ベムリディ錠 25 mg

第 2 部（モジュール 2）：CTD の概要（サマリー）

2.6.6　毒性試験の概要文

ギリアド・サイエンシズ株式会社

(0000)

目次

1　まとめ 8
2　単回投与毒性試験 13
2.1　ラット単回投与毒性試験 13
2.2　イヌ単回投与毒性試験 13
3　反復投与毒性試験 13
3.1　マウス 2 週間経口投与毒性試験 13
3.2　マウス 13 週間経口投与毒性試験 14
3.3　ラット 4 週間経口投与毒性試験 15
3.4　ラット 26 週間経口投与毒性試験 15
3.5　イヌ 4 週間経口投与毒性試験 16
3.6　イヌ 39 週間経口投与毒性試験 17
3.7　アカゲザル 4 週間経口投与毒性試験 18
4　遺伝毒性 19
4.1　*In Vitro* 19
4.1.1　細菌を用いる復帰突然変異試験 19
4.1.2　マウスリンフォーマ *tk* 試験 19
4.2　*In Vivo* 20
4.2.1　マウス小核試験 20
5　がん原性試験 20
6　生殖発生毒性試験 21
6.1　受胎能及び初期胚発生 21
6.1.1　ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 21
6.2　胚・胎児発生に関する試験 22
6.2.1　ラット胚・胎児発生に関する用量設定試験 22
6.2.2　ラット胚・胎児発生に関する試験 23
6.2.3　ウサギ胚・胎児発生に関する用量設定試験 24

6.2.4 ウサギ胚・胎児発生に関する試験 24
6.3 出生前及び出生後の発生並びに母体機能に関する試験 25
7 局所刺激性試験 26
7.1 ウシ摘出角膜を用いた眼刺激性試験 26
7.2 ウサギ皮膚刺激性試験 26
8 その他の毒性試験 26
8.1 感作性 26
8.1.1 マウス局所リンパ節試験（個体アプローチ） 26
8.2 免疫毒性試験 27
8.3 依存性 27
8.4 代謝物 27
8.4.1 TFV の細菌を用いる復帰突然変異試験 28
8.4.2 TFV のマウスリンフォーマ *tk* 試験 28
8.5 不純物 28
8.5.1 TAF（モノフマル酸塩）の不純物の安全性確認のためのラット 2 週間経口投与毒性試験 28
8.5.2 TAF（ヘミフマル酸塩）の不純物の安全性確認のためのラット 4 週間経口投与毒性試験 29
8.6 光毒性評価 29
9 考察及び結論 29
9.1 標的臓器毒性 29
9.1.1 腎臓 29
9.1.2 骨 30
9.1.3 その他 30
9.2 遺伝毒性 31
9.3 がん原性 31
9.4 生殖毒性 31
9.5 局所刺激性 32

9.6　その他の毒性試験 32

9.7　曝露量の比較及び曝露量の安全域 33

9.8　結論 33

10　図表 33

11　参考文献 34

表目次

表 2.6.6- 1　毒性試験プログラム 12

略号及び用語の説明

略号	日本語	英語
λ_{max}	最大吸収	absorption maxima
ALP	アルカリフォスファターゼ	alkaline phosphatase
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ	aspartate amino transferase
AUC_{0-xx}	時間 0 から xx 時間までの濃度－時間曲線下面積	partial area under the concentration versus time curve from time “0” to time “xx”
BCOP	ウシ角膜混濁度及び透過性	bovine corneal opacity permeability
BMD	骨密度	bone mineral density
C_{max}	最高濃度	the maximum observed concentration of drug
DNA	デオキシリボ核酸	deoxyribonucleic acid
Dpd	デオキシピリジノリン	deoxypyridinoline
dpm	-	disintegrations per minute
DXA	-	dual-emission X-ray absorptiometry
EC3	LLNA で SI が 3 となる被験物質濃度	estimated concentration of 3 is the concentration of test substance which would result in an SI of 3 in the LLNA
ECG	心電図	electrocardiography
F_1	第 1 世代	first generation
f.b.e.	遊離塩基換算	free base equivalents
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準	Good Laboratory Practice
GS-7339	TAF のジアステレオマー	diastereomer of TAF, GS-7340
HBV	B 型肝炎ウイルス	hepatitis B virus
HIV	ヒト免疫不全ウイルス-1	human immunodeficiency virus
^{3}HTdR	^{3}H-メチルチミジン	^{3}H-methyl Thymidine
LE	-	Long Evans
LNC	リンパ節細胞	lymph node cell
LLNA	局所リンパ節試験	local lymph node assay
mtDNA	ミトコンドリアデオキシリボ核酸	mitochondrial DNA
NOAEL	無毒性量	no observed adverse effect level
OECD	経済協力開発機構	Organization for Economic Cooperation and Development
PBMC	末梢血単核球	peripheral blood mononuclear cell
PCE	多染性赤血球	polychromatic erythrocyte
PII	一次刺激性インデックス	Primary Irritation Index
PK	薬物動態	pharmacokinetic
PTH	副甲状腺ホルモン	parathyroid hormone
RBC	赤血球	red blood cell
RT	逆転写酵素	reverse transcriptase

略号及び用語の説明（続き）

SD	-	Sprague-Dawley
SI	刺激指数	Stimulation Index
T_3	トリヨードサイロニン	triiodothyronine
TAF	テノホビル アラフェナミド、GS-7340	tenofovir alafenamide, GS-7340
TDF	テノホビル ジソプロキシルフマル酸塩	tenofovir disoproxil fumarate, bis-POC PMPA fumarate
TFV	テノホビル	tenofovir
TFV-DP	テノホビル二リン酸	tenofovir diphosphate
tk	チミジンキナーゼ	thymidine kinase
TK	トキシコキネティクス	toxicokinetics
WBC	白血球	white blood cell

1　まとめ

本資料は、B 型慢性肝炎の治療に対するテノホビル アラフェナミド（TAF、開発コード：GS-7340）錠の医薬品製造販売承認申請をサポートするために提出する。TAF はテノホビル（TFV）のプロドラッグであり、原薬はフマル酸塩である。TFV は B 型肝炎ウイルス（HBV）の逆転写酵素（RT）及びヒト免疫不全ウイルス（HIV）-1 RT を阻害するヌクレオチドアナログであり、経口バイオアベイラビリティは低い。テノホビル ジソプロキシルフマル酸塩（TDF）は B 型慢性肝炎患者の治療を適応とする既承認の TFV のプロドラッグである（販売名：テノゼット錠®300mg）。

TAFは、標的細胞で速やかにTFVに加水分解された後、リン酸化されて活性代謝物であるテノホビル二リン酸（TFV-DP）に代謝される。TFV-DPはHBV RT及びHIV-1 RTを阻害し、ウイルスのデオキシリボ核酸（DNA）鎖伸長を停止させる［1、2］。TAFはヒト血漿中でTDFよりも安定であるため、TDFの約 1/10 の投与量でも細胞内TFV-DP濃度は高く、循環血中TFV濃度は約 90%低い［3、4］（2.7.2.2.3.1.1 項）。このTAF特有の代謝メカニズムにより、TDFと比較して優れた臨床プロファイルを示す可能性がある。

TFVと異なり、TAFは腎取り込みトランスポーターである有機アニオントランスポーター（OAT）1 及びOAT3 の基質ではなく、相互作用も示さない（2.6.4.7.5.2 項）。TAFはこれらのトランスポーターを一過性に発現させたヒト腎上皮細胞おいてOAT依存性細胞毒性を示さない。したがって、TAFが能動的（OAT依存的）に腎近位尿細管に蓄積する可能性は低い。TAFが腎尿細管細胞へのTFV負荷に関与するとは考え難く、腎細胞中TFV濃度は血漿中TFV濃度と相関すると考えられる。TAF 25mg投与後の血漿中TFV濃度はTDF 300 mg投与後に比べて約 90%低い。TAFでは、TDFと比べTFVの全身曝露量の低値及びTFV-DPの細胞内濃度の高値が認められ、TDF投与後のリスクとして知られる腎毒性及び骨密度低下を低減させると考えられる［5、6］（2.7.4.2.1.5 項）。

TAF のヒト及びイヌ血漿中タンパク結合率を検討した結果、非結合型分率はそれぞれ 46.8%及び 48.0%及びであった（2.6.4.4.2 項）。

TAF の毒性試験プログラムを表 2.6.6- 1 に示す。TAF は、マウス、ラット、イヌ又はサルの単回及び 39 週間までの反復投与毒性試験で評価した。さらに、*in vivo* 遺伝毒性試験ではマウスを使用し、生殖発生毒性試験ではラット及びウサギを使用した。感作性試験及び皮膚刺激性試験を除き、いずれの *in vivo* 試験においても、臨床投与経路である経口投与を適用した。ラット及びイヌの *in vivo* 代謝プロファイルは、ヒトと類似していることが示されている（2.6.4.5.2 項）。毒性試験の溶媒は、1）25 mmol/L クエン酸、2）0.5%ポリソルベート 20、0.5%カルボキシメチルセルロース、0.9%ベンジルアルコール、又は 3）0.1%（v/v）ポリソルベート 20 及び 0.1% (w/v)ヒドロキシプロピルメチルセルロースを使用した。

TAF の開発では、遊離塩基体（GS-7340）、モノフマル酸塩（GS-7340-02）及びヘミフマル酸塩（GS-7340-03）の 3 種類の化合物を使用した。ヘミフマル酸塩は、原薬であり、モノフマル酸塩と物理学的／化学的性質が類似しており、血中及び体液中では遊離塩基体として存在する。反復投与毒性試験には、モノフマル酸塩を使用したが、モノフマル酸塩による試験でヘミフマル酸

塩の潜在的影響が評価された。受胎能及び初期胚発生試験、ウシ角膜眼刺激性試験、マウス局所リンパ節試験（LLNA）及び不純物評価のためのラット 4 週間投与試験にはヘミフマル酸塩を使用した。各試験の要約では、遊離塩基換算（f.b.e.）した投与量（mg f.b.e./kg/日）も追記した。

反復投与毒性試験並びに生殖発生毒性試験では、TAF 及び TFV の血漿中濃度分析のために血液を採取した。CD-1 マウス、Sprague-Dawley（SD）ラット及び TgRasH2 野生型マウスの TAF の薬物動態（PK）プロファイルからは、TAF は速やかに TFV に変換されることが示された（2.6.4.3.2 項）。TDF と異なり、TAF はヒト血漿中では比較的安定（$t_{1/2}$ は約 75 分）（2.6.4.5.1.1 項）であるが、細胞内では速やかに TFV に代謝される。げっ歯類での比較的短期間の反復毒性試験では、TAF ではなく TFV の血中濃度を評価し、非げっ歯類の反復投与毒性試験では TAF 及び TFV の両トキシコキネティクス（TK）を評価した。ラット及びウサギでの生殖発生毒性試験では、TAF 及び TFV の両 TK を評価した。

腎臓に関する所見として、ラット及びイヌ経口投与毒性試験では腎尿細管巨大核が観察された。ラットでは、4 週間投与試験の 400 mg/kg/日群に腎皮質尿細管の極微の巣状性好塩基球増加及びこれに伴う極微の腎皮質尿細管巨大核が観察され、26 週間投与試験の 100 mg/kg/日群でも極微の腎皮質尿細管巨大核が認められた。イヌでは、4 週間投与試験の 3 及び 10 mg/kg/日群及び 39 週間投与試験の 13 週間以上の投与で 6 又は 18/12 mg/kg/日群に腎尿細管巨大核及び／又は好塩基球増加が観察された。腎皮質尿細管の変性／再生所見は、イヌ 39 週間投与毒性試験の 13 及び 39 週間投与動物の 6 又は 18/12 mg/kg/日群に限られた。これらの所見の重症度は用量に依存した。13 週間の休薬期間後、投薬に関連した組織学的変化は腎臓で継続して観察されたものの、発現頻度及び重症度は低減していた。

骨に関する所見として、ラット 26 週間投与試験の 100 mg/kg/日群で、脛骨海綿骨萎縮が観察され、ラット 26 週間投与試験の 25 mg/kg/日群以上で骨代謝マーカーの増加並びに血清 1,25-ジヒドロキシビタミン D_3 及び 25-ヒドロキシビタミン D_3 の低下が認められた。また、イヌ 39 週間試験で骨密度（BMD）パラメーターの低値が 18/12 mg/kg/日群に認められた。本所見は、体重減少の二次的変化である可能性があるものの、雄での有意な血清 1,25-ジヒドロキシビタミン D_3 及び 25-ヒドロキシビタミン D_3 の低値を伴った。

マウス 13 週間投与試験の 10 mg/kg/日群以上において、鼻粘膜に有害な変性（嗅上皮）及び急性炎症（好中球浸潤）が認められた。これらの変化は、ラット、イヌ及びサルではマウスよりも長期間の投与でも認められなかったことから、ヒトへの関連は不明であり、ヒトでの鼻の炎症に対するリスクはきわめて低いと考えられた。

イヌ 39 週間投与試験において、2 mg/kg/日群では心電図（ECG）への影響は、観察されなかった。6 及び 18/12 mg/kg/日群では、PR間隔の軽微な延長（それぞれ雌雄平均で約 27%及び 37%）が観察され、トリヨードサイロニン（T_3）の有意な低下を伴った［7、8］。13 週間の休薬期間後、血清T3 値は投与終了時の対照群と同程度の濃度にまで回復した。

イヌ 39 週間投与試験の高用量である 18/12 mg/kg/日群で、数匹の一部臓器［眼（脈絡叢、毛様体）、肺及び脾臓］に極微の組織球浸潤が認められた。眼科学的検査は正常であった。これらの浸潤細胞は、主に毛様体の血管周囲領域にみられ、網膜毛様体の縁（ヒトでの鋸状縁に相当）にある毛様体と周辺網膜との境界下にある脈絡膜層では比較的少なかった。本所見は両側性にみら

れ、典型的な発現部位は毛様体の血管周囲及び脈絡膜層と周辺網膜の境界の結合部であったことから、観察された浸潤細胞は、血液－眼関門の維持に広く関わる単核細胞の軽微かつ無秩序な血管周囲浸潤の発現頻度及び程度が増加したものと考えられた。以上より、イヌにおけるこの病理組織学的所見のヒトにおける臨床的意義は限定的なものであることが示唆される。本所見（極微の組織球浸潤）の認められたイヌ 18/12 mg/kg/日群における TAF 及び TFV 曝露量は、ヒトにおける TAF 25 mg 投与時の曝露量（2.7.2.3.2.1.2.1 項）と比較してそれぞれ 9 及び 42 倍高かった。マウス及びラットにおけるそれぞれ 13 週間及び 26 週間までの反復投与試験並びにサル 4 週間及びイヌ 4 週間投与試験では、眼科学的検査及び眼組織の病理組織学的検査に投薬に関連した影響は認められなかった。有色マウスにおけるブドウ膜及び有色皮膚への分布から、放射能はメラニン含有組織に選択的に結合しないことが示唆されている。また、皮膚及び眼を含め、SD ラットと Long Evans（LE）ラット間で分布の差は観察されなかったため、メラニンには結合しないことが示唆された（2.6.4.4.1 項）。組織分布試験及び毒性試験で認められた結果に基づき、ヒトでの後部ブドウ膜炎のリスクはきわめて低いものと判断される。

In vitro 試験として細菌（*Salmonella typhimurium*、*Escherichia coli*）を用いた復帰突然変異試験及びマウスリンフォーマ細胞を用いた L5178Y 遺伝子突然変異試験を実施した。*In vivo* 試験として、マウス骨髄小核試験（500、1000 及び 2000 mg/kg、経口投与）を実施した。その結果、TAF はこれら *in vitro* 及び *in vivo* バッテリー試験で遺伝毒性を示さなかった。

TAF を用いたがん原性試験は実施しなかった。トランスジェニックマウス及びラットに TAF を投与したときの PK データにより、プロドラッグである TAF の血漿中濃度は測定不能であることが示されている（2.6.4.3.2.1 項）。TAF のマウス及びラット反復投与試験では、血漿中に十分量の TFV が認められたが、TDF のがん原性試験で認められた TFV 曝露量と比較すると低値であった。TDF を 300 mg/kg/日までの用量で 104 週間マウスに連日投与しても、がん原性は認められなかった。600 mg/kg/日群では、低頻度であったが投薬に関連するとみられる十二指腸腫瘍を認めた。ラットに 300 mg/kg/日までの用量の TDF を 2 年間経口投与したがん原性試験では、腫瘍性病変は認められなかった。これらの試験において、TDF のがん原性は低かったことから、TAF のがん原性も低いと考えられる。

ラット、イヌ及びサルの反復投与毒性試験で生殖器が評価された。ラット及びイヌ長期投与試験並びにサル 4 週間反復投与毒性試験の生殖器の病理組織学的検査及び臓器重量測定に、投薬に関連した所見は認められなかった。

ラット受胎能試験では、雌雄親動物に用量関連性の体重増加抑制が認められたが、交配、受胎能、精子の運動性、精子濃度、黄体数、着床部位数、早期及び後期吸収胚数並びに生存胎児数を含む生殖能パラメーターに、160 mg f.b.e./kg/日の投与まで、投薬に関連した所見は認められなかった。受胎能及び初期胚発生の毒性に関する無毒性量（NOAEL）は 160 mg f.b.e./kg/日であった。

ラット及びウサギ胚・胎児発生試験では、最高用量のそれぞれ 250 mg/kg/日及び 100 mg/kg/日で母動物毒性が認められた。ラットでは、一過性の軽微な骨化遅延を伴う胎児体重の低値が、母動物毒性のみられた 250 mg/kg/日で観察された。ラットでの胚・胎児発生に関する NOAEL は、100 mg/kg/日であった。ウサギでの胚・胎児発生への影響は 100 mg/kg/日まで認められず、NOAEL は 100 mg/kg/日であった。

TAF を用いた出生前及び出生後の発生毒性試験は実施しなかった。がん原性試験同様、ラットでは TAF の血漿中濃度は測定不能であり、TAF 投与後の TFV 曝露量は、TDF の出生前及び出生後の発生毒性試験で認められた TFV 曝露量より低値である。TDF の出生前及び出生後の発生毒性試験では、TFV の潜在的な出生後の毒性が明らかになっている。TDF のラットにおける出生前及び出生後の発生毒性試験では、母動物毒性を認める 450 mg/kg/日群以上において死亡児数増加が認められ、母動物の一般毒性に関する NOAEL は 150 mg/kg/日であった。胎児の発生、第 1 世代（F_1 世代）の一般毒性及び F_1 世代雌雄の行動、生殖及び発生毒性に対する NOAEL はいずれも 150 mg/kg/日であった。

消化管に対する局所刺激性を、反復経口投与毒性試験で評価した。その結果、マウス、ラットイヌ及びサル反復投与毒性試験で、消化管に臨床的及び病理組織学的変化は認められなかった。その結果、TAF に消化管毒性は観察されなかった。臨床試験での TAF を含むレジメンの忍容性は概して良好であった。消化管障害の発現頻度は被験者集団での一般的な発現頻度と同程度であり、安全性プロファイルは確認されている。

ウシ摘出角膜を用いた眼刺激性試験では、TAF（ヘミフマル酸塩）は腐食性・強度眼刺激性物質ではなく、TAF（モノフマル酸塩）は半閉塞的条件でウサギ皮膚に対し非刺激性・非腐食性であった。

LLNA で TAF（ヘミフマル酸塩）には潜在的な皮膚感作誘発能はないことが示された。

TAF 原薬及び製剤の不純物及び分解産物が同定され、これらの毒性試験を実施した。

TAF についての非臨床毒性試験の包括的プログラムを表 2.6.6- 1 に示す。本概要文に要約した主要な毒性試験及び TK 試験は医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）の手順に従って実施した。予備試験、探索的試験及び機序に関する試験については全てが厳格に GLP に準拠して行われたものではないが、適切な実施計画書や文書に従い実施した。これらの非臨床試験成績は、B 型慢性肝炎の治療に対する TAF の使用を支持している。

表 2.6.6- 1　　毒性試験プログラム

試験の種類及び期間	動物種	投与経路	GLP	被験物質
単回投与毒性試験	ラット イヌ	経口 経口	適 適	TAF（モノフマル酸塩） TAF（モノフマル酸塩）
反復投与毒性試験				
2 週間	マウス	経口	不適	TAF（モノフマル酸塩）
4 週間	ラット イヌ サル	経口 経口 経口	適 適 適	TAF（モノフマル酸塩） TAF（モノフマル酸塩） TAF（モノフマル酸塩）
13 週間	マウス	経口	適	TAF（モノフマル酸塩）
26 週間	ラット	経口	適	TAF（モノフマル酸塩）
39 週間	イヌ	経口	適	TAF（モノフマル酸塩）
遺伝毒性試験				
In Vitro： 復帰突然変異試験	細菌	*In Vitro*	適	TAF（モノフマル酸塩）
In Vitro：マウスリンフォーマ *tk* 試験	マウスリンパ腫細胞	*In Vitro*	適	TAF（モノフマル酸塩）
In Vivo：小核試験	マウス	経口	適	TAF（モノフマル酸塩）
がん原性試験				
2 年間	マウス ラット	経口 経口	適 適	TDF TDF
生殖発生毒性試験				
受胎能及び初期胚発生試験	ラット	経口	適	TAF（ヘミフマル酸塩）
胚・胎児発生試験 用量設定試験 胚・胎児発生試験 予備試験 用量設定試験 胚・胎児発生試験	 ラット ラット ウサギ ウサギ ウサギ	 経口 経口 経口 経口 経口	 適 適 不適 適 適	 TAF（モノフマル酸塩） TAF（モノフマル酸塩） TAF（モノフマル酸塩） TAF（モノフマル酸塩） TAF（モノフマル酸塩）
出生前及び出生後の発生試験	ラット	経口	適	TDF
局所刺激性試験				
眼刺激性試験	ウシ摘出角膜	*In Vitro*	適	TAF（ヘミフマル酸塩）
皮膚刺激性試験	ウサギ	経皮	適	TAF（モノフマル酸塩）
その他の試験				
代謝物の遺伝毒性試験 復帰突然変異試験 マウスリンフォーマ *tk* 試験	 細菌 マウスリンパ腫細胞	 *In Vitro* *In Vitro*	 適 適	 TFV TFV
抗原性試験 局所リンパ節試験	マウス	経皮	適	TAF（ヘミフマル酸塩）
不純物評価試験 2 週間 4 週間	 ラット ラット	 経口 経口	 適 適	 TAF（モノフマル酸塩） TAF（ヘミフマル酸塩）

