

**アレセンサカプセル20 mg
アレセンサカプセル40 mg
(アレクチニブ塩酸塩)**

第2部（モジュール 2）：CTD の概要（サマリー）

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

中外製薬株式会社

略語一覧

略語	英名	和名
ALK	Anaplastic lymphoma kinase	未分化リンパ腫キナーゼ
ALT	Alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
ALP	Alkaline phosphatase	アルカリフォスファターゼ
AST	Aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
A/G	Albumin/globulin	アルブミン/グロブリン
AUC _{0-24h}	Area under the plasma concentration–time curve from zero to 24h	0から24時間までの血漿中濃度–時間曲線下面積
CHL	Fibroblastic cell line isolated from Chinese hamster lung	チャイニーズハムスター肺線維芽細胞
C _{max}	Maximum (peak) plasma concentration	最高血漿中薬物濃度
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> hybridization	蛍光インサイチューハイブリダイゼーション
GLP	Good laboratory practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
γ-GT	γ-glutamyl transpeptidase	ガンマ-グルタミルトランスペプチダーゼ
HPCD	Hydroxypropyl-β-cyclodextrin	ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン
HPMC	Hydroxypropyl methyl cellulose	ヒドロキシプロピルメチルセルロース
IC ₅₀	Half maximal (50%) inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICH	International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
MCV	Mean corpuscular volume	平均赤血球容積
MCH	Mean corpuscular hemoglobin	平均赤血球ヘモグロビン量
MCHC	Mean corpuscular hemoglobin concentration	平均赤血球ヘモグロビン濃度
NZW	New Zealand White	ニュージーランドホワイト
OECD	Organisation for economic co-operation and development	経済協力開発機構
SBECD	Sulfobutyl ether-β-cyclodextrin	スルフォブチルエーテル-β-シクロデキストリン
UVA	Ultraviolet A	紫外線 A 波

目次

	頁
2.6.6 毒性試験の概要文.....	4
2.6.6.1 まとめ.....	4
2.6.6.2 急性毒性.....	7
2.6.6.3 反復投与毒性（トキシコキネティクス評価を含む）.....	7
2.6.6.3.1 ラットを用いた4週間反復経口投与毒性試験.....	7
2.6.6.3.2 ラットを用いた13週間反復経口投与毒性試験.....	8
2.6.6.3.3 カニクイザルを用いた2週間反復経口投与予備毒性試験.....	9
2.6.6.3.4 カニクイザルを用いた4週間反復経口投与毒性試験.....	10
2.6.6.3.5 カニクイザルを用いた13週間反復経口投与毒性試験.....	10
2.6.6.4 遺伝毒性.....	11
2.6.6.4.1 細菌を用いた復帰突然変異試験（エームス試験）.....	11
2.6.6.4.2 培養 CHL 細胞を用いた染色体異常試験.....	12
2.6.6.4.3 TK6 細胞を用いた小核試験（機序解明）.....	12
2.6.6.4.4 ラットを用いた <i>in vivo</i> 小核試験.....	12
2.6.6.4.5 ラットを用いた <i>in vivo</i> 小核試験（機序解明）.....	13
2.6.6.5 がん原性.....	13
2.6.6.6 生殖発生毒性.....	13
2.6.6.6.1 ラットを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験.....	14
2.6.6.6.2 ウサギを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験.....	14
2.6.6.7 その他の毒性.....	15
2.6.6.7.1 代謝物の毒性試験.....	15
2.6.6.7.2 線維芽細胞株 Balb/c 3T3 を用いた <i>in vitro</i> 光安全性試験.....	15
2.6.6.8 考察及び結論.....	16
2.6.6.9 図表.....	22
2.6.6.10 参考文献.....	22

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6.1 まとめ

アレクチニブ塩酸塩（以下、本薬）の毒性評価のための動物種として、*in vitro* 薬物代謝プロファイルがヒトと類似しているラット及びカニクイザルを選択した。ただし、生殖発生毒性試験においては、生殖発生毒性の評価に一般的に用いられているラット及びウサギを選択した。投与経路は臨床投与経路と同じく経口とした。本薬の毒性試験一覧を表 2.6.6.1-1に示した。

急性毒性は、2回投与によるラット小核試験及びカニクイザル2週間予備毒性試験の初回投与翌日までの成績から評価した。本薬は進行がんの治療を目的とした抗悪性腫瘍薬であるため、ICH（日米 EU 医薬品規制調和国際会議）S9ガイドライン（抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン）に基づき、反復投与毒性試験の投与期間は最長13週間とした。これらの反復投与毒性試験ではトキシコキネティクス試験を実施して曝露量を確認するとともに、休薬期間を設定して認められた所見の回復性を検討した。遺伝毒性は標準的組み合わせ（復帰突然変異試験、*in vitro* 染色体異常試験、*in vivo* 小核試験）で評価し、遺伝毒性試験で観察された小核の誘発機序を解明するために、セントロメア解析を併用した *in vitro* 及び *in vivo*（ラット）の小核試験を実施した。生殖発生毒性試験として、ラット及びウサギの胚・胎児の発生に関する用量設定試験を実施した。これらの試験で本薬がラット及びウサギの胚・胎児に対して毒性を有することが明らかとなったことから、動物数を増やした本試験は実施していない。また、本薬は光安全性の評価対象となりうる波長領域である290～700 nm の範囲内で光吸収を示すことから、*in vitro* の光安全性試験を実施した。更に、ヒトにおける本薬の主要代謝物 CH5468924-000(M-4)についても遺伝毒性を評価した。

ICH S9ガイドラインでは、進行がんの治療を目的とした抗悪性腫瘍薬の製造販売承認申請において「受胎能および着床までの初期胚発生に関する試験」、「出生前および出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験」及びがん原性試験の実施が求められていないことから、これらの試験は行わなかった。また、本薬の臨床投与経路が経口であることから局所刺激性試験は実施しておらず、毒性試験及び中枢神経系に対する影響を検討した安全性薬理試験において中枢神経系への影響を示唆する所見が認められていないことから、薬物乱用に関する非臨床試験も実施しなかった。

本薬の毒性試験は、ICH ガイドラインに準じて実施し、主要試験はGLP 適合下で行った。

毒性試験の溶媒として、開発初期に探索的に実施したカニクイザルの2週間予備毒性試験では 0.5 w/v% SBECD/0.5 mol/L 塩酸水溶液を用い、より後期に実施した他の試験では 0.5 w/v% HPCD/0.5 mol/L メタンスルホン酸/0.5 mol/L 塩酸水溶液を用いた。更に、ラット及びカニクイザルの13週間反復投与毒性試験並びにラット及びウサギの胚・胎児発生に関する試験では、0.5 w/v% HPMC/0.5 mol/L 塩酸水溶液を溶媒とした。このように複数の溶媒を用いたことから、毒性評価は曝露量を基に行った。なお、光安全性試験では本薬の遊離塩基を被験物質として用いたが、その他の試験は本薬の塩酸塩を用いた。本薬の用量及び濃度は遊離塩基換算量で示した。

急性毒性

本薬の急性毒性はラット及びカニクイザルを用いて評価した。ラットでは小核試験（0, 6, 20, 60, 200, 500, 1000及び2000 mg/kg/日、雄6例/群）の2回目投与翌日までの一般状態及び体重・摂餌量を基に評価し、カニクイザルでは2週間予備毒性試験（0, 6, 20及び60 mg/kg/日、雌雄各1例/群）の初回投与翌日までの一般状態を基に評価した。ラットの小核試験では2000 mg/kg/日まで、カニクイザルの2週間予備毒性試験では60 mg/kg/日まで、死亡及び状態悪化はなかった。

反復投与毒性

本薬の反復経口投与毒性は、ラット及びカニクイザルを用いて評価した。いずれの動物種においても、4及び13週間の反復投与毒性試験で毒性による死亡又は状態悪化はみられなかった。開発初期に探索的に行ったカニクイザルの2週間予備毒性試験では、高用量群の2例中1例が瀕死状態に陥り、投与13日目に切迫剖検した。状態悪化の主因は無便、消化管における内容物貯留及び消化管拡張等の消化器系の異常と考えられ、用量制限毒性は消化器系の異常と判断した。

ラット及びカニクイザルの反復経口投与毒性試験において共通してみられた主要な所見は、赤血球系、消化管、肝胆道系及び副腎に対する影響であった。その他に、ラットでは気管、肺、骨及び切歯に対する影響並びに血液凝固時間の延長を伴う回腸の出血性変化もみられた。4及び13週間反復投与毒性試験でみられた変化は、それぞれ4及び8週間の休薬期間の後には回復又は回復傾向を示した。

遺伝毒性

細菌を用いた復帰突然変異試験において、遺伝子突然変異誘発作用はみられなかった。培養 CHL 細胞を用いた染色体異常試験において、染色体構造異常の誘発はみられなかったが、倍数性細胞の増加が認められた。ラットを用いた *in vivo* 小核試験では、骨髓における小核保有幼若赤血球が増加した。小核誘発の機序を解明するために実施された TK6細胞を用いた FISH 法を併用した *in vitro* 小核試験において、セントロメアを含む小核保有細胞の増加が認められた。また、ラットで FISH 法を併用して行った小核試験においても、セントロメアを含んだ小核保有幼若赤血球の軽度の増加が認められた。

これらの結果より、本薬は DNA 及び染色体に対する直接作用はないが、染色体分配異常を誘発することが示唆された。

生殖発生毒性

生殖発生毒性試験として胚・胎児発生に関する用量設定試験を行った。

ラットでは9 mg/kg/日以上で、母動物の体重増加抑制、胎児体重の低値、内臓異常（尿管拡張、胸腺索、心室小型、心室壁菲薄化）の出現率の増加及び骨化遅延が認められた。27 mg/kg/日では、更に、母動物の体重・摂餌量減少、腺胃粘膜の赤色部を含む剖検所見及び母動物全例における全胚致死が認められた。ウサギでは9 mg/kg/日以上で母動物の赤血球形態異常がみられ、27 mg/kg/日では、更に、母動物の体重低値、摂餌量の減少及び血液学的検査・血液化学的検査における検査値の変化がみられた。また、この群では流産、全胚致死、着床後胚損失率の増加、胎盤重量の低値、胎児体重の低値及び骨格変異の発生率の増加等も認められた。

これらの試験は1群6例の妊娠動物を用いた小規模な試験であり、また母動物において毒性のみられる条件ではあったものの、本薬はラット及びウサギの胚・胎児発生に対して毒性を有すると結論された。

代謝物の毒性

ヒトにおける本薬の主要代謝物として、CH5468924-000(M-4)が同定されている。この主要代謝物の遺伝毒性を評価した。

スクリーニングエームス試験及び TK6細胞を用いた *in vitro* 小核試験において、遺伝子突然変異誘発性及び小核誘発性は認められなかった。

光安全性

本薬は光安全性の評価対象となりうる波長領域である290～700 nm の範囲内で光吸収を示す。本薬の光毒性の潜在リスクを検討する目的で、線維芽細胞株を用いた *in vitro* 光安全性試験を行った。この試験において本薬は陽性を示し、光毒性を有する可能性があると考えられた。

表 2.6.6.1-1 アレクチニブの主要毒性試験一覧表

試験の種類		動物種/細胞	投与経路又は試験方法	投与量/濃度 ^{1,2)}	GLP適用
反復投与毒性	4週間用量設定	ラット	経口	0, 3, 10, 30 (mg/kg/日)	非適合
	4週間	ラット	経口	0, 6, 20, 60 (mg/kg/日)	適合
	13週間	ラット	経口	0, 3, 9, 27 (mg/kg/日)	適合
	2週間予備	カニクイザル	経口	0, 6, 20, 60 (mg/kg/日)	非適合
	4週間用量設定	カニクイザル	経口	0, 1, 3, 10 (mg/kg/日)	非適合
	4週間	カニクイザル	経口	0, 1.7, 5, 15 (mg/kg/日)	適合
	13週間	カニクイザル	経口	0, 1.3, 4, 12 (mg/kg/日)	適合
遺伝毒性	復帰突然変異	ネズミチフス菌, 大腸菌	<i>in vitro</i>	0, 31.3~1000 (µg/plate)	適合
	染色体異常	チャイニーズハムスター肺由来細胞株	<i>in vitro</i>	0, 3~10 (µg/mL)	適合
	小核 (機序解明)	TK6ヒトリンパ芽球様細胞株	<i>in vitro</i>	0, 0.4~6.3 (µg/mL)	非適合
	小核	ラット	経口	0, 6, 20, 60, 200, 500, 1000, 2000 (mg/kg/日)	適合
	小核 (機序解明)	ラット	経口	0, 100, 200, 500, 1000 (mg/kg/日)	適合
生殖発生毒性	胚・胎児発生 (用量設定試験)	ラット	経口 (妊娠7~17日)	0, 3, 9, 27 (mg/kg/日)	適合
	胚・胎児発生 (用量設定試験)	ウサギ	経口 (妊娠6~18日)	0, 3, 9, 27 (mg/kg/日)	適合
その他	代謝物の復帰突然変異 (スクリーニングエームス)	ネズミチフス菌, 大腸菌	<i>In vitro</i>	0, 1.58~500 (µg/plate)	非適合
	代謝物の <i>in vitro</i> 小核	TK6ヒトリンパ芽球様細胞株	<i>In vitro</i>	0, 0.1~2.8 (µg/mL)	非適合
	<i>In vitro</i> 光安全性	Balb/c 3T3マウス線維芽細胞株	<i>in vitro</i>	0, 0.02~50 (µg/mL)	非適合

- 1) 光安全性試験では本薬の遊離塩基を被験物質として用い、その他の試験では本薬の塩酸塩を用いた。用量及び濃度は遊離塩基換算量として示した。
- 2) *In vivo* 試験では3種類の溶媒を用いた。カニクイザルの2週間予備毒性試験では 0.1% w/v SBECD/0.1 mol/L 塩酸水溶液を用いた。その他の試験では、ラットとカニクイザルの13週間 GLP 反復投与毒性試験並びにラット及びウサギの胚・胎児発生に関する試験 (用量設定試験) を除き、0.1% w/v HPCD/0.1 mol/L メタンスルホン酸/0.1 mol/L 塩酸水溶液を用いた。ラットとカニクイザルの13週間 GLP 反復投与毒性試験並びにラット及びウサギの胚・胎児発生に関する試験 (用量設定試験) では、0.1% w/v HPMC/0.1 mol/L 塩酸水溶液を用いた。

2.6.6.2 急性毒性

本薬の経口投与による急性毒性は、GLP 適用下で実施したラット（雄）小核試験（2.6.6.4.4）及び GLP 非適用下で実施したカニクイザル2週間反復経口投与予備毒性試験（2.6.6.3.3）で評価した。ラットでは2回目投与翌日までの一般状態観察、体重及び摂餌量を基に、カニクイザルでは初回投与翌日までの一般状態を基に評価した。

ラットの6 mg/kg/日（ラット4週間試験の初回投与日の雄の平均 AUC_{0-24h} : 6480 ng·h/mL）で異常はみられなかった。20 mg/kg/日以上で摂餌量減少、500 mg/kg/日以上で体重増加抑制又は体重減少、1000 mg/kg/日以上で便減少がみられたものの、一般状態に異常はみられなかった。2000 mg/kg/日（ラット小核試験の初回投与日の平均 AUC_{0-24h} : 53700 ng·h/mL）まで死亡及び状態悪化はなかった。

カニクイザルでは、60 mg/kg/日（初回投与日の平均 AUC_{0-24h} : 雄11500 ng·h/mL, 雌12600 ng·h/mL）までの用量で、初回投与日及び翌日の一般状態に異常はみられなかった。

2.6.6.3 反復投与毒性（トキシコキネティクス評価を含む）

本薬の反復投与毒性試験として、2週間の予備毒性試験をカニクイザル用いて実施し、4及び13週間の試験をラット及びカニクイザルを用いて実施した。GLP 適用試験では、一般状態観察、体重・摂餌量測定、眼科学的検査、血液学的検査、血液化学的検査、尿検査、骨髄細胞数検査、剖検、臓器重量測定、病理組織学的検査及びトキシコキネティクス分析を実施し、4又は8週間の休薬期間（それぞれ4又は13週間反復投与毒性試験）を設けて回復性を検討した。カニクイザルではこれらの検査に加えて心電図検査を実施した。

2.6.6.3.1 ラットを用いた4週間反復経口投与毒性試験

（資料番号4.2.3.2-2）

1群雌雄各15例の RccHanTM:WIST ラットに本薬を0 (■w/v% HPCD/■mol/L メタンスルホン酸/■mol/L 塩酸水溶液)、6, 20, 60 mg/kg/日の用量で4週間経口投与した。投与終了後、1群雌雄各5例を4週間の回復試験に供し、回復性を検討した。また、トキシコキネティクス試験として1群雌雄各3例で曝露量の確認を行った。

投与量はラット4週間用量設定試験（0, 3, 10, 30 mg/kg/日）を基に設定した（資料番号4.2.3.2-1）。この試験では、30 mg/kg/日まで薬物に起因した死亡・状態悪化はなかった。30 mg/kg/日で体重増加抑制、 γ -GT 高値、網赤血球数の高値等が認められたが、いずれも軽度の変化であった。これより、明らかな毒性発現用量と推察される60 mg/kg/日を本試験の高用量に設定し、以下公比約3で中間用量（20 mg/kg/日）及び低用量（6 mg/kg/日）を設定した。

試験方法及び成績を表2.6.7.7.1-1に示した。

試験期間を通じ全群で死亡及び状態悪化はなかった。

6 mg/kg/日（投与28日目の雄及び雌の平均 AUC_{0-24h} : 9340及び13900 ng·h/mL）以上で、主に雌でウニ状赤血球、赤血球断片化の赤血球形態異常（雄は20 mg/kg/日以上）、ALP（雄は20 mg/kg/日以上）及び骨型 ALP の高値（雄は60 mg/kg/日のみ）、雌雄で血液中の巨大血小板、肺泡のマクロファージ浸潤並びに血糖高値がみられた。血糖高値は軽度であり、ラットの13週間反復投与毒性試験を含むその他の試験では認められておらず、毒性学的な意義は限定的であると考えられた。

20 mg/kg/日（投与28日目の雄及び雌の平均 AUC_{0-24h} : 38100及び33200 ng·h/mL）以上では、雌雄で体重増加抑制、雄で網赤血球（雌は60 mg/kg/日）・雌で脾臓重量の高値（雄は60 mg/kg/日）、雌雄で脾臓の成熟巨核球増加、肝型 ALP 及び肝重量の高値、肝細胞の腫大、胆管上皮の空胞化、副腎重量高値及び副腎皮質の肥大、腺胃上皮の変性、消化管粘膜の炎症性細胞浸潤及び増殖帯伸長、気管（雄、雌については60 mg/kg/日）・消化管（雌雄）の粘膜におけるマクロファージ/多核巨細胞浸潤がみられ、雌でリンパ系組織のリンパ球減少、白血球高値（総白

血球，リンパ球，好中球等），心臓重量高値（いずれも雄は60 mg/kg/日），雄における総コレステロール高値及び脾臓の赤血球系の髄外造血増加，並びに雌における摂餌量減少（一過性）がみられた。更に，雌雄で下垂体の絶対重量のみの低値，雌で下垂体前葉細胞の軽微な萎縮（中間用量で4/10例，高用量で9/10例）も観察された。下垂体前葉の萎縮による影響は甲状腺や生殖器等の下流組織にも認められていないことから，この所見の毒性学的意義は低いと考えられた。また，変化が認められた用量では体重増加抑制及び摂餌量の減少がみられていることから，栄養状態の悪化に起因した2次的な変化であった可能性も考えられた。

60 mg/kg/日（投与28日目の雄及び雌の平均 AUC_{0-24h} ：39800及び40300 ng・h/mL）では，雌雄で骨における活性化破骨細胞増加，骨梁減少，骨髄における好中球増加及び雌における γ -GT 高値がみられた。

4週間の休薬によりいずれの変化も回復又は回復傾向を示した。60 mg/kg/日の休薬群雄5例中1例で雄性生殖器に萎縮性変化がみられた。しかし，ラット13週間反復投与毒性試験の高用量の曝露量は本試験と同程度であったが同様の変化はみられず，その他の試験でも雄生殖器に対する影響が認められていないことから，この変化は偶発的なものと考えられた。

ラットに本薬を4週間投与した時の無毒性量は6 mg/kg/日未満であった。

2.6.6.3.2 ラットを用いた13週間反復経口投与毒性試験

（資料番号4.2.3.2-3）

1群雌雄各15例の RccHanTM:WIST ラットに本薬を0（ w/v% HPMC/ mol/L 塩酸水溶液），3，9，27 mg/kg/日の用量で13週間経口投与した。投与終了後，1群雌雄各5例を8週間の回復試験に供し，回復性を検討した。また，トキシコキネティクス試験として1群雌雄各3例で曝露量の確認を行った。

投与量はラット4週間反復経口投与毒性試験（2.6.6.3.1）を基に設定した。この試験では，6 mg/kg/日以上で赤血球形態異常，血液中に巨大血小板の出現，ALP の高値が，20 mg/kg/日以上では体重増加抑制，網赤血球及び脾臓重量の増加，肝臓，下垂体，消化管での病理所見等が，60 mg/kg/日では更に骨において病理所見が認められた。また，投与液の処方変更に伴い，本試験では曝露量の改善が予想された。これらのことから，明らかな毒性が発現すると推定され，かつ，ラット4週間反復経口投与毒性試験の60 mg/kg/日と同程度の曝露量が期待される27 mg/kg/日を高用量に設定し，以下，公比3で中間用量（9 mg/kg/日）及び低用量（3 mg/kg/日）を設定した。

試験方法及び成績を表2.6.7.2-1に示した。

試験期間を通じ全群で薬物に起因する死亡及び状態悪化はなかった。

3 mg/kg/日（投与91日目の雄及び雌の平均 AUC_{0-24h} ：5100及び8450 ng・h/mL）以上で，雌で体重増加抑制（雄は9 mg/kg/日以上），AST 高値，肝細胞の単細胞/限局性壊死，肝臓の類洞壁細胞腫大/黄褐色色素沈着（いずれも雄は27 mg/kg/日），雌雄で肺泡の泡沫マクロファージ浸潤，雄で副腎束状帯細胞の大型脂肪滴増加（雌は9 mg/kg/日以上）がみられた。雄で脾臓の髄外造血増加（雌は9 mg/kg/日以上）も認められ，貧血刺激を示唆する所見と考えられた。

9 mg/kg/日（投与91日目の雄及び雌の平均 AUC_{0-24h} ：18600及び25800 ng・h/mL）以上で認められた主な所見は，雌で摂餌量低値，血液中の大型血小板（いずれも雄は27 mg/kg/日），雌雄で赤血球形態異常，消化管粘膜のマクロファージ/多核巨細胞/炎症性細胞の浸潤及び雌で増殖帯伸長（雄は27 mg/kg/日），雌雄で粘液を伴う腺胃粘膜上皮の肥大，腺胃上皮の変性，リンパ節のマクロファージ/赤血球貪食/血液吸収がみられ，雄でリンパ系組織のリンパ球減少（雌は27 mg/kg/日），雌雄で ALP 及び肝型 ALP の高値，雄で網赤血球高値（雌は27 mg/kg/日），雌における腸型 ALP 及び心臓重量高値であった。更に，雌で好中球（雄は27 mg/kg/日），雌雄で α 2-グロブリン， β -グロブリンの高値もみられたが，これらは消化管粘膜の炎症性細胞の浸潤により示唆される炎症性変化に伴う2次的な変化と考えられた。

27 mg/kg/日（投与91日目の雄及び雌の平均 AUC_{0-24h} ：35300及び41100 ng・h/mL）では，主に

脾臓の成熟巨核球増加（雌雄），胆管上皮の空胞化（雌雄）/変性/壊死（いずれも雌），骨髓の好中球（雌雄）/巨核球（雌）の増加，気管粘膜固有層のマクロファージ/多核巨細胞（雌雄）/炎症性細胞（雌）の浸潤，雌雄で小腸粘膜上皮の配列不整/剥離，回腸粘膜の出血，腸間膜リンパ節の多核巨細胞，副腎束状帯細胞の脂肪滴減少，活性化破骨細胞増加，骨梁減少，切歯のエナメル芽細胞の配列不整/変性/壊死及び乳頭層/象牙芽細胞層の毛細血管拡張，下垂体前葉の軽微な萎縮，活性化部分トロンボプラスチン時間延長並びに総白血球・無機リンの高値がみられ，雄でプロトロンビン時間が延長した。雌では更に気管粘膜上皮の配列不整，下顎切歯の白色化/短縮，切歯の象牙芽細胞の配列不整，骨型 ALP 及び γ -GT・肝重量の高値，胆管増生及び副腎の重量高値・暗褐色化も認められた。なお，腸管出血に関連すると考えられる変化として，黒色便，大腸の暗赤色（いずれも雌雄）/ゼリー状の内容物（雄），貧血性変化（赤血球（雌），ヘモグロビン濃度（雌），ヘマトクリット（雄）及び MCHC（雌雄）の低値並びに眼球の変色（雌雄）），雌雄の尿素窒素値の高値及び近位尿細管の黄褐色色素沈着，雄における MCV 及び MCH の低値，雌における網赤血球高値，腸管膜リンパ節のヘモジデリン沈着及び髓外造血並びに肝臓の類洞壁細胞の黄褐色色素沈着もみられた。高用量群では雌におけるアルブミン低値と雄における血糖の低値などもみられ，いずれも摂餌量減少及び出血性変化による栄養状態の悪化に伴う2次的な影響と考えられた。

