノール濃度はいずれも定量下限未満 (BLQ) であった。この結果は、本剤投与群の CL が小さいことと一致しているが、塩酸ドキソルビシンを同様に投与したときも血漿中及び組織内ドキソルビシノール濃度はいずれも BLQ であったことから、用量及び定量下限も関連しているものと考えられる。

(5) 排泄

ラットに本剤又は塩酸ドキソルビシンを単回静脈内投与し、尿糞中ドキソルビシン濃度を測定したところ、本剤投与群における投与 72 時間後までの尿中排泄率は約 3% であり、投与後 48 ~ 72 時間で最も排泄率が高かった。一方、塩酸ドキソルビシン投与群における投与 72 時間後までの尿中排泄率は約 8% であり、投与後 0 ~ 24 時間で最も排泄率が高かった。

塩酸ドキソルビシンの主排泄経路は胆汁中であり、未変化体及び数種の代謝物が糞中より排泄されると報告されているが³⁾、非標識体を用いた排泄試験において、糞中にドキソルビシンは検出されなかった。この原因の 1 つとして、腸内細菌叢によりドキソルビシンの蛍光発色基が分解され、本試験で用いた蛍光測定法では検出されなかったことが考えられる。

ラットに ¹⁴C-JNS002 又は ¹⁴C-塩酸ドキソルビシンを単回静脈内投与したときのマスバランスについて検討したところ、両投与群ともに性差は認められず、主排泄経路は糞中であった。

2.4.4 毒性試験

ラット及びイヌ単回投与毒性試験は、Doxil-2 を用いて実施した。ラット及びイヌ反復投与毒性試験、ラット及びウサギ生殖発生毒性試験（胚・胎児発生に関する試験）並びに局所刺激性試験、抗原性試験は最終製剤である JNS002 を用いて実施した（表 2.4.4-1）。これらの試験は、ASA（追加試験）を除いてすべて GLP を遵守して実施した。JNS002 及び Doxil-2 の投与用量は、すべて塩酸ドキシソルピシン量として示した。

表 2.4.4-1 本剤を用いた毒性試験の一覧表

試験の種類	試験系	投与方法	投与量 (mg/kg)	記載箇所
単回投与毒性試験	ラット ^{a)}	静脈内	雄：0, 4, 8, 12	4.2.3.1.8
	イヌ ^{a)}	静脈内	雌雄：0, 1.5, 1.8, 2.1	4.2.3.1.11
反復投与毒性試験				
(13回：1回/3日)	ラット	静脈内	雌雄：0, 0.25, 1.0, 1.5 塩酸ドキシソルピシン 1.0 SPL ^{d)}	4.2.3.2.3
(10回：1回/3週)	イヌ	静脈内	雌雄：0, 0.25, 0.75, 1.0 塩酸ドキシソルピシン 1.0 SPL ^{e)}	4.2.3.2.7
生殖発生毒性試験				
(胚・胎児発生)	ラット ^{b)}	静脈内	雌：0, 0.1, 0.5, 1.0 塩酸ドキシソルピシン 0.2, 0.4 SPL ^{e)}	4.2.3.5.2.1
	ウサギ ^{c)}	静脈内	雌：0, 0.5, 1.5, 2.5	4.2.3.5.2.2
局所刺激性試験	ウサギ	静脈内	雄：生理食塩液, JNS002, 塩酸ドキシソルピシン, SPL; 0.1, 1.0mL	4.2.3.6.1
	ウサギ	皮下	雄：生理食塩液, JNS002, 塩酸ドキシソルピシン, SPL; 0.1, 1.0mL	4.2.3.6.2
抗原性試験				
ASA	モルモット	感作：皮下, 静脈内 惹起：静脈内	雄：感作 0.16, 0.8 惹起 5	4.2.3.7.1.1
PCA	モルモット	感作：皮内 惹起：静脈内	雄：感作 ASA 感作動物から 採取した血清 惹起 5	
ASA (追加試験)	モルモット	感作：静脈内 惹起：静脈内	雄：感作 0.8 惹起 5	4.2.3.7.1.2

a) : Doxil-2, b) : 妊娠 6, 9, 12 及び 15 日に投与, ただし塩酸ドキシソルピシン群は妊娠 6-15 日まで連日投与

c) : 妊娠 6, 9, 12, 15 及び 18 日に投与, d) : JNS002 の 1.5 mg/kg と同量, e) : JNS002 の 1.0 mg/kg と同量