2　単回投与毒性試験

2.1　ラット単回投与毒性試験

（試験番号 R990185、添付資料番号 4.2.3.1.1、評価資料）

Crl: CD(SD)ラット（雌雄各 5 匹／群）に，0（溶媒）、100、300 又は 1000 mg/kg（遊離塩基換算で 80、240、800 mg f.b.e./kg）の TAF（モノフマル酸塩）を単回経口投与（15 又は 20 mL/kg）し、14 日間観察した。試験期間中、死亡は観察されず、本試験における概略の致死量及び NOAEL はいずれも 1000 mg/kg 超と判断した。

2.2　イヌ単回投与毒性試験

（試験番号 D990181、添付資料番号 4.2.3.1.2、評価資料）

ビーグル犬（雌雄各 1 匹／群）に、0（溶媒）、30、90 又は 270 mg/kg（遊離塩基換算で 24、72、216 mg f.b.e./kg）の TAF（モノフマル酸塩）を単回経口投与（15 mL/kg）し、14 日間観察した。投与開始前並びに試験第 2 及び 14 日に全動物について血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査を実施した。試験期間中、死亡は観察されなかった。軽度の一般症状（流延、悪心、嘔吐、活動低下、脱力、振戦、協調不能）が 270 mg/kg 群で観察されたが、投与 2 日後に消失した。血中尿素窒素の一過性の増加（試験第 2 日に認められたが、14 日では認められず）が 270 mg/kg 群に認められた。その他、14 日間の観察期間中、血液生化学検査、血液学的検査及び尿検査値に意義のある変化は認められなかった。対照群と比較して全投薬群に胸腺重量の低値が認められ、胸腺萎縮が 90 及び 270 mg/kg 群の雄に認められた。腎尿細管病変として好塩基球増加又は巨大核が 270 mg/kg 群の雄並びに 90 及び 270 mg/kg 群の雌に認められた。本試験における概略の致死量及び NOAEL はそれぞれ 270 mg/kg 超及び 30 mg/kg と判断した。

3　反復投与毒性試験

3.1　マウス 2 週間経口投与毒性試験

（試験番号 TX-120-2006、添付資料番号 4.2.3.2.1、参考資料）

Crl:CD-1(ICR)マウス（雌雄各 10 匹／群）に 0（溶媒）、100、500 又は 1000 mg/kg/日（遊離塩基換算で 80、400 又は 800 mg f.b.e/kg/日）の TAF（モノフマル酸塩）を 14 日間 1 日 1 回経口投与（投与容量：10 mL/kg）した。さらに、サテライト動物（対照群：雌雄各 6 匹、投薬群：雌雄各 42 匹）に同様に投与し、試験第 1 及び 14 日に TK 評価を実施した。

投与 9 日までに、毒性及び TK 評価動物において、30 匹（500 mg/kg/日群の雌雄各 5 匹及び 1000 mg/kg/日群の雄 7 匹雌 13 匹）がそれぞれ死亡又は切迫屠殺された。投与過誤が確認された回数、投与液の粘稠性（500 及び 1000 mg/kg/日群の投与液は著しく粘性が高かった）、剖検での肺の異常所見の数並びに非致死的な経口投与時の傷害及び二次的な炎症を示す病理組織学的変化に基づくと、500 及び 1000 mg/kg/日群の早期死亡の原因は、一部不明であるものの、それぞれの投与液（50 及び 100 mg/mL）の性状に起因した可能性が考えられた。

極微から中等度の臨床検査値変動が 500 又は 1000 mg/kg/日群でみられた。その内訳は、軽度から中等度の絶対網赤血球数の低値、極微から中等度の総タンパク質及びアルブミンの高値、軽度から中等度のアルカリフォスファターゼ（ALP）の高値及び軽度の無機リンの高値であった。直腸上皮に極微から軽微の空胞化／アポトーシスが 100 mg/kg/日群以上の雄並びに 500 及び 1000 mg/kg/日群の雌に観察されたが、上皮に傷害像はみられず、炎症及び壊死に至ることはなかったことから、これらの所見は有害とは判断しなかった。

TAF の全身曝露量は投与量増加に伴い増加し、蓄積性はなかった。TFV の全身曝露量は投与量増加に伴い増加した。性差はみられず（2 倍未満）、蓄積性もなかった。TAF 及び TFV の時間 0 から 24 時間までの濃度－時間曲線下面積（AUC_{0-24}）比から TAF は代謝物である TFV に速やかに変換されることが示された。

以上の結果から、本試験の NOAEL は 100 mg/kg/日と判断した。NOAEL（100 mg/kg/日）での TAF 曝露量は、最高濃度（C_{max}）は 21.2 ng/mL（試験第 14 日、雌雄合算値）であったが、AUC_{0-t} は十分なデータが得られなかったため算出できなかった。TFV 曝露量は、C_{max} は 1.24 µg/mL、AUC_{0-t} は 5.74 µg•h/mL（試験第 14 日、雌雄合算値）であった。

3.2　マウス 13 週間経口投与毒性試験

（試験番号 TX-120-2007、添付資料番号 4.2.3.2.2、評価資料）

Crl:CD-1(ICR) マウス（雌雄各 15 匹／群）に 0（溶媒）、10、30 又は 100 mg/kg/日（遊離塩基換算で 8、24 又は 80 mg f.b.e./kg/日）の TAF（モノフマル酸塩）を 1 日 1 回 13 週間経口投与（投与容量：10 mL/kg）した。さらに、サテライト動物（対照群：雌雄各 6 匹、投薬群：雌雄各 42 匹）に同様に投与し、試験第 1 日及び 13 週に TK 評価を実施した。

投薬に関連した死亡は認められなかった。100 mg/kg/日群の雄 1 匹を試験第 54 日に投与過誤により切迫屠殺した。100 mg/kg/日群の雄及び全投薬群の雌で、軽微な体重増加抑制が認められた。30 mg/kg/日群以上の雌雄で、摂餌量の一過性の低値が投与開始時に認められた。体重及び摂餌量への影響は有害とはみなさなかった。一般状態変化並びに臨床検査値、臓器重量のパラメーター及び剖検所見に投薬に関連した影響はみられなかった。病理組織学的検査において、10 mg/kg/日群以上の雌雄で、鼻甲介に投薬に関連した所見として、極微から軽微の鼻粘膜呼吸部及び鼻粘膜嗅部における好中球浸潤並びに極微から中等度（高用量のみ）の嗅上皮変性の発現頻度の増加及び重症度の高度化が観察された。さらに、30 mg/kg/日群以上の雌雄では鼻甲介に有害所見（鼻腔内に滲出液）が認められた。対照群の動物での浸潤及び嗅上皮変性は軽微であり、発現頻度も低かった。100 mg/kg/日群の雌雄の直腸に投薬に関連した病理組織学的所見（アポトーシスの極微の増加）が認められた。

TAF の血漿中濃度データは限定的であったため、TK パラメーターは算出不能であった。TFV の全身曝露量は 10～100 mg/kg/日の範囲で投与量比を超える増加を示した。性差はみられず（2 倍未満）、蓄積性もなかった。マウスへの経口投与後、TAF は急速に TFV に変換された。

10 mg/kg/日群以上で鼻甲介の病理組織学的所見の発現頻度の増加及び重症度の高度化が観察されたことから、本試験の NOAEL は 10 mg/kg/日未満であった。10 mg/kg/日投与時の TFV 曝露量の $AUC_{0\text{-}t}$ は雄で 0.191 μg•h/mL、雌で 0.239 μg•h/mL（試験第 13 週）であった。

3.3　ラット 4 週間経口投与毒性試験

（試験番号 R990182、添付資料番号 4.2.3.2.3、評価資料）
（試験番号 R990182-PK、添付資料番号 4.2.3.2.3、評価資料）

Crl: CD(SD)ラット（雌雄各 10 匹／群）に 0（溶媒）、1.5、6.25、25、100 又は 400 mg/kg/日（遊離塩基換算で 1.2、5、20、80 又は 320 mg f.b.e./kg/日）の TAF（モノフマル酸塩）を 1 日 1 回 28 日間経口投与（投与容量：15 mL/kg）した。さらに、サテライト動物（投薬群：雌雄各 8 匹）に同様に投与し、試験第 1 及び 28 日に TK 評価を実施した。また、骨毒性評価のため、血清及び尿中骨代謝マーカー測定及び BMD 測定を実施した。

試験期間中、投薬に関連した死亡は認められなかった。試験期間中、5 匹（毒性評価群の 400 mg/kg/日の雄 2 匹及び 6.25 mg/kg/日の雄 1 匹、並びに TK 群の 6.25 mg/kg/日及び 400 mg/kg/日の雌各 1 匹）に死亡が確認されたが、毒性評価群の 3 匹は投与過誤（食道穿刺）によると判断された。TK 群の動物は剖検しなかったため死因は特定できなかった。

投薬に関連する影響として、400 mg/kg/日群に口及び鼻部の被毛の赤色化、体重増加抑制、摂餌量低下、白血球（WBC）及び赤血球（RBC）パラメーターの低値、カルシウム尿、BMD パラメーター低下、骨代謝マーカーの変動（1,25-ジヒドロキシビタミン D_3 の低値）、胸腺重量対体重比の低値、腎皮質尿細管の極微の巣状性好塩基球増加及びこれに伴う極微から軽微の腎皮質尿細管巨大核、胸腺萎縮並びに大腿骨の海綿骨萎縮が認められた。影響の大半は 400 mg/kg/日群に限定されていたが、WBC パラメーターの低値は 25 mg/kg/日群から認められた。眼科学的検査及び尿検査に投薬の影響は認められなかった。NOAEL は 6.25 mg/kg/日と判断した。NOAEL（6.25 mg/kg/日）における TFV 曝露量の $AUC_{0\text{-}last}$ は雄で 0.358 μg•h/mL、雌で 0.321 μg•h/mL（試験第 28 日）であった。

3.4　ラット 26 週間経口投与毒性試験

（試験番号 TOX-120-001、添付資料番号 4.2.3.2.4、評価資料）

Crl: CD(SD)ラット（雌雄各 15 匹／群）に 0（溶媒）、5、25 又は 100 mg/kg/日（遊離塩基換算で 4、20 又は 80 mg f.b.e./kg/日）の TAF（モノフマル酸塩）を 1 日 1 回 26 週間経口投与（投与容量：10 mL/kg）した。さらに、サテライト動物（投薬群：雌雄各 8 匹）に同様に投与し、試験第 1 日並びに 13 及び 26 週に TK 評価を実施した。また、骨毒性評価のため、骨代謝マーカー測定及び BMD 評価を実施した。

投与期間中において、投薬に関連した死亡及び一般状態の変化は認められなかった。試験期間中、毒性評価群の雌 6 匹（対照群並びに 5 及び 100 mg/kg/日群でそれぞれ 1、2 及び 3 匹）が死亡したが、うち 5 匹は採血及び投与過誤による死亡と推察された。残る 1 匹（5 mg/kg/日）の死亡は特定できなかった。またサテライト動物の雌 2 匹（100 mg/kg/日）を切迫屠殺したが、死因は不明又は投与過誤であった。

投薬に関連する影響として、極微の腎皮質尿細管巨大核（100 mg/kg/日群）及び極微から軽微の脛骨海綿骨萎縮（100 mg/kg/日群の雌）、BMD パラメーターの低下（100 mg/kg/日群）が観察された。また、25 及び 100 mg/kg/日群雄における用量依存的な骨代謝マーカー［デオキシピリジノリン（Dpd）及び C テロペプチド］の高値並びに 25 及び 100 mg/kg/日群の雌雄における関連ホルモン（血清 1,25-ジヒドロキシビタミン D_3 及び 25-ヒドロキシビタミン D_3）の用量に依存しない低値がみられた。5 mg/kg/日群では影響は観察されなかった。

体重、摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査、通常の血液生化学検査及び尿検査のパラメーターに意義ある影響は認められなかった。また、臓器重量及び剖検所見でも投薬に関連した影響は認められなかった。

TK 評価では、TAF は経口投与後に急速に吸収され、TFV に変換されることが示された。明らかな雌雄差は認められなかった。TFV の C_{max} 及び AUC 値は、いずれの測定日でも 5 mg/kg/日から 100 mg/kg/日の範囲で用量比例的に増加した。

以上のとおり、25 mg/kg/日群にみられた影響（骨代謝マーカーの高値及び関連ホルモンの低値）は極微であったため、NOAEL は 25 mg/kg/日と判断した。NOAEL（25 mg/kg/日）における TFV 曝露量の $AUC_{0\text{-}24}$ は雄で 3.526 µg•h/mL、雌で 3.991 µg•h/mL（試験第 26 週）であった。

3.5　イヌ 4 週間経口投与毒性試験

（試験番号 D990175、添付資料番号 4.2.3.2.5、評価資料）
（試験番号 D990175-PK、添付資料番号 4.2.3.2.5、評価資料）

ビーグル犬（雌雄各 4 匹／群）に 0（溶媒）、0.1、0.3、1、3 又は 10 mg/kg/日（遊離塩基換算で 0.08、0.24、0.8、2.4 又は 8 mg f.b.e./kg/日）の TAF（モノフマル酸塩）を 1 日 1 回 28 日間経口投与（投与容量：10 mL/kg）した。本試験では、骨毒性評価のため、血清及び尿中骨代謝マーカー測定及び BMD 測定を実施した。

試験期間中、死亡は認められず、投薬に関連した一般症状も観察されなかった。体重、摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査、尿検査に投薬の影響はみられなかった。高用量群（10 mg/kg/日）雌のみにアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）が微増したが、毒性学的意義については不明である。病理組織学的検査では、3 mg/kg/日群の雌雄各 1 匹及び 10 mg/kg/日群の雌雄全例に腎尿細管の巨大核が認められ、10 mg/kg/日群の雄 2 匹及び雌 3 匹では好塩基球増加を伴っていた。骨代謝マーカー及び関連ホルモン並びに BMD パラメーターに投薬による影響は認められなかった。

血漿中 TAF 濃度は、1.0 mg/kg/日群で定量可能な試料が限られていたことから、0.1 及び 0.3 mg/kg/日の試料は測定しなかった。また、血漿中 TAF 及び TFV のいずれについても、1 及び 3 mg/kg/日群では、定量可能な試料が限られたため、TK パラメーターは 10 mg/kg/日群のみ算出した。10 mg/kg/日群での試験第 28 日の TFV の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24}$ はそれぞれ 0.44 µg/mL 及び 5.26 µg•h/mL であった（雌雄合算、中央値）。10 mg/kg/日群で、反復投与による蓄積性が示された。10 mg/kg/日群の試験第 28 日の末梢血単核球（PBMC）中 TFV 濃度は 18.6 µg/mL であった。

以上のとおり、本試験では、3 mg/kg/日群以上で投薬に関連した腎臓病変が観察されたことから、NOAEL は 1 mg/kg/日と判断した。

3.6　イヌ 39 週間経口投与毒性試験

（試験番号 TOX-120-002、添付資料番号 4.2.3.2.6、評価資料）

雌雄ビーグル犬に 0（溶媒）、2、6 又は 18/12 mg/kg/日（遊離塩基換算で 1.6、4.8 又は 14.4/9.6 mg f.b.e./kg/日）の TAF（モノフマル酸塩）を 1 日 1 回 13 週間（雌雄各 2 匹／群）又は 39 週間（雌雄各 4 匹／群）連日経口投与（投与容量：10 mL/kg）した。さらに、高用量群に雌雄各 2 匹を追加し、3 ヵ月間の休薬期間後の回復性を検討した。本試験では、骨毒性評価のため、血清及び尿中骨代謝マーカー測定及び BMD 測定を実施した。高用量群において、重度の一般状態悪化及び体重及び摂餌量の低値がみられたため、雄及び雌に対してそれぞれ試験第 45 及び 51 日に投与量を 18 mg/kg/日から 12 mg/kg/日に減量した。

試験期間中、18/12 mg/kg/日群の雄 2 匹が試験第 45 及び 65 日に死亡した。試験第 65 日に切迫屠殺した 1 匹は投与過誤によるとみられた。試験第 45 日に切迫屠殺した雄 1 匹については、投薬に関連するとみられる一般状態悪化が認められた。当該動物では、体重減少、摂餌量低下、AST、グロブリン量、トリグリセリド、コレステロール及び総ビリルビンの高値、並びに単球及び血小板数の低値が認められた。剖検では、下顎リンパ節の両側性の拡張がみられ、病理組織学的には軽微な唾液腺の炎症及び形質細胞増加を認めた。病理組織学的所見として、後眼部ブドウ膜における軽度の単核球浸潤、腎皮質尿細管変性、マクロファージ浸潤を伴う腸管関連リンパ組織、腸間膜リンパ節及び胸腺の萎縮、胃底腺の粘膜萎縮、幽門腺の粘膜過形成、並びに軽微でびまん性の盲腸及び結腸の粘膜の変性又は再生が認められた。

投与開始後 7 週間に 18 mg/kg/日を投与された動物で体重増加抑制が観察された。本所見は雄で顕著であった。

血液学的検査、血液生化学検査及び尿検査では、18/12 mg/kg/日群で AST の高値（対照群と比較して約 2.7 倍）及び総ビリルビンの高値（対照群と比較して約 1.7 倍）を除き、背景値の範囲内であった。2 mg/kg/日群では ECG の変化は認められなかった。投与 39 週において、PR 間隔の用量関連性の延長が 6 mg/kg/日群（+約 27%）及び 18/12 mg/kg/日群（+約 37%）で観察された。また、高用量群のみに、投薬に起因したと考えらえる心拍数の可逆的な低下が QT 間隔の軽度な延長を伴って認められた。以上の変化は血清 T_3 の低値を伴っていた［7、8］。13 週間の休薬期間後、血清 T_3 値は投与終了時の対照群の値と同程度にまで回復した。

眼科学的検査及び尿検査に投薬の影響は認められなかった。

18/12 mg/kg/日群の試験第 39 週の骨吸収マーカーの N テロペプチドに対照群と比較して有意な低値が認められたが、遊離 Dpd 及び骨型 ALP に有意差はみられなかった。18/12 mg/kg/日群雄の 1,25-ジヒドロキシビタミン D_3（試験第 13 及び 39 週）及び 25-ヒドロキシビタミン D_3（試験第 39 週）に有意な低値が観察された。投薬群の血清副甲状腺ホルモン（PTH）濃度はばらつきが大きかった。13 週間の休薬期間後、骨代謝マーカー及びホルモンに回復性が認められた。

18/12 mg/kg/日群において BMD パラメーターの変化（低値）が認められた。本所見は骨成長への影響を反映していると考えられ、体重への影響の二次的所見と考えられた。

投薬に関連した病理組織学的変化が、13 週間投与及び 39 週間投与のいずれにも、腎臓、眼、肺及び脾臓に認められた。さらに、肝臓及び副腎に 39 週間投与で、長期投与の影響とみられる

投薬に関連した影響が認められた。13 週間投与では、6 又は 18/12 mg/kg/日群で腎皮質尿細管の変性／再生及び巨大核がみられ、39 週間投与にも同様の所見が認められた。これらの所見は、6 mg/kg/日群の雌雄では極微～軽微（グレード 1～2）であったのに対し、18/12 mg/kg/日の雄では軽度～中等度（グレード 2～3）であった。39 週間投与では、2 mg/kg/日群の雄 2 匹でも、同様の変化（巨大核及び尿細管変性）が認められたが、重症度は極微（グレード 1）であった。両投与期間終了後の 18/12 mg/kg/日群の数匹で、後眼部ブドウ膜に単核細胞の極微～軽微の浸潤（グレード 1～2）が認められた。13 週間投与後の肺での投薬に関連した唯一の所見として 18/12 mg/kg/日群に肺胞組織球症が認められた。さらに、39 週間投与後の肺では、色素を含んだマクロファージの蓄積が認められ、主に本所見は高用量（18/12 mg/kg/日）群で検出され、6 又は 2 mg/kg/日群での発現匹数はわずかであった。色素を含んだマクロファージの浸潤が、両投与期間終了後に、18/12 mg/kg/日群の白脾髄に高頻度に認められた。39 週間投与後、18/12 mg/kg/日群で小葉中心性肝細胞の細胞質の好酸性封入体が認められ、6 又は 18/12 mg/kg/日群では肝マクロファージ及び／又は類洞壁細胞（Kupffer 細胞）の色素沈着が認められた。また、18/12 mg/kg/日群の数匹では、副腎の類洞細胞（組織マクロファージ）において類似した色素沈着も認められた。肺、肝臓、脾臓、及び副腎の組織マクロファージでの細胞内色素の原因は不明であるが、単核食細胞系のこれらの細胞における被験物質又はその代謝物の蓄積を反映している可能性が考えられる。13 週間の休薬期間後、投薬に関連した組織学的変化が依然、腎臓、肺及び肝臓に観察されたが、発現頻度及び重症度は低下していた。

TK 評価では、TAF は経口投与後に急速に吸収され、TFV に変換され、TAF 及び TFV はそれぞれ投与後 0.5 及び 1 時間に最高血漿中濃度に達した。TAF の全身曝露量は用量依存的であった。TAF の全身曝露量（C_{max} 及び AUC）は、2～18/12 mg/kg/日の範囲で投与量比を上回って増加した。TFV の全身曝露量（C_{max} 及び AUC）は、投与量に比例して増加した。反復投与後に TFV の若干の蓄積（約 3 倍）が認められた。経口投与後の TAF 及び TFV の PK に性差は認められなかった。

試験第 39/40 週の PBMC 中 TFV 濃度は、全投薬群で投与 24 時間後まで測定可能であった。回復群動物での投与 72 時間後までの PBMC 中 TFV 濃度から推定した終末相半減期の中央値は 31 時間であった（血漿中 TFV の推定値と同様）。投与量で標準化したときの PBMC 中 TFV の $AUC_{0\text{-}24}$ 値は、試験第 39/40 週において、投与量比を上回る増加を示した。

以上の所見に基づき、本試験の NOAEL は 2 mg/kg/日と判断した。投薬に関連した所見は、13 週間の休薬期間後に完全又は部分的に回復した。NOAEL（2 mg/kg/日）における TFV 曝露量の $AUC_{0\text{-}24}$ は 1.18 µg•h/mL（雌雄合算値、試験第 39/40 週）であった。