8週間の休薬によりいずれの変化も回復又は回復傾向を示した。ラットに本薬を13週間投与した時の無毒性量は3 mg/kg/日未満であった。

2.6.6.3.3 カニクイザルを用いた2週間反復経口投与予備毒性試験

（資料番号4.2.3.2-4）

1群雌雄各1例のカニクイザルに本薬を0（ $\blacksquare$ w/v% SBECD/ $\blacksquare$ mol/L 塩酸水溶液），6，20，60 mg/kg/日の用量で2週間経口投与した。また，トキシコキネティクス試験を実施して曝露量を確認した。

投与量は，同じ投与量で予備的に実施したカニクイザル単回トキシコキネティクス試験（6，20，60 mg/kg）の成績を基に高用量を60 mg/kg/日を設定し，以下公比約3で中間用量（20 mg/kg/日）及び低用量（6 mg/kg/日）を設定した。

試験方法及び成績を表2.6.7.6-1に示した。

投与期間中，60 mg/kg/日の2例中1例（雌）が瀕死状態に陥り，切迫剖検された。この動物では投与4日目から便減少又は無便がみられ，投与の約1週後には体重減少を伴わない摂餌量の減少がみられ始め，投与13日目に一般状態の悪化から瀕死剖検された。状態悪化の主因は投与4日目以降にみられた便減少/無便，消化管における内容物貯留及び消化管拡張等の消化器系の異常と考えられ，用量制限毒性は消化器系に対する影響と判断した。

6 mg/kg/日（投与14日目の雄及び雌の AUC_{0-24h} ：3870及び4140 ng・h/mL）では異常はみられなかった。

20 mg/kg/日（投与14日目の雄及び雌の AUC_{0-24h} ：12100及び8520 ng・h/mL）以上では，主にウニ状赤血球，赤血球断片化の赤血球形態異常（雌雄，ただし雌の60 mg/kg/日は欠側値），雌雄で MCV，雌でヘモグロビン濃度及び雌雄でヘマトクリットの減少（ただし60 mg/kg/日は雌のみ），雄で MCHC 及び雌で網赤血球の増加，雄で炎症細胞を伴う胆管増生（雌は60 mg/kg/日），雌雄で肝細胞腫大及び副腎皮質肥大がみられた。これらの変化に加えて，雌で血小板の増加（雄は60 mg/kg/日），骨髓の造血細胞減少，脾島の不整形，脾臓のうっ血（60 mg/kg/日は雄のみ）及び雌雄で下垂体前葉の萎縮もみられたが，ほぼ同様の曝露量で4週間投与したカニクイザルの用量設定試験では，これらの所見は認められなかったことから，いずれも毒性学的な意義は限定的と考えられた。

60 mg/kg/日の生存例雄（投与14日目の雄の AUC_{0-24h} ：9820 ng・h/mL）では，主に便減少/無便，嘔吐（投与直後），腹部膨満，摂餌量減少，ALP・総ビリルビンの増加，肝重量高値，毛細胆管の胆汁色素，胃のびらん/潰瘍及び萎縮，十二指腸のびらん，大腸の内容物貯留及び大腸のガ

スがみられた。その他に、栄養状態の悪化やストレスに伴う2次的な変化と推察される総コレステロール、総蛋白質、アルブミン及び A/G 比の減少、胸腺、リンパ節及び膀胱粘膜上皮の萎縮及び下垂体重量の低値、一般状態の悪化に関連した変化と推察されるクレアチニン及び無機リンの増加もみられた。

カニクイザルに本薬を2週間投与した場合の無毒性量は6 mg/kg/日であった。

2.6.6.3.4 カニクイザルを用いた4週間反復経口投与毒性試験

(資料番号4.2.3.2-6)

1群雌雄各3～5例のカニクイザルに本薬を0 (■ w/v% HPCD/■ mol/L メタンスルホン酸/■ mol/L 塩酸水溶液), 1.7, 5, 15 mg/kg/日の用量で4週間経口投与した。投与終了後, 1.7 mg/kg/日群を除く各群の雌雄各2例を4週間の回復試験に供し, 回復性を検討した。また, トキシコキネティクス試験を実施して曝露量を確認した。

投与量はカニクイザル4週間用量設定試験 (0, 1, 3, 10 mg/kg/日) を基に設定した (資料番号4.2.3.2-5)。この試験では, 10 mg/kg/日まで死亡及び状態悪化は認められなかったが, 3 mg/kg/日以上で赤血球の形態異常が増加し, 10 mg/kg/日では網赤血球の増加並びにアルブミン・A/G 比の減少が認められた。これより, 本試験では何らかの毒性変化が予想される15 mg/kg/日を高用量に設定し, 以下公比約3で中間用量 (5 mg/kg/日) 及び低用量 (1.7 mg/kg/日) を設定した。

試験方法及び成績を表2.6.7.7.3-1に示した。

試験期間を通じ全群で死亡及び状態悪化はなかった。

1.7 mg/kg/日 (投与28日目の雄及び雌の平均 AUC_{0-24h} : 1160及び1300 ng・h/mL) 以上で, 雌でウニ状赤血球, 赤血球断片化, 標的赤血球の赤血球の形態異常 (雄は5 mg/kg/日以上) がみられた。

5 mg/kg/日 (投与28日目の雄及び雌の平均 AUC_{0-24h} : 2400及び3980 ng・h/mL) 以上では, 雌雄で肝型 ALP 増加, 大腸粘膜の増殖帯伸長及び雄における副腎皮質肥大がみられた。更に, この用量以上においては黒色便 (雌雄) も観察されたが, 消化管出血を示唆する剖検所見又は血液吸収像や出血像等の病理組織学的所見はみられていない。また, 本試験と異なる溶媒を用いて行われたカニクイザルの13週間反復投与毒性試験では, 高用量群の全身曝露量が本試験とほぼ同等であったにもかかわらず, 黒色便は観察されなかった。以上のことから, 本試験でみられた黒色便は消化管出血を示唆するものではなく, 毒性学的な意義は低いと考えられる。

15 mg/kg/日 (投与28日目の雄及び雌の平均 AUC_{0-24h} : 6530及び6540 ng・h/mL) では, 雌雄で大腸拡張, 小腸粘膜の増殖帯伸長, 直接ビリルビン増加, 肝重量高値, 肝細胞腫大, グリソン鞘の炎症性細胞浸潤, 骨髓の好中球増加 (グリソン鞘の炎症性細胞浸潤に対する反応性の変化と考えられる), ヘマトクリット減少, 平均赤血球ヘモグロビン濃度増加, 雄における赤血球及びヘモグロビン濃度の減少 (散見) 及びクッパー細胞の腫大, 並びに雌における体重・摂餌量の減少がみられた。更に, 雄1例では赤脾髄に軽微なうっ血も認められたが, ほぼ同様の曝露量で13週間投与したカニクイザルの試験において, このような所見は認められず, また, 剖検時の放血が不十分な場合にもみられることから, 毒性学的な意義は低いと考えられた。

4週間の休薬により赤血球形態異常を除くいずれの変化も回復し, 赤血球形態異常にも回復傾向がみられた。カニクイザルに本薬を4週間投与した場合の無毒性量は1.7 mg/kg/日未満であった。

2.6.6.3.5 カニクイザルを用いた13週間反復経口投与毒性試験

(資料番号4.2.3.2-7)

1群雌雄各3～5例のカニクイザルに本薬を0 (■ w/v% HPMC/■ mol/L 塩酸水溶液), 1.3, 4, 12 mg/kg/日の用量で13週間経口投与し, 投与終了後, 1.3 mg/kg/日群を除く各群の雌雄各2例を8週間の回復試験に供し, 回復性を検討した。また, トキシコキネティクス試験を実施し

て曝露量を確認した。

投与量はカニクイザル4週間反復経口投与毒性試験（2.6.6.3.4）を基に設定した。この試験では、1.7 mg/kg/日以上で赤血球形態異常が認められ、5 mg/kg/日以上で消化管の変化及び副腎皮質肥大等がみられた。更に、15 mg/kg/日では赤血球系パラメータ減少及び肝臓での病理組織変化等が認められた。また、投与液の処方変更に伴い、投与量を低く設定しても4週間反復経口投与試験に近い曝露量が得られることが期待された。これらのことを考慮し、何らかの毒性変化が予想される12 mg/kg/日を高用量に設定し、以下公比約3で中間用量（4 mg/kg/日）及び低用量（1.3 mg/kg/日）を設定した。

試験方法及び成績を表2.6.7.4-1に示した。

試験期間を通じ全群で薬物に起因する死亡及び状態悪化はなかった。

1.3 mg/kg/日（投与91日目の雄及び雌の平均 AUC_{0-24h} : 894及び1030 ng・h/mL）以上で、ウニ状赤血球、赤血球断片化、球状赤血球の赤血球形態異常がみられた（1.3 mg/kg 日群では雄1例のみ、雌は4 mg/kg/日以上）。

4 mg/kg/日（投与91日目の雄及び雌の平均 AUC_{0-24h} : 3610及び2810 ng・h/mL）以上で、雌の γ -GT 増加、雌雄の肝重量高値、雌の胆管増生（雄は12 mg/kg/日）、雌雄の胃腸管粘膜の増殖帯伸長及び雄の副腎皮質の脂肪滴減少（雌は12 mg/kg/日）がみられた。

12 mg/kg/日（投与91日目の雄及び雌の平均 AUC_{0-24h} : 7060及び6920 ng・h/mL）で、雌雄で大腸拡張及び肝細胞腫大、雌におけるグリソン鞘の炎症性細胞浸潤、雄における赤血球減少（1例はヘモグロビン濃度及びヘマトクリットの減少を伴っていた）及び副腎皮質肥大がみられた。更に高用量の雄1例では、剖検時に肺全葉の褐色化及び赤色斑がみられ、病理組織学的には肺胞における多巣性出血及び血管周囲のヘモジデリン食食マクロファージの集簇が観察された。この動物の肺の変化は細胞障害又は炎症その他の所見を伴っておらず、この個体の全身状態は良好であったことから、重篤な肺障害を示唆する所見ではないと考えられた。これは1例のみでみられた所見であり、ラットを含め、より高曝露された動物においても肺に出血性変化はみられなかった。また、試験実施施設におけるカニクイザルの背景データには肺の出血性変化が■%（■例）の頻度で報告されており¹⁾、この1例における肺の出血性変化は、偶発性の所見であった可能性が高いと考えられた。

8週間の休薬により副腎皮質の脂肪滴減少を除くいずれの変化も回復し、副腎の変化も回復傾向を示した。カニクイザルに本薬を13週間投与した時の無毒性量は1.3 mg/kg/日未満であった。

2.6.6.4 遺伝毒性

本薬の遺伝毒性試験として、標準的な組み合わせである細菌を用いた復帰突然変異試験、培養 CHL 細胞を用いた染色体異常試験及びラットを用いた *in vivo* 小核試験を実施した。更に、小核誘発の作用機序を明らかにする目的で、セントロメア解析を併用した *in vitro* 及び *in vivo* 小核試験を実施した。

2.6.6.4.1 細菌を用いた復帰突然変異試験（エームス試験）

（資料番号4.2.3.3.1-1）

本薬の遺伝子突然変異誘発性を検討するため、ネズミチフス菌（TA100, TA1535, TA98, TA1537）及び大腸菌（WP2*uvrA*）を用いたエームス試験を代謝活性化系（ラット肝 S9）の存在下及び非存在下で、プレート法及びプレインキュベーション法で実施した。

用量は、156～5000 μ g/plate の用量でプレート法及びプレインキュベーション法にて実施した予備試験の結果を基に設定した。これらの試験では、代謝活性化系の有無にかかわらず、5000 μ g/plate まで抗菌活性は認められなかったが、313 μ g/plate から沈殿が認められた。これより、本試験では最高濃度を1000 μ g/plate とし、以下、公比2で500, 250, 125, 62.5及び31.3

μg/plate の計6用量を設定した。

試験方法及び成績を表2.6.7.8.1-1に示した。

プレート法及びプレインキュベーション法のいずれの方法においても、代謝活性化系の有無にかかわらず、復帰変異コロニー数の増加はみられず、抗菌活性も認められなかった。

以上の結果から、本試験条件下において、本薬は細菌に対して遺伝子突然変異誘発性を示さないと判断した。

2.6.6.4.2 培養 CHL 細胞を用いた染色体異常試験

(資料番号4.2.3.3.1-2)

本薬の染色体異常誘発性を検討するため、CHL 細胞を用いた染色体異常試験を代謝活性化系（ラット肝 S9）の存在下及び非存在下で実施した。

用量は細胞増殖試験の結果を基に設定した。この試験では短期間処理法（6時間処理-18時間回復）の代謝活性化非存在下及び存在下の50%細胞増殖阻害濃度は、3.8 μg/mL 及び6.8 μg/mL であった。また、連続処理法（代謝活性化系非存在下で24時間処理）の50%細胞増殖阻害濃度は、3.4 μg/mL であった。これより、本試験は代謝活性化非存在下では1～7 μg/mL（7用量）、代謝活性化存在下では2～12 μg/mL（10用量）で実施した。細胞増殖阻害率を基に、短期間処理法の代謝活性化非存在下では4, 5, 6 μg/mL の3用量、代謝活性化存在下では7, 8, 9, 10 μg/mL の4用量、連続処理法では3, 4, 5 μg/mL の3用量で分裂細胞の観察を行った。

試験方法及び成績を表2.6.7.8.2-1に示した。

短期間処理法（代謝活性化非存在下及び存在下）及び連続処理法において、染色体構造異常の増加はみられず、本薬は CHL 細胞に対して染色体構造異常を誘発しないと判断した。一方、短期間処理法の代謝活性化存在下においては、10 μg/mL において倍数性細胞（polyploid）のわずかな増加が認められた。

これらの結果から、本薬が異数性誘発能を有することが示唆された。

2.6.6.4.3 TK6細胞を用いた小核試験（機序解明）

(資料番号4.2.3.3.1-3)

ラットを用いた *in vivo* 小核試験（2.6.6.4.4）において小核保有幼若赤血球数の増加がみられたことから、その作用機序を明らかにする目的で、ヒトリンパ芽球様細胞（TK6）を用いて、セントロメア特異的 DNA プローブによる FISH 法を併用した小核試験を実施した。

TK6細胞を代謝活性化非存在下で0.4～6.3 μg/mL の濃度で24時間処理し、小核保有細胞数を計測した。溶媒対照の2倍以上の小核を有する細胞数が観察された2.7, 3.6, 4.5及び5.4 μg/mL の4用量において FISH 染色を実施し、セントロメアを含む小核の出現率を調べた。

試験方法及び成績を表2.6.7.8.3-1に示した。

2.7 μg/mL 以上でセントロメアを含む小核保有細胞の増加がみられた。エームス試験及び染色体異常試験において、それぞれ遺伝子突然変異及び染色体構造異常の誘発がなかったことも考慮すると、本薬の小核誘発の作用機序は染色体への直接作用ではなく、染色体分配の異常であると考えられた。

2.6.6.4.4 ラットを用いた *in vivo* 小核試験

(資料番号4.2.3.3.2-1)

本薬の小核誘発性を検討するため、1群6例の雄ラットに本薬を0 (■w/v% HPCD/■mol/L メタンスルホン酸/■mol/L 塩酸水溶液)、6, 20, 60, 200, 500, 1000, 2000 mg/kg/日の用量で2日間経口投与し、最終投与の24時間後に骨髓塗抹標本を作製した。骨髓塗抹標本を観察して小核保有幼若赤血球の出現頻度を調べた。また、別途1群3例の雄ラットに本薬0, 500, 1000 及び2000 mg/kg/日を単回投与し、曝露量を確認した。

投与量は予備試験（0, 30, 100, 300, 1000, 2000 mg/kg/日）を基に設定した。この試験では2000 mg/kg/日で死亡例は認められなかったが、体重が減少した。これより、1回目の試験では高用量を2000 mg/kg/日とし、以下公比2で1000 及び500 mg/kg/日を設定した。1回目の試験では全投薬群で小核保有幼若赤血球が増加し、曝露量も3用量ではほぼ同様であった。そのため、小核誘発の無影響量を求める目的で、200 mg/kg/日を最高用量とし、60, 20及び6 mg/kg/日の4用量を設定した追加試験を実施した。

試験方法及び成績を表2.6.7.9.1-1に示した。

200 mg/kg（平均 $C_{\max}$: 1850 ng/mL, 平均 AUC_{0-24h} : 36700 ng・h/mL）まで小核保有幼若赤血球の増加はなかったが、500 mg/kg/日以上で増加がみられ、本薬は小核誘発作用を有するものと判断した。

2.6.6.4.5 ラットを用いた *in vivo* 小核試験（機序解明）

（資料番号4.2.3.3.2-2）

ラットを用いた小核試験（2.6.6.4.4）において小核保有幼若赤血球数の増加がみられたことから、小核の誘発機序を *in vivo* においても検討した。

1群6例の雄ラットに本薬を0（ $\blacksquare$ w/v% HPCD/ $\blacksquare$ mol/L メタンスルホン酸/ $\blacksquare$ mol/L 塩酸水溶液）、100, 200, 500, 1000 mg/kg/日の用量で2日間経口投与し、最終投与の22から24時間後に骨髓を採取して骨髓塗抹標本を作成した。小核保有幼若赤血球の出現頻度を調べるとともに、骨髓細胞から分取した小核保有幼若赤血球についてセントロメア特異的 DNA プローブを用いた FISH 解析を行った。また、別途1群3例の雄ラットに本薬0, 100, 200, 500及び1000 mg/kg/日を単回投与し、曝露量を確認した。

投与量は先に実施したラット小核試験を参考に、100, 200, 500, 1000 mg/kg/日の4用量を設定した。

試験方法及び成績を表2.6.7.9.2-1に示した。

500 mg/kg/日（平均 $C_{\max}$: 4140 ng/mL）以上で小核保有幼若赤血球の軽度の増加が認められ、小核保有細胞の FISH 解析では、セントロメアを含んだ小核保有幼若赤血球数の増加がみられた。エームス試験及び染色体異常試験において、それぞれ遺伝子突然変異及び染色体構造異常の誘発がなかったことも考慮すると、本薬の小核誘発の作用機序は染色体への直接作用ではなく、染色体分配の異常であると考えられた。

2.6.6.5 がん原性

本薬は進行がん患者の治療を目的とした医薬品である。ICH S9ガイドラインでは、がん原性試験は製造販売承認申請には求められていないことから試験を実施しなかった。

2.6.6.6 生殖発生毒性

生殖発生毒性試験として、ラット及びウサギを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験を実施した。これらの試験において、本薬は胚・胎児毒性を有することが示されたことから、本試験は実施しなかった。また、本薬は進行がん患者の治療を目的とした医薬品であり、ICH S9ガイドラインでは、「雌雄の受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験」並びに「出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験」は、製造販売承認申請には求められていないことから試験を実施しなかった。

妊娠ラット及びウサギを用いて、胚・胎児発生に関する用量設定試験を実施した。本薬を器官形成期に投与し、妊娠末期に帝王切開した。ラット・ウサギともに、母動物の検査（一般状態観察、体重・摂餌量測定、剖検、黄体数、着床数、生存胎児数、胚・胎児死亡数及びトキシコキネティクス分析）及び胎児の検査（胎盤観察又は重量測定、性比、体重測定、外表観察、内臓検査、骨格検査）を行った。ウサギでは、母動物の血液学的検査及び血液化学的検査も併せ

て行った。

2.6.6.6.1 ラットを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験

(資料番号4.2.3.5.2-1)

1群6例の妊娠ラットに本薬を0 (w/v% HPMC/mol/L 塩酸水溶液), 3, 9, 27 mg/kg/日の用量で着床から硬口蓋閉鎖までの器官形成期(妊娠7~17日)に経口投与し, 妊娠20日に帝王切開した。交尾確認日を妊娠0日とした。また, トキシコキネティクス試験として1群2例を設置し, 曝露量の確認を行った。

投与量はラット13週間反復投与毒性試験の成績(2.6.6.3.2)を基に設定した。この試験では体重増加抑制が, 3 mg/kg/日では Day 18から, 9 mg/kg/日では Day 11から, 27 mg/kg/日では Day 8から認められた。これより, 投与期間中に体重増加抑制が認められると予想される27 mg/kg/日を高用量をとし, 以下公比3で9 mg/kg/日, 3 mg/kg/日を設定した。

試験方法及び成績を表2.6.7.13.1-1に示した。

試験期間を通じ, 薬物に関連した母動物の死亡は認められなかった。

母動物では, 9 mg/kg/日以上(妊娠17日における平均 AUC_{0-24h} は40600 ng・h/mL)で体重増加抑制が認められ, 27 mg/kg/日(妊娠17日における平均 AUC_{0-24h} は66400 ng・h/mL)では体重及び摂餌量が減少した。剖検では腺胃粘膜に赤色染, 腸管膜リンパ節の暗赤色化及び副腎の黒褐色化がみられた。

胎児では, 9 mg/kg/日で体重低値及び骨化遅延(仙椎及び尾椎数の減少)がみられ, また内臓異常(尿管拡張, 胸腺索, 心室小型, 心室壁菲薄化)の発生率の増加が認められた。帝王切開時に27 mg/kg/日の全母動物で全胚致死が認められ, 胎児死亡率, 早期胚死亡率及び総死亡率が増加した。

母動物の一般毒性及び生殖機能に関する無毒性量はそれぞれ3 mg/kg/日及び9 mg/kg/日, 胚・胎児の発生に関する無毒性量は 3 mg/kg/日であった。

2.6.6.6.2 ウサギを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験

(資料番号4.2.3.5.2-2)

1群各6例の妊娠 NZW ウサギに本薬を0 (w/v% HPMC/mol/L 塩酸水溶液), 3, 9, 27 mg/kg/日の用量で着床から硬口蓋閉鎖までの器官形成期(妊娠6~18日)に経口投与し, 妊娠28日に帝王切開した。交尾確認日を妊娠0日とした。また, トキシコキネティクス試験を実施して曝露量を確認した。

投与量は非妊娠ウサギへの10日間投与試験の成績を基に設定した。この試験では, 90 mg/kg/日では体重及び摂餌量の顕著な低下から全例を Day 7に切迫殺した。30 mg/kg/日では2/3例が体重及び摂餌量低下を示した。10 mg/kg/日では, 体重, 摂餌量, 一般症状及び剖検所見に異常は認められなかった。これより, 何らかの毒性が予想される27 mg/kg/日を高用量に設定し, 以下公比3で9 mg/kg/日, 3 mg/kg/日を設定した。

試験方法及び成績を表2.6.7.13.2-1に示した。

試験期間を通じ, 薬物に関連した母動物の死亡は認められなかった。

母動物では, 9 mg/kg/日(妊娠18日における平均 AUC_{0-24h} は6650 ng・h/mL)以上で赤血球の形態異常が観察された。27 mg/kg/日(妊娠18日における平均 AUC_{0-24h} は43200 ng・h/mL)の1例が妊娠21日に流産した。この群では全母動物で糞便の減少/無便が認められ, 摂餌量の顕著な減少, 体重低値がみられ, 妊娠18日の血液学的検査及び血液化学的検査において, 貧血, 栄養状態の悪化及び炎症又はストレスに関連した変化(ヘマトクリット値, MCV の低値, MCHC, 血小板, 好中球の高値, 好酸球, 好塩基球, 総蛋白質, トリグリセライド, カルシウム等の低値, 総コレステロール, 血糖等の高値等)が認められたが, 剖検において異常はみられなかった。

帝王切開時, 27 mg/kg/日の2例で全胚致死が認められた。この群では着床後胚損失率が増加

し、胚・胎児死亡数の増加、生存胎児数の減少が認められた。更に、胎児体重及び胎盤重量の低値がみられた。外形、内臓及び骨格検査で薬物に起因した異常は認められなかったが、骨格変異である完全過剰肋骨が増加し、短小過剰肋骨が減少した。

母動物の一般毒性に関する無毒性量は3 mg/kg/日、生殖機能に関する無毒性量は9 mg/kg/日、胚・胎児の発生に関する無毒性量は9 mg/kg/日であった。

2.6.6.7 その他の毒性

2.6.6.7.1 代謝物の毒性試験

ヒトにおける本薬の主要代謝物として、CH5468924-000(M-4)が同定されている。この主要代謝物の遺伝毒性を評価した。

(1) M-4のスクリーニングエームス試験

(資料番号4.2.3.7.5-1)