(1) 単回投与毒性試験

ラット及びイヌを用いて Doxil-2 の単回静脈内投与毒性試験を実施した。

雄ラットに Doxil-2 を 4, 8 及び 12 mg/kg の用量で単回静脈内投与した。その結果, 12 mg/kg 群の 4/10 例, 8 mg/kg 群の 1/10 例が一般状態の悪化を示し, 観察期間中に死亡した。したがって, 雄ラットにおける概略の致死量は 8 mg/kg であると判断した。一般状態の変化として, 尾部, 足蹠, 陰囊などの皮膚障害, 陰茎突出, 嗜眠, 円背位及び呼吸困難などが, 更に血液学及び血液生化学的検査値の変動も認められた。これらの所見は, 生存例では観察期間中に回復性を示した。

イヌに Doxil-2 を 1.5, 1.8 及び 2.1 mg/kg の用量で単回静脈内投与した。その結果, 試験 28 日に 2.1 mg/kg 群の雌 1/3 例を投与部位の重篤な障害（腫脹, 炎症及び出血）のため切迫屠殺した。以上のことから, 概略の致死量は雄が 2.1 mg/kg 超, 雌が 2.1 mg/kg と判断した。一般状態の変化

として、便の異常、皮膚障害、赤色尿、活動性低下、消瘦、冷触感などが、更に血液学及び血液生化学的検査値の変動も認められた。これらの所見は、生存例では観察期間中に回復性を示した。

(2) 反復投与毒性試験

ラットに JNS002 を 0.25, 1.0 及び 1.5 mg/kg の用量で 3 日に 1 回の投与頻度で計 13 回、反復静脈内投与した。また、対照群として生理食塩液群, SPL 群及び塩酸ドキシソルピシン (1.0 mg/kg) 群を設けて、同様に投与した。その結果、生理食塩液及び SPL 群では投与に起因する毒性所見は認められなかった。1.5 mg/kg 群では 8 回投与時 (試験 22 日) に雄 7/15 例, 雌 1/15 例を切迫屠殺したため、生存例の投与を中止しその後の評価から除外した。また、1.0 mg/kg 群の雌 1/15 例を一般状態悪化のため試験 36 日に切迫屠殺した。更に、塩酸ドキシソルピシン 群の雄 2/15 例が試験 66 日及び 68 日に死亡した。一般状態観察では、1.0 mg/kg 群で皮膚障害及び接触過敏などが認められた。0.25 mg/kg 群で認められた皮膚障害は軽度であった。これらの所見は、休薬期間終了時にはほとんど回復した。体重増加量及び摂餌量の減少が、1.0 mg/kg 群と塩酸ドキシソルピシン群に認められた。血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査及び病理組織学的検査結果から、塩酸ドキシソルピシンと比較して JNS002 は腎臓、心臓、骨髄に対する影響が軽度であることが示された。一方、皮膚障害は JNS002 の方が強く認められ、精巣及び神経に対する影響は JNS002 と塩酸ドキシソルピシンで同程度であった。

以上の結果から、ラットにおける JNS002 の無毒性量は 0.25 mg/kg 未満と判断した。

イヌに JNS002 を 0.25, 0.75 及び 1.0 mg/kg の用量で 3 週に 1 回の投与頻度で、計 10 回反復静脈内投与した。また、対照群として生理食塩液群, SPL 群及び塩酸ドキシソルピシン (1.0 mg/kg) 群を設けて、同様に投与した。その結果、いずれの投与群においても、被験物質投与に起因した死亡は認められなかった。SPL 群で初回投与時に粘膜の蒼白化、嘔吐及び活動性低下が散見されたため、全群で投与速度を減少した。0.75 mg/kg 以上の群で体重増加量と摂餌量の減少傾向が認められた。0.75 mg/kg 以上の群の全例で、多くの部位に皮膚の障害及び色素沈着が認められ、その後同じ部位に脱毛が認められた。皮膚障害の多くは休薬期間中に回復したが、脱毛は継続的に認められた。投与終了時の病理組織学的検査で塩酸ドキシソルピシン群の全例に心筋細胞の空胞変性が認められ、4 週間の休薬期間終了後には心臓毒性がより重篤に認められた。一方、JNS002 群ではいずれの剖検時にも心臓に対する影響は認められなかった。塩酸ドキシソルピシン群では雄 1/6 例及び雌 2/6 例に骨髄細胞の減少が観察されたが、JNS002 群では骨髄に対する影響は認められなかった。したがって、塩酸ドキシソルピシンに比べ JNS002 は心臓及び骨髄に対する影響が弱いことが示された。一方、精巣に対する影響は JNS002 と塩酸ドキシソルピシンで同程度であった。