3.7　アカゲザル 4 週間経口投与毒性試験

（試験番号 P2000114、添付資料番号 4.2.3.2.7、評価資料）
（試験番号 P2000114-PK、添付資料番号 4.2.3.2.7、評価資料）

アカゲザル（雌雄各 3 匹／群）に 0（溶媒）、3 又は 30 mg/kg/日（遊離塩基換算で 2.4 又は 24 mg f.b.e./kg/日）の TAF（モノフマル酸塩）又は 15 mg/kg/日の TFV を 1 日 1 回 28 日間経口投与（投与容量：10 mL/kg）した。本試験では、血清及び尿中骨代謝マーカー測定、フローサイト

メトリーによるリンパ球分析、骨の病理組織学的評価、並びに組織中シトクロム c 酸化酵素、クエン酸シンターゼ及びミトコンドリアデオキシリボ核酸（mtDNA）量測定を実施した。

試験期間中、投薬に関連した死亡は認められず、一般症状も観察されなかった。TAF の 30 mg/kg/日群の 1 匹を試験第 18 日に切迫屠殺したが、原因は試験開始前から認められた感染によるとみられる消化管障害による一般状態悪化であり、投薬に関連しなかった。体重、血液生化学的検査、血液学的検査（フローサイトメトリーによるリンパ球分析を含む）、尿検査、臓器重量及び病理組織学的検査に投薬に関連した明らかな影響は認められなかった。また、骨代謝マーカー及び骨の病理組織学的パラメーター並びに腎臓、肝臓及び骨格筋組織を用いたミトコンドリア毒性に関する評価パラメーターも投薬の影響は認められなかった。

TK 評価では、試験第 28 日の TAF の C_{max} は投与量比を超える非線形性の増加を示した。TAF の $AUC_{0\text{-}24}$ は 30 mg/kg/日群のみ算出可能であり、1.03 µg•h/mL（雌雄合算）であった。性差は観察されなかった。試験第 28 日の TFV の C_{max} 及び AUC は、投与量比をわずかに上回る増加を示した。反復投与による蓄積性は認められず、性差もなかった。

以上のとおり、本試験の NOAEL は 30 mg/kg/日であった。NOAEL（30 mg/kg/日）における TAF 及び TFV 曝露量（$AUC_{0\text{-}24}$）は、それぞれ 1.03 µg•h/mL 及び 5.87 µg•h/mL（雌雄合算値、試験第 28 日）であった。

4　遺伝毒性

4.1　*In Vitro*

4.1.1　細菌を用いる復帰突然変異試験

（試験番号 V990212、添付資料番号 4.2.3.3.1.1、評価資料）

TAF（モノフマル酸塩）の *in vitro* 遺伝毒性を、細菌を用いる復帰突然変異試験で *Salmonella typhimurium* 株（TA98、TA100、TA1535、TA1537）及び *Escherichia coli* 株 WP2uvrA を用いて Aroclor™誘導ラット肝臓から調製したミクロソーム酵素（S9mix）存在下又は非存在下で 5000 µg/plate（遊離塩基換算で 4000 µg f.b.e./plate）まで検討した。その結果、代謝活性化の有無にかかわらず、全ての試験菌株でプレートあたりの復帰変異コロニー数に陽性を示す増加を認めなかった。

4.1.2　マウスリンフォーマ *tk* 試験

（試験番号 V990213、添付資料番号 4.2.3.3.1.2、評価資料）

マウスリンパ腫 L5178Y 細胞のチミジンキナーゼ（*tk*）遺伝子配座に対する前進突然変異誘発能を、TAF（モノフマル酸塩）の 5000 µg/mL（遊離塩基換算で 4000 µg f.b.e/mL）まで 4 又は 24 時間曝露し検討した。全ての試験は、S9mix の存在下又は非存在下で実施した。TAF（モノフマル酸塩）は、S9mix の存在下又は非存在下のいずれの条件下でも、マウスリンパ腫 L5178Y 細胞の *tk* 遺伝子配座における前進突然変異誘発性を示さず、陰性と評価された。

4.2　*In Vivo*

4.2.1　マウス小核試験

（試験番号 M2000113、添付資料番号 4.2.3.3.2.1、評価資料）

Crl:CD-1(ICR) マウス（雄 5 匹／群）に 0（溶媒）、500、1000 又は 2000 mg/kg（遊離塩基換算で 400、800 又は 1600 mg f.b.e./kg）の TAF（モノフマル酸塩）を経口投与して、*in vivo* での染色体異常誘発活性を評価した。500、1000 mg/kg 及び陽性対照（シクロフォスファミド）投与動物は 24 時間後に、また、2000 mg/kg 及び溶媒対照投与動物は、投与 24 及び 48 時間後にそれぞれ安楽死させ、骨髄を採取した。一般状態に投薬による毒性学的影響は観察されなかった。
2000 mg/kg 群で、骨髄に対する細胞毒性［多染性赤血球：正染性赤血球（PCE：NCE）比の統計学的に有意な低下］が 24 及び 48 時間の両評価時点で認められた。小核を有する PCE の統計学的に有意な増加は認められなかった。TAF は本試験において遺伝毒性は陰性であった。陽性対照動物では統計学的に有意な増加が認められた。

5　がん原性試験

（試験番号M990205、添付資料番号 4.2.3.4.1.1、参考資料 *）
（試験番号 R990204、添付資料番号 4.2.3.4.1.2、参考資料*）

TAF を用いたがん原性試験は実施していない。しかし、第 1 世代の TFV のプロドラッグである TDF をマウス及びラットにそれぞれ 600 及び 300 mg/kg/日までを 2 年間経口投与したがん原性が実施されている。

TDF のマウスがん原性試験（試験番号 M990205）では、Crl:CD-1(ICR) マウス（雌雄各 60 匹／群）に 0（溶媒）、100、300 又は 600 mg/kg/日の TDF を 104 週間連日経口投与した。300 mg/kg/日群以上で流涎及び体重の低値が認められた。腫瘍性病変として、600 mg/kg/日群において十二指腸腫瘍（腺腫／腺癌）が低頻度（雄 1/60 例、雌 2/60 例）にみられた。非腫瘍性病変としては、100 mg/kg/日以上の群で十二指腸の上皮過形成、300 mg/kg/日以上の群で肝臓に好酸性／好塩基性細胞巣、肝細胞肥大、核内封入体、巨大細胞／巨大核及び単細胞壊死並びに類洞内皮細胞増殖、精巣に血管鉱質沈着が、600 mg/kg/日群で腎臓に腎尿細管上皮巨大核及び骨髄に骨髄細胞過形成が認められた。600 mg/kg/日群の試験第 180 日における TFV の $AUC_{0\text{-}24}$ は雌雄で 50.9 及び 44.3 µg•h/mL であった。TAF のマウス 13 週間投与試験での試験第 13 週における 100 mg/kg/日投与時の TFV 曝露量と比較すると（本項 3.2 章）、同一投与量での TAF 及び TDF 経口投与時の定常状態における TFV の血漿中曝露量はほぼ同じと推測された。

TDF のラットがん原性試験（試験番号 R990205）では、SD ラット（雌雄各 60 匹／群）に 0（溶媒）、30、100 又は 300 mg/kg/日を 103/104 週間連日強制経口投与した。100 mg/kg/日群以上

* ：テノゼット錠®300mg 承認申請時に提出済み

で流延が認められ、体重の低値が 100 mg/kg/日群以上の雄及び 300 mg/kg/日群の雌でみられた。ラットに腫瘍性病変は認められなかった。非腫瘍性病変としては、全投薬群で腎尿細管上皮の巨大核がみられた。300 mg/kg/日群の試験第 180 日における TFV の $AUC_{0\text{-}24}$ は雌雄で 15.72 及び 16.69 µg•h/mL であった。

以上のとおり、TDF を用いたがん原性試験において非常に高用量を投与したときにマウスで腫瘍発現頻度が増加したが、ラットでは腫瘍発生頻度増加はみられなかった。ヒトでの TFV 曝露量は TAF より TDF で高いことから、TAF のがん原性が低いことが支持される。TDF は、臨床曝露量より高い曝露量での 2 年間のがん原性試験試験でがん原性が低いことが示された。この結果は、TAF のがん原性が低いことを裏付けている。

6　生殖発生毒性試験

6.1　受胎能及び初期胚発生

6.1.1　ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

（試験番号 TX-120-2012、添付資料番号 4.2.3.5.1.1、評価資料）

Crl:CD(SD)ラット（雌雄各 22 匹／群）に TAF（ヘミフマル酸塩）を遊離塩基換算で 0（溶媒）、20、80 又は 160 mg f.b.e./kg/日（ヘミフマル酸塩での投与量：22、90、180 mg/kg/日）の用量で交配前から交配期間終了時（雄）又は妊娠初期の全期間（雌）まで連日強制経口投与し、交配及び受胎能に対する影響を検討した（投与容量：10 mL/kg）。雄は投与 10 週間以降に剖検し、生殖器官の重量を測定し、その後精子の運動性及び総濃度を評価した。雌雄の生殖機能を、交配及び妊娠の確認結果に基づいて評価した。生殖機能、交配行動、着床、雌の性周期、及び雌雄ラットの一般的な受胎能に対する潜在的影響を評価した。

試験期間中、死亡はみられなかった。一般状態に投薬に関連した有害所見は認められなかった。雄では、80 及び 160 mg f.b.e./kg/日群に試験期間を通して用量依存的な体重の低値が認められた。160 mg/kg/日群の体重は、交配前 28 日、交配第 3、7 及び 10 日、並びに交配終了後 0 日から試験終了時にかけて対照群よりも有意に低く、試験終了時の 160 mg f.b.e./kg/日群の平均体重は対照群よりも 12%低かった。雌では、160 mg f.b.e./kg/日群において、交配前 17 日の平均体重はわずかであったものの対照群よりも有意に低値（-6%）であった。妊娠期間中は、160 mg f.b.e./kg/日群で妊娠 0～7 日に有意な（-19%）体重増加抑制を認めた。摂餌量では、交配前の多くの時点において 160 mg f.b.e./kg/日の雄で有意に低値であった。雌では、交配前に 80 及び 160 mg f.b.e./kg/日群で軽微な摂餌量低下が認められ、妊娠期間中は 160 mg f.b.e./kg/日群で有意に低下した。

交配前の性周期に差はみられなかった。雌雄の生殖パラメーターに投薬に関連した差は認められなかった。交尾率／受胎率／生殖率は、対照群、20、80 及び 160 mg f.b.e./kg/日群の雄でそれぞれ 100/95/95%、95/100/95%、91/95/86%及び 95/95/91%であり、雌ではそれぞれ 100/95/95%、100/100/100%、100/95/95%及び 100/95/95%であった。子宮及び胎児パラメーターに対して投薬に関連した影響は認められず、雌の生殖器重量に有意差はなかった。

160 mg f.b.e./kg/日群の雄で、精巣絶対重量の軽微な増加［左精巣のみ補正平均における有意な増加（9%）］がみられた。本所見は、投薬に関連すると考えられたが、他の生殖器重量及び生殖機能に対する影響はみられないことから有害とは判断しなかった。精巣上体の精子運動性及び精子濃度に投薬の影響は認められず、精子運動性の平均値は対照群、20、80 及び 160 mg f.b.e./kg/日群でそれぞれ 91.8%、95.2%、95.5%及び 94.0%、精子濃度の平均値は対照群、20、80 及び 160 mg f.b.e./kg/日群でそれぞれ 942.2、833.2、966.1 及び 928.5×10^6 個／精巣上体尾部重量 1g であった。

以上より、本試験における雌雄親動物の一般毒性に関する NOAEL は 80 mg f.b.e/kg/日であり、生殖毒性及び初期胚発生に関する NOAEL は 160 mg f.b.e/kg/日であった。

6.2　胚・胎児発生に関する試験

6.2.1　ラット胚・胎児発生に関する用量設定試験

（試験番号 TX-120-2001、添付資料番号 4.2.3.5.2.1、評価資料）

Crl:CD(SD)妊娠ラット（8 匹／群）に、0（溶媒）、5、100 及び 200 mg/kg（遊離塩基換算で 4、80、160 mg f.b.e./kg/日）の TAF（モノフマル酸塩）を妊娠 6～17 日まで連日経口投与（投与容量：5 mL/kg）し、胚・胎児発生に関する用量設定試験を実施した。さらに、サテライト動物（対照群：3 匹、投薬群：9 匹／群）に同様に投与し、妊娠 6 及び 17 日に TK 評価を実施した。

全動物が計画屠殺時まで生存し、一般状態に投薬に関連した所見は認められなかった。200 mg/kg/日群で、対照群と比較して有意な体重増加抑制が、妊娠 8～10 日、妊娠 10～12 日及び妊娠 16～18 日に観察された。200 mg/kg/日群での妊娠 21 日の補正体重（体重増加量－妊娠子宮重量）は対照群と比較して 5%低下しており、妊娠 6～18 日の体重増加量は対照群と比較して 18%低下していた。

投与期間中、200 mg/kg/日群で軽微な摂餌量低下を認めた（-10%）。母動物の剖検所見に投薬に起因すると考えられた所見はなかった。黄体数、着床部位数、性比、生存／死亡胎児数、吸収胚数、着床前及び着床後の胚損失数並びに妊娠子宮重量に、投薬の影響は認められなかった。

200 mg/kg/日群で、対照群と比較して胎児体重の有意な低値が認められた（-7.7%）。しかし、200 mg/kg/日群の胎児体重は背景値の範囲内であったため、有害とはみなさなかった。重大な胎児奇形及び軽微な変異も認められなかった。

経口投与後、TAF 濃度の大半が定量限界未満（<10.0 ng/mL）であったため、TAF の TK パラメーターは算出できなかった。TAF の大部分は TFV に変換され、TFV は速やかに血漿中に検出された。TFV 曝露量は、5～200 mg/kg/日の範囲で投与量増加に伴い増加した。TFV の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t}$ は、5～200 mg/kg/日の投与量において、妊娠 17 日の C_{max} を除き、概して投与量比を上回って増加した。反復投与による TFV の蓄積が認められたが、AUC 比は最大で 2.5 倍であった。

以上より、本試験では、200 mg/kg/日群で体重増加抑制（-18%）及び摂餌量低下（-10%）が認められたことから、母動物毒性に関する NOAEL は 100 mg/kg/日、胚・胎児発生に関する NOAEL は 200 mg/kg/日と判断した。

6.2.2　ラット胚・胎児発生に関する試験

（試験番号 TX-120-2002、添付資料番号 4.2.3.5.2.2、評価資料）

Crl:CD(SD)妊娠ラット（25 匹／群）に、0（溶媒）、25、100 及び 250 mg/kg の TAF（モノフマル酸塩）（遊離塩基換算で 20、80、200 mg f.b.e./kg/日）を妊娠 6～17 日に 1 日 1 回強制経口投与（投与容量：5 mL/kg）し、胚・胎児発生に関する試験を実施した。さらに、サテライト動物（対照群：3 匹、投薬群：9 匹／群）に同様に投与し、妊娠 6 及び 17 日に TK 評価を実施した。

投与液の分析から、25 mg/kg/日群の動物は、妊娠 10～17 日の 5～8 日間で、設定濃度の 5 mg/mL ではなく 3.85 mg/mL で投与されていたことが明らかとなり、このときの投与量は 19.3 mg/kg/日（設定用量の 77%）であった。また、100 mg/kg/日群の動物は、妊娠 6～12 日の 4～7 日間で、設定濃度の 20 mg/mL ではなく 12.9 mg/mL で投与されていたことが明らかとなり、このときの投与量は 64.6 mg/kg/日（設定用量の 65%）であった。

試験期間中、死亡は認められなかった。投薬に関連した可能性のある唯一の一般状態の変化は一過性の流延であり、本所見は 250 mg/kg/日群の 25 匹中 7 匹に認められた。投与期間中、250 mg/kg/日群に有意な体重の低値、体重増加抑制び摂餌量低下が認められた。250 mg/kg/日群の妊娠 21 日における平均体重は対照群と比較して 10%低かった。平均補正体重（妊娠 21 日の体重－妊娠子宮重量）及び平均補正体重増加量（妊娠 6～21 日の体重増加量－妊娠子宮重量）についても 250 mg/kg/日群で低く、妊娠 21 日の平均補正体重は対照群と比較して 10%低かった。

投薬に関連した剖検所見は認められなかった。黄体数、着床部位数、雌雄胎児数、生存胎児数、死亡胎児数、及び吸収胚数に対する影響は観察されなかった。着床前及び着床後胚損失数は対照群と同程度であった。

胎児体重（雄、雌及び雌雄合算値）が用量依存的に低値を示し、250 mg/kg/日群では、背景データの下限を大幅に下回った。胎児の大奇形、並びに外表、内臓及び骨格の小奇形に、投薬の影響はみられなかった。250 mg/kg/日群で胸骨分節の変異（1～4 並びに 5 及び 6）の増加が観察された。

TAF の血漿中濃度は、25 mg/kg/日群では、いずれも定量下限未満であった。TAF 曝露量は 25～250 mg/kg/日の投与で TAF の投与量増加に伴い増加した。TFV 曝露量も 25～250 mg/kg/日の投与で TAF の投与量増加に伴い増加した。反復投与による TFV の蓄積は観察されなかった。TAF は経口投与後に急速に吸収され、TFV に変換されることが示された。

以上より、ラットに 25 mg/kg/日（実投与量平均値：22 mg/kg/日）、100 mg/kg/日（実投与量平均値：84 mg/kg/日）及び 250 mg/kg/日の TAF を 1 日 1 回強制経口投与したとき、250 mg/kg/日群で体重及び摂餌量の低値が認められた。250 mg/kg/日群では、胎児体重の低値がみられ、一過性の軽微な骨化遅延を伴った。本試験では投薬に起因すると考えられる胚死亡及び催奇形性は示されなかった。本結果に基づき、母動物毒性及び胚・胎児発生に関する NOAEL はいずれも 100 mg/kg/日群と判断され、NOAEL での妊娠 17 日における TFV 及び TAF の $AUC_{0\text{-}t}$ 値はそれぞれ 17.4 及び 0.2 µg•h/mL であった。

6.2.3　ウサギ胚・胎児発生に関する用量設定試験

（試験番号 TX-120-2003、添付資料番号 4.2.3.5.2.3、参考資料）
（試験番号 TX-120-2004、添付資料番号 4.2.3.5.2.4、評価資料）

ニュージーランド白色妊娠ウサギ（6 匹／群）に、0（溶媒）、5、25、50 又は 100 mg/kg/日（遊離塩基換算で 4、20、40、80 mg f.b.e./kg/日）の TAF（モノフマル酸塩）を妊娠 7～20 日に 1 日 1 回強制経口投与（投与容量：10 mL/kg）し、胚・胎児発生に関する用量設定試験を実施した（試験番号 TX-120-2004）。本試験の用量は、0（溶媒）、20、50 又は 75 mg/kg/日の用量で実施した非妊娠ウサギ 7 日間経口投与毒性試験（試験番号 TX-120-2003）の結果に基づき設定した。TK 評価のため、妊娠 7 及び 20 日に血漿中 TAF 及び TFV 濃度を測定した。

全動物が計画屠殺時まで生存した。試験期間中、全群で糞排泄の減少が散発的にみられた。100 mg/kg/日群では、6 匹中 4 匹が削痩を呈し、妊娠 7～21 日に軽微な体重減少（-2.5%）及び対照群と比較して補正体重（妊娠 29 日の体重－妊娠子宮重量）の低値（-8.5%）がみられた。投与期間中、100 mg/kg/日群で摂餌量低下がみられ、試験終了時まで継続した。

母動物の剖検所見に投薬の影響は認められなかった。妊娠率は全群で 100%であった。黄体数、着床部位数、生存胎児数、死亡胎児数、吸収胚数、性比、並びに着床前及び着床後胚損失数に投薬の影響はみられなかった。各投薬群の胎児体重は対照群と類似していた。外表検査に投薬に起因した大奇形及び小奇形は認められなかった。

TAF 及び TFV 曝露量は、5～100 mg/kg/日の範囲で投与量増加に伴い増加した。TAF の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t}$ は 5～100 mg/kg/日の範囲で投与量比を上回る増加を示し、TFV はほぼ投与量に比例して増加した。TFV の蓄積は観察されなかった。経口投与後、TAF は大部分が TFV に変換された。

以上より、本試験では、100 mg/kg/日群で母動物に軽微な体重の低値及び摂餌量低下が認められた。胚・胎児死亡、胎児毒性及び催奇形性を示す所見はいずれの投薬群にも認められなかった。本試験に基づき、母動物の毒性に関する TAF の NOAEL は 50 mg/kg/日（$AUC_{0\text{-}t}$ は、TFV 及び TAF でそれぞれ 11.8 及び 5.7 µg•h/mL）、胚・胎児発生に関する TAF の NOAEL は 100 mg/kg/日（$AUC_{0\text{-}t}$ は、TFV 及び TAF でそれぞれ 23.5 及び 10.7 µg•h/mL）と判断された。

6.2.4　ウサギ胚・胎児発生に関する試験

（試験番号 TX-120-2005、添付資料番号 4.2.3.5.2.5、評価資料）

ニュージーランド白色妊娠ウサギ（主試験群：20 匹／群、TK 群：3 匹／群）に、0（溶媒）、10、30 及び 100 mg/kg/日（遊離塩基換算で 8、24 及び 80 mg f.b.e./kg/日）の TAF（モノフマル酸塩）を、妊娠 7～20 日に強制経口投与（投与容量：10 mL/kg）し、胚・胎児発生に関する試験を実施した。さらに、TK 評価のため、妊娠 7 及び 20 日に血漿中 TAF 及び TFV 濃度を測定した。

試験期間中に死亡はみられなかった。100 mg/kg/日群で、対照群と比較して糞排泄減少の発現頻度増加がみられ、本所見は摂餌量低下と関連していた。30 及び 100 mg/kg/日群では、被毛の黄色化の頻度増加が認められた。

100 mg/kg/日群で、体重増加抑制が投与を開始した週に認められた。また、100 mg/kg/日群で、摂餌量低下が妊娠 8～24 日に認められ、同群の 3 匹では、投与期間中 4 日間以上、摂餌量が 30 g