M-4の遺伝子突然変異誘発性を検討するため、ネズミチフス菌 (TA100, TA1535, TA98, TA1537) 及び大腸菌 (WP2*uvrA*) を用いたスクリーニングエームス試験を、0, 1.58, 5, 15.8, 50, 158及び500 µg/plate の濃度で実施した。試験は代謝活性化系 (ラット肝 S9) の存在下及び非存在下でマイクロプレートを用いたプレインキュベーション法で行った。

試験方法及び成績を表2.6.7.15-1に示した。

代謝活性化非存在下では15.8 µg/plate 以上 (WP2*uvrA* は158 µg/plate 以上) で、代謝活性化存在下では TA1535及び TA1537は15.8 µg/plate 以上、TA98及び TA100は50 µg/plate 以上、WP2*uvrA* は158 µg/plate 以上で抗菌活性が認められた。代謝活性化系の有無にかかわらず復帰変異コロニー数の増加はみられなかった。

以上の結果から、本試験条件下において、M-4は細菌に対して遺伝子突然変異誘発性を示さないと判断した。

(2) TK6細胞を用いた M-4の小核試験

(資料番号4.2.3.7.5-2)

ヒトリンパ芽球様細胞 (TK6) を用いて *in vitro* 小核試験を実施した。

1回目の試験では TK6細胞を代謝活性化非存在下、0, 1.2, 1.6, 2.2, 2.8 µg/mL の濃度で24時間処理し、小核保有細胞数を計測した。2回目の試験では代謝活性化非存在下、0, 1.0, 1.5, 2.0, 2.8 µg/mL の濃度で24時間処理して小核保有細胞数を計測するとともに、0, 0.1, 0.3, 0.7 µg/mL の濃度で24時間処理後に24時間の回復期間を設定して小核保有細胞数を計測する試験も実施した。

試験方法及び成績を表2.6.7.15-2に示した。

高用量における相対生存率は1回目の試験の2.8 µg/mL で49%、2回目の試験の2.8 µg/mL (回復期間なし) で43%、0.7 µg/mL (回復期間あり) で45%であった。1回目及び2回目の試験において、小核を有する細胞の増加は認められなかった。

以上の結果から、本試験条件下において、M-4に小核誘発性はないと判断した。

2.6.6.7.2 線維芽細胞株 Balb/c 3T3を用いた *in vitro* 光安全性試験

(資料番号4.2.3.7.7-1)

本薬はほぼ■～■ nm の波長を吸収する。光毒性の潜在リスクを検討する目的で、Balb/c 3T3細胞株を用いた *in vitro* 光安全性試験を実施した。

細胞を本薬 (0, 0.02～50 µg/mL) とともに60分間培養した。その後、擬似太陽光 (UVA, 1.64 mW/cm²) を照射又は非照射した状態で、約50分間室温で静置した。ニュートラルレッドの取り込みにより細胞生存率を求め、細胞生存率の50%阻害濃度 (IC₅₀) を算出した。光毒性

の判定は、PIF (Photo Irritation Factor = 非照射群の IC₅₀/照射群の IC₅₀) が5を超える場合に光毒性が陽性とする OECD テストガイドライン判定基準に準じた。

試験方法及び成績を表2.6.7.15-3に示した。

この試験において本薬は陽性を示した (PIF = 94.8)。

2.6.6.8 考察及び結論

ラット及びカニクイザルの最長13週間までの反復経口投与毒性において共通してみられた主要な所見は、赤血球系、消化管、肝胆道系及び副腎に対する影響であった。その他に、ラットでは気管、肺、骨及び切歯に対する影響並びに血液凝固時間の延長を伴う腸管の出血性変化もみられた。4及び13週間反復投与毒性試験でみられた変化は、それぞれ4及び8週間の休薬期間終了時までには回復又は回復傾向を示した。

細菌を用いた復帰突然変異試験及び哺乳類細胞を用いた染色体異常試験において、それぞれ DNA 及び染色体に対する直接作用は認められなかったが、ラットにおいて染色体の分配異常による小核誘発作用が認められた。また、妊娠ラット及びウサギへの器官形成期投与により、胚・胎児毒性がみられた。更に、*in vitro* 光安全性試験において、光毒性が陽性となった。

投与量の増加に伴って曝露量が増加し、蓄積性は認められなかった。ラット及びカニクイザルともに曝露量及び毒性に明らかな性差は認められなかった。主要な *in vivo* の毒性試験における平均曝露量を表 2.6.6.8-1に示した。

表 2.6.6.8-1 主要な *in vivo* 試験及び臨床試験における反復投与後の平均曝露量

試験の種類	投与量 (mg/kg/day)	C _{max} (ng/mL) , M/F	AUC _{0-24h} [†] (ng·h/mL), M/F
ラット 4 週間 ^{a)}	6	673/841	9340/13900
	20	2190/1770	38100/33200
	60	2200/1990	39800/40300
ラット 13 週間 ^{b)}	3	370/524	5100/8450
	9	1250/1520	18600/25800
	27	1840/2170	35300/41100
カニクイザル 4 週間 ^{a)}	1.7	102/92.5	1160/1300
	5	205/302	2400/3980
	15	456/464	6530/6540
カニクイザル 13 週間 ^{b)}	1.3	83.4/94.3	894/1030
	4	243/189	3610/2810
	12	461/463	7060/6920
ラット 胚・胎児発生 ^{b)} (妊娠ラット)	3	-/827	-/13900
	9	-/2140	-/40600
	27	-/3590	-/66400
ウサギ 胚・胎児発生 ^{b)} (妊娠ウサギ)	3	-/163	-/2950
	9	-/385	-/6650
	27	-/2090	-/43200
ラット 小核 ^{a)}	6 ^c	412/-	6480/-
	20 ^c	1560/-	24200/-
	60 ^c	1770/-	28400/-
	200	1850/-	36700/-
	500	3030/-	55800/-

試験の種類	投与量 (mg/kg/day)	C _{max} (ng/mL) , M/F	AUC _{0-24h} † (ng·h/mL), M/F
	1000	3020/-	59400/-
	2000	2810/-	53700/-
ラット 小核 ^{a)}	100	2100/-	37000/-
(機序解明)	200	3210/-	58700/-
	500	4140/-	74900/-
	1000	4440/-	84200/-
ヒト (AF-001JP 試験)	600 mg/日 (300 mg, 1 日 2 回)	575	11900

-: 該当なし, 曝露量: 反復投与試験及び生殖発生毒性試験は反復投与後の曝露量。ラット小核試験は単回投与後の曝露量

溶媒: a) ■w/v% HPCD/■mol/L メタンスルホン酸/■mol/L 塩酸水溶液, b) ■w/v% HPMC/■mol/L 塩酸水溶液, c) C_{max} 及び AUC_{0-24h} はラット4週間反復経口投与試験を外挿

† ヒト AUC_{0-24h}: 日本人非小細胞肺癌患者における AF-001JP 試験のコホート6で, 臨床推奨用量600 mg/日 (300 mg を1日2回投与) を反復経口投与した時の AUC_{0-10h} を2.4倍した値を用いた。この値は, 反復経口投与後10時間目までの本薬の血中濃度推移に基づいて, コンパートメント解析により算出した AUC_{0-24h} とほぼ同じ値であった²⁾。

(1) 死亡又は状態悪化

ラット及びカニクイザルの4及び13週間反復投与毒性試験において, 本薬に起因する死亡又は状態悪化はみられなかった。開発初期に探索的に実施したカニクイザルの2週間予備毒性試験では, 60 mg/kg/日群の2例中1例が投与期間中に瀕死状態に陥り, 切迫剖検された。この動物では投与4日目から便減少又は無便がみられ, 投与の約1週間後には体重減少を伴わない摂餌量の減少がみられ始め, 投与13日目に一般状態の悪化から瀕死剖検された。剖検時には消化管内容物の貯留, 消化管内のガス及び消化管の拡張等, 消化器系の異常を中心とした所見が認められた。消化器系の異常により, この個体の一般状態が悪化したものと考えられた。また, この結果より, カニクイザルにおける用量制限毒性は消化器系に対する影響と判断された。切迫剖検例について反復投与後の AUC_{0-24h} 及び C_{max} は決定することはできなかったが, 60 mg/kg/日群の生存例における投与14日目の AUC_{0-24h} 及び C_{max} はそれぞれ9820 ng·h/mL 及び568 ng/mL であった。

(2) 赤血球系に対する影響

ラット及びカニクイザルの4及び13週間反復投与毒性試験において, 赤血球系への影響が認められた。赤血球の形態異常は低曝露から発現する変化の一つであった。多くの場合, まず赤血球の形態異常が現れ, 曝露量の増加に伴って, カニクイザルでは貧血傾向が, ラットでは貧血刺激に対する代償性と考えられる変化 (網赤血球の高値, 脾臓における髄外造血の増加等) がみられた。赤血球系パラメータの変化は概して軽度であり, 13週間反復投与毒性試験では最も程度の強いものでも, ラットでは対照群平均値に対して網赤血球数は約1.3倍 (9 mg/kg/日群雌), カニクイザルでは投与前値の群平均に対して赤血球数は約0.94及び0.98倍 (それぞれ12 mg/kg/日群の雄及び雌, 以下同様), ヘモグロビン濃度は0.96及び0.99倍, ヘマトクリット値は0.94及び0.95倍の変動であった。4及び13週間反復投与毒性試験の高用量における曝露量はほぼ同様であったものの, 投与期間延長に伴う増悪はみられなかった。ウサギの胚・胎児発生に関する用量設定試験においても, 9 mg/kg/日以上で赤血球の形態異常, 27 mg/kg/日で投与終了時 (妊娠18日) に赤血球パラメータの変化 (ヘマトクリット値, MCV 等の低値) が観察され, 赤血球に対する影響は動物種によらず認められることが示された。なお, ラットの13週間反復投与毒性試験の27 mg/kg/日群でのみ血液凝固時間の延長を伴う回腸粘膜の出血が観察され, この群では明らかな貧血が認められた (出血とそれに関連する変化の詳細は「(7)血液凝固時

間の延長」の章で述べる)。

いわゆる cytotoxic drugs (細胞毒性型抗がん剤等) とは異なり、骨髄抑制を示唆する変化は認められず、赤血球系パラメータの変化は他の血球の減少を伴っていなかった。

両動物種とも、4及び13週間反復投与毒性試験でみられた赤血球系の変化は、それぞれ4及び8週間の休薬期間終了時までには回復又は回復傾向を示し、赤血球系に対する影響は可逆的であると考えられた。

(3) 消化管への影響

ラット及びカニクイザルの4及び13週間反復投与毒性試験で消化管への影響が認められ、消化管上皮に対する影響(消化管粘膜の増殖帯伸長)が両動物種に共通していた。

ラットでは、更に、腺胃上皮の変性、粘液を伴う腺胃粘膜上皮の肥大、消化管粘膜のマクロファージ/多核巨細胞/炎症性細胞の浸潤、小腸粘膜上皮の配列不整/剥離及び血清中の腸型 ALP の高値が観察された。消化管粘膜に認められた多核巨細胞は、一般的にマクロファージが異物を貪食する際に出現する病理組織像と類似していた。多核巨細胞は、消化管の粘膜のマクロファージが投与液(懸濁液)に含まれる被験物質を貪食したことを示唆する像である可能性が考えられた。また、上述した消化管粘膜の炎症性細胞の浸潤に関連すると考えられる所見として、血中の白血球、 α 2-グロブリン及び β -グロブリンの高値並びに骨髄における好中球増加がみられた。

カニクイザルでは、大腸の拡張が観察された。また、開発初期に探索的に実施されたカニクイザルの2週間の予備毒性試験では、60 mg/kg/日群の2例中2例で便減少、無便及び消化管における内容物貯留等の所見がみられ、この群の1例は消化器症状の悪化により一般状態が悪化し、瀕死剖検された。2週間予備毒性試験は少数例の動物を用いた試験ではあったが、カニクイザルにおける用量制限毒性は消化器系に対する影響であると判断された。いずれの動物種においても、細胞毒性型抗がん剤の投与でみられるような消化管粘膜における細胞死やそれに伴う下痢等の毒性は認められなかった。

両動物種とも、4及び13週間反復投与毒性試験でみられた消化管への影響は、それぞれ4及び8週間の休薬期間終了時までには回復又は回復傾向を示し、可逆的な変化であると考えられた。

(4) 肝胆道系への影響

ラット及びカニクイザルの4及び13週間反復投与毒性試験で肝胆道系への影響が認められた。

ラットでは4週間毒性試験で血清中の肝型 ALP、 γ -GT 及び総コレステロールの高値、胆管上皮の空胞化、肝細胞の腫大及び肝重量の高値がみられ、13週間反復投与毒性試験では更に、胆管上皮の変性/壊死、胆管増生、類洞壁細胞腫大/黄褐色色素沈着及び肝細胞の単細胞性/限局性壊死も認められた。ラットの肝臓における組織学的変化の程度はおおむね軽微から軽度であり、13週間反復投与毒性試験の27 mg/kg/日群の2/19例における限局性肝細胞壊死のみが中等度の変化であった。臨床検査値の変化も軽度であり、ラットの4週間反復投与毒性試験の高用量群(60 mg/kg/日)では対照群平均値に対して総コレステロールは1.4及び1.1倍(それぞれ雄及び雌、以下同様)であった。ラットの13週間反復投与毒性試験の高用量群(27 mg/kg/日)では対照群平均値に対して肝型 ALP は最大で2.3及び5.2倍であった。また、対照群の γ -GT は検出限界以下であったのに対し定量下限値を示した動物が散見された。この試験では AST の軽度な高値も認められたものの(対照群平均値に対して27 mg/kg/日群の雄及び雌でそれぞれ1.3及び1.6倍)、ALT の高値は伴っておらず、肝臓以外の臓器から AST の漏出があった可能性が考えられた。

カニクイザルでは4週間反復投与毒性試験で血清の肝型 ALP 及び直接ビリルビンの増加、グリソン鞘の炎症性細胞浸潤、肝細胞又はクッパー細胞の腫大及び肝重量の高値がみられ、13週間反復投与毒性試験では、更に、血清の γ -GT の増加と胆管増生も認められた。病理組織学的

変化はいずれも軽微であり、臨床検査値の変化も軽度であった。カニクイザルの13週間反復投与毒性試験の高用量（12 mg/kg/日群）では投与前値の群平均に対して γ -GT は約1.2及び1.4倍（それぞれ雄及び雌，以下同様），肝型 ALP は約1.8及び3.2倍であった。

投与期間の延長に伴って肝胆道系の所見の程度が著しく悪化することはなかったものの、ラットにおいては投与期間の延長に伴い、より低曝露から肝胆道系に対する影響が発現した。両動物種とも、4及び13週間反復投与毒性試験でみられた肝胆道系の所見は、それぞれ4及び8週間の休薬期間終了時までには回復し、肝胆道系に対する影響は可逆的であると考えられた。

(5) 副腎への影響

ラット及びカニクイザルの4及び13週間反復投与毒性試験で副腎への影響が認められた。

ラットでは4週間反復投与毒性試験の20 mg/kg/日以上で副腎重量高値及び副腎皮質の肥大がみられ、更に、13週間反復投与毒性試験では副腎束状帯細胞の大型脂肪滴の増加又は脂肪滴の減少が3 mg/kg/日以上でみられた（3 mg/kg では大型脂肪滴の増加（1例）のみ観察）。カニクイザルでは4週間反復投与毒性試験で副腎皮質の肥大が5 mg/kg/日以上でみられ、13週間反復投与毒性試験では副腎束状帯細胞の脂肪滴減少が4 mg/kg/日以上で観察された。

これらの病理組織学的な変化の多くは一般的にストレスによって誘発されるものと同様であり³⁾、投薬による肝臓及び消化管への影響などがストレスとなった可能性が考えられた。ラットではストレス応答と推察される所見として、リンパ系組織（胸腺、リンパ節、脾臓等）におけるリンパ球減少及び血液中の好中球増加が4週間反復投与毒性試験では20 mg/kg/日以上で、13週間反復投与毒性試験では9 mg/kg/日以上で認められた。しかしながら、ラットの定量的全身オートラジオグラフィー（2.6.4.4.1）では副腎に高い放射能分布が示されていることから、本薬が副腎に何らかの影響を及ぼしていた可能性も否定はできない。

4週間反復投与毒性試験でみられた副腎の所見は軽微であったが、13週間反復投与毒性試験では軽微な所見に併せて軽度な所見も観察された。両動物種とも、4及び13週間反復投与毒性試験でみられた副腎の所見は、それぞれ4及び8週間の休薬期間終了時までには、回復又は回復傾向を示した。これより、副腎に対する影響は可逆的であると考えられた。

(6) 呼吸器系への影響

ラットで呼吸器系（肺及び気管）への影響が認められた。

ラットの4及び13週間反復投与毒性試験で肺胞に泡沫マクロファージ浸潤がみられた。これは対照群でもみられた所見であるが、投与量の増加に伴って程度と発現頻度が増加した。4及び13週間反復投与毒性試験の高用量における曝露量はほぼ同様であったが、投与期間の延長に伴う増悪は認められず、いずれの試験においても軽微から軽度の所見であった。

他に肺の異常所見は認められなかったことも考慮すると、この所見の毒性学的な意義は限定的であると考えられた。4及び13週間反復投与毒性試験における泡沫マクロファージ浸潤は、それぞれ4及び8週間の休薬期間終了時には回復又は回復傾向を示した。

ラットの4及び13週間反復投与毒性試験では、気管粘膜に混合型の細胞浸潤（マクロファージ及び多核巨細胞、更に、13週間反復投与毒性試験では炎症性細胞）が認められた。ラットの13週間反復投与毒性試験においては、一部の動物で気管粘膜上皮に軽微から軽度な配列不整も伴っていた。一般的に気管における単核球、炎症性細胞の浸潤はラットでは溶媒投与群にも観察されるが⁴⁾、本試験では投薬群における所見の種類、程度及び頻度は投与期間の延長に伴って増加した。ラットの強制経口投与時にはしばしば逆流（reflux）が生じ、投与液により消化管内だけでなく経気道的にも曝露されることが知られている。気管粘膜に認められた多核巨細胞は、一般的にマクロファージが異物を貪食する際に出現する病理組織像と類似しており、投与液（懸濁液）に含まれる被験物質をマクロファージが貪食したことを示唆する像である可能性が考えられた。また、肺胞の泡沫マクロファージは一般的に溶媒を含む投与液の強制経口投与によって出現する所見と類似しており⁴⁾、これも投与液（懸濁液）に含まれる溶媒及び被験

物質をマクロファージが貪食したことを示唆する像である可能性が考えられた。

以上の様に、本薬が肺及び気管に対して何らかの影響を及ぼす可能性は完全には否定できないが、肺炎や気管支炎で生ずるような浮腫、浸出物、肺胞上皮細胞の傷害、過形成及び線維化等の所見は伴っておらず、また回復性のある所見であったことから、いずれの所見も本薬によって臨床上問題となる呼吸器障害が誘発されることを示唆するものではないと考えられた。

(7) 血液凝固時間の延長

ラットの13週間反復投与毒性試験で血液凝固時間の延長を伴う回腸の出血性変化が認められた。27 mg/kg/日でプロトロンビン時間の延長（対照群平均値に対して雄及び雌でそれぞれ2.0及び1.2倍）及び活性化部分トロンボプラスチン時間の延長がみられた（対照群平均値に対して雄及び雌でそれぞれ1.8及び1.2倍）。9 mg/kg/日群では明らかな出血像はみられなかったものの、腸間膜リンパ節における赤血球貪食、血液吸収やヘモジデリン沈着等の出現頻度及び程度の増加から軽度の消化管出血があったことが示唆され、27 mg/kg/日群では回腸粘膜において出血が認められた。27 mg/kg/日群では回腸粘膜の出血に関連すると推察される所見として、黒色便、大腸における暗赤色/ゼリー状の内容物、貧血性の変化（赤血球パラメータの低値、眼球の変色）、腎臓の近位尿細管の黄褐色色素沈着、肝臓の類洞壁細胞の黄褐色色素沈着、尿素窒素値の高値等の所見も認められた。8週間の休薬期間終了時には、出血の二次的変化である腸間膜リンパ節のヘモジデリン沈着や脾臓の髄外造血増加がみられたものの、血液凝固時間の延長及び出血は回復していた。したがって、血液凝固時間の延長及びそれに伴う出血は可逆的であると考えられた。血液凝固時間の延長は、肝毒性が認められた用量より高い用量で認められた。血液凝固因子は肝細胞で産生され、肝疾患では出血傾向が認められることから⁵⁾、血液凝固時間の延長は肝毒性の二次的影響である可能性も推察される。

(8) 骨への影響

ラットの4及び13週間反復投与毒性試験で骨に対する影響が認められた。4週間反復投与毒性試験では60 mg/kg/日群で、13週間反復投与毒性試験では27 mg/kg/日群で、大腿骨及び胸骨の両方又はいずれか一方において、軽微又は軽度の活性化破骨細胞の増加及び骨梁の減少が観察された。これらに関連すると推察される所見として、4週間反復投与毒性試験では6 mg/kg/日以上で血清中の骨型 ALP の軽度高値がみられ（対照群の平均値に対して60 mg/kg/日の雄及び雌でそれぞれ1.3及び2.0倍）、13週間反復投与毒性試験では27 mg/kg/日群で血中の無機リンの軽度高値が認められた（対照群の平均値に対して雄及び雌でそれぞれ1.3及び1.2倍）。4及び13週間反復投与毒性試験の高用量における曝露量はほぼ同様であったが、投与期間の延長に伴って病理組織学的な変化の程度及び発生頻度は増加した。

4及び13週間反復投与毒性試験でみられた骨に関連する所見は、それぞれ4及び8週間の休薬期間終了時には回復しており、骨に対する影響は可逆的であると考えられた。カニクイザルでは骨に対する影響は認められておらず、げっ歯類は成人と異なる骨代謝を示す（成体でも骨成長が継続する、骨代謝回転速度が速い動物種である等）ことを考慮すると、一般的にはラットの骨に対する影響の成人への外挿性は限定的であると考えられる。したがって、骨の成長が終了している成人患者に対する本所見の外挿性は低いものと推察された。

(9) 歯への影響

ラットの13週間反復投与毒性試験で切歯に対する影響が認められた。ラットの切歯が入れかわる期間（約40から50日⁶⁾）と一致して、投与52日目から27 mg/kg/日群で下顎切歯の白色化が観察され、その後は下顎切歯の短縮も認められた。病理組織学的にはエナメル芽細胞の配列不整/変性/壊死、乳頭層/象牙芽細胞層の毛細血管の拡張及び象牙芽細胞の配列不整がみられた。これらの変化は、エナメル質産生部位である切歯中間部に主座してみられたが、歯原性細胞の増殖活性が高い部位である歯根部ではみられなかった。

歯の所見はいずれも8週間の休薬期間終了時には回復していたことから、可逆的な変化と考えられた。歯の変化はカニクイザルでは認められなかった。ラット4週間反復投与毒性試験及びカニクイザル4及び13週間反復投与毒性試験では、肉眼的に歯の異常は認められなかった。ラットの切歯はヒトと異なり生涯にわたって成長し続けることから、一般的にはラットの切歯に対する影響の成人への外挿性は限定的であると考えられる。また、ヒトのエナメル質の形成活性はラットよりも低いことが報告されている^{7,8)}。成長期の幼児及び小児の歯に対して本薬が影響を及ぼす可能性は否定できないが、歯の成長が終了している成人患者に対する外挿性は低いものと推察された。

(10) 反復投与で認められたその他の所見

その他、ラット反復投与毒性試験において、血小板系及び下垂体への影響並びに心臓重量及び血糖の高値（いずれも軽度）が認められた。

ラットの4及び13週間反復投与毒性試験で血小板系への影響が認められた。みられた所見は血小板産生の亢進を示唆するものであり、4週間反復投与毒性試験では血液中における巨大血小板の出現及び脾臓における成熟巨核球の軽微な増加が観察され、更に13週間反復投与毒性試験の27 mg/kg/日群では血小板の軽度な高値（対照群平均値に対して雄及び雌でそれぞれ1.3及び1.1倍）も伴っていた。4及び13週間反復投与毒性試験の高用量における曝露量はほぼ同様であったが、投与期間延長に伴う明らかな増悪はみられず、いずれの所見も可逆的であった。血小板産生の亢進を誘発しうる要因として、一つには網赤血球数の高値及び脾臓の髄外造血から示唆される赤血球系の造血亢進が考えられた。赤血球系の貧血刺激は、赤血球系の造血を亢進する因子であるエリスロポエチンの産生を腎臓において誘発することが報告されており⁹⁾、エリスロポエチンは血小板系の造血を亢進する作用も有している¹⁰⁾。更に、4及び13週間反復投与毒性試験でみられた炎症性変化（消化管粘膜の炎症性細胞浸潤、13週間反復投与毒性試験でみられた気管粘膜の炎症性細胞浸潤）及び13週間反復投与毒性試験における回腸の出血は、血小板の消費に繋がる変化であり、これらも血小板産生を亢進させた要因と推察された。