以上の結果から、イヌにおける JNS002 の無毒性量は 0.25 mg/kg 未満と判断した。

(3) 遺伝毒性試験

JNS002 の有効成分である塩酸ドキシソルピシンは遺伝毒性を有することが報告されていることから、JNS002 を用いた遺伝毒性試験は実施していない。

(4) がん原性試験

JNS002 の有効成分である塩酸ドキシソルピシンは細胞毒性を有する抗がん剤であることから、JNS002 を用いたがん原性試験を実施していない。

(5) 生殖発生毒性試験

1) ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験

妊娠ラットに JNS002 を 0.1, 0.5 及び 1.0 mg/kg の用量で妊娠 6 日から 3 日に 1 回、計 4 回 静脈内投与し、胎児の器官形成に及ぼす影響を検討した。対照群として、生理食塩液群及び SPL 群に加え、塩酸ドキシソルピシンを 0.2 及び 0.4 mg/kg の用量で妊娠 6 日～15 日まで 1 日 1 回静脈内投

与する群を設けた。その結果，SPL 群及び 0.1 mg/kg 群の母動物及び胎児に被験物質投与に起因する毒性所見は認められなかった。母動物には，0.5 mg/kg 以上の群で体重増加量及び摂餌量の減少が認められた。胎児への影響としては，1.0 mg/kg 群において生存胎児体重の減少，生存胎児数の減少及び吸収胚率の増加が認められ，胎児毒性が示された。また，同群の胎児に化骨遅延が認められたが，胎児の発育遅延に起因するものと推察された。一方，塩酸ドキシソルピシン群では胎児への影響は認められなかった。

2) ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験

妊娠ウサギに JNS002 を 0.5，1.5 及び 2.5 mg/kg の用量で妊娠 6 日から 3 日に 1 回，計 5 回静脈内投与し，胎児の器官形成に及ぼす影響を検討した。対照群として生理食塩液群を設けた。1.5 及び 2.5 mg/kg 群において，それぞれ 1/5 例及び 3/5 例が妊娠後期に死亡した。また，0.5 mg/kg 群では全例が流産したため切迫屠殺したところ，全例に吸収胚が認められた。1.5 及び 2.5 mg/kg 群の母動物についても生存胎児は認められず，すべて吸収胚であった。以上の結果から，JNS002 はウサギに対して流産誘発作用及び胚・胎児致死作用を有することが示唆された。

(6) 局所刺激性試験

JNS002 を静脈内及び皮下投与したときの局所刺激性試験を実施した。ウサギに 0.1 又は 1.0 mL の JNS002 (2.0 mg/mL)，塩酸ドキシソルピシン (2.0 mg/mL) 及び SPL を単回静脈内又は皮下投与した。静脈内投与においては JNS002，塩酸ドキシソルピシン及び SPL の忍容性は良好で，肉眼的及び病理組織学的検査において刺激性は認められなかった。JNS002 の皮下投与後に，投与部位に用量依存性に極微から中等度の炎症などが認められたが，回復傾向が示された。これに対し，塩酸ドキシソルピシン投与後にはより重篤かつ進行性の所見が認められた。SPL は皮下投与による刺激性が認められなかった。これらの試験結果から，JNS002 は塩酸ドキシソルピシンと比較して局所刺激性が弱いことが示された。

(7) その他の毒性試験

1) 抗原性試験

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

2) 毒性の発現機序に関する試験

イヌを用いて JNS002 の反復静脈内投与における皮膚障害及び骨髄抑制の発現とその程度を検討した。その結果，JNS002 投与時の皮膚障害の発現率及び重篤度は，JNS002 の投与間隔を延長させることにより軽減されることが示された。