未満であった。投薬に関連した剖検所見は認められなかった。黄体数、着床部位数、生存胎児数、死亡胎児数、吸収胚数、性比、並びに着床前及び着床後胚損失数に投薬の影響は認められなかった。胎児体重に投薬の影響は認められなかった。大奇形、外表、内臓及び骨格の小奇形並びに一般的な骨格変異の発現頻度に投薬の影響は認められなかった。

TAF 曝露量は、10～100 mg/kg/日の範囲で投与量増加に伴い増加した。妊娠 20 日における C_{max} は 10～100 mg/kg/日で投与量比を上回る増加を示し、AUC_{0-t} の増加は 30～100 mg/kg/日で投与量比を上回った。

TFV 曝露量は、10～100 mg/kg/日の範囲で投与量増加に伴い増加した。C_{max} 及び AUC_{0-t} は、10～100 mg/kg/日で概して投与量に比例して増加した。反復投与による TFV の蓄積が観察認められた。TFV 濃度は TAF 濃度よりも極めて高かったことから、経口投与後、TAF の大部分が TFV に変換されることが示された。

以上のとおり、本試験では、100 mg/kg/日群で対照群と比較して母動物の体重及び摂餌量の減少が認められた。胚・胎児死亡、胎児毒性及び催奇形性を示す所見はいずれの投薬群にも認められなかった。

母動物毒性に関する NOAEL は 30 mg/kg/日（AUC_{0-t}、TAF 及び TFV でそれぞれ 1.1 及び 5.0 µg•h/mL）、胚・胎児発生に関する TAF の NOAEL は最高用量である 100 mg/kg/日（AUC_{0-t} は TAF 及び TFV でそれぞれ 11.0 及び 27.3 µg•h/mL）であった。

6.3　出生前及び出生後の発生並びに母体機能に関する試験

（試験番号R990202、添付資料番号 4.2.3.5.3.1、参考資料 *）

TAF の出生前及び出生後の発生並びに母体機能に関する試験は計画しなかった。しかし、第 1 世代の TFV のプロドラッグである TDF を用いた出生前及び出生後の発生並びに母体機能に関する試験が実施されている。がん原性試験での妥当性と同様に、ラットでの TAF の血漿中濃度は測定不能であり、TDF を用いた出生前及び出生後の発生毒性試験で得られた TFV 曝露量と比較して、TAF のラット反復投与毒性試験の TFV 曝露量は低値であった。TFV の潜在的な出生後の毒性が明らかになっている。TDF の出生前及び出生後の試験を以下に要約する。

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では、SD ラットに TDF を、0（溶媒）、50、150、450 又は 600 mg/kg/日の用量で、妊娠 7 日～分娩後 20 日に 1 日 1 回経口投与した。その結果、母動物に投薬に関連した死亡はみられなかった。妊娠期間中、150 mg/kg/日以上の群で体重増加抑制及び 450mg/kg/日以上の群で摂餌量低下が認められた。450 mg/kg/日以上の群では着床後胚損失数及び死産児数の高値、出生児数の低値及び出生児体重の低値がみられたが、600 mg/kg/日群まで F1 世代の受胎能に悪影響は認められなかった。出生児では 450 mg/kg/日以上

* ：テノゼット錠®300mg 承認申請時に提出済み

の群で性成熟の遅延が認められた。母動物の生殖能及び次世代の出生前及び出生後の発生に対する NOAEL はいずれも 150 mg/kg/日と推定された。TDF に催奇形性は認められなかった。

本試験の NOAEL（150 mg/kg/日）での分娩後 20 日の TFV 曝露量（AUC_{0-24}）は 11.7 μg•h/mL であった。

7　局所刺激性試験

TAF 錠は経口投与で使用する予定である。消化管に対する局所刺激性を、反復経口投与毒性試験で評価した。その結果、TAF に消化管毒性は観察されなかった。臨床試験での TAF を含むレジメンの忍容性は概して良好であった。消化管障害の発現頻度は被験者集団での一般的な発現頻度と同程度であり、安全性プロファイルは確認されている。

7.1　ウシ摘出角膜を用いた眼刺激性試験

（試験番号 TX-120-2013、添付資料番号 4.2.3.6.1、評価資料）

ウシ角膜混濁度及び透過性（BCOP）試験を実施し、TAF（ヘミフマル酸塩）の潜在的な眼刺激性を *in vitro* で評価した。陽性対照にはイミダゾールを使用した。本試験では、*in vitro* での被験物質の腐食性及び強度眼刺激性を評価するため、摘出ウシ角膜を使用した。摘出角膜は食肉産業の副産物として得られた。経済協力開発機構（OECD）ガイドライン 437 に従い、角膜混濁度及び透過性の 2 項目について評価し、両項目を組み合わせて *in vitro* 刺激性スコアを得た。本スコアを使用して、潜在的な眼刺激性物質として被験物質の分類及びランク付けを行うことが可能となる。*In vitro* 刺激性スコアが、55.1 以上を示す化合物が、腐食性・強度刺激性物質であると定義される。TAF（20% w/w）を 4 時間処理したときの *in vitro* 刺激性スコアは 21.0 ± 8.7 であり、腐食性・強度眼刺激性物質ではないと予測された。イミダゾール（陽性対照）の *in vitro* 刺激性スコアは 163.8 ± 8.9 であった。

7.2　ウサギ皮膚刺激性試験

（試験番号 TX-120-2011、添付資料番号 4.2.3.6.2、評価資料）

ウサギにおける TAF の皮膚一次刺激性を OECD ガイドライン 404 に従い、評価した。ニュージーランド白色雄ウサギ 3 匹に、TAF（モノフマル酸塩）約 0.5 g を、水で湿らせて半閉塞的に 4 時間単回皮膚貼付し、4 日間観察した。試験期間を通じて局所皮膚反応を示した動物はいなかった。一次刺激性インデックス（PII）は 0.0 と算出され、TAF は「非刺激性物質」と判定された。

8　その他の毒性試験

8.1　感作性

8.1.1　マウス局所リンパ節試験（個体アプローチ）

（試験番号 TX-120-2014、添付資料番号 4.2.3.7.1.1、評価資料）

OECD ガイドライン 429 に従い、LLNA を実施し、TAF の潜在的な皮膚感作性を評価した。雌 CBA/Ca マウス（5 匹／群）に、10、25 又は 50% w/v の濃度で TAF（ヘミフマル酸塩）を投与した。溶媒［アセトン：オリーブ油（4：1 v/v）］又は陽性対照物質（25% v/v ヘキシルシンナミックアルデヒド）も同様に投与した。TAF 又は対照（溶媒又は陽性対照）の 25 µL を、両耳介の背面に 3 日間連日塗布した。初回塗布から 5 日後に、耳介の所属リンパ節のリンパ節細胞（LNC）の増殖反応を、LNC 懸濁液の β-シンチレーション測定を用いた ^{3}H-メチルチミジン（^{3}HTdR）取り込み量の測定によって評価した。増殖反応は、リンパ節単位の 1 分あたりの放射性壊変（dpm/node）で示し、対照リンパ節に対する被験物質リンパ節の LNC への ^{3}HTdR の取り込み比［被験物質群／対照群比］を刺激指数（SI）として示した。被験物質の 1 つ以上の濃度で SI が 3 以上であるとき、当該物質を感作物質とみなした。

TAF の 10%、25%及び 50% w/v 濃度の SI はそれぞれ 0.9、1.0 及び 1.0 であり、TAF には潜在的な皮膚感作誘発能はないことが示された。EC3（SI が 3 となる被験物質濃度）値は、50% w/v 濃度超であった。陽性対照物質（25% v/v ヘキシルシンナミックアルデヒド）の SI は 6.3 であり、本試験の妥当性が示された。

8.2　免疫毒性試験

TAF の反復投与毒性試験のデータ（血液学的検査、リンパ系組織重量、リンパ系組織の病理組織学的検査及び骨髄細胞充実性）では TAF の潜在的な免疫毒性は示唆されていないため、独立した試験は実施しなかった。

8.3　依存性

TAF の依存性を評価するための独立した試験は実施していない。ヌクレオシ（チ）ドアナログに、薬剤クラスとして依存性を形成することを示唆する性質はない。TAF の非臨床試験に依存性形成を示す所見は認められなかった。[^{14}C]-TAF を用いた組織分布試験では、イヌ（2.6.4.4.1.3 項）及びラット（2.6.4.4.1.2 項）の脳組織に放射能はほとんど又は全く認められなかった。一方、マウス脳組織では低い放射能が検出されたことから、マウスでの低い血液脳関門透過性が示唆された（2.6.4.4.1.1 項）。以上より、依存性試験は必要ないと判断した。

8.4　代謝物

TAF にはヒトに特異的な代謝物がないため、TAF の代謝物に関する独自の毒性試験は実施しなかった。TAF の代謝物である TFV の遺伝毒性試験について以下に要約した。

8.4.1　TFV の細菌を用いる復帰突然変異試験

（試験番号 95-TOX-1278-006、添付資料番号 4.2.3.7.5.1、参考資料 *）

Salmonella typhimurium 株（TA98、TA100、TA1535、TA1537）及び *Escherichia coli* 株 WP2uvrA を用いて TFV の 4610 µg/プレートまでの濃度範囲で、S9mix 存在下及び非存在下、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。追加試験として、TA100 及び TA1535 株を用いて、S9mix 存在下 5000 µg/プレートまで検討した。

TFV は、S9mix 存在下、TA1535 株においてプレートあたりの復帰変異コロニー数が陽性となる増加（6.2 及び 6.8 倍）を示した以外、S9mix 存在下及び非存在下のいずれの条件下においても、プレートあたりの復帰変異コロニー数に増加を認めなかった。

8.4.2　TFV のマウスリンフォーマ *tk* 試験

（試験番号 95-TOX-1278-007、添付資料番号 4.2.3.7.5.2、参考資料*）

マウスリンパ腫 L5178Y 細胞の *tk* 遺伝子配座に対する TFV の前進突然変異誘発能を評価した。

本試験では、TFV は代謝活性非存在下では 156～5000 µg/mL 濃度で陰性であったが、代謝活性存在下では 5000 µg/mL 濃度で変異発現数のわずかな増加（約 2.5 倍）が認められ、陽性判定基準の最小値を上回っていた。観察された増加は 1 濃度のみのわずかな増加であったため、本試験での代謝活性存在下では不確か（equivocal）と判断した。以上より、TFV は、本試験条件下では、L5178Y のマウスリンパ腫 L5178Y 細胞の *tk* 遺伝子配座に対して、代謝活性非存在下で陰性、存在下で不確か（equivocal）と判断した。

8.5　不純物

8.5.1　TAF（モノフマル酸塩）の不純物の安全性確認のためのラット 2 週間経口投与毒性試験

（試験番号 TX-120-2008、添付資料番号 4.2.3.7.6.1、評価資料）

雄性 Hsd:Sprague Dawley®™SD®™ラット（各 10 匹／群）に、溶媒又は純度の異なる 2 種のロット［ロット番号 1：[redacted]（純度[redacted]%）及びロット番号 2：[redacted]（純度[redacted]%）］の 5 又は 50 mg/kg/日の TAF（モノフマル酸塩）を、1 日 1 回 14 日間強制経口投与し、潜在的不純物の毒性を検討した（投与容量：10 mL/kg）。ロット番号 2 には、GS-7339（TAF のジアステレオマー）13%が含まれている。さらに、サテライト動物（対照群：3 匹、投薬群：9 匹）に同様に投与し、試験第 1 及び 14 日に TK 評価を実施した。

いずれのロットの 5 及び 50 mg/kg/日投与群でも、忍容性は良好であった。投薬に関連した所見は認められず、検討した 2 ロット間で差は認められなかった。両ロットの NOAEL は 50 mg/kg/

* ：テノゼット錠®300mg 承認申請時に提出済み

日（40 mg f.b.e./kg/日）であった。純度[redacted]%のロット（ロット番号 1）の試験第 14 日における 50 mg/kg/日群雄の TFV の C_{max} は 218 ng/mL、AUC_{0-t} は 1965 ng•h/mL であり、純度[redacted]%のロット（ロット番号 2）の TFV の C_{max} は 395 ng/mL、AUC_{0-t} は 2481 ng•h/mL であった。

8.5.2　TAF（ヘミフマル酸塩）の不純物の安全性確認のためのラット 4 週間経口投与毒性試験

（試験番号 TX-120-2021、添付資料番号 4.2.3.7.6.2、評価資料）

Crl:CD (SD)ラット（雌雄各 10 匹／群）に 1 日 1 回 4 週間強制経口投与し、TAF の潜在的不純物の毒性を検討した。3 種のロットの TAF（ヘミフマル酸塩）をそれぞれ 25 及び 50 mg f.b.e./kg/日（遊離塩基換算）の用量で投与した。1 ロット（[redacted]）は純度[redacted]%、他の 1 ロット（[redacted]）は 11 種の不純物を添加した純度[redacted]%、残る 1 ロット（[redacted]）は 4 種の不純物を添加した純度[redacted]%であった。対照群には、溶媒を投与した。1 日 1 回 29 日間強制経口投与とし、投与容量は 10 mL/kg とした。さらに、サテライト動物（対照群：3 匹、投薬群：6 匹）に同様に投与し、試験第 1 及び 28 日に TK 評価を実施した。

3 種の異なる不純物プロファイルを有する被験物質を 25 及び 50 mg/kg/日の用量でラットに 4 週間強制経口投与したときの忍容性は良好であった。検討した 3 ロット間に意義ある一般状態所見又は病理組織学的な差は認められなかった。全 3 ロットの NOAEL は 50 mg f.b.e./kg/日であった。

8.6　光毒性評価

TAF の光毒性試験は必要ではないと判断した。20 mmol/L リン酸カリウム緩衝液 pH 6.0 での TAF（ヘミフマル酸塩）液の紫外線吸収スペクトルは、最大吸収（λ_{max}）は 205 及び 262 nm であり、262 nm の特徴的ピークにおいて測定したモル吸光係数は 1.5×10^4 $L \cdot mol^{-1} cm^{-1}$ であった（2.3.S.3 項）。TAF（ヘミフマル酸）は自然の太陽光の範囲では光を吸収しないため、光毒性の懸念はないと考えられる。

9　考察及び結論

9.1　標的臓器毒性

TAF の経口投与毒性を、マウス、ラット、イヌ及びサルを用いた最長 39 週間の投与により検討した。長期試験では、主要な標的臓器は腎臓（巨大核、尿細管変性）及び骨（骨幹端の海綿骨萎縮）であった。ラット及びイヌへの TAF 投与は、骨代謝マーカーを増加させ、血清 1,25-ジヒドロキシビタミン D_3 及び 25-ヒドロキシビタミン D_3 を低下させると考えられた。

9.1.1　腎臓

TAF のラット及びイヌ経口投与毒性試験では、腎尿細管巨大核が観察された。ラットでは、4 週間投与試験の 400 mg/kg/日群に巣状性の極微の腎皮質尿細管の好塩基球増加及びこれに伴う極微の巨大核が、26 週間投与試験の 100 mg/kg/日群に腎皮質尿細管巨大核が認められた。イヌでは、

4 週間投与試験の 3 及び 10 mg/kg/日群並びに 39 週間投与試験の 13 週間投与以上で 6 又は 18/12 mg/kg/日群に腎尿細管巨大核及び／又は好塩基球増加が観察された。

腎皮質尿細管の変性／再生所見は、イヌ 39 週間投与毒性試験の 13 及び 39 週間投与動物の 6 又は 18/12 mg/kg/日群に限られた。6 mg/kg/日群の雌雄では極微から軽微であった。18/12 mg/kg/日群では軽度から中等度であった。2 mg/kg/日群の雄では、極微な同様の所見（巨大核及び腎尿細管変性）が雄 2 匹に観察されたのみであった。13 週間の休薬期間後、投薬に関連した組織学的変化は腎臓で継続して観察されたものの、発現頻度及び重症度は低減していた。

9.1.2　骨

TAF のラット 26 週間投与試験の 100 mg/kg/日群で、骨幹端の海綿骨萎縮が観察された。TAF はラット 26 週間投与試験の 25 mg/kg/日群以上で、骨代謝マーカーを増加させ、血清 1,25-ジヒドロキシビタミン D_3 及び 25-ヒドロキシビタミン D_3 を低下させた。また、イヌ 39 週間投与試験で BMD パラメーターの低値が 18/12 mg/kg/日群に認められた。本所見は、体重減少の二次的な変化である可能性があるものの、雄における有意な血清 1,25-ジヒドロキシビタミン D_3 及び 25-ヒドロキシビタミン D_3 の低下を伴っていた。

9.1.3　その他

TAF のマウス 13 週間投与試験の 10 mg/kg/日群以上において、鼻粘膜に有害な変性（嗅上皮変性）及び急性炎症（好中球浸潤）が認められた。これらの変化は、ラット、イヌ及びサルではマウスよりも長期間の投与でも認められなかったことから、ヒトへの関連は不明であり、ヒトでの鼻の炎症に対するリスクはきわめて低いものと考えられた。

イヌ 39 週間投与試験において、TAF は 2 mg/kg/日群に ECG への影響を認めなかったが、6 及び 18/12 mg/kg/日群で、PR 間隔の軽微な延長（それぞれ雌雄平均で約 27%及び 37%）を認め、T_3 の有意な低下を伴った［7、8］。13 週間の休薬期間後、血清 T_3 値は投与終了時の対照群と同程度の濃度にまで回復した。

イヌ 39 週間投与試験の最高用量である 18/12 mg/kg/日群で、数匹の一部臓器［眼（脈絡叢、毛様体）、肺及び脾臓］に極微の組織球浸潤が認められた。眼科学的検査は正常であった。これらの浸潤細胞は、主に毛様体の血管周囲領域にみられ、網膜毛様体の縁（ヒトでの鋸状縁に相当）にある毛様体と周辺網膜との境界下にある脈絡膜層では比較的少なかった。本所見は両側性にみられ、典型的な発現部位は毛様体の血管周囲及び脈絡膜層と周辺網膜の境界の結合部であったことから、観察された浸潤細胞は、血液ー眼関門の維持に広く関わる単核細胞の軽微かつ無秩序な血管周囲浸潤の発現頻度及び程度が増加したものと考えられた。13 週間の休薬期間後のイヌでは単核細胞浸潤は観察されなかったことから、本所見は機能的変化を伴わない投与期間中の血液ー眼関門の維持に関連した所見であり、軽微かつ投薬に関連した可逆的な変化であることが示唆された。マウス及びラットにおけるそれぞれ 13 週間及び 26 週間までの反復投与試験並びにサル 4 週間及びイヌ 4 週間投与試験では、眼科学的検査及び眼組織の病理組織学的検査において投薬に関連した影響は認められなかった。[^{14}C]TAF 投与後の眼への分布をマウス、ラット及びイヌで

評価した（2.6.4.4.1 項）。特にメラニン結合性は有色及び白色マウス（C57 黒色及び CD-1）並びにラット（LE 及び SD）での分布により、比較検討した。放射能のラット及びイヌの眼への分布は乏しかった（眼の C_{max} は血漿の 8%未満）。低濃度の放射能の一過性曝露がラットの眼で観察されたが、投与 8 時間後では検出限界未満まで低下した。皮膚及び眼を含め、SD ラットと LE ラット間で分布の差は観察されなかったため、メラニンには結合しないことが示唆された。マウスでの[^{14}C]-TAF の眼への分布は、検討した他の動物種よりも高度であった（眼の C_{max} は血漿の 15%～20%）。C57 黒色マウスでの水晶体、ブドウ膜及び眼球における曝露は CD-1 マウスよりも持続した。しかし、有色皮膚及び白色皮膚に分布の差は観察されず、[^{14}C]-TAF 関連放射能はメラニンを含む組織への選択的結合はないことが示唆された。高用量群のイヌの眼で認められた極微の組織球浸潤は、ヒトに TAF 25 mg を投与したときの TAF 及び TFV 曝露量と比較してそれぞれ 9 及び 42 倍高い曝露量で認められ、イヌでの TAF の血液脳関門及び血液網膜関門の透過性は乏しいことが判明していることから、組織分布との関連性はなかった。組織分布試験及び毒性試験で認められた結果に基づき、ヒトでの後部ブドウ膜炎のリスクは極めて低いものと判断される。

TAFはミトコンドリア毒性を誘発する可能性は低いと考えられる。TAFは、HepG2 細胞を用いた 10 日間処理試験において最高濃度の 1 μmol/L（TAF 25 mg投与時C_{max}の約 2 倍）まで、mtDNA量に影響を及ぼさなかった（2.6.2.3.2.6.1 項）。TAFの活性代謝物であるTFV-DPは、mtDNAポリメラーゼγにより、天然基質であるATPと比較して高度に区別される（10000 倍超）［9］。ミトコンドリア毒性を示唆する所見は、非臨床及び臨床試験において認められていない。以上より、TAFは臨床使用においてmtDNAポリメラーゼγを阻害する可能性は低いと考えられる。

9.2　遺伝毒性

In vitro 試験として細菌株を用いた復帰突然変異試験（*Salmonella typhimurium*，*Escherichia coli*）及びマウスリンフォーマ細胞を用いた L5178Y 遺伝子突然変異試験を実施した。*In vivo* 評価として、マウス骨髄小核試験（500、1000 及び 2000 mg/kg を経口投与）を実施した。TAF はこれら *in vitro* 及び *in vivo* バッテリー試験で遺伝毒性を示さなかった。

9.3　がん原性

TAF を用いたがん原性試験は実施しなかった。同じく TFV のプロドラッグである TDF によるマウス及びラット長期経口投与がん原性試験が実施されており、がん原性は低いことが示されていることから、TAF のがん原性も低いと考えられる。

9.4　生殖毒性

ラット及びイヌ長期投与試験並びにサル 4 週間反復投与毒性試験の生殖器の病理組織学的検査及び臓器重量測定に、投薬に関連した所見は認められなかった。

TAF（ヘミフマル酸塩）のラット受胎能及び初期胚発生試験では、雌雄で用量関連性の体重増加抑制が認められたが、交尾率、受胎率、精子の運動性、精子濃度、黄体数、着床部位数、早期及び後期吸収胚数並びに生存胎児数を含む雄又は雌の受胎能に関する検査項目において、

160 mg f.b.e./kg/日の投与まで投薬に関連した所見は認められなかった。受胎能及び初期胚発生毒性に関する NOAEL は 160 mg f.b.e./kg/日であった。