ラットの4及び13週間反復投与毒性試験で下垂体への影響が認められた。4週間反復投与毒性試験では下垂体絶対重量の低値及び下垂体前葉細胞における萎縮がみられ、少数例ではアポトーシス小体の増加及び分裂像の増加も伴っていた。13週間反復投与毒性試験では、高用量群の曝露量が4週間反復投与毒性試験とほぼ同等であったにもかかわらず、下垂体前葉細胞の萎縮のみが観察され、発現頻度は減少した（4週間反復投与毒性試験：中間用量で4/10例、高用量で9/20例、13週間反復投与毒性試験：高用量のみ4/19例）。認められた病理組織学的所見はいずれも軽微であった。下垂体前葉の形態変化は、栄養状態の悪化によっても誘発されることが報告されている¹¹⁾。下垂体の所見が発現した原因は明らかではないが、体重増加量及び摂餌量の減少を伴う用量でみられたことから、栄養状態の悪化により誘発された所見であった可能性も推察された。4及び13週間反復投与毒性試験の高用量における曝露量はほぼ同等であったが、投与期間の延長に伴う増悪はみられなかったこと、軽微な所見であったこと、可逆性の所見であったことから、本所見の毒性学的な意義は限定的であると考えられた。

ラットでは、心臓重量の軽度な高値が4週間反復投与毒性試験（絶対値及び相対値）と13週間反復投与毒性試験（絶対値又は相対値）においてみられた。器質的な変化を伴わないことから、本所見の毒性学的な意義は低いと考えられた。

ラットの4週間反復投与毒性試験においてのみ6 mg/kg/日以上群で血糖のわずかな高値が認められたが、13週間反復投与毒性試験では認められず、本所見の毒性学的な意義は低いと考えられた。

(11) 遺伝毒性

遺伝毒性試験の成績から、本薬はDNA及び染色体に対する直接作用はないが、染色体分配異常を誘発することが示された。一般的に、染色体の分配異常に起因する遺伝毒性には、閾値

があると考えられている¹²⁾⁻¹⁴⁾。したがって、本薬の異数性の誘発作用にも閾値が存在すると考えられる。ラットにおける小核誘発の無影響量は200 mg/kg/日（平均 C_{max} : 1850 ng/mL, 平均 AUC_{0-24h} : 36700 ng·h/mL）であった。

(12) 胚・胎児毒性

本薬（0, 3, 9, 27 mg/kg/日）を器官形成期の妊娠ラット及びウサギに投与し、妊娠末期に帝王切開した。

ラットにおいては、9 mg/kg 日以上の母動物で体重増加抑制が認められ、27 mg/kg/日で摂餌量が低下した。また、この群では全母動物で全胚致死がみられ、胎児の死亡率が増加した。9 mg/kg/日の胎児では、体重低値、仙椎及び尾椎数の減少、内臓異常（尿管拡張、心室小型、心室壁の菲薄化等）の発生率の増加がみられた。

ウサギにおいては、27 mg/kg/日の母動物1例に流産、2例に全胚致死が認められ、全母動物で糞便の減少/無便がみられた。また、赤血球の形態異常、貧血、栄養状態の悪化、ストレス等に関連した血液学的検査及び血液化学的検査値の変化が認められた。9 mg/kg/日では赤血球の形態異常がみられたのみであった。27 mg/kg/日では、着床後胚損失率の増加、生存胎児数の減少、胎児体重及び胎盤重量の低値等が認められ、胎児の骨格検査で完全過剰肋骨（骨格変異）が増加した。

本薬は ALK 阻害作用を有する。ALK ノックアウトマウスでは、明らかな肉眼的及び組織学的異常がなく出生することが報告されているが¹⁵⁾、ラット及びウサギを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験において、本薬は胚・胎児毒性を有することが明らかとなった。ラット及びウサギで認められた胚・胎児毒性は、本薬の小核誘発作用に関連した毒性である可能性が考えられた。

本薬は進行がん患者の治療を目的とした医薬品であり、「雌雄の受胎能および着床までの初期胚発生に関する試験」並びに「出生前および出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験」は、ICH S9ガイドラインでは製造販売承認申請に求められていないことから試験を実施しなかった。なお、雌雄の生殖器に対する影響は、ラット及びカニクイザルの反復経口投与毒性試験の成熟動物で検討し、薬物に直接起因した病理組織学的異常はみられなかった。

(13) 光毒性

本薬は光安全性の評価対象となりうる波長領域である290～700 nm の範囲内で光吸収を示すことから、Balb/c 3T3線維芽細胞株を用いた *in vitro* 光安全性試験を行った。この試験において本薬の PIF (94.8) は OECD テストガイドラインで光毒性陽性と判定される結果を得た。また、ラットの定量的全身オートラジオグラフィーにおいては(2.6.4.4.1)、皮膚及び眼に放射能の分布が示されている結果より、本薬は光毒性を有する可能性があると考えられた。

以上、本薬の非臨床毒性試験では遺伝毒性及び胚・胎児毒性が認められたものの、一般毒性試験で認められた所見の多くは軽微から軽度の可逆性の変化であり、本薬が ALK 陽性非小細胞肺癌患者を対象にした抗悪性腫瘍薬であることを考慮したとき、リスクベネフィットの観点からは許容できる毒性であると考えられた。

2.6.6.9 図表

図表は本文中に挿入した。

2.6.6.10 参考文献

- 1) カニクイザルの背景データ. [REDACTED]
- 2) [REDACTED]. AF-001JP 薬物動態解析報告書（ AUC_{0-24} 予測）、Version. 1.0. 中外製薬株式会

- 社 社内報告書, 2011.
- 3) Pellegrini A, Grieco M, Materazzi G, Gesi M, Ricciardi MP. Stress-induced morphohistochemical and functional changes in rat adrenal cortex, testis and major salivary glands. *Histochem J* 1998;30:695-701.
 - 4) Blankenship B, Skaggs H. Findings in historical control Harlan RCCHanTM: WIST rats from 4-, 13-, 26-week studies. *Toxicol Pathol* 2013; 41:537-47.
 - 5) 櫻川信男, 池田康夫編. E-3-7 肝疾患における凝血異常. 臨床血栓止血学 第1版. 医歯薬出版株式会社 1994.p. 213-20.
 - 6) Schour I, Massler M. 6. The Teeth. In: Farris EJ, Griffith JQ Jr, editors. *The rat in laboratory investigation*. 2nd. ed. JB Lippincott company;1949. p.104-65.
 - 7) Risnes S. Enamel apposition rate and the prism periodicity in human teeth. *Scand J Dent Res* 1986;94:394-404.
 - 8) Smith CE. Cellular and chemical events during enamel maturation. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998;9:128-61.
 - 9) Adamson JW, Longo DL. 58 貧血と赤血球増多症 (多血症) . アンソニー S. ファウチら編. ハリソン内科学 第3版. メディカル・サイエンス・インターナショナル 2003. p.368-75.
 - 10) Yonemura Y, Kawakita M, Fujimoto K, Sakaguchi M, Kusuyama T, Hirose J, et al. Effects of short-term administration of recombinant human erythropoietin on rat megakaryopoiesis. *Int J Cell Cloning* 1992;10:18-27.
 - 11) Herbert DC. Morphology of the mammotrophs and gonadotrophs in the anterior pituitary gland of rats with protein-calorie malnutrition. *Am J Anatomy* 1980 158;521-31.
 - 12) Müller L, Kasper P. Human biological relevance and the use of threshold-arguments in regulatory genotoxicity assessment: experience with pharmaceuticals. *Mutat Res* 2000;464: 19-34.
 - 13) Scott D, Galloway SM, Marshall RR, Ishidate M Jr, Brusick D, Ashby J, et al. International commission for protection against environmental mutagens and carcinogens. Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC task group 9. *Mutat Res* 1991;257:147-204.
 - 14) Thybaud V, Aardema M, Clements J, Dearfield K, Galloway S, Hayashi M, et al. Strategy for genotoxicity testing: hazard identification and risk assessment in relation to *in vitro* testing. *Mutat Res* 2007;627:41-58.
 - 15) Pulford K, Morris SW, Turturro F. Anaplastic lymphoma kinase proteins in growth control and cancer. *J Cell Physiol* 2004;199:330-58.

アレセンサカプセル20 mg
アレセンサカプセル40 mg
(アレクチニブ塩酸塩)

第2部（モジュール 2）：CTD の概要（サマリー）

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.7 毒性試験概要表

中外製薬株式会社

略語一覧

略語	英名	和名
ALT	Alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
ALP	Alkaline phosphatase	アルカリフォスファターゼ
AST	Aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
A/G ratio	Albumin/globulin ratio	アルブミン/グロブリン比
APTT	Activated partial thromboplasin time	活性化部分トロンボプラスチン時間
AUC _{0-24h}	Area under the plasma concentration-time curve from zero to 24h	0から24時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積
BLQ	Below the lower limit of quantification	定量限界未満
BW	Body weight	体重
C _{max}	Maximum (peak) plasma concentration	最高血漿中薬物濃度
DMSO	Dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
ECG	Electrocardiogram	心電図
F	Female	雌
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> hybridization	蛍光インサイチューハイブリダイゼーション
F0	Parental generation	親世代
F1	First filial generation	第一世代
GD	Gestation day	妊娠日
GLP	Good laboratory practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
γ-GT	γ-glutamyl transpeptidase	ガンマ-グルタミルトランスペプチダーゼ
HCT	Hematocrit	ヘマトクリット
HGB	Hemoglobin	ヘモグロビン
HPCD	Hydroxypropyl-β-cyclodextrin	ヒドロキシプロピルベータシクロデキストリン
HCl	Hydrochloric acid	塩酸
HPMC	Hydroxypropyl methyl cellulose	ヒドロキシプロピルメチルセルロース
IP	Inorganic phosphorous	無機リン
M	Male	雄
MCV	Mean corpuscular volume	平均赤血球容積
MCH	Mean corpuscular hemoglobin	平均赤血球ヘモグロビン量
MCHC	Mean corpuscular hemoglobin concentration	平均赤血球ヘモグロビン濃度
MNT	Micronucleus test	小核試験
MsOH	Methanesulfonic acid	メタンスルホン酸
MTD	Maximum tolerated dose	最大耐量
NA	Not applicable	適用なし
NOAEL	No observed adverse effect level	無毒性量
NZW	New Zealand White	ニュージーランドホワイト
PIF	Photo irritation factor	光毒性係数
PT	Prothrombin time	プロトロンビン時間
RBC	Red blood cell	赤血球

略語	英名	和名
SBECD	Sulfobutyl ether- β -cyclodextrin	スルフォブチルエーテル-ベータ-シクロデキストリン
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
UN	Urea nitrogen	尿素窒素
WBC	White blood cell	白血球

目次

	頁
2.6.7 毒性試験概要表	5
2.6.7.1 毒性試験一覧表	5
2.6.7.2 トキシコキネティクス試験の一覧表	7
2.6.7.3 トキシコキネティクス試験成績の一覧表	8
2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧	9
2.6.7.5 単回投与毒性	10
2.6.7.6 反復投与毒性：重要な試験以外の試験	11
2.6.7.7 反復投与毒性：重要な試験	17
2.6.7.7.1 ラットを用いた4週間反復経口投与毒性試験	17
2.6.7.7.2 ラットを用いた13週間反復経口投与毒性試験	24
2.6.7.7.3 カニクイザルを用いた4週間反復経口投与毒性試験	36
2.6.7.7.4 カニクイザルを用いた13週間反復経口投与毒性試験	40
2.6.7.8 <i>In vitro</i> 遺伝毒性	44
2.6.7.8.1 細菌を用いた復帰突然変異試験（エームス試験）	44
2.6.7.8.2 培養 CHL 細胞を用いた染色体異常試験	46
2.6.7.8.3 TK6 細胞を用いた小核試験（機序解明）	47
2.6.7.9 <i>In vivo</i> 遺伝毒性	48
2.6.7.9.1 ラットを用いた <i>in vivo</i> 小核試験	48
2.6.7.9.2 ラットを用いた <i>in vivo</i> 小核試験（機序解明）	49
2.6.7.10 がん原性	50
2.6.7.11 生殖発生毒性：重要な試験以外の試験	51
2.6.7.12 生殖発生毒性：受胎能及び着床までの初期発生に関する試験	52
2.6.7.13 生殖発生毒性：胚・胎児発生に関する試験	53
2.6.7.13.1 ラットを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験	53
2.6.7.13.2 ウサギを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験	56
2.6.7.14 生殖発生毒性：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	59
2.6.7.15 その他の毒性	60

2.6.7 毒性試験概要表

2.6.7.1 毒性試験一覧表

表 2.6.7.1-1 毒性試験一覧表

Test Article: Alectinib Hydrochloride								
Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration +Recovery	Doses ^a (mg/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Repeated-Dose Toxicity								
	RccHan TM :WIST rats	Gavage	4 weeks (Dose-range finding)	0, 3, 10, 30	No	Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.	TOX-0142S	4.2.3.2-1
	RccHan TM :WIST rats	Gavage	4 weeks +4 weeks	0, 6, 20, 60	Yes		TOX-0126	4.2.3.2-2
	RccHan TM :WIST rats	Gavage	13weeks +8 weeks	0, 3, 9, 27	Yes	Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.	TOX-0026	4.2.3.2-3
	Cynomolgus monkeys	Gavage	2 weeks (Preliminary)	0, 6, 20, 60	No	Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.	TOX-0034S	4.2.3.2-4
	Cynomolgus monkeys	Gavage	4 weeks (Dose-range finding)	0, 1, 3, 10	No	Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.	TOX-0141S	4.2.3.2-5
	Cynomolgus monkeys	Gavage	4 weeks +4 weeks	0, 1.7, 5, 15	Yes		TOX-0127	4.2.3.2-6
	Cynomolgus monkeys	Gavage	13weeks +8 weeks	0, 1.3, 4, 12	Yes		TOX-0027	4.2.3.2-7
Genotoxicity								
Ames	<i>S. typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537, <i>E. coli</i> WP2uvrA	<i>In vitro</i>	NA	0, 31.3-1000 µg/plate (+/- S9)	Yes		TOX-0153	4.2.3.3.1-1
Chromosomal aberration	CHL cells	<i>In vitro</i>	NA	0, 4-6 µg/mL (-S9, 6h) 0, 7-10 µg/mL (+S9, 6h) 0, 3-5 µg/mL (-S9, 24h)	Yes		TOX-0154	4.2.3.3.1-2

表 2.6.7.1-1 毒性試験一覧表 (続)

Test Article: Alectinib Hydrochloride or Alectinib

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration +Recovery	Doses ^a (mg/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Micronucleus	TK6 cells	<i>In vitro</i> ^b	NA	0, 0.4–6.3 µg/mL	No	Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.	TOX-0019S	4.2.3.3.1–3
	RccHan TM :WIST rats	Gavage	2 doses	0, 6, 20, 60, 200, 500, 1000, 2000	Yes		TOX-0155	4.2.3.3.2–1
	RccHan TM :WIST rats	Gavage ^b	2 doses	0, 100, 200, 500, 1000	Yes	Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.	TOX-0040	4.2.3.3.2–2
Reproductive and Developmental Toxicity								
Rat, Embryo-fetal Development	RccHan TM :WIST rats	Gavage	GD7 – 17	0, 3, 9, 27	Yes	Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.	TOX-0019	4.2.3.5.2–1
Rabbit, Embryo-fetal Development	Rabbit, Kbl:NZW	Gavage	GD6 – 18	0, 3, 9, 27	Yes		TOX-0024	4.2.3.5.2–2
Other Toxicity Study								
Safety evaluation of Metabolite M-4								
Screening Ames	<i>S. typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537, <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	<i>In vitro</i>	NA	0, 1.58–500 µg/plate (+/- S9)	No	Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.	TOX-0018	4.2.3.7.5–1
<i>In vitro</i> MNT	TK6 cells	<i>In vitro</i>	NA	0, 0.1–2.8 µg/mL	No	Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.	TOX-0019	4.2.3.7.5–2
Photosafety								
<i>In vitro</i> Photosafety	Balb/c 3T3 cells	<i>In vitro</i>	NA	0, 0.02–50 µg/mL	No	Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.	TOX-0047	4.2.3.7.7–1

Alectinib Hydrochloride was used in all studies except photosafety study where Alectinib was used.

a: Doses expressed as Alectinib. b: Mechanism analysis study (FISH analysis)

2.6.7.2 トキシコキネティクス試験の一覧表

表 2.6.7.2-1 トキシコキネティクス試験の一覧表

Test Article: Alectinib Hydrochloride

Type of Studies	Test System	Method of Administration	Doses (mg/kg/day)	GLP Compliance	Study Number	Location in CTD
Rat 4 weeks dose-range finding study	RccHan TM : WIST rats	Gavage	3, 10, 30	No	TOX-0142S	4.2.3.2-1
Rat 4 weeks toxicity study	RccHan TM : WIST rats	Gavage	6, 20, 60	Yes	TOX-0126	4.2.3.2-2
Rat 13weeks toxicity study	RccHan TM : WIST rats	Gavage	3, 9, 27	Yes	TOX-0026	4.2.3.2-3
Cynomolgus monkey 2 weeks dose-range finding study	Cynomolgus monkeys	Gavage	6, 20, 60	No	TOX-0034S	4.2.3.2-4
Monkey 4 weeks dose-range finding study	Cynomolgus monkeys	Gavage	1, 3, 10	No	TOX-0141S	4.2.3.2-5
Cynomolgus monkey 4 weeks toxicity study	Cynomolgus monkeys	Gavage	1.7, 5, 15	Yes	TOX-0127	4.2.3.2-6
Cynomolgus monkey 13weeks toxicity study	Cynomolgus monkeys	Gavage	1.3, 4, 12	Yes	TOX-0027	4.2.3.2-7
Rat embryo-fetal development Dose-range finding study	RccHan TM : WIST rats	Gavage	3, 9, 27	Yes	TOX-0019	4.2.3.5.2-1
Rabbit embryo-fetal development Dose-range finding study	New Zealand White rabbit	Gavage	3, 9, 27	Yes	TOX-0024	4.2.3.5.2-2

2.6.7.3 トキシコキネティクス試験成績の一覧表

表 2.6.7.3-1 トキシコキネティクス試験成績の一覧表

Test Article: Alectinib Hydrochloride

Steady State AUC _{0-24h} (ng·h/mL)							
Dose (mg/kg)	Rat		Cynomolgus Monkey		Pregnant Rat	Pregnant Rabbit	Human
	Male	Female	Male	Female			
1			977 ^d	528 ^d			
1.3			894 ^e	1030 ^e			
1.7			1160 ^f	1300 ^f			
3	4150 ^a /5100 ^b	5330 ^a /8450 ^b	3160 ^d	1990 ^d	13900 ^h	2950 ⁱ	
4			3610 ^e	2810 ^e			
5			2400 ^f	3980 ^f			
6	9340 ^c	13900 ^c	3870 ^g	4140 ^g			
9	18600 ^b	25800 ^b			40600 ^h	6650 ⁱ	
10	19200 ^a	28700 ^a	9460 ^d	14700 ^d			11900 ^j
12			7060 ^e	6920 ^e			
15			6530 ^f	6540 ^f			
20	38100 ^c	33200 ^c	12100 ^g	8520 ^g			
27	35300 ^b	41100 ^b			66400 ^h	43200 ⁱ	
30	43800 ^a	47000 ^a					
60	39800 ^c	40300 ^c	9820 ^g				
200	36700 ^k						
500	55800 ^k						
1000	59400 ^k						
2000	53700 ^k						

a: 4 weeks dose-range finding toxicity study in rats, b: 13 weeks toxicity study in rats, c: 4 weeks toxicity study in rats, d: 4 weeks dose-range finding toxicity study in cynomolgus monkeys, e: 13 weeks toxicity study in cynomolgus monkeys, f: 4 weeks toxicity study in cynomolgus monkeys, g: 2 weeks dose-range finding toxicity study in cynomolgus monkeys, h: Rat preliminary embryo-fetal toxicity study, i: Rabbit preliminary embryo-fetal toxicity study, j: AUC_{0-24h} was calculated from the AUC_{0-10h} of cohort 6 in AF-001JP study (300 mg, bid). k: micronucleus test in rats (after single dose) Vehicle: a, c, d, f, k: ■ w/v% HPCD/■ mol/L MsOH / ■ mol/L HCl solution; b, e, h, i: ■ w/v % HPMC/■ mol/L HCl solution; g: ■ w/v% SBECD/■ mol/L HCl solution

2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧

表 2.6.7.4-1 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧

Test Article: Alectinib Hydrochloride or Alectinib

Lot No.	Specified Impurities (%)		Unspecified impurities	Total of Impurities	Assay (%)	Study Number	Type of Study
	Impurity 1	Impurity 2					
Proposed Specification	■	■	■	■			
■#	■	Not detectable	■	■	■	TOX ■-0034S	Monkey 2 weeks dose-range finding study
■	■	Not detectable	■	■	■	TOX ■-0126 TOX ■-0153 TOX ■-0154 TOX ■-0019S TOX ■-0127	Rat 4 weeks toxicity study Ames test Chromosomal aberration test Micronucleus test (<i>in vitro</i> FISH) Monkey 4 weeks toxicity study
■#	■	Not detectable	■	■	■	TOX ■-0142S TOX ■-0141S	Rat 4 weeks dose-range finding study Monkey 4 weeks dose-range finding study
■#	■	Not detectable	■	■	■	TOX ■-0047	Photosafety
■	■	Not detectable	Not detectable	■	■	TOX ■-0155	Micronucleus test (<i>in vivo</i>)
■	■	Not detectable	Not detectable	■	■	TOX ■-0026 TOX ■-0027	Rat 13weeks toxicity study Monkey 13weeks toxicity study
■	■	Not detectable	Not detectable	■	■	TOX ■-0019 TOX ■-0024 TOX ■-0040	Rat embryo-fetal toxicity study Rabbit embryo-fetal toxicity study Micronucleus test (<i>in vivo</i> FISH)

Alectinib Hydrochloride was used in all studies except photosafety study where Alectinib was used.

Estimated based on a different analysis method.