また，ウサギを用いて JNS002 の反復静脈内投与における心臓毒性の発現とその程度について，塩酸ドキシソルピシンと比較検討した。その結果，JNS002 は塩酸ドキシソルピシンの累積投与量と同量及び 1.5 倍量を投与しても，塩酸ドキシソルピシンより心臓毒性が弱いことが示された。

3) 新添加物に関する試験

a) SPL

本剤で使用している SPL は新規の医薬品添加物を含有することから，*in vitro* 及び *in vivo* の遺伝毒性試験を実施した。更に，ラット及びイヌ反復静脈内投与毒性試験，ラット胚・胎児発生に関する試験，局所刺激性試験並びに抗原性試験において，溶媒対照群として SPL 群を設け，SPL の毒性について評価した (表 2.4.4-2)。

表 2.4.4-2 SPL を用いた毒性試験の一覧表

試験の種類	試験系	投与方法	投与量	記載箇所
反復投与毒性試験 (13回:1回/3日)	ラット	静脈内	雌雄: JNS002 の 1.5 mg/kg と同量	4.2.3.2.3
(10回:1回/3週)	イヌ	静脈内	雌雄: JNS002 の 1.0 mg/kg と同量	4.2.3.2.7
遺伝毒性試験 (復帰突然変異試験)	ネズミチフス菌	<i>in vitro</i>	410, 273, 137, 41.0, 27.2, 13.7 µg/plate ^{a)}	4.2.3.7.7.3.1
(マウスリンフォーマ TK 試験)	L5178Y TK ^{+/+} 細胞	<i>in vitro</i>	41.0, 20.5, 10.3, 5.13, 2.56, 1.28 µg/mL ^{a)}	4.2.3.7.7.3.2
(染色体異常試験)	CHO 細胞	<i>in vitro</i>	41.0, 30.8, 20.5, 10.3 µg/mL ^{a)}	4.2.3.7.7.3.3
(小核試験)	マウス	静脈内	雌雄: 2.05, 4.10, 8.20 mg/kg ^{a)}	4.2.3.7.7.3.4
生殖発生毒性試験 (胚・胎児発生)	ラット ^{b)}	静脈内	雌: JNS002 の 1.0 mg/kg と同量	4.2.3.5.2.1
局所刺激性試験	ウサギ	静脈内	雄: 0.1, 1.0mL	4.2.3.6.1
	ウサギ	皮下	雄: 0.1, 1.0mL	4.2.3.6.2
抗原性試験 ASA (追加試験)	モルモット	感作: 静脈内 惹起: 静脈内	雄: 感作 JNS002 の 0.8 mg/kg と同量 ^{c)} 惹起 JNS002 の 5 mg/kg と同量 ^{c)}	4.2.3.7.1.2

a): 脂質中のリン量として, b): 妊娠 6, 9, 12 及び 15 日に投与

c): SPL 感作動物を JNS002 で惹起する群, 及び JNS002 感作動物を SPL で惹起する群を含む

その結果, SPL に遺伝毒性は認められなかった。イヌ反復静脈内投与毒性試験において投与速度に起因すると考えられる急性反応が認められたが, 投与速度を減少することで発現頻度と重篤度が減少した。その他, SPL に起因する所見は認められなかった。ラット反復静脈内投与毒性試験, ラット胚・胎児発生に関する試験, 局所刺激性試験及び抗原性試験においても, SPL 投与に起因すると考えられる所見は認められなかった。

b) SPL の構成成分

SPL の構成成分のうち, MPEG-DSPE, HSPC, コレステロール及び硫酸アンモニウムについては, 静脈内投与における医薬品添加物としての使用経験がないことから, これらの構成成分の静脈内投与における影響について検討した。なお, これらの構成成分はリポソームを形成する脂質であるか, リポソーム内の水相に封入されているため, 本剤の投与においてこれらの構成成分がフリー体として急激に血中濃度の上昇を示すことはないと考えられる。

MPEG-DSPE

MPEG-DSPE のラット単回静脈内投与における概略の致死量は雌雄とも 1000 mg/kg, ラット 2 週間反復静脈内投与における無毒性量は雌雄とも 100 mg/kg/日と判断され, この用量は臨床における 1 回投与量の約 420 及び 42 倍である。また, 復帰突然変異試験及び染色体異常試験結果は陰性であった。