TAF（モノフマル酸塩）のラット及びウサギ胚・胎児発生試験では、最高用量のそれぞれ 250 mg/kg/日及び 100 mg/kg/日で母動物毒性が認められた。ラットでは、一過性の軽微な骨化遅延を伴う胎児体重の低値が、母動物毒性のみられた 250 mg/kg/日で観察された。ラットでの胚・胎児発生に関する NOAEL は、100 mg/kg/日であり、このときの妊娠 17 日の TAF 及び TFV の $AUC_{0\text{-}t}$ 値はそれぞれ 0.2 及び 17.4 μg•h/mL であった。ウサギでの胚・胎児発生への影響は 100 mg/kg/日まで認められず、NOAEL は 100 mg/kg/日であった。このときの妊娠 20 日の TAF 及び TFV の $AUC_{0\text{-}t}$ 値はそれぞれ 11.0 及び 27.3 μg•h/mL であった。

TAF を用いた出生前及び出生後の発生毒性試験は実施しなかった。TDF の出生前及び出生後の発生毒性試験が実施されており、母動物の毒性用量である 450 mg/kg/日以上で胎児死亡率の高値が認められた。母動物の生殖能、F_1 世代の出生前及び出生後の発生に関する NOAEL は 150 mg/kg/日であった。TAF をラットに投与したときに得られた PK データでは、プロドラッグである TAF の血漿中濃度は検出不能であることが明らかに示されている。TAF を長期投与したラットでは、TFV の血漿中濃度の明らかな増加が得られたが、この TFV の曝露量は TDF の出生前及び出生後の発生毒性試験で既に得られている曝露量よりも低値であった［TDF 600 mg/kg/日投与時の曝露量 27.3 μg•h/mL（分娩後 20 日）に対し TAF 100mg/kg/日投与時では最大 15.5 μg·h/mL（試験第 26 週）］。以上のように、本試験で TDF を投与したときの TFV 曝露量は、ヒトでの TAF 投与時の TFV 曝露量（0.322 μg•h/mL）に対して約 100 倍に相当する曝露量で出生前及び出生後の影響が既に評価されている。TFV の出生後の潜在的な毒性は、TDF の出生前及び出生後の試験によって明確に特徴付けられている。

9.5　局所刺激性

TAF 錠は経口で使用する予定である。消化管に対する局所刺激性の評価を、反復経口投与毒性試験の試験期間中に実施した。その結果、消化管毒性は観察されなかった。臨床試験での TAF を含むレジメンの忍容性は概して良好であった。消化管障害の発現頻度は被験者集団での一般的な発現頻度と同程度であり、安全性プロファイルは確認されている。

ウシ摘出角膜を用いた眼刺激性試験では、TAF（ヘミフマル酸塩）は腐食性・強度眼刺激性物質ではなく、TAF（モノフマル酸塩）は半閉塞的条件でのウサギ皮膚刺激性試験で非刺激性・非腐食性であった。

9.6　その他の毒性試験

LLNA でマウス耳介の背面に TAF（ヘミフマル酸塩）を反復塗布したとき、皮膚感作性を示さなかった。

TAF にはヒトに特異的な代謝物がないため、TAF の代謝物に関する独自の毒性試験は実施しなかった。TFV の *in vitro* 遺伝毒性試験結果からは、TFV の遺伝毒性の懸念はなかった。不純物の 2 週間及び 4 週間投与安全性確認試験をラットで実施し、原薬の潜在的不純物の毒性を評価した。

最初の試験では、純度[redacted]%及び[redacted]%の TAF（モノフマル酸塩）の 5 及び 50 mg/kg/日を雄ラットに 14 日間強制経口投与したとき、忍容性は良好であった。投薬に関連した所見は認められず、検討した 2 ロット間で差は認められなかった。NOAEL は 50 mg/kg/日（40 mg f.b.e./kg/日）と判断した。2 つ目の試験では、11 種の不純物を添加した純度[redacted]%の TAF（ヘミフマル酸塩）及び 4 種の不純物を添加した純度[redacted]%の TAF（ヘミフマル酸塩）を雌雄ラットに 29 日間強制経口投与したところ、純度[redacted]%の TAF（ヘミフマル酸塩）投与と比較して、意義のある臨床上及び病理組織学的な差は認められなかった。NOAEL は 50 mg f.b.e /kg/日であった。

9.7　曝露量の比較及び曝露量の安全域

動物種間の曝露量の比較、安全域及び投薬により観察された作用のヒトの健康への影響については、2.4.4.9.2 項で論じている。

9.8　結論

TAF の非臨床毒性試験の包括的プログラムを施行した。得られた結果は、以下に示す通り TAF 錠の安全性を支持するのに十分である。

TAF を経口投与したときの毒性の標的となる主要臓器は腎臓（巨大核、尿細管変性）及び骨であった。マウスに TAF を投与したとき、鼻粘膜に有害な変性（嗅上皮変性）及び急性炎症（好中球浸潤）が認められた。これらの変化は、ラット、イヌ及びサルではマウスよりも長期間の投与でも認められなかったことから、ヒトへの関連は不明であり、ヒトでの鼻の炎症に対するリスクは低いと考えられた。イヌ 39 週間投与試験の高用量群の数匹に、極微の組織球浸潤が一部臓器［眼（脈絡叢、毛様体）、肺及び脾臓］で認められた。眼で観察された浸潤細胞は、血液ー眼関門の維持に広く関わる単核細胞の軽微かつ無秩序な血管周囲浸潤の発現頻度及び程度が増加したものと考えられた。組織分布試験及び毒性試験で認められた結果に基づき、ヒトでの後部ブドウ膜炎のリスクはきわめて低いものと判断される。

RT 阻害剤は、現在、ミトコンドリア毒性についてクラスラベリングを受けているが、TAF は、*in vitro* 試験及び 39 週間までの反復投与毒性試験においてミトコンドリア毒性の可能性は低いことが示されている。ミトコンドリア毒性を示す所見は、非臨床及び臨床試験のいずれにも認められていない。したがって、TAF は臨床においてミトコンドリア DNA ポリメラーゼ γ を阻害する可能性は低いと考えられる。

TAF は遺伝毒性試験で陽性を示さなかった。TDF は 2 年間がん原性試験でがん原性誘発の可能性は低いことが示された。TAF は生殖発生毒性試験において明らかな有害作用を認めなかった。ラット出生前及び出生後の発生毒性試験で TDF を母動物毒性が認められる高用量投与したとき、F_1 世代ラットにおいて性成熟の遅延が観察された。NOAEL は明確に特定された。TAF はウサギ胎児に対する影響を認めなかった。

10　図表

図表は文中に挿入した。

11　参考文献

1　Yokota T, Konno K, Shigeta S, Holy A, Balzarini J, De Clercq E. Inhibitory effects of acyclic nucleoside phosphonate analogues of hepatitis B virus DNA synthesis in HB611 cells. Antivir Chem Chemother 1994;5 (2):57-63. (4.3.102)

2　Cherrington JM, Allen SJW, Bischofberger N, Chen MS. Kinetic interaction of the diphosphates of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine and other anti-HIV active purine congeners with HIV reverse transcriptase and human DNA polymerases α, β, and γ. Antivir Chem Chemother 1995;6 (4):217-21. (4.3.18)

3　Lee WA, He G-X, Eisenberg E, Cihlar T, Swaminathan S, Mulato A, et al. Selective intracellular activation of a novel prodrug of the human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitor tenofovir leads to preferential distribution and accumulation in lymphatic tissue. Antimicrob Agents Chemother 2005;49 (5):1898-906. (4.3.53)

4　Birkus G, Kutty N, He GX, Mulato A, Lee W, McDermott M, et al. Activation of 9-[(R)-2-[[(S)-[[(S)-1-(Isopropoxycarbonyl)ethyl]amino] phenoxyphosphinyl]-methoxy]propyl]adenine (GS-7340) and other tenofovir phosphonoamidate prodrugs by human proteases. Mol Pharmacol 2008;74 (1):92-100. (4.3.9)

5　Gilead Sciences Inc. VIREAD® (tenofovir disoproxil fumarate) tablets, for oral use VIREAD® (tenofovir disoproxil fumarate) powder, for oral use. U.S. Prescribing Information. Foster City, CA. Revised October 2013. (4.3.37)

6　Department of Health and Human Services (DHHS). HHS Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents Recommends a Fixed-Dose Combination Product of Elvitegravir/Cobicistat/Tenofovir/Emtricitabine as an Alternative Regimen in Antiretroviral Treatment-Naive Individuals with HIV-1 Infection. 2012:1-2. (4.3.26)

7　Kienle RD, Bruyette D, Pion PD. Effects of thyroid hormone and thyroid dysfunction on the cardiovascular system. Vet Clin North Am Small Anim Pract 1994;24 (3):495-507. (4.3.49)

8　Tribulova N, Knezl V, Shainberg A, Seki S, Soukup T. Thyroid hormones and cardiac arrhythmias. Vascular pharmacology 2010;52 (3-4):102-12. (4.3.108)

9　Johnson AA, Ray AS, Hanes J, Suo Z, Colacino JM, Anderson KS, et al. Toxicity of antiviral nucleoside analogs and the human mitochondrial DNA polymerase. J Biol Chem 2001;276 (44):40847-57. (4.3.45)

ベムリディ錠 25 mg

第 2 部（モジュール 2）: CTD の概要（サマリー）

2.6.7　毒性試験概要表

ギリアド・サイエンシズ株式会社

(0000)

目次

2.6.7.1　毒性試験： 一覧表 3
2.6.7.2　トキシコキネティクス： トキシコキネティクス試験の一覧表 8
2.6.7.3　トキシコキネティクス： トキシコキネティクス試験成績の一覧表 9
2.6.7.4　毒性試験： 使用したロット 11
2.6.7.5　単回投与毒性試験 14
2.6.7.6　反復投与毒性試験： 重要な試験以外の試験 15
2.6.7.7　反復投与毒性試験： 重要な試験 16
2.6.7.8　遺伝毒性試験：*in vitro* 41
2.6.7.9　遺伝毒性試験：*in vivo* 46
2.6.7.10　がん原性試験 47
2.6.7.11　生殖発生毒性試験： 重要な試験以外の試験 64
2.6.7.12　生殖発生毒性試験：受胎能及び初期胚発生に関する試験 67
2.6.7.13　生殖発生毒性試験： 胚・胎児発生に関する試験 70
2.6.7.14　生殖発生毒性試験： 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 76
2.6.7.15　新生児を用いた試験 80
2.6.7.16　局所刺激性試験 81
2.6.7.17　その他の毒性試験 82

2.6.7.1　毒性試験：　一覧表

Test Articles: TAF (monofumarate), TAF (hemifumarate), TDF, TFV

Type of Study/Species/Strain (Test article)	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose (mg/kg)[a]	GLP[b]	Testing Facility	Study No. (CRO Study No.)	Location
Single-Dose Toxicity							
Rat/Crl: CD(SD); TAF (monofumarate)	Oral Gavage	1 day	0, 100, 300, 1000	Yes	[redacted], senneville, Quebec, Canada	R990185 ([redacted]89186)	4.2.3.1.1
Dog/Beagle; TAF (monofumarate)	Oral Gavage	1 day	0, 30, 90, 270	Yes	[redacted], senneville, Quebec, Canada	D990181 ([redacted]89187)	4.2.3.1.2
Repeat-Dose Toxicity							
Mouse/Crl:CD-1(ICR); TAF (monofumarate)	Oral Gavage	2 weeks	0, 100, 500, 1000	No	[redacted], Madison, WI, US	TX-120-2006 ([redacted] 8235665)	4.2.3.2.1
Mouse/Crl:CD-1(ICR); TAF (monofumarate)	Oral Gavage	13 weeks	0[e], 10, 30, 100	Yes	[redacted], Madison, WI, US	TX-120-2007 ([redacted] 8241074)	4.2.3.2.2
Rat/Crl:CD (SD); TAF (monofumarate)	Oral Gavage	4 weeks	0, 1.5[d], 6.25, 25, 100, 400	Yes	[redacted], senneville, Quebec, Canada	R990182 ([redacted]89176)	4.2.3.2.3
Rat/Crl:CD (SD); TAF (monofumarate)	Oral Gavage	26 weeks	0, 5, 25, 100	Yes	[redacted], senneville, Quebec, Canada	TOX-120-001 ([redacted]89686)	4.2.3.2.4
Dog/Beagle; TAF (monofumarate)	Oral Gavage	4 weeks	0, 0.1, 0.3, 1[d], 3, 10	Yes	[redacted], senneville, Quebec, Canada	D990175 ([redacted]89128)	4.2.3.2.5
Dog/Beagle; TAF (monofumarate)	Oral Gavage	39 weeks	0, 2, 6. 18/12	Yes	[redacted], senneville, Quebec, Canada	TOX-120-002 ([redacted]89647)	4.2.3.2.6
Monkey/Rhesus; TAF (monofumarate)	Nasogastric Gavage	4 weeks	0, 3, 30	Yes	[redacted] Sparks, NV, US	P2000114 ([redacted]1050-11)	4.2.3.2.7

2.6.7.1　毒性試験：　一覧表（続き）

Test Articles: TAF (monofumarate), TAF (hemifumarate), TDF, TFV

Type of Study/Species/Strain (Test article)	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose (mg/kg)[a]	GLP[b]	Testing Facility	Study No. (CRO Study No.)	Location
Genotoxicity							
In Vitro/*S. typhimurium, E. coli:* TAF (monofumarate)	*In vitro*	52h ± 4 h	100, 333, 1000, 3330, 5000 µg/plate	Yes	[redacted], Vienna, VA, US	V990212 ([redacted] 20900-0-409OECD)	4.2.3.3.1.1
In Vitro/L5178Y mouse lymphoma forward mutation assay/ TAF (monofumarate)	*In vitro*	4h	39.3 to 5000 µg/mL	Yes	[redacted], Vienna, VA, US	V990213 ([redacted] 20900-0-431 ICH)	4.2.3.3.1.2
In Vivo/Micronucleus/ Mouse/Crl:CD-1 (ICR); TAF (monofumarate)	Oral Gavage	1 day	500, 1000, 2000	Yes	[redacted], Vienna, VA, US	M2000113 ([redacted] 21816-0-455OECD)	4.2.3.3.2.1
Carcinogenicity							
Mouse/Crl:CD-1 (ICR) TDF	Oral Gavage	2 Years	0, 100, 300 600	Yes	[redacted], Senneville, Quebec, Canada	M990205 ([redacted]89284)	4.2.3.4.1.1
Rat/Crl: CD (SD) TDF	Oral Gavage	2 Years	0, 30, 100, 300	Yes	[redacted], Senneville, Quebec, Canada	R990204 ([redacted]89282)	4.2.3.4.1.2

2.6.7.1　　毒性試験：　　一覧表（続き）

Test Articles: TAF (monofumarate), TAF (hemifumarate), TDF, TFV

Type of Study/Species/Strain (Test article)	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose (mg/kg)[a]	GLP[b]	Testing Facility	Study No. (CRO Study No.)	Location
Reproductive and Developmental Toxicity							
Fertility Rat/Crl:CD (SD); TAF (hemifumarate)	Oral Gavage	M: 4 weeks premating, 10 weeks total F: 2 weeks premating – GD 13	0, 20, 80[f], 160[g] (f.b.e.)	Yes	[redacted], Greenfield, IN, US	TX-120-2012 ([redacted] 8264528)	4.2.3.5.1.1
Dose Range Finding Embryo-Fetal Development Rat/Crl:CD (SD); TAF (monofumarate)	Oral Gavage	GD 6-17	0, 5, 100[h], 200[i]	Yes	[redacted], Senneville, Quebec, Canada	TX-120-2001 ([redacted] 902244)	4.2.3.5.2.1
Embryo-Fetal Development/ Rat/Crl:CD (SD); TAF (monofumarate)	Oral Gavage	GD 6-17	0, 25, 100[h,i], 250	Yes	[redacted], Senneville, Quebec, Canada	TX-120-2002 ([redacted] 902245)	4.2.3.5.2.2
Preliminary/ Rabbit/NZW; TAF (monofumarate)	Oral Gavage	7 days	0, 20, 50, 75	No	[redacted], Senneville, Quebec, Canada	TX-120-2003 ([redacted] 902246)	4.2.3.5.2.3
Dose Range Finding Developmental Rabbit/ NZW ; TAF (monofumarate)	Oral Gavage	GD 7-20	0, 5, 25, 50[h], 100[c,i]	Yes	[redacted], Senneville, Quebec, Canada	TX-120-2004 ([redacted] 902247)	4.2.3.5.2.4

2.6.7.1　毒性試験：　一覧表（続き）

Test Articles: TAF (monofumarate), TAF (hemifumarate), TDF, TFV

Type of Study/Species/Strain (Test article)	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose (mg/kg)[a]	GLP[b]	Testing Facility	Study No. (CRO Study No.)	Location
Embryo-Fetal Developmental/ Rabbit/ NZW; TAF (monofumarate)	Oral Gavage	GD 7-20	0, 10, 30[h], 100[d,i]	Yes	[redacted], Senneville, Quebec, Canada	TX-120-2005 ([redacted]902248)	4.2.3.5.2.5
Prenatal and Postnatal Development							
Rat/Crl:CD (SD); TDF	Oral Gavage	GD 7 – LD 20	0, 50, 150[h, j], 450, 600	Yes	[redacted], Horsham, PA, US	R990202 ([redacted] 707-016)	4.2.3.5.3.1
Local Tolerance							
In Vitro Tests/Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay; (BCOP); TAF (hemifumarate)	Topical	4 h	20% (w/w) in 0.9% sodium chloride solution	Yes	[redacted], Huntingdon, Cambridgeshire, UK	TX-120-2013 ([redacted], UK EUN0017)	4.2.3.6.1
In Vivo Tests/Rabbit Dermal Irritation/ NZW; TAF (monofumarate)	Topical	4 h	0.5 g / rabbit	Yes	[redacted], Chandler, AZ, US	TX-120-2011 ([redacted] 8253834)	4.2.3.6.2
Other Toxicity Studies							
LLNA/Mouse/CBA/Ca; TAF (hemifumarate)	Topical	3 days	10, 25, 50% (w/v)	Yes	[redacted], Huntingdon, Cambridgeshire, UK	TX-120-2014 ([redacted], UK EUN0018)	4.2.3.7.1.1
Reverse Mutation Assay; *typhimurium, E. coli:* TFV	*In Vitro*	NA	Up to 5000 µg/plate with and without S9 activation	Yes	[redacted], Vienna, VA, US	95-TOX-1278-006 (CHV 17444-0-409)	4.2.3.7.5.1

2.6.7.1　毒性試験：　一覧表（続き）

Test Articles: TAF (monofumarate), TAF (hemifumarate), TDF, TFV

Type of Study/Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose (mg/kg)[a]	GLP[b]	Testing Facility	Study No. (CRO Study No.)	Location
Other Toxicity Studies (continues)							
Mouse Lymphoma L5178Y TFV	*In Vitro*	NA	Up to 5000 µg/mL with and without S9 activation	Yes	[redacted], Vienna, VA, US	95-TOX-1278-007 (CHV 17444-0-431)	4.2.3.7.5.2
Impurity Qualification in Rat; TAF (monofumarate)	Oral Gavage	2 weeks	0, 5, <u>50</u>	Yes	[redacted], Chandler, AZ, US	TX-120-2008 ([redacted] 8246754)	4.2.3.7.6.1
Impurity Qualification in Rat; TAF (hemifumarate)	Oral Gavage	4 weeks	0, 25, <u>50</u> (f.b.e.)	Yes	[redacted], Madison, WI, US	TX-120-2021 ([redacted] 8298810)	4.2.3.7.6.2

TAF = tenofovir alafenamide; TDF = tenofovir disoproxil fumarate; TFV = tenofovir; [redacted]; NA = not applicable; GD = gestation day; LD = lactation day; w/w = weight/weight; w/v = weight/volume, F = female; M = male; f.b.e = free baseequivalent; SD = Sprague Dawley

a Unless otherwise specified, the highest No-Observed-Adverse-Effect Level (NOAEL) is underlined.
b 'Yes', indicates study includes a GLP Compliance statement.
c NOAEL greater than
d NOEL
e NOAEL could not be determined
f Male and female
g Early embryonic toxicity
h Maternal
i Embryo-fetal
j Prenatal and Postnatal

2.6.7.2　トキシコキネティクス：　トキシコキネティクス試験の一覧表

Test Article: TAF (monofumarate), TAF (hemifumarate)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose (mg/kg)	GLP[a]	Gilead Study No.
2-Week Repeat Dose	Mouse	Oral Gavage	0, 100, 500, 1000 [b]	No	TX-120-2006
13-Week Repeat Dose	Mouse	Oral Gavage	0, 10, 30, 100 [b]	Yes	TX-120-2007
4 -Week Repeat Dose	Rat	Oral Gavage	0, 1.5, 6.25, 25, 100, 400 [b]	Yes	R990182-PK
26-Week Repeat Dose	Rat	Oral Gavage	0, 5, 25, 100 [b]	Yes	TOX-120-2001
4-Week Repeat Dose	Dog	Oral Gavage	0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 [b]	Yes	D990175-PK
39-Week Repeat Dose	Dog	Oral Gavage	0, 2, 6, 18/12 [b]	Yes	TOX-120-002
4-Week Repeat Dose	Monkey	Oral Gavage	0, 3, 30 [b]	Yes	P2000114-PK
Dose Range Finding Embryo/Fetal Development	Rat	Oral Gavage	0, 5, 100, 200 [b]	Yes	TX-120-2001
Embryo/Fetal Development	Rat	Oral Gavage	0, 25, 100, 250 [b]	Yes	TX-120-2002
7-Day Tolerability Study	Rabbit	Oral Gavage	0, 20, 50, 75 [b]	No	TX-120-2003
Dose Range Finding Embryo/Fetal Development	Rabbit	Oral Gavage	0, 5, 25, 50, 100 [b]	Yes	TX-120-2004
Embryo/Fetal Development	Rabbit	Oral Gavage	0, 10, 30, 100 [b]	Yes	TX-120-2005
Qualification of Impurities	Rat	Oral Gavage	0, 5, 50 [b]	Yes	TX-120-2008
Qualification of Impurities	Rat	Oral Gavage	0, 25, 50 [c]	Yes	TX-120-2021

a　'Yes' indicates study includes a GLP Compliance statement.
b　TAF (monofumarate)
c　TAF (hemifumarate)