2.6.7.5 単回投与毒性

該当なし。

2. 6. 7. 6 反復投与毒性：重要な試験以外の試験

表 2. 6. 7. 6-1 反復投与毒性：重要な試験以外の試験

Test Article: Alectinib Hydrochloride

Species/ Test System	Method of adminis- tration	Treatment Duration	Animals/ Group	Dose (mg/kg/day)	Mean C _{max} (ng/mL) M/F	Mean AUC _{0-24h} (ng·h/mL) M/F	Noteworthy Findings	Location in CTD
RccHan TM; WIST rat	Gavage	4 weeks Dose range- finding	Tox: 5/sex TK: 3/sex	0	/	/	Mortality: No deaths No abnormal findings	4.2.3.2-1
				3	Day 1: 179/238 Day 28: 263/332	Day 1: 2670/3620 Day 28: 4150/5330	Mortality: One animal was euthanized due to its deteriorated condition caused by dosing error. In-life: No abnormalities Hematology/Urinalysis/Bone marrow/Necropsy: No abnormalities Blood chemistry: [F] Increased AST, ALT and γ -GT Organ weight: [F] Liver $\uparrow$ (1F) Histopathology: [M, F] Single-cell necrosis of hepatocytes, thinning of corneal epithelium, [F] Degeneration/necrosis of bile duct epithelium, bile duct proliferation, inflammatory cell infiltration in Glisson's sheath and swelling of sinusoidal cells of liver	
				10	Day 1: 599/721 Day 28: 1350/1560	Day 1: 9050/13900 Day 28: 19200/28700	Mortality: No deaths In addition to the changes seen at the low dose, In-life: [M] Body weight gain suppression Hematology/Urinalysis/Bone marrow/Necropsy: No abnormalities Blood chemistry: [M, F] Increased ALP and hepatic ALP, [M] Increased AST, [F] Increased bone ALP (at this dose level only, 1F) Organ weight: [F] Thymus $\downarrow$ Histopathology: [M] Degeneration/necrosis of bile duct epithelium of liver, [F] Increased tingible body macrophages in thymus	

表 2.6.7.6-1 反復投与毒性：重要な試験以外の試験（続）

Test Article: Alectinib Hydrochloride

Species/ Test System	Method of adminis- tration	Treatment Duration	Animals/ Group	Dose (mg/kg/day)	Mean C _{max} (ng/mL) M/F	Mean AUC _{0-24h} (ng·h/mL) M/F	Noteworthy Findings	Location in CTD
				30	Day 1: 1500/1240 Day 28: 2300/2430	Day 1: 25300/25400 Day 28: 43800/47000	Mortality: No deaths In addition to the changes seen at the middle dose, Hematology: [M, F] Abnormal RBC morphology, [F] Increased reticulocytes (1F) Blood chemistry: [M] Increased inorganic phosphorus and bone ALP Urinalysis/Bone marrow/Necropsy: No abnormalities Organ weight: [F] Pituitary gland ↓, submandibular glands ↓ Histopathology: [M, F] Increased single-cell necrosis of follicular cells in skin, decreased trabecular bone and increased activated osteoclasts in metaphysis, [M] Dilatation of sinusoidal capillaries in adrenal gland (1M), increased tingible body macrophages in thymus, [F] Chief cell atrophy and parietal cell vacuolar degeneration in glandular stomach, inflammation of mucosa mainly in the glandular base, proliferating zone extension in glandular mucosa of stomach, atrophy of anterior cell of pituitary gland NOAEL: <3 mg/kg/day, MTD: 30 mg/kg/day	

The vehicle was an aqueous solution of ■% w/v HPCD and ■ mol/L methanesulfonic acid and ■ mol/L HCl solution, /: Not done

表 2.6.7.6-1 反復投与毒性：重要な試験以外の試験（続）

Test Article: Alectinib Hydrochloride

Species/ Test System	Method of adminis- tration	Treatment Duration	Animals/ Group	Dose (mg/kg/day)	Mean C _{max} (ng/mL) M/F	Mean AUC _{0-24h} (ng·h/mL) M/F	Noteworthy Findings	Location in CTD
Cynomolgus monkeys	Gavage	2 weeks Preliminary	1/sex	0	/	/	Mortality: No deaths No abnormal findings	4.2.3.2-4
				6	Day 1: 262/382 Day 14: 377/423	Day 1: 3230/4070 Day 14: 3870/4140	Mortality: No deaths No abnormal findings	
				20	Day 1: 605/832 Day 14: 830/619	Day 1: 9870/11100 Day 14: 12100/8520	Mortality: No deaths In-life: No abnormalities Hematology: [M, F] Decreased hematocrit (female only in the case of high-dose group), decreased MCV, abnormal RBC morphology (data missing as for high-dose female), [M] Increased MCHC, [F] Increased platelets and reticulocytes, decreased haemoglobin concentration Blood chemistry: No abnormalities Ophthalmic/ECG/Bone marrow/Organ weight/Necropsy: No abnormalities Histopathology: [M, F] Centrilobular enlargement of hepatocytes, atrophy of anterior cells of pituitary gland, hypertrophy of adrenal fasciculata cells, decreased zymogen granules in pancreatic acinar cells, [M] Bile duct proliferation with inflammatory cells of liver, [F] Irregular shaped islets in pancreas, decreased bone marrow haematopoietic cells, congestion in spleen (these three findings were seen in males only in the case of high-dose group)	

表 2.6.7.6-1 反復投与毒性：重要な試験以外の試験（続）

Test Article: Alectinib Hydrochloride

Species/ Test System	Method of adminis- tration	Treatment Duration	Animals/ Group	Dose (mg/kg/day)	Mean C _{max} (ng/mL) M/F	Mean AUC _{0-24h} (ng·h/mL) M/F	Noteworthy Findings	Location in CTD
				60	Day 1: 574/816 Day 14: 568/-	Day 1: 11500/12600 Day 14: 9820/-	Mortality: The female's condition deteriorated on Day 13 and it was necropsied in extremis on the same day. In-life: [Survivor] Vomiting, abdominal distention, decreased stools/no-faeces (sporadically from Day 3), decreased food consumption, [Animal necropsied in extremis] Decreased stools/no-faeces (sporadically from Day 4), loose stools, decreased food consumption; on day of necropsy, decreased locomotor activity, hypothermia, salivation and diarrhea <u>In addition to the changes seen at the middle dose,</u> Hematology: [Survivor] Increased platelets, [Animal necropsied in extremis] Increased neutrophils and MCHC, decreased RBCs, eosinophils and lymphocytes Blood chemistry: [Survivor and animal necropsied in extremis] Increased ALP, total bilirubin, creatinine and inorganic phosphorus, decreased total cholesterol, total protein, albumin and A/G ratio, [Animal necropsied in extremis] Increased AST, ALT, urea nitrogen and glucose, and decreased Na, Cl and Ca	

表 2.6.7.6-1 反復投与毒性：重要な試験以外の試験（続）

Test Article: Alectinib Hydrochloride

Species/ Test System	Method of adminis- tration	Treatment Duration	Animals/ Group	Dose (mg/kg/day)	Mean C _{max} (ng/mL) M/F	Mean AUC _{0-24h} (ng·h/mL) M/F	Noteworthy Findings	Location in CTD
							Ophthalmic/ECG: No abnormalities Bone marrow: [Animal necropsied in extremis] Low number of nucleated cells Organ weight: [Survivor] Liver ↑, pituitary gland ↓, [Animal necropsied in extremis] Adrenal glands ↑, spleen ↓, thymus ↓ Necropsy: [Survivor and animal necropsied in extremis] Dark red focus on stomach, gaseous content in large intestine, [Survivor] Retention of contents in large intestine, [Animal necropsied in extremis] Retention of contents in esophagus, stomach and small intestine, mushy contents in large intestine, stained fur in perianal region, dilatation of esophagus and large intestine, dark red focus on gallbladder mucosa, small spleen and thymus, dark red focus and edematous area of skin/subcutis of lower abdomen Histopathology: [Survivor and animal necropsied in extremis] Bile pigment in bile canaliculi, erosion/ulcer and atrophy in stomach, erosion of duodenum, atrophy of thymus, atrophy of mesenteric lymph nodes, atrophy of urinary bladder mucosal epithelium, [Survivor] increased multinucleated hepatocytes, [Animal necropsied in extremis] Thinning of lingual and esophageal epithelium, bile duct proliferation with inflammatory cells, ulcer of gallbladder, erosion of large intestine, atrophy of axillary lymph nodes, decreased lymphocytes in spleen, atrophy of parotid gland acinar cells, atrophy of submandibular gland acinar cells, edema of subcutis in lower abdominal region, congestion of skin/subcutis of lower abdominal region, swelling of ganglion cells in dorsal root ganglion NOAEL: 6 mg/kg/day MTD: 20 mg/kg/day Lethal dose: 60 mg/kg/day	

The vehicle was an aqueous solution of ■ w/v% SBECD and ■ mol/L HCl solution, /: Not done, -: No sample due to premature euthanasia

表 2.6.7.6-1 反復投与毒性：重要な試験以外の試験（続）

Test Article: Alectinib Hydrochloride

Species/ Test System	Method of adminis- tration	Treatment Duration	Animals/ Group	Dose (mg/kg/day)	Mean C _{max} (ng/mL) M/F	Mean AUC _{0-24h} (ng·h/mL) M/F	Noteworthy Findings	Location in CTD
Cynomolgus monkeys	Gavage	4 weeks	1/sex	0	/	/	Mortality: No deaths No abnormal findings	4.2.3.2-5
				1	Day 1: 35.1/19.8 Day 28: 72.8/51.9	Day 1: 604/324 Day 28: 977/528	Mortality: No deaths No abnormal findings	
				3	Day 1: 256/144 Day 28: 244/183	Day 1: 2760/1950 Day 28: 3160/1990	Mortality: No deaths In-life: No abnormalities Hematology: [M] Abnormal RBC morphology Blood chem/Urinalysis/ Bone marrow/ Organweight/Necropsy/Histopathology: No abnormalities	
				10	Day 1: 383/429 Day 28: 614/820	Day 1: 5950/9050 Day 28: 9460/14700	Mortality: No deaths In-life: No abnormalities <u>In addition to the changes seen at the middle dose,</u> Hematology: [M] Decreased hematocrit and MCV, increased reticulocytes, [F] Abnormal RBC morphology Blood chemistry: [F] Decreased albumin and A/G ratio Urinalysis/Bone marrow/Necropsy: No abnormalities Organ weight: [M, F] Liver ↑ Histopathology: [M, F] Decreased lipid droplets in fascicular cells of adrenal cortex Reversibility: Not determined in this study NOAEL: 1 mg/kg/day MTD: 10 mg/kg/day	

The vehicle was an aqueous solution of ■ w/v % HPCD, ■ mol/L methanesulfonic acid and ■ mol/L HCl solution; /: Not done,

2. 6. 7. 7 反復投与毒性：重要な試験

2. 6. 7. 7. 1 ラットを用いた4週間反復経口投与毒性試験

表 2. 6. 7. 7. 1-1 ラットを用いた4週間反復経口投与毒性試験

Report Title : A 4-week Repeated Dose Oral Gavage Toxicity Study of CH5424802-002 in Rats Followed by a 4-week Recovery Period (Study number: ■■■895)
 Test Article: Alectinib Hydrochloride
 Species/Strain : RccHanTM:WIST rats
 Duration of Dosing : 4 weeks
 Study Number : TOX■■-0126
 Initial Age : 6 weeks
 Duration of Postdose : 4 weeks
 Location in CTD : 4.2.3.2-2
 Date of First Dose : ■■(M), ■■(F) ■■20■■
 Method of Administration : Oral gavage, once daily
 Vehicle/Formulation : ■■w/v% HPCD/■■mol/L MsOH/
 GLP Compliance : Yes
 NOAEL : < 6 mg/kg/day
 ■■mol/L HCl solution
 Special Features : None

Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		6		20		60	
Number of Animals (Recovery)	M: 10 (5)	F: 10 (5)	M: 10 (5)	F: 10 (5)	M: 10 (5)	F: 10 (5)	M: 10 (5)	F: 10 (5)
TK : CH5424802-000								
Number of Animals	3	3	3	3	3	3	3	3
Mean C _{max} Day 1	BLQ	BLQ	412 ± 19	458 ± 3	1560 ± 150	1140 ± 80	1770 ± 280	1790 ± 140
(ng /mL) Day 28	BLQ	BLQ	673 ± 86	841 ± 106	2190 ± 330	1770 ± 360	2200 ± 190	1990 ± 270
Mean AUC _{0-24h} Day 1	Not determined	Not determined	6480 ± 170	8240 ± 250	24200 ± 2100	23000 ± 1000	28400 ± 3500	34900 ± 4600
(ng ·h/mL) Day 28	Not determined	Not determined	9340 ± 860	13900 ± 200	38100 ± 4200	33200 ± 7100	39800 ± 3400	40300 ± 5300
Noteworthy Findings								
Died or Euthanized Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight Gain (g) : Day 1-28	129.7 ± 13.0	63.8 ± 9.6	132.1 ± 11.6	58.9 ± 11.8	117.4± 15.5 *	46.3 ± 7.7**	108.8± 13.0**	44.5 ± 8.7**
Food Consumption (g/animal/day) : Day 4	20.94 ± 1.46	16.83 ± 1.20	21.29 ± 1.38	17.20 ± 1.47	20.65 ± 1.24	15.37 ± 1.04*	20.64± 1.60	15.42 ± 1.63*
Clinical Observation Salivation	—	—	—	—	—	—	+	+

Data are shown in Mean ± SD; —: No noteworthy findings, +: slight; BLQ: Below the limit of quantification (< 1 ng/mL)

*p < 0.05, **p < 0.01: Statistical analysis was performed using the decision tree in toxicological software.

表 2.6.7.7.1-1 ラットを用いた4週間反復経口投与毒性試験（続）

Test Article: Alectinib Hydrochloride								
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		6		20		60	
Number of Animals (Recovery)	M: 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)
Hematology: Day 29								
WBC (× 10 ³ /μL)	6.54 ± 1.59	5.83 ± 1.11	7.48 ± 1.62	7.54 ± 1.63	8.06 ± 1.61	8.86 ± 2.18**	9.59 ± 1.99**	9.32 ± 2.01**
Lymphocytes (× 10 ³ /μL)	5.74 ± 1.56	5.04 ± 0.97	6.63 ± 1.62	6.61 ± 1.57	7.06 ± 1.41	7.24 ± 1.84*	8.16 ± 1.89**	7.70 ± 1.69**
Neutrophils (× 10 ³ /μL)	0.63 ± 0.19	0.61 ± 0.24	0.67 ± 0.23	0.73 ± 0.18	0.82 ± 0.27	1.39 ± 0.86*	1.21 ± 0.64*	1.37 ± 0.51**
Monocytes (× 10 ³ /μL)	0.11 ± 0.03	0.12 ± 0.06	0.13 ± 0.04	0.14 ± 0.05	0.14 ± 0.05	0.18 ± 0.06*	0.17 ± 0.05**	0.19 ± 0.04*
Reticulocytes ratio (%)	4.07 ± 0.43	4.50 ± 0.91	4.38 ± 0.46	4.34 ± 0.37	4.97 ± 0.52**	5.49 ± 0.83	4.68 ± 0.60*	5.21 ± 0.46*
Giant platelets (No. of Animals)	1	0	2	3	10	10	10	10
Poikilocytosis (No. of animals)								
Burr cells and/or erythrocytes fragments	0	0	0	1	7	9	6	10
Diffusely basophilic erythrocytes	0	0	1	0	5	8	7	9
Blood Chemistry: Day 29								
Glucose (mg/dL)	107.7 ± 9.0	101.0 ± 12.3	123.9 ± 19.1*	112.1 ± 10.3*	131.9 ± 8.8**	122.6 ± 8.9**	150.2 ± 15.7**	121.8 ± 7.1**
Total protein (g/dL)	6.11 ± 0.24	6.16 ± 0.39	6.25 ± 0.42	6.28 ± 0.33	6.45 ± 0.37	6.40 ± 0.20	6.71 ± 0.22**	6.37 ± 0.34
Albumin (g/dL)	3.23 ± 0.14	3.59 ± 0.29	3.32 ± 0.26	3.58 ± 0.20	3.42 ± 0.26	3.65 ± 0.23	3.59 ± 0.20**	3.58 ± 0.30
ALP (U/L)	377.7 ± 55.3	226.8 ± 44.5	436.9 ± 95.8	299.3 ± 38.8**	578.8 ± 128.7**	444.0 ± 130.7**	633.1 ± 107.2**	538.4 ± 120.5**
Hepatic ALP (U/L)	55.46 ± 21.75	12.23 ± 6.94	69.07 ± 25.44	15.98 ± 12.69	142.92 ± 52.22**	82.77 ± 44.03**	216.95 ± 89.39**	141.18 ± 81.26**

Data are shown in Mean ± SD

*p < 0.05, **p < 0.01: Statistical analysis was performed using the decision tree in toxicological software.

表 2.6.7.7.1-1 ラットを用いた4週間反復経口投与毒性試験 (続)

Test Article: Alectinib Hydrochloride

Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		6		20		60	
Number of Animals (Recovery)	M: 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)
Bone ALP (U/L)	291.94 ± 46.42	180.35 ± 40.96	332.05 ± 81.42	253.13 ± 39.49**	409.65 ± 138.00	326.85 ± 107.37**	384.10 ± 59.20**	367.76 ± 80.45**
γ-GT (U/L)	0.9 ± 0.3	0.8 ± 0.4	0.9 ± 0.3	1.1 ± 0.3	0.8 ± 0.4	1.1 ± 0.3	1.0 ± 0.0	1.6 ± 1.0*
Total cholesterol (mg/dL)	61.7 ± 9.6	48.2 ± 9.0	74.2 ± 14.1	58.3 ± 11.4	98.4 ± 14.1**	55.0 ± 11.2	85.2 ± 10.2**	52.9 ± 15.0
Organ weight: Day 29								
Liver (% of BW)	3.05 ± 0.12	3.00 ± 0.18	3.10 ± 0.19	3.18 ± 0.19	3.54 ± 0.16**	4.05 ± 0.22**	3.71 ± 0.15**	4.14 ± 0.17**
Adrenal glands (×10 ⁻³ %)	23.30 ± 3.01	42.18 ± 4.38	25.14 ± 4.43	47.29 ± 5.46	27.75 ± 4.06*	57.39 ± 3.60**	29.58 ± 3.95**	53.12 ± 6.33**
Heart (% of BW)	0.32 ± 0.01	0.34 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.37 ± 0.02*	0.36 ± 0.02**	0.43 ± 0.02**	0.38 ± 0.02**	0.44 ± 0.03**
Spleen (% of BW)	0.24 ± 0.03	0.26 ± 0.03	0.24 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.25 ± 0.03	0.35 ± 0.04**	0.28 ± 0.05*	0.32 ± 0.03**
Salivary glands (% of BW)	0.20 ± 0.03	0.21 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.20 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.18 ± 0.01	0.19 ± 0.01
Pituitary gland (mg)	8.61 ± 0.74	12.69 ± 1.33	8.11 ± 0.65	12.26 ± 1.26	7.86 ± 0.41*	11.11 ± 1.11*	7.72 ± 0.78*	10.11 ± 0.80**
Histopathology: Day 29 (No. of Animals)								
Lymph node, mandibular								
Decrease, lymphocyte, lymph follicle	0	0	/	/	/	0	0	1, minimal
Decrease, lymphocyte, medulla	0	0	/	/	/	0	0	2, minimal
Decrease, lymphocyte, paracortex	0	0	/	/	/	0	0	2, minimal

Data are shown in Mean ± SD; /: Not done, *p < 0.05, **p < 0.01: Statistical analysis was performed using the decision tree in toxicological software.

表 2.6.7.7.1-1 ラットを用いた4週間反復経口投与毒性試験（続）

Test Article: Alectinib Hydrochloride								
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		6		20		60	
Number of Animals (Recovery)	M: 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)
Lymph node, mesenteric								
Decrease, lymphocyte, follicle	0	0	/	/	0	0	3, minimal	4, minimal
Decrease, lymphocyte, medulla	0	0	/	/	0	0	3, minimal	4, minimal
Decrease, lymphocyte, paracortex	0	0	/	/	0	0	3, minimal	5, minimal
Thymus								
Decrease, lymphocyte	0	0	/	0	0	7, minimal	5, minimal	10, minimal to mild
Spleen								
Decrease, lymphocyte, marginal zone	0	0	0	0	0	0	3, minimal	5, minimal
Decrease, lymphocyte, periarterial lymphoid tissue	0	0	0	0	0	0	3, minimal	4, minimal
Increase, extramedullary hematopoiesis, erythrocytic	0	0	0	0	3, minimal	0	3, minimal	0
Increase, mature megakaryocyte	0	0	0	0	1, minimal	4, minimal	5, minimal	4, minimal
Bone marrow, femur								
Emperipoiesis, megakaryocyte	0	0	0	0	1, minimal	3, minimal	2, minimal	5, minimal
Increase, neutrophil	0	0	0	0	0	0	5, minimal	7, minimal
Bone marrow, sternum								
Emperipoiesis, megakaryocyte	0	0	0	0	1, minimal	3, minimal	1, minimal	6, minimal

/: Not done

表 2.6.7.7.1-1 ラットを用いた4週間反復経口投与毒性試験（続）

Test Article: Alectinib Hydrochloride								
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		6		20		60	
Number of Animals (Recovery)	M: 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)
Trachea Cell infiltration, macrophage/multinucleated giant cell, lamina propria	0	0	0	/	1, minimal	0	4, minimal	4, minimal
Lung (and bronchus) Cell infiltration, foamy macrophage, alveolus	0	0	1, minimal	5, minimal	7, minimal to mild	10, minimal to mild	9, minimal to mild	9, minimal to mild
Stomach Cell infiltration, inflammatory, mucosa, glandular stomach	0	0	0	0	10, minimal	10, minimal to mild	10, minimal to mild	10 , mild to moderate
Cell infiltration, macrophage, mucosa, glandular stomach	0	0	0	0	0	6, minimal	0	10, minimal to moderate
Degeneration, glandular epithelium	0	0	0	0	10, minimal	10, minimal to mild	10, minimal to mild	10, mild to severe
Extension, proliferative zone, mucosa, glandular stomach	0	0	0	0	3, minimal	7, minimal to mild	10, minimal to mild	7, minimal to moderate
Small intestine, duodenum Cell infiltration, inflammatory, mucosa	0	0	0	0	3, minimal	1, minimal	6, minimal to mild	9, minimal
Cell infiltration, macrophage, mucosa	0	0	0	0	9, minimal to mild	10, minimal to mild	9, minimal to mild	10, minimal to mild
Extension, proliferative zone, mucosa	0	0	0	0	10, minimal	10, minimal	10, minimal	10, minimal

/: Not done

表 2.6.7.7.1-1 ラットを用いた4週間反復経口投与毒性試験（続）

Test Article: Alectinib Hydrochloride

Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		6		20		60	
Number of Animals (Recovery)	M: 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)
Small intestine, jejunum Cell infiltration, macrophage, mucosa	0	0	/	/	/	0	0	1, minimal
Liver Enlargement, hepatocyte Vacuolation, bile ductal epithelium	0 0	0 0	0 0	0 0	8, minimal 10, minimal to mild	10, minimal 8, minimal to mild	10, minimal 10, mild	10, minimal 10, mild
Pancreas Increase, apoptotic body, acinar cell	0	0	0	/	2, minimal	0	4, minimal	2, minimal
Pituitary Atrophy, anterior cell Increase, apoptotic body, anterior lobe Increase, mitotic figure, anterior lobe	0 0 0	0 0 0	/ / /	0 0 0	/ / /	4, minimal 0 0	0 0 0	9, minimal 1, minimal 2, minimal
Adrenal glands Hypertrophy, cortical cell, fascicular zone Hypertrophy, cortical cell, reticular zone	0 0	0 0	0 0	0 0	0 3, minimal	0 9, minimal	5, minimal 7, minimal	5, minimal 10, minimal
Skin Thickening, epidermis	0	0	/	/	/	0	0	1, minimal
Bone, femur Decrease, trabecular bone Increased, activated osteoclast	0 0	0 0	/ /	/ /	0 0	0 0	5, minimal 5, minimal	8, minimal 5, minimal

/: Not done

表 2.6.7.7.1-1 ラットを用いた4週間反復経口投与毒性試験 (続)

Test Article: Alectinib Hydrochloride								
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		6		20		60	
Number of Animals (Recovery)	M: 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)
Bone, sternum Decrease, trabecular bone	0	0	/	/	0	0	2, minimal	3, minimal
Histopathology: Day 57 Thymus Decrease, lymphocytes	0	0	/	0	/	2, minimal	0	3, minimal
Stomach Small, glandular epithelium	0	0	/	0	0	1, minimal	3, minimal	3, minimal
Cell infiltration, lymphocyte, mucosa, glandular stomach	0	0	/	0	0	0	0	3, minimal to mild
Cell infiltration, macrophage, mucosa, glandular stomach	0	0	/	0	0	0	0	3, minimal
Testis Decrease, spermatogenic cell	0	NA	/	NA	0	NA	1, minimal	NA
Epididymis Decrease, sperm, duct	0	NA	/	NA	0	NA	1, minimal	NA
Prostate Vacuolation, glandular epithelium	0	NA	/	NA	0	NA	1, mild	NA

/: Not done

2. 6. 7. 7. 2 ラットを用いた13週間反復経口投与毒性試験

表 2. 6. 7. 7. 2-1 ラットを用いた13週間反復経口投与毒性試験

Report Title : A 13-Week Repeated Dose Oral Gavage Toxicity Study of CH5424802-002 in Rats Followed by a 8-Week Recovery Period

Species/Strain : RccHanTM:WIST rats

Initial Age : 6 weeks

Date of First Dose : (M), (F) 20

Vehicle/Formulation : w/v% HPMC/ mol/L HCl solution

Special Features : None

Duration of Dosing : 13 weeks

Duration of Postdose : 8 weeks

Method of Administration : Oral gavage, once daily

GLP Compliance : Yes

Test Article: Alectinib Hydrochloride

Study Number : TOX-0026

Location in CTD : 4.2.3.2-3

NOAEL : < 3 mg/kg/day

Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		3		9		27	
Number of Animals (Recovery)	M: 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)	M : 9 [#] (5)	F : 10 (5)
TK : CH5424802-000								
Number of Animals	3	3	3	3	3	3	3	3
Mean C _{max} (ng /mL)								
Day 1	BLQ	BLQ	208 ± 30	238 ± 26	649 ± 45	872 ± 149	1780 ± 130	1960 ± 30
Day 91	BLQ	BLQ	370 ± 82	524 ± 114	1250 ± 380	1520 ± 190	1840 ± 160	2170 ± 90
Mean AUC _{0-24h} (ng・h/mL)								
Day 1	Not determined	Not determined	3010 ± 660	4000 ± 490	9770 ± 720	15100 ± 700	30000 ± 4000	35800 ± 1800
Day 91	Not determined	Not determined	5100 ± 1410	8450 ± 750	18600 ± 5700	25800 ± 1900	35300 ± 3300	41100 ± 2100

BLQ: Below the lower limit of quantification (< 1 ng/mL)

#: One animal was euthanized due to its deteriorated condition caused by dosing error and was excluded from evaluation in this study.