HSPC

HSPC リポソーム溶液のラット単回静脈内投与における概略の致死量は雌雄とも 672 mg/kg 超, ラット 2 週間反復静脈内投与における無毒性量は雌雄とも 33.6 mg/kg/日と判断され, この用量は臨床における 1 回投与量の約 90 及び 5 倍である。

本剤の 1 回投与における HSPC の総投与量は血中リン脂質濃度の 10% 以下であり, リン脂質の生理的日内変動以内の用量であることから, 本剤投与により HSPC が生体に対して影響することはほとんどないと考えられる。

コレステロール

本剤の1回投与におけるコレステロールの総投与量は血中コレステロール濃度の10%以下であり、生理的日内変動以内の用量であることから、本剤投与によりコレステロールが生体に対して影響することはほとんどないと考えられる。

硫酸アンモニウム

硫酸アンモニウムのラット単回静脈内投与における概略の致死量は雌雄とも300 mg/kgであり、臨床における1回投与量の約200倍である。更に、硫酸アンモニウムは遺伝毒性を示さず、13週間のラット混餌投与における無影響量は雄で886 mg/kg/日、雌で1975 mg/kg/日であることが示されている。

(8) 考察及び結論

1) 毒性の標的器官

a) 単回静脈内投与毒性

ラット及びイヌにDoxil-2を単回静脈内投与した結果、Doxil-2に起因する所見として皮膚障害、一般状態の悪化、体重減少並びに赤血球パラメータ及び白血球数の減少が認められた。イヌでは便の異常も認められた。

b) 反復静脈内投与毒性

JNS002をラットに3日に1回の投与間隔で計13回、及びイヌに3週に1回の投与間隔で計10回、反復静脈内投与した。その結果、ラットにおいては皮膚障害、精巣毒性、心臓毒性、骨髄抑制、神経障害が認められた。イヌにおいては皮膚障害、精巣毒性が認められた。精巣毒性は休薬後も持続して認められ、心臓毒性及び神経障害は休薬後に発現又は重篤化が認められたが、その他の所見は休薬により回復性を示した。JNS002群では同用量の塩酸ドキシソルピシン群と比較して、心臓毒性及び骨髄抑制が軽度であり、塩酸ドキシソルピシン群で認められた腎臓毒性はJNS002群では認められなかった。

c) 心臓毒性

ラット及びイヌにおける反復静脈内投与試験において、病理組織学的検査結果から、JNS002は同用量の塩酸ドキシソルピシンと比較して心臓毒性が軽度であることが示された。更に、ウサギを用いてJNS002と塩酸ドキシソルピシンの心臓毒性を比較検討した。その結果、JNS002は塩酸ドキシソルピシンの累積投与量と同量及び1.5倍量を投与しても、塩酸ドキシソルピシンより心臓毒性が弱いことが示された。

d) 骨髄毒性

ラット及びイヌにおける反復静脈内投与試験において、血液学的検査及び病理組織学的検査結果から、JNS002の骨髄抑制は同用量の塩酸ドキシソルピシンよりも軽度であることが示された。イヌを用いたJNS002の皮膚障害及び骨髄抑制の発現機序に関する試験において、JNS002投与全群で白血球数の減少は認められず、高用量群で軽度なヘモグロビン量及びヘマトクリット値の減少が認められたが、休薬により回復性が認められた。したがって、JNS002による骨髄毒性は可逆性の軽度な所見であることが示された。

e) 腎臓毒性

ラット反復静脈内投与試験において、塩酸ドキシソルピシン群では慢性進行性腎症が発現した。一方、JNS002は腎臓に対する影響が認められなかった。

f) 皮膚毒性

本剤の単回及び反復静脈内投与試験において皮膚障害が認められ、病理組織学的検査において炎症等の所見が認められたが、休薬により回復性を示した。また、投与間隔を延長することで皮膚障害の程度が軽減した。一方、皮下投与による局所刺激性試験において、塩酸ドキソルピシンの局所刺激性は JNS002 よりも重篤かつ進行性であることが示された。これらのことから、JNS002 投与時の皮膚障害は有効成分である塩酸ドキソルピシンに起因すると考えられる。