2.6.7.3　トキシコキネティクス：　トキシコキネティクス試験成績の一覧表

Test Article: TAF(monofumarate), TAF (hemifumarate)

	Steady State TFV AUC (µg•h/mL)							
Species	Mouse		Rat		Rabbit	Dog		Monkey
Method of Administration	Oral Gavage		Oral Gavage		Oral Gavage	Oral Gavage		Oral Gavage
Gender (M/F)	M	F	M	F	F	M	F	M & F
Dose (mg/kg/day)								
0.1						NC[e]	NC[e]	
0.3						NC[e]	NC[e]	
1						NC[e]	NC[e]	
1.5			0.05[c]	0.06[c]				
2						1.30[f]	1.07[f]	
3						NC[e]	NC[e]	0.35[a,*]
5			0.7[d,*],0.02[k,$], 0.07[k,§]	0.7[d,*], 0.41[g]	1.6[i]			
6						3.89[f]	5.01[f]	
6.25			0.4[c]	0.3[c]				
10	0.19[b]	0.24[b]			2.0[j]	5.26[e,*]	5.26[e,*]	
18/12						14.90[f]	12.57[f]	
20					2.3[l]			
25			2.5[c], 3.8[d,*], 2.4[n,*,∞],3.0[n,*,∂], 2.6[n,*,ß]	2.8[c], 3.8[d,*] 2.4[n,*,∞],3.0[n,*,∂], 2.6[n,*,ß], 2.8[h]	6.0[i]			
30	1.56[b]	1.45[b]			5.0[j]			5.87[a,*]
50			2.0[k,$], 2.5[k,§], 6.8[n,*,∞] 6.0[n,*,∂], 6.0[n,*,ß]	6.8[n,*,∞],6.0[n,*,∂], 6.0[n,*,ß]	11.8[i], 5.7[l]			

2.6.7.3　トキシコキネティクス：　トキシコキネティクス試験成績の一覧表（続き）

Test Article: TAF(monofumarate), TAF (hemifumarate)

	Steady State TFV AUC (µg•h/mL)							
Species	Mouse		Rat		Rabbit	Dog		Monkey
Method of Administration	Oral Gavage		Oral Gavage		Oral Gavage	Oral Gavage		Oral Gavage
Gender (M/F)	M	F	M	F	F	M	F	M & F
Dose (mg/kg/day)								
75					10.1[l]			
100	5.97[m], 7.80[b]	5.51[m], 6.55[b]	12.2[c] ,15.5[d,*]	14.6[c] ,15.5[d,*], 20.6[g],17.4[h]	23.5[i], 27.3[j]			
200				35.7[g]				
250				55.7[h]				
400			62.7[c]	75.1[c]				
500	27.2[m]	30.8[m]						

F = female; M = male; GD = gestation day; AUC = Other than as indicated all AUC values are specified as AUC_{0-t}

a P2000114 (Day 28, $AUC_{0-\tau}$)
b TX-120-2007 (Week 13)
c R990182 (Day 28, AUC_{0-last})
d TOX-120-001 (Week 26)
e D990175 (Day 28, median)
f TOX-120-002 (Week 39/40) (dose reduced from 18 to 12 mg/kg/day on Days 45 and 51 for males and females, respectively)
g TX-120-2001 (GD 17)
h TX-120-2002 (Day 17)
i TX-120-2004 (GD 20)
j TX-120-2005 (GD 20)
k TX-120-2008 (Day 14)
l TX-120-2003 (Day 7)
m TX-120-2006 (Day 14)
n TX-120-2021 (Day 28)
* males and females combined
$ [redacted]% purity
§ [redacted]% purity
∞ [redacted]% purity
∂ [redacted]% purity
ß [redacted]% purity

2.6.7.4　毒性試験：　使用したロット

Test Article: TAF (monofumarate), TAF (hemifumarate)

Lot No.	Purity (%)	TAF Impurities (%)										
		PMPA	不純物1*	不純物2*	不純物3*	不純物4*	不純物5*	不純物6*	不純物7*	不純物8* #	不純物9*	Type of Study
Specification	[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	≤[redacted]	
[redacted]	[redacted]	NT	NT	NT	NT	NT	NT	—	—	—	NT	a
[redacted]	[redacted]	NT	NT	NT	NT	NT	NT	[redacted]	—	—	NT	b
[redacted]	[redacted]	NT	NT	NT	NT	NT	NT	[redacted]	—	—	NT	c
[redacted]	[redacted]	NT	NT	NT	NT	NT	NT	[redacted]	—	—	NT	d
[redacted]	[redacted]	NT	NT	NT	NT	NT	NT	[redacted]	—	—	NT	e
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	Tr	Tr	Tr	[redacted]	[redacted]	[redacted]	NT	f
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	Tr	Tr	Tr	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	g
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	—	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	h
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	Tr	[redacted]	Tr	[redacted]	[redacted]	Tr	[redacted]	i
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	Tr	Tr	—	—	[redacted]	Tr	—	[redacted]	j
[redacted]	[redacted]	[redacted]	Tr	Tr	[redacted]	[redacted]	—	[redacted]	—	—	NT	k

* 新薬承認情報提供時に置換え

2.6.7.4　　毒性試験：　　使用したロット（続き）

Test Article: TAF (monofumarate), TAF (hemifumarate)

Lot No.	Purity (%)	Observed Impurities (%)												
		PMPA	不純物1*	不純物2*	不純物3*	不純物10*#	不純物11*#	不純物12*#	不純物13*#	不純物14*#	不純物15*#	不純物4*	不純物16*#	Type of Study
[redacted]*	[redacted]	[redacted]	Tr	[redacted]	[redacted]	—	—	[redacted]	[redacted]	—	—	[redacted]	—	k
[redacted]*	[redacted]	[redacted]	Tr	Tr	[redacted]	[redacted]	[redacted]	—	—	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	k

* 新薬承認情報提供時に置換え

2.6.7.4 毒性試験： 使用したロット（続き）

Test Article: TAF (monofumarate), TAF (hemifumarate)

Lot No.	Observed Impurities (%)													
	不純物17*	不純物18*	不純物19*	不純物6*	不純物20*	不純物21*	不純物22*	不純物23*	不純物24* #	不純物25* #	不純物26* #	不純物8* #	不純物9*	Type of Study
[redacted]*	Tr	—	—	[redacted]	—	—	—	—	[redacted]	[redacted]	[redacted]	—	[redacted]	k
[redacted]*	—	[redacted]	[redacted]	[redacted]@	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	—	—	—	—	[redacted]	k

— = < DL, Detection limit (DL) = 0.02% for all impurities; Tr = trace < 0.05 (quantitation limit (QL) = 0.05%); NT = not tested

a Used for study numbers V990212, V990213 (Genetic toxicity)
b Used for study numbers R990133, R990185, D990181, R990139, R990182, D990142, D990175, R990177, R990186 (Single Dose; Repeat Dose; Other)
c Used for study number TOX-120-001 (Repeat Dose)
d Used for study number TOX-120-002 (Repeat Dose)
e Used for study numbers P2000114, R2000044, M2000113 (Repeat Dose; Genetic toxicity)
f Used for study numbers TX-120-2001, TX-120-2002, TX-120-2003, TX-120-2004, TX-120-2005, TX-120-2006, TX-120-2007, TX-120-2008 (Reprotox; Repeat Dose; Impurity Qualification)
g Used for study number TX-120-2011 (Local Tolerability)
h Used for study number TX-120-2008 (Impurity Qualification)
i Used for study number TX-120-2012 (Reprotox)
j Used for study numbers TX-120-2013, TX-120-2014 (Worker Safety)
k Used for study number TX-120-2021 (Impurity Qualification)
* These two batches of drug substance were used to qualify known and/or potential impurities. They were prepared by spiking process impurities and therefore have a different impurity profile to other batches.
# Not specified in 3.2.S.4.1
@ Coeluted with GS-645502
.

* 新薬承認情報提供時に置換え

2.6.7.5　単回投与毒性試験

Test Article: TAF (monofumarate)

Species / Strain	Method of Administration (Vehicle)	Duration of Dosing	Dose (mg/kg)	Gender and No./Group	NOAEL (mg/kg)	Noteworthy Findings	Gilead Study No. (CRO Study No.) /Location
Rat/ Sprague-Dawley	Oral Gavage (25 mmol/L citric acid)	1 day (with 14 days observation period)	0, 100, 300, 1000	5/sex/group	> 1000	Salivation was noted immediately following dose administration in both males and females at all dose levels, with the exception of females at a dose of 100 mg/kg, and was most severe in animals treated at 1000 mg/kg. Slight reduction in BW gain was seen at 1000 mg/kg over Days 1 to 7 of the observation period, although BW gain in these animals was comparable to the controls over Days 8 to 14 of the observation period.	R990185[a] ([redacted] 89186) /4.2.3.1.1
Dog/Beagle	Oral Gavage (25 mmol/L citric acid)	1 day (with 14 days observation)	0, 30, 90, 270	1/sex/group	30	Vomiting, retching and salivation observed at 270 mg/kg. This was more pronounced in the male that also showed signs of reduced activity, weakness, tremors and incoordination. Slight salivation was also noted at 90 mg/kg. BW was variable between groups, with the most marked loss seen in the 270 mg/kg male. FC was also variable with markedly lower consumption in the male at 270 mg/kg. An increase in BUN was also noted in the male treated at 270 mg/kg, and in females at 30, 90 and 270 mg/kg on Day 2. Differences were no longer apparent on Day 14. Increases in kidney and spleen weight relative to BW were noted for males at 30, 90 and 270 mg/kg, with an increase in relative spleen weight also observed in females at 30 or 270 mg/kg. Treatment-related renal tubular changes characterized by basophilia and karyomegaly were seen in the male and female at 270 mg/kg, and also the female at 90 mg/kg. Moderate atrophy of the thymus was noted in the male treated at 270 mg/kg and minimal atrophy was noted in the male treated at 90 mg/kg. Etiology of the thymus change was uncertain.	D990181[a] ([redacted] 89187) / 4.2.3.1.2

NOAEL = No-Observed-Adverse-Effect Level; BW = body weight; FC = food consumption; BUN = blood nitrogen urea; [redacted] = [redacted]
a　Indicates GLP compliant

2.6.7.6　反復投与毒性試験：　重要な試験以外の試験

Test Article: TAF (monofumarate)

<table>
<tr><th>Species / Strain</th><th>Method of Administration (Vehicle/Formulation)</th><th>Duration of Dosing</th><th>Dose (mg/kg/day)</th><th>Gender and No./Group</th><th>NOAEL (mg/kg/day)</th><th>Noteworthy Findings</th><th>Gilead Study No. (CRO Study No.) /Location</th></tr>
<tr>
<td>Mouse/ Crl:CD-1(ICR)</td>
<td>Oral Gavage
(0.1% (v/v) Tween 20 and 0.1% (w/v) hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) K100LV in reverse osmosis water)</td>
<td>2 weeks</td>
<td>0, 100, 500, 1000</td>
<td>10/sex/group</td>
<td>100</td>
<td>Early deaths occurred at 500 and 1000 mg/kg/day. Test article-related effects included minimal to moderate clinical pathology changes at 500 or 1000 mg/kg/day and anatomic pathology findings for all animals given TAF (monofumarate).
TK parameters (combined sexes) were as follows:
<table>
<tr><th>Dose (mg/kg/ day)</th><th>Day</th><th>C_{max} (µg/mL)</th><th>AUC_{0-t} (µg•h/mL)</th></tr>
<tr><td colspan="4">TFV</td></tr>
<tr><td rowspan="2">100</td><td>Day 1</td><td>0.931</td><td>5.34</td></tr>
<tr><td>Day 14</td><td>1.24</td><td>5.74</td></tr>
<tr><td rowspan="2">500</td><td>Day 1</td><td>4.13</td><td>25.9</td></tr>
<tr><td>Day 14</td><td>3.93</td><td>29.4</td></tr>
<tr><td rowspan="2">1000</td><td>Day 1</td><td>4.46</td><td>48.2</td></tr>
<tr><td>Day 8</td><td>6.28</td><td>5.67</td></tr>
<tr><td colspan="4">TAF</td></tr>
<tr><td rowspan="2">100</td><td>Day 1</td><td>0.013</td><td>NC</td></tr>
<tr><td>Day 14</td><td>0.021</td><td>NC</td></tr>
<tr><td rowspan="2">500</td><td>Day 1</td><td>6.14</td><td>13.02</td></tr>
<tr><td>Day 14</td><td>2.76</td><td>1.91</td></tr>
<tr><td rowspan="2">1000</td><td>Day 1</td><td>8.77</td><td>22.5</td></tr>
<tr><td>Day 8</td><td>23.3</td><td>17.8</td></tr>
</table>
NC = insufficient data to calculate</td>
<td>TX-120-2006 ([redacted] 8235665) /4.2.3.2.1</td>
</tr>
</table>

2.6.7.7　反復投与毒性試験：　重要な試験

2.6.7.7.1　マウス 13 週間経口投与毒性試験

Test Article: TAF(monofumarate)

Report Title: 13-Week Oral Gavage Toxicity and Toxicokinetic Study with GS-7340-02 in Mice

Gilead Study No. TX-120-2007
[redacted] **Study No.** 8241074

Species/Strain: Mouse/Crl:CD-1(ICR)
Duration of Dosing: 13 weeks
Location: 4.2.3.2.2

Initial Age: 5 to 6 weeks old
Duration of Postdose: NA
GLP Compliance: Yes

Date of First Dose: 08 February 2011
Method of Administration: Oral Gavage
Lot Number: [redacted]

Vehicle: 0.1% (v/v) Tween 20 and 0.1% (w/v) HPMC K100LV prepared in reverse osmosis water

Special Features: Insufficient TAF data for TK analysis; TFV TK analyses presented

No Observed Adverse Effect Level: Not determined (< 10 mg/kg/day)

Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		10		30		100	
Gender: Number of Animals (TK)	M: 6	F: 6	M: 42	F: 42	M: 42	F: 42	M: 42	F: 42
Toxicokinetics (TFV): $AUC_{(0\text{-}t)}$ (ng•h/mL)								
Day 1	NA[a]	NA[a]	148	193	1140	1424	5829	7239
Week 13	NA[a]	NA[a]	191	239	1561	1453	7797	6545
Toxicokinetics (TFV): C_{max} (ng/mL)								
Day 1	NA[a]	NA[a]	62.3	57.6	248	337	1024	999
Week 13	NA[a]	NA[a]	58.8	99.6	422	280	958	767

2.6.7.7.1　　マウス 13 週間経口投与毒性試験（続き）　　TX-120-2007

Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		10		30		100	
Gender: Number of Animals (Main)	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	1[b]	0
Body Weight Change								
Dosing Days 1 – 92 (g)	9.3	8.0	9.4	7.1	9.3	6.1	7.9	7.3
Food Consumption (%)[c]								
Dosing Week 1	41.6 g	36.7 g	+3.4	-0.8	-13.9*	-12.8*	-10.8*	-12.5*
Dosing Week 2	31.1 g	28.9 g	+2.9	+0.3	+11.6*	+8.3	+14.1*	+13.1*
Clinical Observations	—	—	—	—	—	—	—	—
Ophthalmoscopy	—	—	—	—	—	—	—	—
Hematology	—	—	—	—	—	—	—	—
Serum Chemistry	—	—	—	—	—	—	—	—
Dosing Phase – Final Phase Sacrifice								
Number Evaluated	15	15	15	15	15	15	14	15
Organ Weights	—	—	—	—	—	—	—	—
Number Evaluated	15	15	15	15	15	15	15	15
Macroscopic Observations	—	—	—	—	—	—	—	—

2.6.7.7.1　　マウス 13 週間経口投与毒性試験（続き）　　TX-120-2007

Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		10		30		100	
Gender: Number of Animals (Main)	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15
Dosing Phase – Final Phase Sacrifice, continued								
Histopathology								
Nasal Turbinates								
Infiltrate, Neutrophil, Respiratory Mucosa								
Minimal	1	1	3	3	4	6	6	10
Slight	0	0	2	0	2	0	5	4
Infiltrate, Neutrophil, Olfactory Mucosa								
Minimal	1	1	7	4	7	4	7	11
Slight	0	0	2	0	1	0	7	2
Degeneration, Olfactory Epithelium								
Minimal	2	2	5	4	5	7	3	8
Slight	0	0	3	0	2	0	8	4
Moderate	0	0	0	0	1	0	2	1
Exudate, Lumen								
Minimal	0	0	0	0	2	2	2	2
Rectum								
Apoptosis, Increased								
Minimal	0	0	0	0	0	0	5	2

HPMC = hydroxypropylmethylcellulose; M = Male; F = Female; TK = toxicokinetic; NA = Not Applicable; — = Comparable to control animals or no treatment-related findings

a　Values below the lower limit of quantitation (with the exception of Animal No. A54618 (Control TK female) for tenofovir on Day 1 of the dosing phase)

b　On Day 54 of the dosing phase Animal No. A54419 (100 mg/kg/day Main male) was sacrificed in moribund condition due to gavage-related injury. Respectively on Days 15 and 45 of the dosing phase, Animal Nos. A54647 (10 mg/kg/day TK female) and A54746 (100 mg/kg/day TK female) were found dead. These deaths were not considered test article-related.

c　For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences or fold change from controls are shown. Statistical significance is based on actual data not on the percent.

*　$p \leq 0.05$ (ANOVA and Dunnett's t-test where applicable)

2.6.7.7.2　　ラット 28 日間経口投与毒性試験

Test Article: TAF(monofumarate)

Report Title: A 28-Day Oral Toxicity Study of GS-7340-02 in the Albino Rat

Gilead Study No. R990182 and R990182-PK
[redacted] **Study No.** 89176

Species/Strain: Sprague-Dawley rat
Duration of Dosing: 28 days
Location: 4.2.3.2.3
Initial Age: 10 weeks old
Duration of Postdose: None
GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: 09 December 1999
Method of Administration: Oral gavage
Lot Number: [redacted]
Vehicle: 50 mmol/L Citric Acid (formulated in Sterile Water for Irrigation, USP)
Special Features: Biochemical markers of bone turnover , Peripheral Quantitative Computed Tomography (pQCT)
No Observed Adverse Effect Level: 6.25 mg/kg/day

Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		1.5		6.25		25		100		400	
Gender: Number of Animals (TK)	M: 0	F: 0	M: 8	F: 8	M: 8	F: 8	M: 8	F: 8	M: 8	F: 8	M: 8	F: 8
Toxicokinetics (TFV): $AUC_{0\text{-last}}$ (h•ng/mL)												
Day 1	NA	NA	45.5	49.2	288	296	2430	2770	12700	13600	61800	78400
Day 28	NA	NA	52.7	55.1	358	321	2450	2820	12200	14600	62700	75100
Toxicokinetics (TFV): C_{max} (ng/mL)												
Day 1	NA	NA	35.5	35.6	167	229	1340	1970	6970	6990	12900	20100
Day 28	NA	NA	49.7	52.8	169	211	1300	1690	4780	6160	10300	14400

2.6.7.7.2　　ラット 28 日間経口投与毒性試験（続き）　　R990182

Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		1.5		6.25		25		100		400	
Gender: Number of Animals (Main)	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10
Noteworthy Findings												
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0
Body Weight Gain (%)[a]												
Week 1 to 2	49.9	30.9	—	—	—	—	-29%[A]	-35%[B]	-37%[B]	-24%[A]	-67%[B]	-56%[B]
Week 2 to 3	20.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	-68%[B]	—
Week 3 to 4	—	1.8	—	+494%[B]	—	—	—	—	—	—	—	—
Food Consumption (%)[a]												
Week 1 to 2	209.2	162.0	—	—	—	—	—	—	—	—	-17%[B]	-14%[B]
Week 2 to 3	203.4	159.5	—	—	—	—	—	—	—	—	-18%[B]	-14%[A]
Week 3 to 4	195.3	154.6	—	—	—	—	—	—	—	—	-14%[B]	-11%[A]
Clinical Observations												
Fur, Staining, Red, Muzzle	1	1	1	—	1	—	1	—	2	—	4	2
Hematology[a]												
White Blood Cell ($\times 10^3/mm^3$)	7.9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	-57%[B]	—
Monocytes (n/mm^3)	286.9	—	-53%[A]	—	-100%[B]	—	-98%[B]	—	-91%[B]	—	-93%[B]	—
Lymphocytes (n/mm^3)	6590.3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	-57%[B]	—
Red Blood Cell ($\times 10^6/mm^3$)	7.71	7.06	—	—	—	—	—	—	—	—	-11%[B]	-12%[B]
Hemoglobin (g/dL)	14.9	14.1	—	—	—	—	—	—	—	—	-6%[B]	-7%[B]
Hematocrit (%)	42.4	39.7	—	—	—	—	—	—	—	—	-8%[B]	-8%[B]
Mean Corpuscular Hemoglobin (pg)	19.3	20.0	—	—	—	—	—	—	—	—	+6%[B]	+6%[A]
Red Blood Cell Distribution Width (%)	12.2	11.7	—	—	—	—	—	—	—	—	+20%[B]	+15%[B]

2.6.7.7.2　　ラット 28 日間経口投与毒性試験（続き）　　R990182

Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		1.5		6.25		25		100		400	
Gender: Number of Animals (Main)	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10
Clinical Chemistry[a]												
Urea Nitrogen (mg/dL)	16.3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+28%[B]	—
Alkaline Phosphatase (U/L)	110.3	71.0	—	—	—	—	—	—	—	—	-37%[B]	-44%[B]
Cholesterol (mg/dL)	54.8	70.3	—	—	—	—	—	—	—	—	+71%[B]	+30%[A]
Organ Weights[a]												
Relative Thymus Weight (%)	0.071	0.127	—	—	—	—	—	—	—	—	-61%[B]	-45%[B]
Gross Pathology												
Thymus − Number Evaluated	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Discoloration Dark	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—
Small	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	7	1
Histopathology												
Femur – Number Evaluated	10	10	—	—	—	—	—	—	—	—	10	10
Atrophy – Cancellous Bone	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4	9
Kidney – Number Evaluated	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Tubular Basophilia	1	—	1	—	1	—	—	—	—	—	8	3
Tubular Karyomegaly	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	7	5
Hyaline Droplets	1	—	—	—	2	—	3	—	6	—	2	—
Thymus – Number Examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Atrophy	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	9	6

2.6.7.7.2 ラット 28 日間経口投与毒性試験（続き） R990182

Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		1.5		6.25		25		100		400	
Gender: Number of Animals (Main)	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10
Bone Parameters[a]												
Periosteal Circumference (mm)	16.09	13.44	—	—	—	+5%[A]	—	—	—	—	-4%	-1.5%
Total Mean Slice Area – Distal Femur (mm^2)	20.65	14.41	—	—	—	+10%[A]	—	—	—	—	-7%	-3%
Bone Mineral Density (mg/cm^3)	576.5	752.3	—	—	—	—	—	—	—	—	-7%	-14%[B]
Urinary Calcium (mg/dL)	7.1	8.3									515%[C]	647%[D]
1,25-Dihydroxy Vitamin D (pg/mL)	51.67		—		—		—		-51%[A]		-74%[A]	

[redacted]= [redacted]; M = Male; F = Female, NA = Not applicable; − = Comparable to control animals or no treatment-related findings

a For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data not on the percent.