表 2.6.7.7.2-1 ラットを用いた13週間反復経口投与毒性試験 (続)

Test Article: Alectinib Hydrochloride								
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		3		9		27	
Number of Animals (Recovery)	M: 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)	M : 9 (5)	F : 10 (5)
Noteworthy Findings								
Died or Euthanized Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (g)								
Day 18	242.35 ± 8.94	173.21 ± 8.19	241.84 ± 9.34	168.15 ± 7.63*	238.31 ± 9.88	166.00 ± 5.01**	224.64 ± 7.86**	159.06 ± 5.40**
Day 91	374.51 ± 23.56	239.03 ± 12.79	375.87 ± 22.02	233.92 ± 11.21	357.97 ± 20.59*	219.49 ± 8.73**	299.21 ± 16.66**	202.99 ± 10.24**
Food Consumption (g/animal/day):								
Days 25-29	22.29 ± 1.27	17.44 ± 0.89	22.35 ± 1.21	17.31 ± 0.92	22.43 ± 1.54	16.61 ± 1.10*	20.06 ± 1.54**	15.95 ± 0.66**
Days 78-85	21.10 ± 1.19	16.94 ± 1.13	21.27 ± 1.20	16.78 ± 0.90	20.84 ± 1.13	16.21 ± 1.13	19.28 ± 1.36**	15.20 ± 1.35**
Clinical observation (No. of Animals)								
Brackish feces	0	0	0	0	0	0	1	3
Discoloration of eyeballs	0	0	0	0	0	0	1	4
White discoloration of lower incisors	0	0	0	0	0	0	0	8
Elongated upper incisors and short lower incisors	0	0	0	0	0	0	0	1

Data are shown in Mean ± SD.

*p < 0.05, **p < 0.01: Statistical analysis was performed using the decision tree in toxicological software.

表 2.6.7.7.2-1 ラットを用いた13週間反復経口投与毒性試験（続）

Test Article: Alectinib Hydrochloride

Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		3		9		27	
Number of Animals (Recovery)	M: 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)	M : 9 (5)	F : 10 (5)
Hematology: Day 92								
WBC (× 10 ³ /μL)	4.14 ± 0.52	1.97 ± 0.40	4.91 ± 1.42	2.36 ± 0.76	5.08 ± 0.96*	3.32 ± 0.94**	7.03 ± 1.72**	4.05 ± 0.51**
Neutrophils (× 10 ³ /μL)	0.98 ± 0.29	0.32 ± 0.09	1.06 ± 0.42	0.42 ± 0.13*	1.31 ± 0.32*	0.60 ± 0.15**	3.07 ± 0.98**	1.83 ± 0.43**
Monocytes (× 10 ³ /μL)	0.07 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.11 ± 0.05*	0.04 ± 0.02	0.10 ± 0.04*	0.05 ± 0.01**	0.21 ± 0.07**	0.13 ± 0.03**
Reticulocytes (× 10 ⁹ /μL)	145.43 ± 9.21	172.08 ± 29.19	153.56 ± 12.31	200.23 ± 34.78	184.15 ± 21.05**	215.48 ± 32.80*	418.90 ± 277.73**	423.34 ± 131.70**
RBC (× 10 ⁶ /μL)	8.00 ± 0.30	7.34 ± 0.32	8.09 ± 0.43	7.54 ± 0.41	8.19 ± 0.36	7.32 ± 0.25	7.93 ± 1.08	6.82 ± 0.71*
HGB (g/dL)	15.01 ± 0.44	14.28 ± 0.36	15.15 ± 0.43	14.81 ± 0.46	15.53 ± 0.38	14.50 ± 0.50	13.88 ± 1.29	13.17 ± 1.45*
HCT (%)	41.17 ± 1.43	40.25 ± 1.69	41.70 ± 1.32	41.93 ± 1.87	42.65 ± 1.50	40.58 ± 1.41	39.26 ± 2.73*	38.13 ± 4.09
MCHC (g/dL)	36.45 ± 0.92	35.46 ± 0.70	36.34 ± 0.83	35.33 ± 0.65	36.46 ± 0.51	35.76 ± 0.62	35.33 ± 0.98**	34.55 ± 0.91**
MCV (fL)	51.51 ± 0.93	54.90 ± 2.05	51.60 ± 1.78	55.65 ± 1.30	52.13 ± 1.39	55.42 ± 0.94	50.00 ± 4.77*	55.89 ± 1.53
MCH (pg)	18.78 ± 0.69	19.48 ± 0.75	18.74 ± 0.86	19.68 ± 0.64	19.01 ± 0.54	19.82 ± 0.52	17.63 ± 1.31**	19.29 ± 0.56
Platelets (× 10 ³ /μL)	880.0 ± 77.2	940.4 ± 95.1	826.6 ± 114.3	979.3 ± 111.0	877.5 ± 85.2	1014.1 ± 204.5	1121.2 ± 305.6**	1026.5 ± 214.2
PT (sec)	19.52 ± 1.16	17.31 ± 0.46	20.72 ± 1.63	16.95 ± 0.60	21.66 ± 4.85	16.70 ± 0.88	38.90 ± 8.85**	20.38 ± 3.67
APTT (sec)	17.42 ± 2.48	17.62 ± 2.03	19.10 ± 1.72*	16.65 ± 2.61	19.81 ± 1.53**	18.62 ± 1.67	30.69 ± 3.96**	22.02 ± 2.95**
Giant platelets (No. of Animals)	0	0	0	0	0	2	6	5
Poikilocytes (No. of Animals)	0	0	0	0	7	4	9	7
Blood Chemistry: Day 92								
Glucose (mg/dL)	161.6 ± 24.2	128.0 ± 23.7	152.2 ± 18.7	133.0 ± 18.5	148.0 ± 24.1	135.3 ± 16.3	124.1 ± 16.5**	130.1 ± 11.0
AST (U/L)	90.9 ± 15.6	87.2 ± 13.7	100.0 ± 16.3	134.3 ± 40.9**	111.7 ± 15.1*	117.3 ± 31.3**	121.2 ± 41.1**	139.8 ± 40.2**

Data are shown in Mean ± SD.

*p < 0.05, **p < 0.01: Statistical analysis was performed using the decision tree in toxicological software.

Increases of APTT at 3 and 9 mg/kg/day in males were not considered adverse because these changes were small and within the historical data.

表 2.6.7.7.2-1 ラットを用いた13週間反復経口投与毒性試験（続）

Test Article: Alectinib Hydrochloride

Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		3		9		27	
Number of Animals (Recovery)	M: 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)	M : 9 (5)	F : 10 (5)
ALP (U/L)	248.1 ± 67.2	99.5 ± 24.6	275.7 ± 78.3	112.4 ± 25.5	341.5 ± 55.8*	132.3 ± 33.4**	297.3 ± 84.7*	199.3 ± 74.1**
Hepatic ALP (U/L)	46.51 ± 22.75	4.57 ± 2.13	64.34 ± 38.34	5.53 ± 1.99	100.26 ± 50.03**	7.01 ± 3.78*	108.34 ± 38.91**	23.90 ± 10.46**
Intestinal ALP (U/L)	133.04 ± 55.60	57.91 ± 22.15	142.03 ± 73.77	73.22 ± 24.09	161.37 ± 40.48	82.59 ± 32.27*	125.29 ± 69.90	123.90 ± 78.89**
Bone ALP (U/L)	68.58 ± 16.89	37.04 ± 17.20	69.31 ± 16.04	33.65 ± 7.57	79.85 ± 22.29	42.69 ± 9.80	63.69 ± 12.81	51.52 ± 17.12*
γ-GT (U/L)	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	2.0 ± 0.0
Alpha1-globulin (g/dL)	1.18 ± 0.09	1.05 ± 0.10	1.19 ± 0.06	1.05 ± 0.11	1.16 ± 0.08	1.06 ± 0.10	0.94 ± 0.09**	0.94 ± 0.10*
Alpha2-globulin (g/dL)	0.44 ± 0.05	0.40 ± 0.00	0.44 ± 0.05	0.41 ± 0.03	0.50 ± 0.00**	0.45 ± 0.05**	0.52 ± 0.04**	0.49 ± 0.06**
Beta-globulin (g/dL)	0.85 ± 0.05	0.75 ± 0.07	0.81 ± 0.07	0.77 ± 0.07	0.93 ± 0.05**	0.89 ± 0.06**	1.10 ± 0.07**	0.92 ± 0.09**
Gamma-globulin (g/dL)	0.23 ± 0.05	0.26 ± 0.05	0.22 ± 0.04	0.26 ± 0.05	0.21 ± 0.03	0.31 ± 0.06	0.17 ± 0.05**	0.20 ± 0.05*
Albumin (g/dL)	4.08 ± 0.09	4.15 ± 0.24	4.11 ± 0.10	4.52 ± 0.14	4.19 ± 0.12	4.45 ± 0.14	3.97 ± 0.22	3.96 ± 0.24*
UN (mg/dL)	18.15 ± 2.45	17.99 ± 3.01	18.94 ± 2.43	17.85 ± 2.67	18.50 ± 1.90	18.85 ± 2.36	22.57 ± 2.34**	20.69 ± 2.42*
IP (mg/dL)	4.33 ± 0.66	4.22 ± 0.92	4.71 ± 1.11	3.82 ± 0.94	4.78 ± 0.59	4.22 ± 1.02	5.74 ± 0.80**	5.21 ± 0.35*
Necropsy: Day 92								
Mesenteric lymph node								
Enlargement	0	0	0	0	6	3	9	10
Dark-red discoloration	0	0	0	0	3	1	9	10
Colon								
Dark-red contents	0	0	0	0	0	0	2	1
Gelatinous contents	0	0	0	0	0	0	1	0

Data are shown in Mean ± SD; /: Not examined; BLQ: Below the lower limit of quantification

*p < 0.05, **p < 0.01: Statistical analysis was performed using the decision tree in toxicological software.

表 2.6.7.7.2-1 ラットを用いた13週間反復経口投与毒性試験（続）

Test Article: Alectinib Hydrochloride

Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		3		9		27	
Number of Animals (Recovery)	M: 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)	M : 9 (5)	F : 10 (5)
Ileum								
Dilatation	0	0	0	0	0	0	0	7
Tooth								
White discoloration	0	0	0	0	0	0	0	6
Short lower incisors	0	0	0	0	0	0	0	1
Elongated upper incisors	0	0	0	0	0	0	0	1
Adrenal glands								
Enlargement	0	0	0	0	0	0	0	4
Dark-brown discoloration	0	0	0	0	0	0	0	1
Necropsy: Day 148								
Mesenteric lymph node								
Enlargement	0	0	0	0	1	1	5	5
Brown discoloration	0	0	0	0	0	0	3	2
Organ weight: Day 92								
Heart (/100 g BW)	250.1 ± 15.0	280.4 ± 19.4	258.2 ± 16.7	300.1 ± 13.4*	272.7 ± 17.5**	331.5 ± 27.5**	303.6 ± 19.8**	382.7 ± 20.5**
Adrenal (/100 g BW)	17.75 ± 2.52	31.67 ± 4.20	18.31 ± 2.99	31.36 ± 4.43	19.29 ± 2.69	37.57 ± 3.29**	22.61 ± 4.08**	45.38 ± 8.76**
Liver (/100 g BW)	2601.8 ± 140.9	2574.2 ± 189.8	2665.3 ± 191.3	2671.5 ± 216.7	2754.9 ± 119.7*	2908.7 ± 134.3**	3028.1 ± 112.2**	3664.8 ± 175.4**

表 2.6.7.7.2-1 ラットを用いた13週間反復経口投与毒性試験（続）

Test Article: Alectinib Hydrochloride

Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		3		9		27	
Number of Animals (Recovery)	M: 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)	M : 9 (5)	F : 10 (5)
Histopathology: Day 92								
Spleen								
Increased extramedullary hematopoiesis	0	0	3, minimal	0	8, minimal	1, minimal	8, minimal to mild	10, minimal to mild
Increased mature megakaryocytes	0	0	0	0	0	0	2, minimal	8, minimal
Decreased lymphocytes in white pulp	0	0	0	0	0	0	9, minimal to mild	10, minimal to mild
Bone marrow, femur								
Increased neutrophil	0	0	/	/	0	0	8, minimal to mild	8, minimal to mild
Increased megakaryocytes	0	0	/	/	0	0	0	1, minimal
Bone marrow, sternum								
Increased neutrophil	0	0	/	/	0	/	1, minimal	0
Stomach								
Macrophage infiltration in glandular mucosa	0	0	0	0	6, minimal	8, minimal	7, minimal	10, minimal to mild
Inflammatory cell infiltration in glandular mucosa	0	0	0	0	7, minimal	9, minimal	8, minimal	10, minimal
Degeneration of glandular epithelium	9, minimal	10, minimal	9, minimal	10, minimal	9, minimal to mild	10, minimal to mild	9, minimal to mild	10, mild
Hypertrophy with mucin of glandular epithelium	0	0	0	0	4, minimal	1, minimal	3, minimal	4, minimal
Extension of proliferating zone in glandular mucosa	9, minimal	9, minimal	10, minimal	10, minimal	8, minimal	9, minimal to mild	9, mild	10, minimal to mild

/: Not done

表 2.6.7.7.2-1 ラットを用いた13週間反復経口投与毒性試験（続）

Test Article: Alectinib Hydrochloride

Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		3		9		27	
Number of Animals (Recovery)	M: 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)	M : 9 (5)	F : 10 (5)
Jejunum								
Macrophage/multinucleated giant cell in mucosa	0	0	/	/	0	0	7, minimal to moderate	4, minimal
Inflammatory cell infiltration in mucosa	0	0	/	/	0	0	3, minimal to mild	0
Disarrangement/ desquamation of mucosal epithelium	0	0	/	/	0	0	1, minimal	0
Extension of proliferating zone in mucosa	0	0	/	/	0	0	1, minimal	0
Ileum								
Macrophage/multinucleated giant cell in mucosa	0	0	0	0	4, minimal	7, minimal	9, mild to moderate	10, mild to moderate
Inflammatory cell infiltration in mucosa	0	0	0	0	0	0	9, minimal to mild	10, minimal to mild
Disarrangement/ desquamation of mucosal epithelium	0	0	0	0	0	0	8, minimal	7, minimal
Hemorrhage in mucosa	0	0	0	0	0	0	2, minimal	3, minimal
Decreased lymphocyte in Peyer's patch	0	0	0	0	0	0	9, minimal	10, minimal to mild
Mesenteric Lymph nodes								
Macrophage/erythrophagy in sinus	5, minimal	6, minimal	4, minimal	5, minimal	10, mild to moderate	10, mild to moderate	9, moderate	10, moderate
Blood absorption	1, minimal	2, minimal	1, minimal	0	6, minimal to mild	3, minimal to mild	9, moderate to sever	10, mild to sever
Hemosiderin deposition	1, minimal	2, minimal	0	1, minimal	2, minimal to mild	0	9, mild to moderate	10, minimal to moderate

/: Not done

表 2.6.7.7.2-1 ラットを用いた13週間反復経口投与毒性試験（続）

Test Article: Alectinib Hydrochloride

Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		3		9		27	
Number of Animals (Recovery)	M: 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)	M : 9 (5)	F : 10 (5)
Multinucleated giant cell in sinus	0	0	0	0	0	0	9, minimal to moderate	10, minimal to moderate
Extramedullary hematopoiesis	0	0	0	0	0	0	0	3, mild
Axillary lymph nodes								
Macrophage/erythrophagy in sinus	0	0	0	0	1, minimal	7, minimal	6, minimal	5, minimal
Decreased lymphocyte	0	0	0	0	3, minimal	0	9, minimal	10, minimal
Blood absorption	0	0	0	0	0	0	0	1, minimal
Lung								
Foamy macrophage infiltration in alveolus	1, minimal	3, minimal	5, minimal	5, minimal	10, minimal	10, minimal	9, minimal to mild	10, minimal to mild
Trachea								
Macrophage/multinucleated giant cell in lamina propria	0	0	/	/	0	0	9, minimal	10, minimal to moderate
Disarrangement of mucosal epithelium	0	0	/	/	0	0	0	6, minimal to mild
Inflammatory cell infiltration in lamina propria	0	0	/	/	0	0	0	3, minimal
Liver								
Single cell necrosis of hepatocyte	0	0	/	6, minimal	0	2, minimal to mild	3, minimal	10, minimal to mild
Focal necrosis of hepatocyte	0	0	/	6, minimal	0	2, , minimal to mild	3, minimal to moderate	6, minimal to moderate
Microgranuloma	5, minimal	6, minimal	/	8, minimal	5, minimal	5, minimal	4, minimal to mild	4, minimal
Swelling/yellow brown pigmentation of sinusoidal cell	0	0	/	2, minimal	0	2, minimal	7, minimal	10, minimal to mild

/: Not done

表 2.6.7.7.2-1 ラットを用いた13週間反復経口投与毒性試験（続）

Test Article: Alectinib Hydrochloride

Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		3		9		27	
Number of Animals (Recovery)	M: 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)	M : 9 (5)	F : 10 (5)
Bile duct proliferation	0	0	/	0	0	0	0	4, minimal
Degeneration/necrosis of bile duct epithelium	0	0	/	0	0	0	0	3, minimal
Vacuolation of bile ductal epithelium	0	0	/	0	0	0	9, minimal	10, minimal
Adrenal glands								
Increased large lipid droplet in fascicular cell	0	0	1, minimal	0	4, minimal to mild	8, minimal	5, minimal to mild	7, minimal
Decreased lipid droplet in fascicular cell	0	0	0	0	0	0	3, minimal	6, minimal to mild
Yellow brown pigmentation in sinusoidal cell	0	0	0	0	0	0	0	5, minimal
Tooth								
Remnant of eosinophilic material in enamel space	0	0	/	/	0	0	7, minimal	10, minimal to mild
Degeneration/necrosis of ameloblast in mid region	0	0	/	/	0	0	4, minimal	10, minimal to mild
Dilatation of capillary at papillary layer in mid region	0	0	/	/	0	0	4, minimal	8, minimal
Disarrangement of ameloblast in mid region	0	0	/	/	0	0	1, minimal	3, minimal to mild
Disarrangement of odontoblast in mid region	0	0	/	/	0	0	0	4, minimal

/: Not done

表 2.6.7.7.2-1 ラットを用いた13週間反復経口投与毒性試験（続）

Test Article: Alectinib Hydrochloride

Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		3		9		27	
Number of Animals (Recovery)	M: 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)	M : 9 (5)	F : 10 (5)
Kidneys Yellow brown pigmentation in proximal tubule	0	0	/	/	0	0	5, minimal	9, minimal to mild
Bone, sternum Decreased trabecular bone	0	0	/	/	0	0	4, minimal	6, minimal
Bone, Femur Increased activated osteoclast in metaphysis	0	0	/	/	0	0	8, minimal	9, minimal
Decreased trabecular bone in metaphysis	0	0	/	/	0	0	7, minimal to mild	5, minimal to mild
Pituitary glands Atrophy of anterior cell	0	0	/	/	0	0	1, minimal	3, minimal
Mandibular glands Decreased granule in granulated duct	0	0	/	/	0	0	2, minimal	2, minimal
Skin/Subcutis Thickening of epidermis	0	0	/	/	0	0	2, minimal	7, minimal to mild
Prostate gland Glandular atrophy	0	NA	/	NA	0	NA	3, minimal to mild	NA
Seminal vesicle Glandular atrophy	0	NA	/	NA	0	NA	1, mild	NA
Mammary glands Atrophy	/	0	/	/	/	0	/	2, minimal

/: Not done

表 2.6.7.7.2-1 ラットを用いた13週間反復経口投与毒性試験（続）

Test Article: Alectinib Hydrochloride								
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		3		9		27	
Number of Animals (Recovery)	M: 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)	M : 9 (5)	F : 10 (5)
Adipose tissue								
Atrophy of adipose tissue in subcutis	0	0	/	/	0	0	2, minimal	3, minimal to mild
Histopathology: Day 148								
Spleen								
Increased extramedullary hematopoiesis	0	0	3, minimal	/	2, minimal	0	5, minimal to mild	3, minimal
Stomach								
Macrophage infiltration in glandular mucosa	0	0	/	/	/	0	0	1, minimal
Lymphocyte infiltration in glandular mucosa	0	0	/	/	/	0	0	1, minimal
Extension of proliferating zone in glandular mucosa	2, minimal	4, minimal	/	/	/	4, minimal	5, minimal	4, minimal to mild
Ileum								
Macrophage/multinucleated giant cell in mucosa	0	0	/	/	0	0	2, minimal	2, minimal
Mesenteric lymph node								
Macrophage/erythrophagy in sinus	4, minimal	5, minimal	1, minimal	3, minimal	2, minimal to mild	4, minimal to mild	5, mild	5, mild
Hemosiderin deposition	0	0	0	0	3, minimal	3, minimal	5, mild to moderate	5, mild to moderate
Lung								
Foamy macrophage infiltration in alveolus	2, minimal	2, minimal	1, minimal	2, minimal	3, minimal	4, minimal	5, minimal	5, minimal

/: Not done

表 2.6.7.7.2-1 ラットを用いた13週間反復経口投与毒性試験（続）

Test Article: Alectinib Hydrochloride								
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		3		9		27	
Number of Animals (Recovery)	M: 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)	M : 10 (5)	F : 10 (5)	M : 9 (5)	F : 10 (5)
Trachea								
Disarrangement of mucosal epithelium	0	0	/	/	/	0	0	2, minimal
Macrophage/multinucleated giant cell in lamina propria	0	0	/	/	/	0	0	5, minimal to mild
Adrenal glands								
Increased large lipoid droplet in fascicular cell	0	0	/	/	0	/	1, minimal	0
Kidneys								
Yellow brown pigmentation in proximal tubule	0	0	/	/	0	0	1, minimal	3, minimal

/: Not done

2.6.7.7.3 カニクイザルを用いた4週間反復経口投与毒性試験

表 2.6.7.7.3-1 カニクイザルを用いた4週間反復経口投与毒性試験

Report Title : A 4-week Repeated Dose Oral Gavage Toxicity Study of CH5424802-002 in Cynomolgus Monkeys Followed by a 4-week Recovery Period

Species/Strain : Cynomolgus monkey

Initial Age : 3 years old

Date of First Dose : (M), (F) 20

Vehicle/Formulation : w/v% HPCD / mol/L MsOH / mol/L HCl solution

Special Features : None

Duration of Dosing : 4 weeks

Duration of Postdose : 4 weeks

Method of Administration : Oral gavage, once daily

GLP Compliance : Yes

Test Article: Alectinib Hydrochloride

Study Number : TOX-0127

Location in CTD : 4.2.3.2-6

NOAEL : < 1.7 mg/kg/day

Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		1.7		5		15	
Number of Animals (Recovery)	M: 3 (2)	F: 3 (2)	M: 3	F: 3	M: 3 (2)	F: 3 (2)	M: 3 (2)	F: 3 (2)
TK : CH5424802-000								
Number of Animals	5	5	3	3	5	5	5	5
Mean C _{max} (ng/mL)								
Day 1	BLQ	BLQ	119 ± 58	107 ± 7	305 ± 104	346 ± 128	449 ± 108	444 ± 63
Day 28	BLQ	BLQ	102 ± 49	92.5 ± 25.6	205 ± 64	302 ± 131	456 ± 175	464 ± 83
Mean AUC _{0-24h} (ng·h/mL)								
Day 1	Not determined	Not determined	1370 ± 560	1210 ± 150	3730 ± 1340	3950 ± 1980	6730 ± 2140	6910 ± 1380
Day 28	Not determined	Not determined	1160 ± 620	1300 ± 280	2400 ± 1120	3980 ± 2210	6530 ± 2630	6540 ± 2550
Noteworthy Findings								
Died or Euthanized Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (kg)								
Day 28	3.30 ± 0.30	2.74 ± 0.23	3.60 ± 0.50	2.57 ± 0.12	3.20 ± 0.36	2.60 ± 0.21	3.42 ± 0.44	2.54 ± 0.23
Food Consumption (g/animal/day)								
Day 14	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.01	100.0 ± 0.0	92.0 ± 17.9	95.2 ± 6.7	78.2 ± 17.4*
Clinical Observation (No. of animals)								
Blackish stool	0	0	0	0	3	4	5	4

Data are shown in Mean ± SD. BLQ: Below the limit of quantification (< 1 ng/mL)

*p < 0.05, **p < 0.01: Statistical analysis was performed using the decision tree in toxicological software.