SPL に塩酸ドキソルピシンを封入した JNS002 は、腫瘍組織等の血管新生部位に対して低濃度のドキソルピシンを長時間曝露させる⁴⁾。また、静脈内投与とされ血管外に漏出した塩酸ドキソルピシンは皮膚障害を惹起するが、その損傷した組織を修復するための血管新生に伴い血管内皮増殖因子が分泌されることで、血管透過性も上昇する⁵⁾と考えられる。更に、JNS002 投与により損傷皮膚においてドキソルピシンの蓄積が認められる⁶⁾。以上のことから、JNS002 の反復静脈内投与時には塩酸ドキソルピシンと比較して、皮膚障害が強く発現したと推察される。

g) 生殖発生毒性

ラット及びウサギを用いて胚・胎児発生に関する毒性を検討した結果、ラットにおいて、胎児体重の減少、生存胎児数の減少及び胚吸収率の増加が認められたことから、JNS002 の胎児毒性が示された。また、胎児の化骨遅延も認められ、胎児の発育遅延に起因する所見と考えられた。ウサギでは、胚・胎児毒性及び流産誘発作用があることが示唆された。

本剤の有効成分である塩酸ドキソルピシンは雄ラットにおいて精巣重量減少及び精子形成に影響を及ぼし、授胎能を低下させることが報告されており⁷⁾、本剤のラット及びイヌの反復投与毒性試験においても、病理組織学的検査で精巣萎縮が認められた。一方、雌性生殖器に影響は認められなかった。

2) 塩酸ドキソルピシンとの類似点及び相違点

各動物実験において、JNS002 投与後に認められた毒性は、塩酸ドキソルピシンの既知の毒性と同様であったが、心臓毒性、骨髄毒性及び腎臓毒性は同用量の塩酸ドキソルピシンよりも軽度であった。JNS002 は塩酸ドキソルピシンがリポソーム内に封入されたまま長時間にわたり血中を循環し、リポソームから塩酸ドキソルピシンが徐々に放出されるため、塩酸ドキソルピシン投与時と比較して、JNS002 投与時には毒性が軽度であったと考えられる。

一方、JNS002 投与動物に皮膚障害が認められたが、塩酸ドキソルピシン投与動物には認められなかった。しかしながら、皮膚障害は塩酸ドキソルピシンにおいても血管外に漏出した際に認められる所見であり⁸⁾、塩酸ドキソルピシンの持続静脈内投与時に認められることが知られている⁹⁾。また、精巣毒性に関しては JNS002 と塩酸ドキソルピシン間で差は認められなかった。

以上のように、JNS002 の副作用の特徴として、塩酸ドキソルピシンと比較し心臓毒性、腎臓毒性及び骨髄抑制の減弱と、皮膚障害の増強が認められた。

2.4.5 総括及び結論

2.4.5.1 本剤の特徴

非臨床薬理試験の結果：

- 1) 正常の Balb/c マウスを用いて、耐用量の検討を行った結果、週 1 回静脈内投与では 12 mg/kg 以上で、週 2 回では 9 mg/kg 以上で有意な体重減少が認められた。この結果に基づき、マウス結腸癌細胞株 C26 を皮下移植したマウスに 1.5 ~ 6.0 mg/kg の本剤を週 1 回又は 2 回投与し、腫瘍増殖抑制作用及び生存期間の延長作用を調べたところ、6.0 mg/kg を週 1 回 3 週間投与した群に最も顕著な抗腫瘍効果が認められた。