Significantly different from control value:

A $p < 0.05$ (Dunnett's)

B $p < 0.01$ (Dunnett's)

C $p < 0.01$ (Dunn's)

D $p < 0.001$ (Dunn's)

2.6.7.7.3　　ラット 26 週間経口投与毒性試験

Test Article: TAF (monofumarate)

Report Title: A 26-Week Oral Gavage Toxicity Study of GS-7340-02 in the Albino Rat

Gilead Study No. TOX-120-001
[redacted] **Study No.** 89686

Species/Strain: Sprague-Dawley rat
Duration of Dosing: 26 weeks
Location: 4.2.3.2.4

Initial Age: 6 weeks at start of dosing
Duration of Postdose: N/A
GLP Compliance: Yes

Date of First Dose: 10 Apr 2002
Method of Administration: Oral gavage
Lot Number: [redacted]

Vehicle: 0.5% polysorbate 20, NF; 0.5% carboxymethylcellulose; 0.9% Benzyl Alcohol

Special Features: Bone parameters: Biochemical markers of bone turnover and hormones, Peripheral Quantitative Computed Tomography (pQCT)

No Observed Adverse Effect Level: 25 mg/kg/day

Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		5		25		100	
Gender: Number of Animals (TK)	M: 0	F: 0	M: 8	F: 8	M: 8	F: 8	M: 8	F: 8
Toxicokinetics (TFV): AUC[a] (h•µg/mL)								
Day 1	NA	NA	0.625	0.584	3.024	3.704	12.555	12.275
Week 13	NA	NA	0.798	0.656	3.639	3.809	15.844	14.245
Week 26	NA	NA	0.739	0.601	3.526	3.991	15.931	15.138
Toxicokinetics (TFV): C_{max} (µg/mL)								
Day 1	NA	NA	0.326	0.292	1.214	1.354	5.071	4.817
Week 13	NA	NA	0.337	0.351	1.335	1.593	4.766	6.262
Week 26	NA	NA	0.282	0.252	1.249	1.798	4.499	5.323

2.6.7.7.3　　ラット 26 週間経口投与毒性試験（続き）　　TOX-120-001

Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		5		25		100	
Gender: Number of Animals (Main)	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15
Died or Sacrificed Moribund[b]	0	1	0	2	0	0	0	3
Body Weights	—	—	—	—	—	—	—	—
Food Consumption	—	—	—	—	—	—	—	—
Clinical Observations	—	—	—	—	—	—	—	—
Ophthalmology	—	—	—	—	—	—	—	—
Hematology	—	—	—	—	—	—	—	—
Clinical Chemistry	—	—	—	—	—	—	—	—
Urinalysis	—	—	—	—	—	—	—	—
Organ Weights	—	—	—	—	—	—	—	—
Macroscopic Observations	—	—	—	—	—	—	—	—

2.6.7.7.3　　ラット 26 週間経口投与毒性試験（続き）　　TOX-120-001

Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		5		25		100	
Gender: Number of Animals (Main)	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15
Noteworthy Findings								
Histopathology								
Bone – Tibia								
Number Evaluated	15	14	—	13	—	15	15	13
Atrophy: Cancellous Bone	—	—	—	—	—	—	—	8
Kidney								
Number Evaluated	15	15	15	15	15	15	15	15
Basophilia: Tubular	6	4	4	4	6	3	7	3
Karyomegaly: Tubular	—	—	—	—	—	—	11	2
Degeneration: Tubular	—	—	—	—	1	—	—	—
Hyaline droplet: Tubular	8	—	3	—	4	—	11	—
Pyelitis/Pyelonephritis	—	1	—	4	—	1	1	1
Dilatation: Pelvis	—	1	1	1	1	1	—	—
Cyst	—	1	—	1	1	1	—	—
Fibrosis	—	—	—	—	1	—	—	1
Bone Densitometry (pQCT)[c]								
Right Proximal Tibia − Metaphysis								
Trabecular bone mineral density (BMD), Week 26 (mg/cm^3)	221.9	280.79	-2.1%	-9.3%	-2.3%	-2.3%	-18.4%[A]	-21%[A]
Trabecular bone mineral content (BMC), Week 26 (mg/mm)	2.26	0.83	-6.2%	-12%	-4.4%	-2.4%	-22.6%[B]	-33.7%[C]
Right Distal Femur - Metaphysis								
Trabecular (BMD), ex-vivo (mg/cm^3)	259.8	301.2	d	d	d	d	-15.4%[B]	-5.3%
Trabecular (BMC), ex-vivo (mg/mm)	3.5	1.9	d	d	d	d	-17.1%[B]	-5.3%

2.6.7.7.3 ラット 26 週間経口投与毒性試験（続き） TOX-120-001

Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		5		25		100	
Gender: Number of Animals (Main)	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15
Urine Biochemical Markers of Bone Turnover, Week 13[c]								
Deoxypyridinoline (nmol/L/mmol/L creatinine)	80.603	—	—	—	—	—	+25%[A]	—
C-Telopeptide (µg/mmol creatinine)	3.673	—	+55%	—	+78%[D]	—	+135%[F]	—
Serum Biochemical Markers of Bone Turnover and Hormones, Week 26[c]								
1,25-Dihydroxy Vitamin D_3 (pmol/L)	112.774	105.021	+26%	-10%	-21%	-45%	-28%	-59%[F]
25-Hydroxy Vitamin D_3 (ng/mL)	19.064	22.358	+3%	-14%	+3%	-15%	-5%	-22%[B]

[redacted] = [redacted]; M = Male; F = Female; TK = toxicokinetic; NA = Not Applicable; − = Comparable to control animals or no treatment-related findings; pQCT = peripheral quantitative computed tomography

a $AUC_{0-\infty}$ on Day 1 and AUC_{0-24} in Weeks 13 and 26

b There were no unscheduled deaths recorded during the 26-week treatment period which were considered to treatment related. Two high dose female TK animals were euthanized on days 732 and 164; in both cases the deterioration of their condition could not be attributed to an accident during dose administration.

c For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data not on the percent.

d Bone densitometry (pQCT) was only evaluated in the right distal femur (metaphysis) of animals in the control and 100 mg/kg/day groups.

A $p \leq 0.05$ (Dunnett's)
B $p \leq 0.01$ (Dunnett's)
C $p \leq 0.001$ (Dunnett's)
D $p \leq 0.05$ (Dunn's)
E $p \leq 0.01$ (Dunn's)
F $p \leq 0.001$ (Dunn's)

2.6.7.7.4　　イヌ 28 日間経口投与毒性試験

Test Article: TAF (monofumarate)

Report Title: A 28-Day Oral Gavage Toxicity Study of GS-7340-02 in the Beagle Dog

Gilead Study No. D990175 and D990175-PK
[redacted] **Study No.** 89128

Species/Strain: Beagle dog
Duration of Dosing: 28 days
Location: 4.2.3.2.5

Initial Age: 7 to 8 months at dosing
Duration of Postdose: N/A
GLP Compliance: Yes

Date of First Dose: 24 November 1999
Method of Administration: Oral gavage
Lot Number: [redacted]

Vehicle: 50 mmol/L Citric Acid (formulated in Sterile Water for Irrigation, USP)

Special Features: Bone parameters: : Biochemical markers of bone turnover and hormones, Peripheral Quantitative Computed Tomography (pQCT)

No Observed Effect Level: 1 mg/kg/day

Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		0.1		0.3		1		3		10	
Gender: Number of Animals	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4
Toxicokinetics (TFV): AUC (h•µg/mL)												
Day 1	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	
Day 28	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	$5.26^{b}_{(0-\tau)}$	
Toxicokinetics (TFV): C_{max} (µg/mL)												
Day 1	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	0.385^{b}	
Day 28	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	0.444^{b}	
Toxicokinetics (TAF): AUC (h•µg/mL)												
Day 1	NA[a]	NA[a]	NA[a]	NA[a]	NA[a]	NA[a]	NC	NC	NC	NC	NC	
Day 28	NA[a]	NA[a]	NA[a]	NA[a]	NA[a]	NA[a]	NC	NC	NC	NC	$0.985^{b}_{(0-\tau)}$	

2.6.7.7.4　　イヌ 28 日間経口投与毒性試験（続き）　　D990175

Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		0.1		0.3		1		3		10	
Gender: Number of Animals	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4
Toxicokinetics (TAF): C_{max} (µg/mL)												
Day 1	NA[a]	NA[a]	NA[a]	NA[a]	NA[a]	NA[a]	NC	NC	NC	NC	0.582[b]	
Day 28	NA[a]	NA[a]	NA[a]	NA[a]	NA[a]	NA[a]	NC	NC	NC	NC	1.28[b]	
Trough (TFV) in PBMC (µg/mL PBMC Solution)												
Day 8	NA[a]	NA[a]	NA[a]	NA[a]	NA[a]	NA[a]	NC		1.32		7.24[b]	
Day 22	NA[a]	NA[a]	NA[a]	NA[a]	NA[a]	NA[a]	NC		NC		9.66[b]	
Day 28	NA[a]	NA[a]	NA[a]	NA[a]	NA[a]	NA[a]	NC		2.22		18.6[b]	
Noteworthy Findings												
Died or sacrificed moribund, adverse findings etc.	There were no unscheduled deaths or adverse findings for body weight, food consumption, clinical observations, ophthalmology examinations or hematology parameters.											
Serum Chemistry												
AST (U/L)												
Day 14	38.3	39.8	37.0	37.5	43.0	34.5	34.0	34.3	38.3	46.0	42.8	46.8
Day 28	34.8	35.3	33.8	36.0	39.8	33.8	34.5	35.8	37.5	36.0	47.0	52.5*
Urinalysis	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Organ Weights	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Gross Pathology												
Number Evaluated	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Cecum, Area Dark	1	1	—	1	—	—	1	1	2	—	2	—
Colon, Area Dark	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	2	1
Duodenum, Area Dark	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—
Rectum, Area Dark	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2

2.6.7.7.4　　イヌ 28 日間経口投与毒性試験（続き）　　D990175

Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		0.1		0.3		1		3		10	
Gender: Number of Animals	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4
Lung, Area Depressed	—	—	—	—	1	—	—	—	—	1	—	—
Area Dark	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—
Area Pale	—	—	—	—	—	—	1	—	1	1	—	—
Area Raised	2	1	1	2	—	1	1	—	1	1	—	1
Discoloration Pale	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—
Spleen, Area Dark	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—
Area Depressed	1	1	1	—	1	1	—	—	—	—	—	1
Area Pale	1	—	1	1	—	—	—	—	—	—	1	—
Area Raised	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—
Adhesion	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
Histopathology												
Kidney												
Number Evaluated	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Karyomegaly: Tubular	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	4	4
Basophilia: Tubular	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	3
Bone Densitometry (pQCT)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

[redacted]= [redacted]; M = Male; F = Female; TK = toxicokinetic; NA = Not Applicable; NC = Not calculated (insufficient data); − = Comparable to control animals or no treatment-related findings; PBMC = peripheral blood mononuclear cell; pQCT = peripheral quantitative computed tomography

a　Not assayed
b　Median
*　$p \leq 0.01$ (Dunnett's)

2.6.7.7.5　　イヌ 9 ヵ月間経口投与毒性試験

Test Article: TAF (monofumarate)

Report Title:
A 9 Month Oral Gavage Toxicity Study of GS-7340-02 in the Beagle Dog with a 3 Month Recovery Period For Selected Animals

Gilead Study No. TOX-120-002
[redacted] **Study No.** 89647

Species/Strain: Beagle dog
Duration of Dosing: 9 months
Location: 4.2.3.2.6

Initial Age: 5-6 months
Duration of Postdose: 3 months
GLP Compliance: Yes

Date of First Dose: 28 May 2002
Method of Administration: Oral gavage
Lot Number: [redacted]

Vehicle: 0.5% polysorbate 20, NF; 0.5% carboxymethylcellulose; 0.9% Benzyl Alcohol

Special Features: Bone densitometry, biochemical markers of bone turnover and associated parameters, dual energy X-ray absorptiometry (DXA) and Peripheral Quantitative Computed Tomography (pQCT)

No Observed Adverse Effect Level: 2 mg/kg/day

Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		2		6		18/12[a]	
No. of Animals [b] 3-month interim	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2
9-month	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4+2	F: 4+2
Toxicokinetics (TAF): AUC_{0-t} (µg•h/mL)								
Day 1	NA		0.03		0.37		2.07	
Week 13	NA		0.07		0.66		2.23	
Week 39/40	NA		0.08		1.03		1.95	
Toxicokinetics (TAF): C_{max} (µg/mL)								
Day 1	NA		0.08		0.72		3.60	
Week 13	NA		0.13		1.10		3.24	
Week 39/40	NA		0.14		1.42		2.62	

2.6.7.7.5 イヌ 9 ヵ月間経口投与毒性試験（続き） TOX-120-002

Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		2		6		18/12[a]	
No. of Animals [b] 3-month interim	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2
9-month	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4+2	F: 4+2
Toxicokinetics (TFV): AUC_{0-24} (h•µg/mL)								
Day 1	NA		0.40		1.31		3.80	
Week 13	NA		1.21		4.10		12.48	
Week 39/40	NA		1.18		4.45		13.73	
Toxicokinetics (TFV): C_{max} (µg/mL)								
Day 1	NA		0.08		0.25		0.80	
Week 13	NA		0.16		0.56		1.26	
Week 39/40	NA		0.18		0.54		1.32	
Toxicokinetics (TFV): PBMC AUC_{0-24}(ng•h/10^6 cells)								
Week 39/40	NA		258.2		1263.5		3256.2	
Noteworthy Findings								
Died or sacrificed moribund[c]	0	0	0	0	0	0	2	0
Body Weight (%)[d]								
Week 13	9.95 kg	—	—	—	—	—	-22.4[B]	—
Week 26	10.95 kg	—	—	—	—	—	-23.1[B]	—
Week 39	11.50 kg	8.88 kg	-6.7	-10.5	-13.2	-6.0	-25.7[C]	-11.9
Food Consumption (%)[d]								
Week 13	256.72 g	—	—	—	—	—	-23.8	—
Week 26	319.40 g	—	—	—	—	—	-21.7	—
Week 39	329.48 g	—	—	—	—	—	-19.8	—

2.6.7.7.5　　イヌ 9 ヵ月間経口投与毒性試験（続き）　　TOX-120-002

Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		2		6		18/12[a]	
No. of Animals [b] 3-month interim	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2
9-month	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4+2	F: 4+2
Clinical Observations	An increased incidence of salivation was recorded both pre-dose and following dose administration for animals from all treated groups including the controls. In addition, a red/brown fur staining was also observed on the paws of the treated animals with a higher incidence observed in animals administered 18/12 mg/kg/day. This change was most often distributed on the lower extremities, the hind paws and the forepaws, and was still apparent to a lesser degree during the three month recovery period.							
Ophthalmoscopy	—	—	—	—	—	—	—	—
Electrocardiography [d]								
Heart Rate (beats/min)								
Week 13	117.0	106.0	—	—	—	—	-32.5%[B]	-29.2%[B]
Week 39	111.0	—	-24.3%[A]	—	—	—	-49.5%[C]	—
PR (msec)								
Week 13	—	86.7	—	—	—	—	—	+26.2%[B]
Week 39	83.8	87.5	—	—	+28.3%[B]	+25.7%	+31.3%[B]	+41.9%[D]
QT (msec)								
Week 13	189.2	200.8	—	—	—	—	+17.2%[B]	+10.2%[B]
Week 39	200.0	217.5	—	—	—	—	+26.3%[C]	+10.7%[A]
Hematology [d]								
Eosinophil (n)								
Week 13	0.175	0.257	—	—	—	—	-53.1%	-64.6%[E]
Week 26	0.273	0.218	—	—	—	—	-76.2%[A]	-48.6%[D]
Week 39	0.323	0.190	—	—	—	—	-82.4%	-60.5%

2.6.7.7.5　　イヌ 9 ヵ月間経口投与毒性試験（続き）　　TOX-120-002

Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		2		6		18/12[a]	
No. of Animals [b] 3-month interim 9-month	M: 2 M: 4	F: 2 F: 4	M: 2 M: 4	F: 2 F: 4	M: 2 M: 4	F: 2 F: 4	M: 2 M: 4+2	F: 2 F: 4+2
Hemoglobin (g/dL)								
Week 13	15.52	—	—	—	—	—	-12.5%[B]	—
Week 26	16.23	—	—	—	—	—	-11.5%[B]	—
Week 39	16.28	—	—	—	—	—	-14.6%[B]	—
Biochemistry [d]								
AST (U/L)								
Week 13	26.3	27.0	—	—	+48%[D]	—	+124%[F]	+96%[F]
Week 26	30.0	31.8	—	—	+42%[A]	—	+103%[C]	+48%[A]
Week 39	23.0	20.3	—	—	—	—	+162%[E]	+170%[B]
ALP (U/L)								
Week 13	—	80.2	—	—	—	—	—	+29%[A]
Week 26	65.5	—	—	—	—	—	+103%[A]	—
Week 39	56.3	—	—	—	—	—	+146%[E]	—
Total bilirubin (g/dL)								
Week 13	—	0.128	—	—	—	—	—	+39%[B]
Week 39	—	0.138	—	—	—	—	—	+74%[D]
Creatinine (mg/dL)								
Week 13	0.80	—	—	—	—	—	+19%[B]	—
Week 26	0.85	—	—	—	—	—	+27%[A]	—
Week 39	0.83	0.70	—	—	—	—	+17%[A]	+31%[A]

2.6.7.7.5　　イヌ 9 ヵ月間経口投与毒性試験（続き）　　TOX-120-002

Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		2		6		18/12[a]	
No. of Animals [b] 3-month interim 9-month	M: 2 M: 4	F: 2 F: 4	M: 2 M: 4	F: 2 F: 4	M: 2 M: 4	F: 2 F: 4	M: 2 M: 4+2	F: 2 F: 4+2
Triglycerides (mg/dL)								
Week 26	32.0	—	—	—	—	—	+34%[A]	—
Week 39	39.3	50.3	—	—	—	+53%[A]	+64%[B]	+67%[B]
A/G-P (ratio)								
Week 13	1.465	1.468	—	—	—	—	-30%[B]	-21%[B]
Week 26	1.325	—	—	—	—	—	-27%[B]	—
Week 39	1.565	1.578	—	—	+15%[A]	—	-37%[C]	+27%[A]
T_3 (ng/dL)								
Week 39	108.8	100.2	—	—	—	—	-32%[B]	-30%[D]
Phosphorus (mg/dL)								
Week 13	5.298	—	—	—	—	—	+18%[B]	—
Creatinine Kinase (U/L)								
Week 26	154.5	—	—	—	—	—	+147%[B]	—
Week 39	91.5	87.5	—	—	+76%[A]	—	+207%[C]	+127%[E]
Albumin (g/dL)								
Week 13	3.55	3.37	—	+6%[A]	—	+8%[B]	-10%[B]	-7%[A]
Week 26	3.55	3.35	—	+7%[A]	—	—	-11%[A]	—
Week 39	4.03	3.80	—	—	—	—	-15%[C]	-8%[A]

2.6.7.7.5　イヌ 9 ヵ月間経口投与毒性試験（続き）　TOX-120-002

Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		2		6		18/12[a]	
No. of Animals [b] 3-month interim 9-month	M: 2 M: 4	F: 2 F: 4	M: 2 M: 4	F: 2 F: 4	M: 2 M: 4	F: 2 F: 4	M: 2 M: 4+2	F: 2 F: 4+2
Bone Parameters [d]								
1.25-dihydroxy Vitamin D_3 (pmol/L)								
Week 13	539.15	—	—	—	—	—	-27%[A]	—
Week 39	440.06	—	—	—	—	—	-51%[A]	—
25-hydroxy Vitamin D_3 (ng/mL)								
Week 13	41.03	28.87	—	—	—	—	-17.4%	+185%[E]
Week 39	56.00	50.87	—	—	—	—	-41%[A]	+2.1%
N-telopeptide; (nmol/L BCE/mmol/L Creatinine)								
Week 39	253.7	229.3	—	—	—	—	+153%[E]	+60%[A]
Body mineral density (g/cm^2)								
Whole body								
Week 13	0.336	—	—	—	—	—	-13%[C]	—
Week 39	0.372	—	—	—	—	—	-19%[F]	—
Lumbar vertebrae								
Week 13	0.554	0.533	—	—	—	—	-15%[C]	-9%[A]
Week 39	0.588	0.596	—	—	—	—	-21%[C]	-13%[B]
Organ weight relative to body weight (%)								
Lung								
Week 39	0.78400	0.83031	—	—	—	—	+58%[B]	+35%[B]
Spleen								
Week 39	0.66659	—	—	—	—	—	+119%[C]	—