表 2.6.7.7.3-1 カニクイザルを用いた4週間反復経口投与毒性試験（続）

Test Article: Alectinib Hydrochloride

Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		1.7		5		15	
Number of Animals (Recovery)	M: 3 (2)	F : 3 (2)	M : 3	F : 3	M : 3 (2)	F : 3 (2)	M : 3 (2)	F : 3 (2)
Hematology: Day 28								
RBC (× 10 ⁶ /μL)	5.61 ± 0.58	5.37 ± 0.36	5.96 ± 0.38	5.48 ± 0.60	5.55 ± 0.33	5.29 ± 0.28	5.23 ± 0.37	5.10 ± 0.24
HGB (g/dL)	13.70 ± 1.24	13.08 ± 0.44	14.03 ± 0.12	13.10 ± 0.92	13.26 ± 0.61	13.28 ± 0.23	12.80 ± 0.70	12.48 ± 0.64
HCT (%)	44.18 ± 3.89	42.26 ± 1.21	44.80 ± 1.23	42.43 ± 3.27	41.62 ± 2.49	42.84 ± 1.40	39.98 ± 2.49	39.24 ± 2.87
MCV (fL)	78.88 ± 4.61	78.94 ± 4.17	75.40 ± 6.15	77.63 ± 3.67	75.06 ± 4.06	81.02 ± 3.09	76.52 ± 2.61	77.04 ± 5.86
MCHC (g/dL)	31.00 ± 0.19	30.92 ± 0.29	31.33 ± 0.59	30.90 ± 0.46	31.90 ± 0.58*	31.00 ± 0.72	32.04 ± 0.59*	31.84 ± 0.91
Poikilocytes (No. of animals)								
Burr cell	0	0	0	1	2	4	5	5
Fragmented cell	0	0	0	1	2	4	5	5
Leptocytes	0	0	0	0	0	0	0	1
Blood Chemistry: Day 28								
Direct bilirubin (mg/dL)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.08 ± 0.18	0.04 ± 0.09
Hepatic ALP (U/L)	140.74 ± 70.20	102.72 ± 16.45	132.90 ± 49.21	128.37 ± 58.74	253.30 ± 177.94	164.52 ± 86.35	298.94 ± 135.33	361.24 ± 96.89*
Bone ALP (U/L)	1962.10 ± 415.15	1104.22 ± 401.54	2053.17 ± 590.07	1367.57 ± 189.54	2102.62 ± 542.95	1195.00 ± 377.18	2075.34 ± 417.81	884.06 ± 323.41
Organ Weight: Day 29								
Liver (% of BW)	1.56 ± 0.08	1.89 ± 0.13	1.63 ± 0.15	1.84 ± 0.10	1.77 ± 0.09	2.07 ± 0.07	1.94 ± 0.16*	2.25 ± 0.28
Gross Necropsy: Day 29								
Enlargement liver	0	0	0	0	0	0	1	1
Dilatation of cecum	0	0	0	0	0	0	1	1
Dilatation of colon	0	0	0	0	0	0	1	1

Data are shown in Mean ± SD.

*p < 0.05, **p < 0.01: Statistical analysis was performed using the decision tree in toxicological software.

表 2.6.7.7.3-1 カニクイザルを用いた4週間反復経口投与毒性試験（続）

Test Article: Alectinib Hydrochloride

Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		1.7		5		15	
Number of Animals (Recovery)	M: 3 (2)	F : 3 (2)	M : 3	F : 3	M : 3 (2)	F :3 (2)	M : 3 (2)	F : 3 (2)
Histopathology: Day 29								
Liver								
Enlargement of hepatocyte	0	0	0	0	0	0	2, minimal	1, minimal
Enlargement of Kupffer cell	0	0	0	0	0	0	1, minimal	0
Inflammatory cell infiltration in Glisson's sheath	0	0	0	0	0	0	1, minimal	1, minimal
Spleen								
Congestion of red pulp	0	0	0	0	0	0	1, minimal	0
Adrenal glands								
Hypertrophy of cortical cell at fascicular zone	0	0	0	0	1, minimal	0	2, minimal	0
Hypertrophy of cortical cell at reticular zone	0	0	0	0	2, minimal	0	2, minimal	0
Bone marrow, sternum								
Increase in neutrophil	0	0	0	0	0	0	2, minimal	2, minimal
Stomach								
Multinucleated parietal cell	0	0	0	0	0	0	1, minimal	1, minimal
Duodenum								
Extension of mucosal proliferative zone	0	0	0	0	0	0	1, minimal	1, minimal

アレセンサ

2.6.7 毒性試験概要表

Page 39

2.6.7.7.4 カニクイザルを用いた13週間反復経口投与毒性試験

表 2.6.7.7.4-1 カニクイザルを用いた13週間反復経口投与毒性試験

Report Title : A 13-week Repeated Dose Oral Gavage Toxicity Study of CH5424802-002 in Cynomolgus Monkeys Followed by an 8-week Recovery Period

Species/Strain : Cynomolgus monkey

Initial Age : 3 years old

Date of First Dose : (M), (F) 20

Vehicle/Formulation : w/v% HPMC/ mol/L HCl solution

Special Features : None

Duration of Dosing : 13 weeks

Duration of Postdose : 8 weeks

Method of Administration : Oral gavage, once daily

GLP Compliance : Yes

Test Article: Alectinib Hydrochloride

Study Number : TOX-0027

Location in CTD : 4.2.3.2-7

NOAEL : < 1.3 mg/kg/day

Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		1.3		4		12	
Number of Animals (Recovery)	M: 3 (2)	F: 3 (2)	M: 3	F: 3	M: 3 (2)	F: 3 (2)	M: 3 (2)	F: 3 (2)
TK : CH5424802-000								
Number of Animals	5	5	3	3	5	5	5	5
Mean C _{max} (ng/mL)								
Day 1	BLQ	BLQ	59.8 ± 26.9	87.5 ± 8.2	170 ± 42	175 ± 45	394 ± 129	439 ± 82
Day 91	BLQ	BLQ	83.4	94.3 ± 26.0	243 ± 33	189 ± 51	461 ± 134	463 ± 60
Mean AUC _{0-24h} (ng·h/mL)								
Day 1	Not determined	Not determined	792 ± 274	942 ± 133	2700 ± 530	2520 ± 420	6640 ± 2370	6410 ± 1170
Day 91	Not determined	Not determined	894	1030 ± 60	3610 ± 580	2810 ± 1040	7060 ± 2530	6920 ± 1680
Noteworthy Findings								
Died or Euthanized Moribund	0	0	1 (death due to spontaneous acute dilatation of stomach, day81)	0	0	0	0	0
Body Weight (kg):Day 91	4.06 ± 0.59	2.70 ± 0.21	4.05	2.77 ± 0.31	4.22 ± 0.71	2.68 ± 0.33	4.12 ± 0.79	2.72 ± 0.26
Food Consumption (g/animal/day): Day 91	100.0 ± 0.0	91.4 ± 11.9	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	99.2 ± 1.8	100.0 ± 0.0	95.8 ± 9.4

BLQ: Below the limit of quantification (< 1 ng/mL)

表 2.6.7.7.4-1 カニクイザルを用いた13週間反復経口投与毒性試験（続）

Test Article: Alectinib Hydrochloride

Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		1.3		4		12	
Number of Animals (Recovery)	M: 3 (2)	F: 3 (2)	M: 3	F: 3	M: 3 (2)	F: 3 (2)	M: 3 (2)	F: 3 (2)
Hematology: Day 91								
RBC (× 10 ⁶ /μL)	5.91 ± 0.30	5.56 ± 0.21	5.53	5.59 ± 0.57	5.65 ± 0.20	5.10 ± 0.26	5.14 ± 0.37**	5.23 ± 0.26
HGB (g/dL)	13.80 ± 0.68	13.38 ± 0.51	13.15	13.30 ± 0.95	13.60 ± 0.44	12.52 ± 0.72	12.66 ± 1.40	12.76 ± 0.62
HCT (%)	45.38 ± 1.40	44.00 ± 0.99	42.20	43.47 ± 2.93	44.46 ± 0.96	40.66 ± 1.64*	40.66 ± 3.81	40.80 ± 2.44
Poikilocytosis (No. of animals)								
Burr cell	0	0	1	0	1	1	5	5
Fragmented red cell	0	0	1	0	1	1	5	5
Spherocyte	0	0	0	0	0	0	0	1
Blood Chemistry: Day 91								
γ-GT (U/L)	81.8 ± 13.0	69.6 ± 13.6	84.0	67.7 ± 16.3	114.8 ± 10.5*	87.4 ± 21.0	98.0 ± 23.3	78.6 ± 29.9
Hepatic ALP (U/L)	118.16 ± 26.05	173.96 ± 87.60	67.90	75.67 ± 35.98	122.36 ± 42.55	162.50 ± 48.95	224.58 ± 103.64	379.28 ± 238.28
Organ weight: Day 92								
Liver (% of BW)	1.30 ± 0.14	1.80 ± 0.15	1.47	1.77 ± 0.23	1.66 ± 0.03*	1.91 ± 0.19	1.77 ± 0.10**	2.11 ± 0.01
Necropsy: Day 92								
Dilatation of the cecum	0	0	0	0	0	0	2	1
Dilatation of the colon	0	0	0	0	0	0	2	1
Dark discoloration of the adrenals	0	0	0	0	0	0	3	1
Brownish change in the lungs	0	0	0	0	0	0	1	0
Reddish patch of all lobes in the lungs	0	0	0	0	0	0	1	0

Data are shown in Mean ± SD.

*p < 0.05, **p < 0.01: Statistical analysis was performed using the decision tree in toxicological software.

表 2.6.7.7.4-1 カニクイザルを用いた13週間反復経口投与毒性試験（続）

Test Article: Alectinib Hydrochloride								
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		1.3		4		12	
Number of Animals (Recovery)	M: 3 (2)	F : 3 (2)	M : 3	F : 3	M : 3 (2)	F : 3 (2)	M : 3 (2)	F : 3 (2)
Histopathology: Day 92								
Liver								
Enlargement of hepatocyte	0	0	0	0	0	0	1, minimal	2, minimal
Proliferation of bile duct	0	0	0	0	0	2, minimal	1, minimal	3, minimal
Inflammatory cell infiltration in Glisson's sheath	0	0	0	0	0	0	0	2, minimal
Adrenal glands								
Decrease in lipid droplet of cortical cell at fascicular zone	0	0	0	0	3, minimal	0	3, mild	2, minimal
Hypertrophy of cortical cell at reticular zone	0	0	0	0	0	0	1, minimal	0
Stomach								
Extension of mucosal proliferative zone	0	0	0	0	0	0	3, minimal	3, minimal
Cecum								
Extension of mucosal proliferative zone	0	0	0	0	1, minimal	1, minimal	3, minimal	3, minimal
Colon								
Extension of mucosal proliferative zone	0	0	0	0	1, minimal	1, minimal	3, minimal	2, minimal
Rectum								
Extension of mucosal proliferative zone	0	0	0	0	0	1, minimal	2, minimal	1, minimal

表 2.6.7.7.4-1 カニクイザルを用いた13週間反復経口投与毒性試験（続）

Test Article: Alectinib Hydrochloride								
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		1.3		4		12	
Number of Animals (Recovery)	M: 3 (2)	F : 3 (2)	M : 3	F : 3	M : 3 (2)	F : 3 (2)	M : 3 (2)	F : 3 (2)
Lung								
Perivascular accumulation of hemosiderin-pigmented macrophage	0	0	0	0	0	0	1, mild	0
Multifocal hemorrhage at alveolus	0	0	0	0	0	0	1, mild	0
Histopathology: Day 148								
Adrenal glands								
Decrease in lipid droplet of cortical cell at fascicular zone	0	0	/	/	1, minimal	0	1, minimal	1, minimal

2. 6. 7. 8 In vitro 遺伝毒性

2. 6. 7. 8. 1 細菌を用いた復帰突然変異試験（エームス試験）

表 2. 6. 7. 8. 1-1 細菌を用いた復帰突然変異試験（エームス試験）

Report Title : Bacterial Reverse Mutation Test of CH5424802-002

Test for Induction of : Reverse mutation in bacterial cells
Strains : *S. typhimurium* (TA100, TA1535, TA98, TA1537), *E. coli* (WP2uvrA)
Metabolizing Systems : Rat liver S9
Vehicle : DMSO
Positive Controls : S9 - : AF-2, NaN₃, 9-AA
S9 + : 2-AA

No. of Independent Assay : 2
No. of Replicate culture : 3

Test Article :
Alectinib Hydrochloride
Study Number. : TOX-0153
Location in CTD : 4.2.3.3.1-1

Treatment : Plate method and pre-incubation method (20 minute incubation) Date of Treatment : 20 GLP Compliance : Yes
Cytotoxicity : S9 - : Microbial toxicity was not observed in any test strain up to 1000 µg/plate.
S9 + : Microbial toxicity was not observed in any test strain up to 1000 µg/plate.
Genotoxicity : None

Test Article	Dose Level (µg/plate)	Plate Method : Revertant Colony Counts/Plate (Mean ± SD)									
		TA100		TA1535		TA98		TA1537		WP2uvrA	
		S9 -	S9 +	S9 -	S9 +	S9 -	S9 +	S9 -	S9 +	S9 -	S9 +
DMSO	0	112 ± 1	119 ± 10	11 ± 1	13 ± 3	21 ± 1	26 ± 3	11 ± 3	20 ± 1	36 ± 1	40 ± 4
Alectinib Hydrochloride	31.3	112 ± 8	125 ± 6	11 ± 2	12 ± 2	20 ± 3	25 ± 5	13 ± 2	19 ± 3	37 ± 2	40 ± 1
	62.5	123 ± 10	132 ± 12	10 ± 1	13 ± 2	20 ± 2	25 ± 1	12 ± 2	22 ± 2	34 ± 1	41 ± 3
	125	127 ± 4	134 ± 4	11 ± 0	12 ± 1	18 ± 1	27 ± 3	13 ± 2	18 ± 2	36 ± 2	41 ± 3
	250*	112 ± 8	134 ± 13	12 ± 1	13 ± 2	19 ± 3	26 ± 2	12 ± 2	18 ± 2	36 ± 2	40 ± 1
	500*	125 ± 2	129 ± 15	9 ± 1	10 ± 1	19 ± 4	25 ± 2	14 ± 3	19 ± 3	33 ± 3	41 ± 4
	1000*	110 ± 3	125 ± 9	9 ± 1	10 ± 2	16 ± 2	23 ± 3	13 ± 3	19 ± 3	35 ± 2	42 ± 3
AF-2	0.01	857 ± 33	/	/	/	/	/	/	/	237 ± 19	/
	0.1	/	/	/	/	1182 ± 22	/	/	/	/	/
NaN ₃	0.5	/	/	597 ± 12	/	/	/	/	/	/	/
9-AA	80	/	/	/	/	/	/	343 ± 37	/	/	/
2-AA	0.5	/	/	/	/	/	238 ± 15	/	/	/	/
	1	/	1762 ± 100	/	/	/	/	/	/	/	/
	2	/	/	/	277 ± 14	/	/	/	215 ± 17	/	/
	10	/	/	/	/	/	/	/	/	/	1348 ± 30

AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, NaN₃: Sodium azide, 9-AA: 9-aminoacridine hydrochloride, 2-AA: 2-aminoanthracene

*: Precipitation was observed.

表 2.6.7.8.1-1 細菌を用いた復帰突然変異試験（エームス試験）（続）

Test Article	Dose Level ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Pre-incubation Method : Revertant Colony Counts/Plate (Mean $\pm$ SD)									
		TA100		TA1535		TA98		TA1537		WP2 $uvrA$	
		S9 -	S9 +	S9 -	S9 +	S9 -	S9 +	S9 -	S9 +	S9 -	S9 +
DMSO	0	100 $\pm$ 3	110 $\pm$ 10	8 $\pm$ 2	10 $\pm$ 1	18 $\pm$ 3	28 $\pm$ 2	14 $\pm$ 3	20 $\pm$ 1	28 $\pm$ 6	33 $\pm$ 2
Alectinib Hydrochloride	31.3	98 $\pm$ 2	109 $\pm$ 7	10 $\pm$ 3	11 $\pm$ 1	18 $\pm$ 2	25 $\pm$ 1	14 $\pm$ 2	18 $\pm$ 3	24 $\pm$ 3	33 $\pm$ 2
	62.5	102 $\pm$ 7	108 $\pm$ 9	9 $\pm$ 2	10 $\pm$ 1	18 $\pm$ 2	27 $\pm$ 4	14 $\pm$ 2	21 $\pm$ 2	21 $\pm$ 2	34 $\pm$ 4
	125	99 $\pm$ 3	109 $\pm$ 0	11 $\pm$ 4	9 $\pm$ 1	18 $\pm$ 2	23 $\pm$ 2	15 $\pm$ 2	19 $\pm$ 2	24 $\pm$ 2	32 $\pm$ 0
	250*	101 $\pm$ 3	105 $\pm$ 2	9 $\pm$ 1	9 $\pm$ 2	18 $\pm$ 1	26 $\pm$ 4	14 $\pm$ 2	20 $\pm$ 3	22 $\pm$ 1	32 $\pm$ 0
	500*	102 $\pm$ 11	102 $\pm$ 3	5 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1	14 $\pm$ 1	24 $\pm$ 4	18 $\pm$ 5	21 $\pm$ 3	26 $\pm$ 1	33 $\pm$ 2
	1000*	97 $\pm$ 6	109 $\pm$ 11	6 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1	17 $\pm$ 3	21 $\pm$ 3	15 $\pm$ 4	19 $\pm$ 6	27 $\pm$ 2	34 $\pm$ 2
AF-2	0.01	937 $\pm$ 28	/	/	/	/	/	/	/	194 $\pm$ 11	/
	0.1	/	/	/	/	754 $\pm$ 23	/	/	/	/	/
NaN ₃	0.5	/	/	566 $\pm$ 19	/	/	/	/	/	/	/
9-AA	80	/	/	/	/	/	/	235 $\pm$ 12	/	/	/
2-AA	0.5	/	/	/	/	/	260 $\pm$ 5	/	/	/	/
	1	/	1029 $\pm$ 38	/	/	/	/	/	/	/	/
	2	/	/	/	200 $\pm$ 9	/	/	/	164 $\pm$ 15	/	/
	10	/	/	/	/	/	/	/	/	/	1207 $\pm$ 144

AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, NaN₃: Sodium azide, 9-AA: 9-aminoacridine hydrochloride, 2-AA: 2-aminoanthracene

*: Precipitation was observed.

2. 6. 7. 8. 2 培養 CHL 細胞を用いた染色体異常試験

表 2. 6. 7. 8. 2-1 培養 CHL 細胞を用いた染色体異常試験

Report Title : Chromosomal Aberration Test of CH5424802-002 with CHL Cells

Test for Induction of : Chromosome aberrations
Strain : CHL/IU (fibroblast derived from lung of female Chinese hamster)
Metabolizing System : Rat liver S9
Vehicle : DMSO
Positive Control : S9 - : MMC
S9 + : BP

No. of Independent Assays : 2
No. of Replicate Cultures : 2
No. of Cells Analyzed/Culture : 200

Test Article :
Alectinib Hydrochloride
Study Number : TOX-0154
Location in CTD : 4.2.3.3.1-2

Treatment : Short term treatment assay: 6 h treatment (S9 -/+) -18 h recovery
Continuous treatment assay: 24 h treatment (S9 -)

Date of Treatment : 2018 to 2018

GLP Compliance : Yes

Cytotoxicity : The lowest concentrations at which the cell growth index reduced to less than 50% were 6 µg/mL, 10 µg/mL, and 5 µg/mL in the short-term assay - S9 mix, the short-term assay + S9 mix, and the continuous assays.

Genotoxicity : The incidence of numerical aberrant cells (polyploidy) was slightly increased at 10 µg/mL in the short-term assay with S9 mix.

	Test Article	Dose (µg/mL)	Metabolic Activation	Treatment-Recovery (h)	No. of Cells Analyzed /Culture	Cell growth index (%)	Total Structural Aberrant Cells (%)	Total Numerical Aberrant Cells (%) (polyploids)
Short-term treatment assay	DMSO	0	-	6-18	200	100.0	0.5	0.0
	Alectinib Hydrochloride	4	-	6-18	200	79.1	0.0	1.5
		5	-	6-18	200	56.5	0.0	1.5
		6	-	6-18	200	33.3	0.0	1.0
	MMC	0.1	-	6-18	200	not determined	27.0	0.0
	DMSO	0	+	6-18	200	100.0	0.0	0.0
	Alectinib Hydrochloride	7	+	6-18	200	72.1	0.0	0.5
		8	+	6-18	200	68.0	0.0	1.0
		9	+	6-18	200	54.9	0.0	1.0
		10	+	6-18	200	39.4	0.0	4.0
	BP	10	+	6-18	200	not determined	39.5	0.0
Continuous treatment assay	DMSO	0	-	24-0	200	100.0	0.0	0.0
	Alectinib Hydrochloride	3	-	24-0	200	71.0	0.5	0.0
		4	-	24-0	200	57.6	0.0	0.0
		5	-	24-0	200	37.5	0.5	0.0
	MMC	0.05	-	24-0	200	not determined	19.0	0.0

MMC: Mitomycin C, BP: Benzo[a]pyrene

2. 6. 7. 8. 3 TK6細胞を用いた小核試験（機序解明）

表 2. 6. 7. 8. 3-1 TK6細胞を用いた小核試験（機序解明）

Report Title : Study to elucidate the mechanisms of micronucleus induction by CH5424802-002 in TK6 cells

Test for Induction of : Micronuclei with or without centromere
Strain : TK6 cells
Metabolizing System : No metabolic activation

No. of Independent Assays : 1
No. of Replicate Cultures : 2
No. of Cells Analyzed : More than 1000
cells/culture well for micronucleus test and a total
of more than 100 micronuclei/concentration for
FISH analysis

Test Article :
Alectinib Hydrochloride
Study Number : TOX-0019S
Location in CTD : 4.2.3.3.1-3

Vehicle : DMSO
Positive Control : S9 - : MMS
Treatment : 24 h continuous treatment

Date of Treatment : 20

GLP Compliance : No

Cytotoxicity : 6.3 µg/mL
Genotoxicity : Alectinib Hydrochloride significantly induced CMN (FISH-signal positive micronucleated cell).

Test Article	Dose (µg/mL)	Metabolic Activation	RCC (%)	PD	MN cells ^{a)} (%)	FISH analysis on 100 MN Positive (%) ^{b)} /Negative (%)	Frequency/1000 cells ¹⁾		Mitotic cells (%)
DMSO	0	-	100	1.7	1.6	53/47	8.5	7.5	1.6
Alectinib Hydrochloride	0.4	-	85	1.4	1.6	NE	NE	NE	1.9
	0.9	-	62	1.0	2.4	NE	NE	NE	1.5
	1.8	-	47	0.6	2.8	NE	NE	NE	1.6
	2.7	-	42	0.4	3.4 [#]	77/23*	26.2*	7.8	0.9
	3.6	-	41	0.4	3.7 [#]	82/18*	30.3*	6.7	1.2
	4.5	-	39	0.3	4.4 [#]	63/37	27.7*	16.3	1.5
	5.4	-	38	0.3	4.3 [#]	62/38	26.7*	16.3	1.5
	6.3	-	31	0.0	7.2 [#]	NE	NE	NE	1.5
MMS	15	-	49	0.6	6.0 [#]	54/46	32.4*	27.6*	1.2

RCC: Relative cell count; PD: Population doubling; MN: Micro nuclei; CMN: Centromere-positive MN; NMN: Non-centromeric MN; MMS: Methylmethanesulfonate

NE: Not evaluated

The value of each dose was the mean of the value with duplicate culture well.

1) Calculated from a) and b) at each treatment; CMN = $a \times 10 \times b/100$, NMN = $a \times 10$ - CMN.

#MN cells (%) was higher than 2-fold that of the solvent control.

*p< 0.01, Fisher's exact test (FISH analysis and mitotic cells)

2. 6. 7. 9 *In vivo* 遺伝毒性

2. 6. 7. 9. 1 ラットを用いた *in vivo* 小核試験

表 2. 6. 7. 9. 1-1 ラットを用いた *in vivo* 小核試験

Report Title : Micronucleus Test of CH5424802-002 in Rat Bone Marrow - Oral Administration Route -

Test for Induction of : Bone marrow micronuclei
Species/Strain : RccHan™:WIST rats, male
Initial Age : 7 weeks
Cells Evaluated : Immature erythrocytes

Treatment Schedule : Once daily for 2 consecutive days
Sampling Time : 24 hr after the final administration
Method of Administration : Oral gavage
Vehicle/Formulation : ■ w/v% HPCD/■ mol/L
MsOH/■ mol/L HCl solution

Test Article :
Alectinib Hydrochloride
Study Number : TOX■-0155
Location in CTD : 4.2.3.3.2-1

Date of Dosing : ■ and ■ ■ ■ 20■

No. of Immature erythrocytes Analyzed/Animal: 2000
Special Feature : Toxicokinetic analyses were conducted in animals (3 males/group) received a single dose of either vehicle or the test article (≥ 200 mg/kg).