- 2) ヒト卵巣癌細胞株 HEY 及び A2780/AD (A2780 由来ドキソルビシン耐性株) の異種皮下移植モデルを用いて抗腫瘍効果を検討したところ, Doxil-2 又は本剤は両株に対し溶媒対照群と比較して有意な増殖抑制作用を認め, 更に塩酸ドキソルビシンと比較しても有意に強い増殖抑制作用が認められた。
- 3) ヒト前立腺癌細胞株 PC-3 を皮下移植したマウスを用い本剤の有効成分であるドキソルビシンの腫瘍への分布を共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて検討した。Doxil-2 投与群では, 塩酸ドキソルビシン投与群と比較して腫瘍内に長期間かつ高濃度にドキソルビシン由来の蛍光が検出され, 腫瘍への高い集積性が確認された。
- 4) 本剤及び SPL の中枢神経系, 心血管系及び呼吸系に対する作用をラット又はイヌを用いて検討した。中枢神経系及び呼吸系に対し本剤及び SPL は影響を示さなかった。
- 5) 心血管系に対し, 本剤及び SPL 投与群のすべての動物で, 投与直後から収縮期及び拡張期血圧の低下が観察された。血圧の低下は投与終了時までにはブドウ糖注射液投与群の血圧と同程度に回復する可逆的な反応であった。また, 心電図の波形に影響は認められず, ブドウ糖注射液投与群と比較して, PR 間隔, RR 間隔, QRS 時間, QT 間隔及び QTc には有意な変化はみられなかった。
- 6) 本剤及び SPL の溶血性及び血液適合性を調べた結果, 溶血性は認められず, 血液適合性試験において適合であると判断された。
- 7) SPL のみを用いて, 反復投与における心血管系への影響及び抗ヒスタミン剤の影響を調べた。SPL を 1 回目に投与した際の血圧低下よりも, 2 回目の方が最低平均動脈圧, 最低拡張期血圧及び最低収縮期血圧のいずれの低下も大きかった。抗ヒスタミン剤の前処理により, SPL による血圧低下は部分的に抑制されたが, 完全な血圧低下の抑制は示しておらず, 心拍数の増加に対しては有意な低下は認められなかった。

非臨床薬物動態試験の結果：

- 1) ラット, ウサギ及びイヌに STEALTH[®]リポソームに封入した塩酸ドキソルビシンを投与したとき, いずれの動物種においても血漿中ドキソルビシン濃度は緩やかに消失した。また, ラット及びウサギでは, STEALTH[®]リポソームに封入していない塩酸ドキソルビシン投与時に比べて血漿中ドキソルビシン濃度は高濃度に推移した。更に, ラットでは少なくとも投与後 96 時間にわたって, 大部分の血漿中ドキソルビシンは STEALTH[®]リポソームに封入されていることが示された。
- 2) ラットに本剤を 3 日に 1 回, 13 回反復静脈内投与したとき, ドキソルビシンの体内からの消失は初回投与時に比べ遅延することが示唆された。また, 皮膚に損傷が認められ, 損傷皮膚内ドキソルビシン濃度は正常皮膚に比べて高値であった。
- 3) 担癌マウスに STEALTH[®]リポソームに封入した塩酸ドキソルビシンを単回静脈内投与したとき, STEALTH[®]リポソームに封入していない塩酸ドキソルビシン投与時に比べて腫瘍選択性が高まることが示唆された。
- 4) ラットに本剤又は塩酸ドキソルビシンを単回静脈内投与したとき, 組織内ドキソルビシン濃度は, 投与後短時間では塩酸ドキソルビシン投与群の方が高値であったが, 投与後長時間経過すると本剤投与群の方が高値であった。
- 5) ラットに ¹⁴C-JNS002 又は ¹⁴C-塩酸ドキソルビシンを単回静脈内投与したとき, 総放射能は ¹⁴C-JNS002 投与群では血液, 血漿及び脾臓に, ¹⁴C-塩酸ドキソルビシン投与群では腎臓, 脾臓, 肝臓及び甲状腺に高濃度に分布した。また, 両投与群ともに, 雄性生殖器より雌性生殖器 (標的部位の卵巣を含む) に高濃度に分布することが示された。
- 6) ラットに本剤又は塩酸ドキソルビシンを単回静脈内投与したとき, ドキソルビシンの尿中排泄率は, 塩酸ドキソルビシン投与群では投与後 0~24 時間で最も高かったのに対し, 本剤投与群では投与後 48~72 時間で最も高かった。