GLP Compliance : Yes

Toxic/Cytotoxic Effects : None

Genotoxic Effects : At 500 mg/kg and above, statistically significant increases in the incidence of MNIMES

Evidence of Exposure : Toxicokinetics

Test Article	Dose (mg/kg/day)	Sampling Time (h)	No. of Animals/Group	No. of IMEs Analyzed /animal	MNIME Number (% , Mean ± SD)	No. of Erythrocytes Analyzed/animal	IME Ratio among Total Erythrocytes (% , Mean ± SD)	C _{max} (ng/mL, Mean± SD)	AUC _{0-24h} (ng·h/mL, Mean± SD)
Vehicle	0	24	M 6	2000	13 (0.11 ± 0.09)	1000	64.6 ± 4.2	BLQ	/
Alectinib Hydrochloride	500			2000	27 [#] (0.23 ± 0.17)	1000	62.3 ± 4.0	3030 ± 840	55800 ± 9800
	1000			2000	33 ^{###} (0.28 ± 0.09)	1000	60.3 ± 5.3	3020 ± 950	59400 ± 12700
	2000			2000	26 [#] (0.22 ± 0.11)	1000	60.6 ± 5.2	2810 ± 460	53700 ± 4300
CP	20			2000	766 ^{###} (6.38 ± 1.43)	1000	37.2 ± 5.8 **	/	/
Vehicle	0	24	M 6	2000	14 (0.12 ± 0.05)	1000	63.0 ± 2.2	BLQ	/
Alectinib Hydrochloride	6			2000	12 (0.10 ± 0.06)	1000	62.2 ± 1.6	/	/
	20			2000	12 (0.10 ± 0.06)	1000	60.3 ± 3.8	/	/
	60			2000	15 (0.13 ± 0.10)	1000	63.2 ± 2.2	/	/
	200			2000	23 (0.19 ± 0.08)	1000	61.9 ± 5.0	1850 ± 260	36700 ± 5400
CP	20			2000	647 ^{###} (5.39 ± 1.84)	1000	32.2 ± 5.0 **	/	/

IME: Immature erythrocyte; MNIMES: Micronucleated IMEs; MEs: Mature erythrocytes; CP: Cyclophosphamide monohydrate; BLQ: Below the limit of quantification (<1 ng/mL)

/: Not done; Statistical analysis: ** p ≤ 0.01: Student's *t*-test; # p ≤ 0.05, ## p ≤ 0.01: Kastenbaum & Bowman's method

2.6.7.9.2 ラットを用いた *in vivo* 小核試験（機序解明）

表 2.6.7.9.2-1 ラットを用いた *in vivo* 小核試験（機序解明）

Report Title : Micronucleus test of CH5424802-002 in rat bone marrow with FISH analysis

Test Article :
Alectinib Hydrochloride

Test for Induction of : Bone marrow micronuclei
Species/Strain : RccHan™:WIST rats, male

Treatment Schedule : Once daily for 2 consecutive days
Sampling Time : Between 22 to 24 h after the final administration

Study Number : TOX-0040

Initial Age : 7 weeks

Method of Administration : Oral gavage (MMC, VBS: intravenous)

Location in CTD : 4.2.3.3.2-2

Cells Evaluated : Immature erythrocytes

Vehicle/Formulation : w/v% HPCD/ mol/L MsOH/ mol/L HCl solution

Date of Dosing : and . 20

No. of Immature erythrocytes Analyzed/Animal : 2000

FISH analysis : up to 100 MNIMES/animal

GLP Compliance : Yes

Special Feature : Toxicokinetic analyses were conducted in animals (3 males/group) received a single dose of either vehicle or the test article.

Toxic/Cytotoxic Effects : At 1000 mg/kg/day, statistically significant decrease in the ratio of immature erythrocytes to the total erythrocytes

Genotoxic Effects : At 500 and 1000 mg/kg/day, statistically significant increases in the number of FISH-signal positive MNIMES

Evidence of Exposure : Toxicokinetics

Test Article	Dose (mg/kg/day)	Sampling Time (h)	No. of Animals/ Group	MNIMES/ IME ^{a)} (% Mean ± SD)	Observed MNIMES			FISH analysis on MNIMES (%)		Frequency/ 1000 cells ¹⁾		C _{max} (ng /mL, Mean± SD)	AUC _{0-24h} (ng·h /mL, Mean± SD)
					Total	FISH -Pos	FISH -Neg	FISH-Pos ^{b)} MNIME	FISH-Neg MNIME	FISH-Pos MNIME	FISH-Neg MNIME		
Vehicle	0	Between 22 to 24	M 6	0.15 ± 0.06	502	77	425	15.3	84.7	0.23	1.27	BLQ	/
Alectinib Hydrochloride	100			0.18 ± 0.06	/	/	/	/	/	/	/	2100 ± 140	37000 ± 900
	200			0.21 ± 0.14	/	/	//	/	/	/	/	3210 ± 790	58700 ± 10900
	500			0.25 ± 0.06*	600	244 [#]	356	40.7	59.3	1.02	1.48	4140 ± 270	74900 ± 6800
	1000			0.42 ± 0.17**	552	226 [#]	326	40.9	59.1	1.72	2.48	4440 ± 330	84200 ± 8100
MMC	2			5.68 ± 1.57**	600	70	530	11.7	88.3	6.63	50.17	/	/
VBS	0.5			3.18 ± 1.10**	600	451 [#]	149	75.2	24.8	23.90	7.90	/	/

IMES: immature erythrocytes; MNIMES: micronucleated IMES; /: Not done; BLQ: Below the limit of quantification (<1 ng/mL); MMC: Mitomycin C; VBS: Vinblastine sulfate,

1) Calculated from a) and b) at each treatment; Frequency of FISH-Pos MNIMES=a×10×b/100, Frequency of FISH-Neg MNIMES=a×10-Frequency of FISH-Pos MNIMES, Statistical analysis: *P<0.05, ** P<0.01: Mann-Whitney U-test, # P<0.01: Fisher's exact test

2.6.7.10 がん原性

該当なし

2.6.7.11 生殖発生毒性：重要な試験以外の試験

該当なし

2.6.7.12 生殖発生毒性：受胎能及び着床までの初期発生に関する試験

該当なし

2.6.7.13 生殖発生毒性：胚・胎児発生に関する試験

2.6.7.13.1 ラットを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験

表 2.6.7.13.1-1 ラットを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験

Report Title : A Preliminary Study for Effects of CH5424802-002 on Embryo-fetal Development by Oral Gavage Dose in Rats

Species/Strain : RccHanTM:WIST rats

Initial Age : 13 weeks

Date of First Dose : 20

Vehicle/Formulation : w/v% HPMC/ mol/L HCl solution

Duration of Dosing : GD 7 to 17

Day of Mating : GD 0

Day of Section: GD 20

Method of Administration : Oral gavage, once daily

Test Article: Alectinib Hydrochloride

Study Number : TOX-0019

Location in CTD : 4.2.3.5.2-1

GLP Compliance : Yes

NOAEL :

F0 Female: 3 mg/kg/day for general toxicity and 9 mg/kg/day for reproductive function

F1 Litters: 3 mg/kg/day

Special Features : None

Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	3	9	27
Dam				
TK: CH5424802-000				
Number of Animals	2	2	2	2
Mean C _{max} (ng/mL)	BLQ	344	991	1910
GD 7	BLQ	827	2140	3590
GD 17	Not determined	6060	16000	38800
Mean AUC _{0-24h} (ng·h/mL)	Not determined	13900	40600	66400
GD7				
GD17				
No. of Pregnant	6	6	6	6
No. of Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
No. of Aborted or with Total Resorption of Litter	—	—	—	All dams showed total litter loss.
Clinical Observations	No test article-related changes were observed.			
Necropsy Observations	—	—	—	Red focus of the glandular stomach, dark-red discoloration in the mesenteric lymph node, diminished size and black-brown discoloration in the adrenal glands were observed.
Body Weight (g): GD 17	312.88 ± 22.94	308.12 ± 9.47	296.98 ± 13.12*	259.82 ± 10.97**
Food Consumption (g/animal/day): GD17-18	23.32 ± 2.26	24.53 ± 3.14	21.17 ± 2.66	15.45 ± 3.38 ^{##}

Data are shown in Mean ± SD, BLQ: Below the limit of quantification; GD: Gestation day; —: No noteworthy findings

*p< 0.05, **p< 0.01 : Statistical analysis was performed using the decision tree in toxicological software or SAS system.

表 2.6.7.13.1-1 ラットを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験（続）

Test Article: Alectinib Hydrochloride				
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	3	9	27
No. of Corpora Lutea	14.3 ± 1.5	14.5 ± 0.5	13.3 ± 1.2	13.3 ± 2.3
No. of Implantations	12.5 ± 2.6	12.8 ± 1.5	12.5 ± 1.0	12.2 ± 1.3
Preimplantation Loss (%)	12.9 ± 15.3	11.6 ± 8.7	5.8 ± 9.3	7.6 ± 9.7
Litters				
No. of Live fetuses	11.8 ± 2.7	11.5 ± 2.8	11.2 ± 2.0	0.0 ± 0.0
Embryonic Death (%)	4.5 ± 5.3	11.5 ± 13.4	8.4 ± 11.1	69.2 ± 31.7**
Early Fetal Death (%)	1.2 ± 2.9	0.0 ± 0.0	2.7 ± 4.1	30.8 ± 31.7*
Late Fetal Death (%)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Post-implantation Loss (%)	5.7 ± 6.6	11.5 ± 13.4	11.1 ± 11.6	100.0 ± 0.0**
Fetal Body Weight: Male/Female (g)	3.64 ± 0.20/ 3.48 ± 0.13	3.69 ± 0.11/ 3.40 ± 0.28	3.43 ± 0.21/ 3.24 ± 0.17	—
Fetal Sex Ration (% males)	58.15 ± 15.04	52.05 ± 13.06	49.49 ± 14.27	—
Placental Observations	Normal	Normal	Normal	—
External Examination				
No. of Fetuses evaluated	71	69	67	—
External Anomaly (%)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	—
Visceral Examination				
No. of Fetuses evaluated	38	35	34	—
Visceral Anomaly (%)				
Ureter–Dilated	2.8 ± 6.8	0.0 ± 0.0	17.8 ± 28.8	—
Thymus–Thymic cord	5.2 ± 8.0	9.9 ± 17.5	31.4 ± 30.7	—
Umbilical artery –Bilateral	2.1 ± 5.1	2.4 ± 5.8	0.0 ± 0.0	—
Umbilical artery –Transposed	4.5 ± 6.9	8.9 ± 10.5	7.0 ± 11.1	—
Heart Ventricle–Small	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	6.7 ± 16.3	—
Heart Ventricular wall –Thin	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	3.3 ± 8.2	—
Coronary orifice - Supernumerary coronary orifice	0.0 ± 0.0	4.2 ± 10.2	0.0 ± 0.0	—

Data are shown in Mean ± SD, —: All dams were noted total litter loss with the 27 mg/kg/day group.

*p< 0.05, **p<0.05: Statistical analysis was performed using the decision tree in toxicological software or SAS system.

表 2.6.7.13.1-1 ラットを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験（続）

Test Article: Alectinib Hydrochloride				
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	3	9	27
Skeletal Examination				
No. of Fetuses evaluated	33	34	33	—
Skeletal Anomaly (%)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	—
Skeletal Variation (%)				
Skull, Parietal - Incomplete ossification	11.3 ± 8.9	7.0 ± 11.1	5.2 ± 8.0	—
Skull, Interparietal - Incomplete ossification	5.2 ± 8.0	4.2 ± 10.2	17.3 ± 14.4	—
Sternebra - Incomplete ossification	40.7 ± 30.7	12.5 ± 20.9	12.9 ± 23.1	—
Sternebra - Bipartite ossification	0.0 ± 0.0	5.6 ± 13.6	0.0 ± 0.0	—
Rib, Supernumerary-rib - Thoracolumbar-Short	29.0 ± 24.3	22.6 ± 30.8	24.7 ± 25.6	—
Rib, The 13th rib-Short	0.0 ± 0.0	2.8 ± 6.8	0.0 ± 0.0	—
Thoracic vertebra, Thoracic centrum - Bipartite ossification	3.3 ± 8.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	—
Fore limb, Metacarpal - Incomplete ossification	21.8 ± 29.3	17.3 ± 18.7	18.8 ± 22.9	—
Number of sacral and caudal vertebrae	8.2 ± 0.2	8.0 ± 0.5	7.5 ± 0.5*	—

Data are shown in Mean ± SD, —: All dams were noted Total Litter Loss with the 27 mg/kg/day group.

*p< 0.05, **p<0.05: Statistical analysis was performed using the decision tree in toxicological software or SAS system.

2. 6. 7. 13. 2 ウサギを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験

表 2. 6. 7. 13. 2-1 ウサギを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験

Report Title : A Preliminary Study for Effects of CH5424802-002 on Embryo-fetal Development by Oral Gavage Dose in Rabbits

Species/Strain : Kbl:NZW rabbits

Initial Age : 19 weeks

Date of First Dose : 20

Vehicle/Formulation : w/v% HPMC/ mol/L HCl solution

Duration of Dosing : GD 6 to 18

Day of Mating : GD 0

Day of Section: GD 28

Method of Administration : Oral gavage, once daily

Test Article: Alectinib Hydrochloride

Study Number : TOX-0024

Location in CTD : 4.2.3.5.2-2

GLP Compliance : Yes

NOAEL :

F0 Female: 3 mg/kg/day for general toxicity and 9 mg/kg/day for reproductive function

F1 Litters: 9 mg/kg/day

Special Features : None

Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	3	9	27
Dam				
TK: CH5424802-000				
Number of Animals	3	3	3	3
Mean C _{max} (ng/mL) GD 6	BLQ	155 ± 5	366 ± 39	914 ± 128
GD 18	BLQ	163 ± 28	385 ± 9	2090 ± 560
Mean AUC _{0-24h} (ng·h/mL) GD 6	Not determined	2460 ± 240	6130 ± 710	16600 ± 2800
GD 18	Not determined	2950 ± 550	6650 ± 50	43200 ± 10100
No. of Pregnant	6	6	6	6
No. of Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
No. of Aborted or with Total Resorption of Litter	0	0	0	Abortion:1 (GD21) Total litter loss: 2
Clinical Observations	—	—	—	Decrease in stool volume/no-stool(all dams on GD18)
Necropsy Observations	—	—	—	—
Body Weight (kg): GD 18	3.55 ± 0.11	3.56 ± 0.18	3.50 ± 0.12	3.09 ± 0.17**
Food Consumption (g/day): GD18-19	141.8 ± 28.1	120.3 ± 29.6	146.8 ± 25.0	6.8 ± 4.6**
No. of Corpora Lutea	8.2 ± 2.0	9.8 ± 1.5	6.8 ± 1.6	6.6 ± 2.7
No. of Implantations	7.5 ± 2.4	9.2 ± 1.9	6.3 ± 1.9	6.4 ± 2.7

Data are shown in Mean ± SD, —: No noteworthy findings; BLQ: Below the limit of quantification

*p< 0.05, **p<0.05: Statistical analysis was performed using SAS system.

表 2.6.7.13.2-1 ウサギを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験（続）

Test Article: Alectinib Hydrochloride				
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	3	9	27
Hematology: GD 18				
HCT (%)	40.18 ± 1.25	41.15 ± 1.14	40.92 ± 1.23	37.18 ± 2.12**
MCV (fL)	66.82 ± 1.33	69.72 ± 1.38*	66.35 ± 2.76	61.90 ± 1.66**
Reticulocytes (%)	6.48 ± 0.54	6.38 ± 0.68	6.82 ± 0.91	2.93 ± 1.61**
MCHC (g/dL)	32.73 ± 0.45	32.70 ± 0.41	32.92 ± 0.46	34.92 ± 0.83**
Platelet (10 ³ /μL)	407.5 ± 87.3	450.8 ± 111.4	376.5 ± 86.9	638.2 ± 155.0**
Neutrophil (%)	19.70 ± 3.22	18.88 ± 8.34	21.33 ± 4.29	31.03 ± 7.29*
Eosinophil (%)	2.48 ± 1.17	1.85 ± 0.64	2.23 ± 0.62	0.87 ± 0.29**
Basophil (%)	7.55 ± 1.45	7.08 ± 2.01	7.18 ± 1.43	3.20 ± 0.46**
Poikilocytes: burr cells	0	0	1	6
Blood Chemistry: GD 18				
Total protein (g/dL)	5.20 ± 0.15	5.07 ± 0.32	5.02 ± 0.24	4.62 ± 0.25**
Triglyceride (mg/dL)	102.7 ± 39.7	141.5 ± 47.2	124.7 ± 66.9	37.8 ± 3.7*
Calcium (mg/dL)	14.00 ± 0.48	14.12 ± 0.43	13.87 ± 0.36	12.62 ± 0.41**
Chloride (mEq/L)	105.0 ± 2.0	104.0 ± 2.0	105.2 ± 1.0	101.0 ± 3.5*
A/G ratio	3.61 ± 0.25	3.44 ± 0.19	3.53 ± 0.14	2.95 ± 0.47*
Total cholesterol (mg/dL)	22.0 ± 5.7	23.2 ± 4.4	33.5 ± 11.9	79.7 ± 30.1**
Glucose (mg/dL)	114.3 ± 6.4	112.5 ± 6.5	116.3 ± 9.0	128.3 ± 7.5*
Creatinine (mg/dL)	0.88 ± 0.11	0.92 ± 0.09	0.88 ± 0.05	1.51 ± 0.31**
α1-globin (%)	4.88 ± 0.44	5.10 ± 0.54	5.23 ± 0.27	5.80 ± 0.62*
α2-globin (%)	3.47 ± 0.44	3.60 ± 0.44	3.38 ± 0.53	6.18 ± 1.27**
Albumin (g/dl)	4.07 ± 0.12	3.90 ± 0.23	3.92 ± 0.17	3.45 ± 0.25**
Litters				
No. of Live Fetus	7.3 ± 2.5	8.2 ± 1.6	5.5 ± 1.8	3.2 ± 2.9*
No. of Embryo-fetal death	0.2 ± 0.4	1.0 ± 1.3	0.8 ± 1.3	3.2 ± 1.9**
Postimplantation Loss (%)	2.3 ± 5.7	9.8 ± 13.3	11.3 ± 18.5	59.2 ± 38.9**
Fetal Body Weight Male/Female (g)	34.88 ± 2.04/ 35.25 ± 2.20	34.50 ± 4.45/ 32.74 ± 1.60	37.05 ± 4.67/ 36.09 ± 2.66	24.55 ± 4.67**/ 25.16 ± 5.92**

Data are shown in Mean ± SD, *p< 0.05, **p <0.05: Statistical analysis was performed using SAS system.

表 2. 6. 7. 13. 2-1 ウサギを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験（続）

Test Article: Alectinib Hydrochloride				
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	3	9	27
Placental Weight Male/Female (g)	5.00 ± 0.37/ 4.75 ± 0.43	4.55 ± 0.49/ 4.08 ± 0.26	5.76 ± 1.05/ 5.39 ± 0.79	3.47 ± 0.20*/ 3.67 ± 0.84
Sex Ration (Ratio of Males)	0.55 ± 0.27	0.49 ± 0.24	0.54 ± 0.21	0.38 ± 0.04
Placental Findings	-	-	-	-
External Examination				
No. of Fetuses evaluated	44	49	33	16
External Abnormalities (%)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Visceral Examination				
No. of Fetuses evaluated	44	49	33	16
Visceral Abnormalities (%)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	6.67 ± 11.55
Retrosophageal subclavian (%)	0.00	0.00	0.00	6.67
Visceral Variation (%)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Skeletal Examination				
No. of Fetuses evaluated	44	/	33	16
Skeletal Abnormalities (%)	0.00 ± 0.00	/	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Skeletal variations (%)	71.63 ± 28.53	/	75.70 ± 39.30	80.00 ± 34.64
Thready fusion of sternebra (%)	0.00	/	0.00	5.57
Asymmetrical fusion of sternebra (%)	5.55	/	0.00	0.00
Full supernumerary rib (%)	53.02	/	65.97	80.00
Knobby rib (%)	1.67	/	0.00	0.00
Short supernumerary rib (%)	35.93	/	22.22	0.00
Supernumerary lumber vertebra (%)	1.85	/	16.47	17.77
No. of Ossified				
No. of Fetuses evaluated	44	/	33	16
Sternebra	5.72 ± 0.19	/	5.77 ± 0.30	5.80 ± 0.35
Sacral and Caudal Vertebrae	19.45 ± 0.15	/	19.27 ± 0.48	19.40 ± 0.60

Data are shown in Mean ± SD; -: No noteworthy findings; /: Not done

*p < 0.05, **p < 0.05: Statistical analysis was performed using SAS system.

2.6.7.14 生殖発生毒性：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

該当なし

2. 6. 7. 15 その他の毒性

表 2. 6. 7. 15-1 代謝物 M-4のスクリーニングエームス試験

Test Article: M-4

Study Type	Treatment Duration	Species/ Test System	Treatment	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Vehicle	Metabolite system	Results	Location in CTD
Screening Ames	<i>In vitro</i>	<i>S. typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537, <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	Pre- Incubation in microplate	0, 1.58-500 (+/-S9)	DMSO	Rat liver S9	Cytotoxicity: S9 - : $\geq 15.8 \mu\text{g}/\text{plate}$ for TA98, TA1537, TA100, TA1535 $\geq 158 \mu\text{g}/\text{plate}$ for WP2 <i>uvrA</i> S9 + : $\geq 15.8 \mu\text{g}/\text{plate}$ for TA1537, TA1535 $\geq 50 \mu\text{g}/\text{plate}$ for TA98, TA100 $\geq 158 \mu\text{g}/\text{plate}$ for WP2 <i>uvrA</i> Genotoxicity: None	4.2.3.7.5-1

Test Article	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Plate Method : Revertant Colony Counts/Plate (Mean)									
		TA100		TA1535		TA98		TA1537		WP2 <i>uvrA</i>	
		S9 -	S9 +	S9 -	S9 +	S9 -	S9 +	S9 -	S9 +	S9 -	S9 +
DMSO	0	128	136	14	17	55	32	9	9	50	59
M-4 (CH5468924)	1.58	142	165	13	15	55	32	11	8	48	62
	5	115	164	6	19	60	28	11	11	64	60
	15.8	99 ^t	156	18 ^t	11 ^t	26 ^t	38	3 ^t	10 ^t	45	62
	50	110 ^t	128 ^t	9 ^t	9 ^t	23 ^t	35 ^t	7 ^t	10 ^t	50	45
	158	101 ^t	134 ^t	13 ^t	11 ^t	16 ^t	28 ^{t,p}	10 ^t	8 ^{t,p}	48 ^{t,p}	50 ^{t,p}
	500	108 ^t	128 ^{t,p}	9 ^{t,p}	9 ^{t,p}	30 ^{t,p}	27 ^{t,p}	7 ^{t,p}	6 ^{t,p}	47 ^{t,p}	50 ^{t,p}
AF-2	0.05	/	/	/	/	531	/	/	/	1110	/
NaN ₃	2.5	1255	/	1112	/	/	/	/	/	/	/
ICR-191	0.05	/	/	/	/	/	/	2745	/	/	/
2-AA	0.4	/	1808	/	174	/	911	/	243	/	/
	20	/	/	/	/	/	/	/	/	/	180

AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, NaN₃: Sodium azide, 2-AA: 2-aminoanthracene

t: Cytotoxicity, p: Precipitation of the test compound

表 2.6.7.15-2 TK6細胞を用いた代謝物 M-4の小核試験

Study Type	Treatment Duration	Species/ Test System	Treatment	Dose (mg/mL)	Vehicle	Metabolite system	Results	Test Article: M-4 Location in CTD
<i>In vitro</i> MNT	Treatment 24 h Recovery 1 st study: 0h 2 nd study: 0 or 24h	TK6 cells	<i>In vitro</i>	0, 0.1-2.8	DMSO	—	Cytotoxicity: None Genotoxicity: None	4.2.3.7.5-2

Test Article	Dose (µg/mL)	Metabolic Activation	Treatment- Recovery	RCC (%)	MN cells (%)	PD	Mitotic cells (%)
1 st Study (recovery: 0h)							
DMSO	0	—	24h-0h	100	1.30	1.32	2.56
M-4 (CH5468924)	1.2	—	24h-0h	71	1.16	0.83	1.54
	1.6	—	24h-0h	68	1.81	0.77	1.05
	2.2	—	24h-0h	58	2.29	0.54	0.89
	2.8	—	24h-0h	49	1.88	0.29	0.58
MMS	15.0	—	24h-0h	56	5.62	0.49	1.14
2 nd Study (recovery: 0h or 24h)							
DMSO	0	—	24h-0h	100	1.15	1.25	1.90
M-4 (CH5468924)	1.0	—	24h-0h	70	1.57	0.74	1.15
	1.5	—	24h-0h	66	1.65	0.65	0.99
	2.0	—	24h-0h	55	1.55	0.40	0.82
	2.8	—	24h-0h	43	1.77	0.05	0.34
MMS	15.0	—	24h-0h	62	4.33	0.57	1.06
DMSO	0	—	24h-24h	100	1.28	2.50	2.06
M-4 (CH5468924)	0.1	—	24h-24h	84	2.32	2.26	1.83
	0.3	—	24h-24h	73	2.27	2.05	1.74
	0.7	—	24h-24h	45	2.18	1.36	1.50
MMS	15.0	—	24h-24h	27	6.59	0.59	0.75

RCC: Relative cell count; PD: Population doubling MN cells: Micronucleated cells; MMS: Methylmethanesulfonate

表 2.6.7.15-3 光安全性試験

Test Article: Alectinib						
Study Type	Treatment	Species/ Test System	Dose (µg/mL)	Vehicle	Results	Location in CTD
Photosafety						
<i>In vitro</i> photosafety	<i>In vitro</i>	Balb/c 3T3 cells	0, 0.02–50	PBS/1%DMSO	PIF: 94.8 A potential risk of phototoxicity was suggested.	4.2.3.7.7–1

PBS: phosphate buffered saline; PIF: Photo irritation factor (calculated based on IC₅₀(dark)/IC₅₀(UVA) with the Photox version 2.0)