- 7) ラットに ^{14}C -JNS002 又は ^{14}C -塩酸ドキソルビシンを単回静脈内投与したとき、主排泄経路は糞中であった。

非臨床毒性試験の結果：

- 1) 単回静脈内投与における概略の致死量は、雄ラットで 8 mg/kg, 雄イヌで 2.1 mg/kg 超, 雌イヌで 2.1 mg/kg であった。主な所見として、皮膚障害, 一般状態の悪化, 並びに血液学及び血液生化学的検査値の変動が認められたが、生存例では観察期間中に回復性を示した。
- 2) ラット反復静脈内投与毒性試験において皮膚障害, 心臓毒性, 骨髄抑制, 精巣毒性及び神経毒性が認められた。イヌ反復静脈内投与毒性試験においては、皮膚障害及び精巣毒性が認められた。
- 3) 反復静脈内投与毒性試験及び毒性の発現機序に関する試験により、本剤は同用量の塩酸ドキソルビシンと比較して心臓毒性, 骨髄毒性及び腎臓毒性が軽度であることが示された。本剤は塩酸ドキソルビシンがリポソーム内に封入されたまま長時間にわたり血中を循環し、リポソームから塩酸ドキソルビシンが徐々に放出されるため、塩酸ドキソルビシンと比較して毒性が軽度であったと推察される。
- 4) 反復静脈内投与により、本剤は塩酸ドキソルビシンと比較して皮膚障害の増強が認められたが、投与間隔を延長することにより皮膚障害は軽減した。本剤投与時には血管新生部位に対して低濃度のドキソルビシンを長時間曝露させること、及び損傷皮膚においてドキソルビシンの蓄積が認められることにより、塩酸ドキソルビシンと比較して皮膚障害がより強く認められたと推察される。
- 5) 胚・胎児発生に関する試験において、ラットでは胎児体重の減少, 生存胎児数の減少及び吸収胚率の増加が認められ、胎児毒性が示された。また、ウサギでは本剤投与全例で吸収胚を示し、流産誘発作用及び胚・胎児致死作用が示唆された。一方、雌性生殖器に対する影響は認められなかった。
- 6) SPL に起因する所見として、イヌ反復静脈内投与毒性試験において投与速度に起因すると考えられる急性反応が認められたが、投与速度を減少することで発現頻度と重篤度が減少した。その他、ラット反復静脈内投与毒性試験、遺伝毒性試験、ラット胚・胎児発生に関する試験、局所刺激性試験及び抗原性試験において、SPL に起因する所見は認められなかった。

非臨床試験において、塩酸ドキソルビシンを STEALTH[®]リポソームに封入した本剤はドキソルビシンの体内動態を顕著に変化させることが確認され、特にリポソームで封入されていない塩酸ドキソルビシンに比較し腫瘍部位への選択性が認められ、その結果強い抗腫瘍効果を示した。塩酸ドキソルビシンに比較して皮膚障害の増強が観察されたものの、骨髄毒性、腎臓毒性、心臓毒性等の有害反応の低減が認められた。

2.4.6 参考文献

- 1) Samuels BL, Vogelzang NJ, Ruane M, Simon MA. Continuous venous infusion of doxorubicin in advanced sarcomas. *Cancer Treat Rep.* 1987; 71: 971-2.
- 2) Arnold RD, Slack JE, Straubinger RM. Quantification of doxorubicin and metabolites in rat plasma and small volume tissue samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectroscopy. *J Chromatogr B.* 2004; 808: 141-52.
- 3) Tavoloni N, Guarino AM. Disposition and metabolism of adriamycin in the rat. *Pharmacology.* 1980; 21: 244-55.
- 4) Maeda N, Takeuchi Y, Takada M, Sadzuka Y, Namba Y, Oku N. Anti-neovascular therapy by use of tumor neovasculature-targeted long-circulating liposome. *J Control Release.* 2004;100:41-52.

- 5) Cornali E, Zietz C, Benelli R, Weninger W, Masiello L, Breier G, et al. Vascular endothelial growth factor regulates angiogenesis and vascular permeability in Kaposi's sarcoma. *Am J Pathol.* 1996; 149: 1851-69.
- 6) Amantea M, Newman MS, Sullivan TM, Forrest A, Working PK. Relationship of dose intensity to the induction of palmar-plantar erythrodysesthia by pegylated liposomal doxorubicin in dogs. *Hum Exp Toxicol.* 1999;18:17-26.
- 7) Kato M, Makino S, Kimura H, Ota T, Furuhashi T, Nagamura Y. Sperm motion analysis in rats treated with adriamycin and its applicability to male reproductive toxicity studies. *J Toxicol Sci.* 2001;26:51-9.
- 8) Rudolph R, Stein RS, Pattillo RA. Skin ulcers due to adriamycin. *Cancer.* 1976;38:1087-94.
- 9) Garnick MB, Weiss GR, Steele GD Jr, Israel M, Schade D, Sack MJ, et al. Clinical evaluation of long-term, continuous-infusion doxorubicin. *Cancer Treat Rep.* 1983;67:133-42.