2.6.7.7.5　　イヌ 9 ヵ月間経口投与毒性試験（続き）　　TOX-120-002

Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		2		6		18/12[a]	
No. of Animals [b] 3-month interim 9-month	M: 2 M: 4	F: 2 F: 4	M: 2 M: 4	F: 2 F: 4	M: 2 M: 4	F: 2 F: 4	M: 2 M: 4+2	F: 2 F: 4+2
Gross pathology								
No. examined Week 13	(2)	(2)	(2)	(2)	(2)	(2)	(0)	(2)
Kidney: discoloration pale	—	—	—	—	—	—	—	2
No. examined Week 39	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)
Kidney: discoloration pale	—	—	—	—	1	—	4	4
Lung: area raised	1	—	—	—	1	2	3	2
Histopathology								
No. examined Week 39	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)
Adrenal								
Deposits: pigment	—	—	—	—	—	—	1	1
Eye								
Infiltration: mononuclear cell	—	—	—	—	—	—	3	1
Kidney								
Degeneration/regeneration: tubular	—	—	1	—	4	2	4	4
Karyomegaly: tubular	—	—	2	—	4	3	4	4
Infiltration: mononuclear cell	1	—	—	—	—	—	2	2
Liver								
Deposits: pigment	—	—	—	—	2	1	4	4
Hepatocellular cytoplasmic acidophilic inclusion	—	—	—	—	—	—	3	2

2.6.7.7.5　イヌ 9 ヵ月間経口投与毒性試験（続き）　TOX-120-002

Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		2		6		18/12[a]	
No. of Animals [b] 3-month interim 9-month	M: 2 M: 4	F: 2 F: 4	M: 2 M: 4	F: 2 F: 4	M: 2 M: 4	F: 2 F: 4	M: 2 M: 4+2	F: 2 F: 4+2
No. examined Week 39	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)
Lung								
Infiltration: macrophage	—	—	2	1	1	1	4	4
Histiocytosis	—	—	—	—	—	1	3	2
Inflammation: interstitial	—	—	2	—	—	2	4	—
Spleen								
Infiltration: macrophage	—	—	—	—	—	—	4	3
Recovery Phase								
Noteworthy Findings	NA	NA	NA	NA	NA	NA	—	—

M = Male; F = Female; TK = toxicokinetic; NA = Not Applicable; — = Comparable to control animals or no treatment-related findings, PBMC = peripheral blood mononuclear cell

a Due to severe clinical signs and reduced body weights the dose level was decreased on Day 45 and 51 for males and females, respectively.

b Animals were administered GS 7340-02 for 3-month (2/sex/group) or 9-month (4/sex/group) with a 3 month post dose recovery phase (2/sex at 18/12 mg/kg/day). two males at 18/12 mg/kg/day dose group were euthanised prior to the completion of the first 3 months of treatment, consequently no males were included in the scheduled interim kill.

c One was euthanised on Day 45 due to its deteriorating clinical condition. The other was euthanized on Day 65 due to a gavage accident.

d For controls, group *means* are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data not on the percent

Significantly different from control group (group 1) value:

A $p \leq 0.05$

B $p \leq 0.01$

C $p \leq 0.001$ (Dunnett)

D $p \leq 0.05$

E $p \leq 0.01$

F $p \leq 0.001$ (Dunn)

2.6.7.7.6　　サル 28 日間経口投与毒性試験

Test Article: TAF (monofumarate)

Report Title:
A 28-Day Toxicity Study of GS-7340-02 and Tenofovir (GS-1278) Administered Orally to Rhesus Monkeys

Gilead Study No. P2000114 and P2000114-PK
[redacted]**Study No.** SBi 1050-11

Species/Strain: Rhesus monkey
Duration of Dosing: 4 weeks
Location: 4.2.3.2.7

Initial Age: 2.2 − 5.2 years old
Duration of Postdose: None
GLP Compliance: Yes

Date of First Dose: 16 January 2001
Method of Administration: Nasogastric gavage
Lot Number: [redacted]

Vehicle: 50 mmol/L Citric Acid

Special Features: Biochemical markers of bone marrow turnover, parathyroid serum levels, and ionized calcium and lactate levels in plasma, lymphocyte analysis, histopathological examination of bone.

No Observed Adverse Effect Level: 30 mg/kg/day TAF (monofumarate) (TFV data not shown)

Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		3		30	
Gender: Number of Animals (TK)	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3
Toxicokinetics (TFV): AUC (h•µg/mL)[a]						
Day 1	NA[b]		0.472		6.67	
Day 28	NA[b]		0.352		5.87	
Toxicokinetics: (TFV): C_{max} (µg/mL)						
Day 1	NA[b]		0.090		0.904	
Day 28	NA[b]		0.050		0.963	
Toxicokinetics: (TAF): AUC (h•µg/mL)[a]						
Day 1	NA		NC		NC	
Day 28	NA		NC		1.03	
Toxicokinetics: (TAF): C_{max} (µg/mL)						
Day 1	NA		NC		NC	
Day 28	NA		0.019		1.37	

2.6.7.7.6　　サル 28 日間経口投与毒性試験（続き）　　P2000114

Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		3		30	
Gender: Number of Animals (Main)	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3
Noteworthy Findings						
Died or sacrificed moribund	—	—	—	—	1[c]	—
Body Weight (%)[c]	4.1 kg		-9.7%		+2.4%	
Low Food Consumption (number of animals effected)	3	2	2	3	2	3
Clinical Observations						
Unformed or watery stools (number of animals effected)	2	1	2	1	2	2
Hematology[c]						
White blood cell count ($10^3/mm^3$)	15.1		-43.7%*		-22.5%	
Plasma Chemistry	No test article changes were observed					
Serum Chemistry						
Alkaline phosphatase (U/mL)	261		+43.3%		+54.4%*	
Lymphocyte Analysis	—	—	—	—	—	—
Urinalysis[c]						
Specific gravity [Day 7]	1.011		0%		-0.1%	
[Day 14]	1.007		-0.3%*		-0.1%	
[Day 28]	1.011		+0.2%		-0.3%	
Creatine (mg/dL) [Day 7]	36.3		+25.3%		+4.4%	
[Day 14]	28		-35.4%*		-36.4%	
[Day 28]	32.8		+48.2%		+58.8%	

2.6.7.7.6　　サル 28 日間経口投与毒性試験（続き）　　P2000114

Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		3		30	
Gender: Number of Animals (Main)	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3
Organ Weight	No test article changes were observed					
Gross Pathology	No test article changes were observed					
Routine Histopathology	No test article changes were observed					
Histopathologic Bone Evaluation	No test article changes were observed					
Tissue Analysis for Cytochrome c Oxidase, Citrate Synthase, mtDNA Content	No test article changes were observed					

M = Male; F = Female; TK = toxicokinetic; NA = Not Applicable; NC = Not calculated due to insufficient data; — = Comparable to control animals or no treatment-related findings

a　$AUC_{0-\infty}$ on Day 1 and AUC_{0-24} on Day 28

b　Values below the lower limit of quantitation

c　Euthanized on Day 18 – this animal had been dosed previously with TAF (monofumarate) in a single dose PK study (SBI 1006-11). Although it had been determined healthy prior to assignment to that study, it developed chronic diarrhea during the 5-day period prior to dosing in and this continued throughout that study, and also into this study. The animal was administered Pepto-Bismol and additional fluids, but still developed signs of dehydration by Day 5. The animal also exhibited signs of malaise. By Day 14 body weight had decreased 17% from prestudy weight. Microscopic evaluation of the GI tract was suggestive of bacterial infection.

d　For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences or fold change from controls are shown. Statistical significance is based on actual data not on the percent.

*　$p \leq 0.05$ (Dunnett's)

2.6.7.8　遺伝毒性試験：*in vitro*

2.6.7.8.1　細菌を用いる復帰突然変異試験

Test Article: TAF (monofumarate)

Report Title:
Salmonella – Escherichia coli/Mammalian-Microsome Reverse Mutation Assay with a Confirmation Assay with GS-7340-02

Gilead Study No. V990212
[redacted] **Study No.** 20900-0-409OECD

Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells
No. of Independent Assays: 2
Location: 4.2.3.3.1.1

Strains: *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*
No. of Replicate Cultures: 3
GLP Compliance: Yes

Metabolizing System: Aroclor™-induced rat liver S9
No. of Cells Analyzed/Cultured: ~10^8
Lot Number: [redacted]

Vehicle:
Dimethylsulfoxide (DMSO)
Vehicle for Positive Controls:
Deionized (DI) Water (sodium azide only); DMSO (all other positive controls)

Treatment: Plate incorporation for 52 ± 4 hours
Date of Treatment: initial 15 October 1999 / confirmatory 21 October 1999

Cytotoxic Effects: None

Genotoxic Effects: None

Metabolic Activation	Treatment	Dose Level (µg/plate)	Plate Incorporation – Initial Assay Revertants/Plate (Mean ± SD)				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2*uvr*A
Without Activation	DMSO	50 µL/plate	17 ± 6^N	96 ± 12^N	9 ± 5^N	5 ± 4^N	16 ± 6^N
	TAF (monofumarate)	100	14 ± 4^N	98 ± 10^N	8 ± 2^N	5 ± 1^N	21 ± 4^N
		333	21 ± 7^N	98 ± 13^N	12 ± 6^N	5 ± 2^N	21 ± 1^N
		1000	18 ± 3^N	90 ± 8^N	10 ± 3^N	7 ± 2^N	16 ± 2^N
		3330	14 ± 7^N	93 ± 2^N	16 ± 5^N	5 ± 2^N	18 ± 3^N
		5000	12 ± 2^R	84 ± 19^N	13 ± 6^N	8 ± 3^N	17 ± 1^N
	2-nitrofluorene	1.0	244 ± 32^N				
	sodium azide	2.0		796 ± 63^N	668 ± 60^N		
	ICR-191	2.0				564 ± 19^N	
	4-nitroquinoline-N-oxide	1.0					184 ± 24^N

2.6.7.8.1　　細菌を用いる復帰突然変異試験（続き）　　V990212

Metabolic Activation	Treatment	Dose Level (µg/plate)	Plate Incorporation – Initial Assay Revertants/Plate (Mean ± SD)				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2*uvr*A
With Activation	DMSO	50 µL/plate	31 ± 12[N]	146 ± 9[N]	18 ± 1[N]	9 ± 5 [N]	17 ± 3 [N]
	TAF (monofumarate)	100	30 ± 8[N]	117 ± 9[N]	12 ± 1[N]	10 ± 4[N]	16 ± 13[N]
		333	30 ± 2[N]	117 ± 18[N]	10 ± 3[N]	5 ± 3[N]	23 ± 2[N]
		1000	29 ± 4[N]	129 ± 10[N]	18 ± 6[N]	11 ± 3[N]	22 ± 4[N]
		3330	26 ± 3[N]	116 ± 18[N]	14 ± 2[N]	9 ± 3[N]	20 ± 2[N]
		5000	29 ± 3[N]	114 ± 26[N]	13 ± 7[N]	4 ± 4[N]	15 ± 3[N]
	benzo[a]pyrene	2.5	412 ± 35[N]				
	2-aminoanthracene	2.5		862 ± 132[N]	162 ± 22[N]	174 ± 12[N]	
	2-aminoanthracene	25.0					280 ± 36[N]

SD = Standard Deviation
N　　Normal
R　　Slightly reduced

2.6.7.8.1　　細菌を用いる復帰突然変異試験（続き）　　V990212

Metabolic Activation	Treatment	Dose Level (µg/plate)	Plate Incorporation – Confirmatory Assay Revertants/Plate (Mean ± SD)				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2*uvr*A
Without Activation	DMSO	50 µL/plate	20 ± 4[N]	85 ± 7[N]	13 ± 7[N]	4 ± 3 [N]	15 ± 2[N]
	TAF (monofumarate)	100	15 ± 8[N]	74 ± 3[N]	9 ± 5[N]	5 ± 2[N]	14 ± 2[N]
		333	22 ± 3[N]	80 ± 10[N]	13 ± 6[N]	6 ± 3[N]	19 ± 4[N]
		1000	23 ± 1[N]	92 ± 11[N]	9 ± 5[N]	4 ± 0[N]	16 ± 5[N]
		3330	20 ± 4[N]	96 ± 7[N]	9 ± 4[N]	6 ± 5[N]	19 ± 3[N]
		5000	15 ± 3[N]	83 ± 12[N]	11 ± 3[N]	6 ± 2[N]	15 ± 6[N]
	2-nitrofluorene	1.0	234 ± 17[N]				
	sodium azide	2.0		752 ± 30[N]	615 ± 28[N]		
	ICR-191	2.0				614 ± 58[N]	
	4-nitroquinoline-N-oxide	1.0					196 ± 50[N]
With Activation	DMSO	50 µL/plate	27 ± 4[N]	109 ± 23[N]	10 ± 2[N]	7 ± 3[N]	15 ± 6[N]
	TAF (monofumarate)	100	25 ± 2[N]	94 ± 14[N]	11 ± 4[N]	5 ± 2[N]	15 ± 2[N]
		333	28 ± 3[N]	103 ± 11[N]	9 ± 4[N]	6 ± 2[N]	20 ± 9[N]
		1000	27 ± 2[N]	89 ± 7[N]	13 ± 5[N]	10 ± 3[N]	23 ± 6[N]
		3330	21 ± 4[N]	107 ± 18[N]	14 ± 3[N]	7 ± 1[N]	20 ± 2[N]
		5000	26 ± 1[N]	90 ± 6[N]	11 ± 2[N]	7 ± 4[N]	21 ± 6[N]
	benzo[a]pyrene	2.5	441 ± 10[N]				
	2-aminoanthracene	2.5		1225 ± 162[N]	158 ± 8[N]	193 ± 24[N]	
	2-aminoanthracene	25.0					242 ± 15[N]

SD = Standard Deviation
N　　Normal

2.6.7.8.2　　マウスリンフォーマ *tk* 試験

Test Article: TAF (monofumarate)

Report Title: L5178Y TK$^{+/-}$ Mouse Lymphoma Forward Mutation Assay with a Confirmatory Assay with GS-7340-02

Gilead Study No. V990213
[redacted] **Study No.** 20900-0-431 ICH

Test for Induction of: Forward gene mutation at TK locus

Cell Line: L5178Y/TK$^{+/-}$

Metabolizing System: Aroclor 1254-induced rat liver (S9)

No. of Independent Assays: 2

No. of Replicate Cultures: 1

No. of Cells Analyzed/Culture:
Treated: 6×10^6 Cloned: 3×10^6

Location: 4.2.3.3.1.2

GLP Compliance: Yes

Lot Number: [redacted]

Vehicle for Test Article:
Dimethylsulfoxide (DMSO)

Vehicle for Positive Controls:
Cell culture grade water for methyl methanesulfonate; DMSO for methylcholanthrene

Treatment: 4 hours without and with S9 (Initial Assay)

Date of Treatment: initial 19 October 1999 / confirmatory 09 November 1999

Cytotoxic Effects: None

Genotoxic Effects: None

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (µg/mL)	RSG (%)[a]	Cloning Efficiency[b]	Relative Growth[c]	Mutant Frequency (10^{-6})[d]
Without Activation 4 hour Treatment	DMSO	1% (µL/mL)	113.3	92.5	104.8	57.4
		1% (µL/mL)	103.1	93.9	96.8	57.5
		1% (µL/mL)	83.7	113.6	95.1	53.4
	TAF (monofumarate)	39.3	77.1	92.9	71.6	53.6
		78.5	87.8	89.4	78.5	51.9
		157	74.1	112.5	83.3	53.9
		313	109.9	93.5	102.8	69.4
		625	88.5	105.2	93.1	70.0
		1250	78.8	94.1	74.2	67.1
		2500	55.1	106.1	58.4	77.3
		5000	28.4	88.3	25.1	106.6
	Methyl methanesulfonate	6.5	88.1	88.1	77.6	149.6
		13	67.7	61.2	41.4	252.8

2.6.7.8.2　　マウスリンフォーマ *tk* 試験（続き）　V990213

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (µg/mL)	RSG (%)[a]	Cloning Efficiency[b]	Relative Growth[c]	Mutant Frequency (10^{-6})[d]
With Activation 4 hour Treatment	DMSO	1% (µL/mL)	119.9	106.1	127.2	61.2
		1% (µL/mL)	92.5	96.9	89.6	64.3
		1% (µL/mL)	87.7	96.9	85.0	72.9
	TAF (monofumarate)	1250	110.4	93.4	103.2	91.1
		1500	123.1	94.1	115.8	99.3
		2000	91.5	98.7	90.3	82.7
		2500	80.8	86.0	69.5	126.0
		3000	80.2	102.4	82.1	82.2
		3500	53.5	121.5	65.0	85.2
		4000	61.2	103.7	63.5	84.6
		4500	46.1	98.9	45.6	94.5
	Methylcholanthrene	2	79.5	81.1	64.5	310.8
		4	75.6	113.6	85.9	272.2

a　Cum. RSG = Cumulative Suspension Growth Relative to the Average Vehicle Control Suspension Growth
b　Cloning Efficiency = Total Viable Colony Count / Number of Cells seeded × 100
c　Relative Growth = (Relative Suspension Growth × Relative Cloning Efficiency) / 100
d　Mutant Frequency = (Total Mutant Colonies/Total Viable Colonies) × (2×10^{-4})
Decimal is moved to express the frequency in units of 10^{-6}
Expressed as Total Mutant Frequency

2.6.7.9　遺伝毒性試験：*in vivo*

2.6.7.9.1　マウス小核試験

Test Article: TAF (monofumarate)

Report Title: *In Vivo* Mouse Micronucleus Assay with GS-7340-02

Gilead Study No. M2000113
[redacted] **Study No.** 21816-0-445OECD

Test for Induction of: Bone marrow micronuclei
Species/Strain: Mouse/Crl: CD-1 (ICR)
Age: 9 weeks
No. of Cells Evaluated / Animal: 2000
Special Features: None

Treatment Schedule: Single dose
Sampling Time: 24 and 48 hours after dosing
Method of Administration: Oral Gavage
Vehicle: 50 mmol/L citric acid
Positive Control Vehicle: Deionized (DI) Water

Location: 4.2.3.3.2.1
GLP Compliance: Yes
Date of Treatment: 31 October 2000
Lot Number: [redacted]

Toxic/Cytotoxic Effects: Cytotoxicity to the bone marrow was noted at the 2000 mg/kg dose group at the 24 and 48 hour harvest timepoints.

Genotoxic Effects: TAF (monofumarate) was evaluated as negative in the mouse bone marrow micronucleus assay under the conditions of the protocol.

Treatment	Dose (mg/kg)	Number of Males	Harvest Time (Hours)	Mean Ratio PCE:NCE (±SE) Male	Mean % MNPCE (±SE) Male
50 mmol/L Citric Acid	20 mL/kg	5	24	0.76 ± 0.08	0.03 ± 0.01
		5	48	0.78 ± 0.06	0.04 ± 0.02
TAF (monofumarate)	500	5	24	0.74 ± 0.02	0.08 ± 0.03
	1000	5	24	0.74 ± 0.07	0.10 ± 0.05
	2000	5	24	0.49 ± 0.07**	0.09 ± 0.02
		5	48	0.24 ± 0.01**	0.12 ± 0.04
Cyclophosphamide	80	5	24	0.65 ± 0.05	2.71 ± 0.39*

GLP = Good Laboratory Practice; MNPCE = Micronucleated PCEs; NCE = Normochromatic erythrocyte; PCE = Polychromatic erythrocyte; SE = Standard Error
*　Significantly greater than the corresponding vehicle control, $p < 0.01$
**　Significantly less than the corresponding vehicle control, $p \leq 0.05$

2.6.7.10　がん原性試験

2.6.7.10.1　マウスがん原性試験

Test Article: TDF

Report Title: An Oral Carcinogenicity Study of Tenofovir Disoproxil Fumarate (TDF) in the Albino Mouse
Gilead Study No. M990205
Species/Strain: Mouse/ Crl:CD-1(ICR)
Duration of Dosing: 104 Weeks
Location: 4.2.3.4.1.1
Initial Age: 6 weeks
Method of Administration: Oral gavage
GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: 10 October 2000 (Main)
Vehicle/Formulation: Suspension vehicle
Lot Number: [redacted]

Basis for High-Dose Selection:
The dose levels were selected according to the potential human exposure, existing toxicity data and limitations imposed by the test article. A previous 13 week oral toxicity study indicated that 600 mg/kg/day (60 mg/mL) is the highest dose level of TDF that may be practically administered to albino mice.

Special Features:
Separate populations for toxicokinetic evaluations were included in the study: Groups of 30 males and 30 females were sampled on Days 1 and 180 for the high dose only. Animals were euthanized on completion of the blood collection & subjected to necropsy. Before assignment of animals to a treatment group, 10 males & 10 females animals, selected randomly, were subjected to a health screen.

Dose (mg/kg/day)	0 (Vehicle)		100		300		600	
Number Evaluated	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60
Toxicokinetics								
$AUC_{0\text{-}24}$ (µg•h/mL) Day 1	—	—	—	—	—	—	30.9	35.1
$AUCss_{0\text{-}24}$ (µg•h/mL) Day 180	—	—	—	—	—	—	44.3	50.9
Number of Animals								
At Start	60	60	60	60	60	60	60	60
Died/Sacrificed Moribund	33	39	37	32	31	29	40	43
Terminal Sacrifice	27	21	23	28	29	31	20	17
Survival (%)	45	35	38	47	48	52	33	28
Body Weight (%)[a]	38.65 g	30.79 g	-4.4*	+1.5	-3.4	-1.6	-3.7	-0.06
Food Consumption (%)[a]	37.4 g	39.4 g	+8.6	+2.3	+5.1	+0.3	+9.9*	-0.3

2.6.7.10.1　　マウスがん原性試験（続き）　M990205

Dose (mg/kg/day)	0 (Vehicle)		100		300		600	
Number Evaluated	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60
Number of Animals with Neoplastic Lesions								
Abdomen								
Leiomyosarcoma	—	—	1	—	—	—	—	1
Osteosarcoma	—	—	—	1	—	—	—	—
Rhabdomyosarcoma (metastasis)	—	—	1	—	—	—	—	—
Sarcoma	—	—	—	1	—	—	—	—
Adrenal								
Adenoma: cortical	—	1	—	1	1	1	—	—
Sarcoma: fusiform cell	1	—	—	1	—	—	—	—
Benign pheochromocytoma	—	—	—	2	—	—	—	—
Sarcoma (metastasis)	—	—	—	1	—	—	—	—
Bone − Femur								
Hemangiosarcoma	—	—	1	—	—	—	—	—
Bone − Misc.								
Hemangiosarcoma	1	—	—	—	—	—	—	—
Osteosarcoma	—	—	—	1	—	—	—	—
Rhabdomyosarcoma	—	—	—	—	—	1	—	—
Brain								
Malignant meningioma	1	—	—	—	—	—	—	—
Cecum								
Leiomyoma	—	—	—	—	—	1	—	—

2.6.7.10.1　　マウスがん原性試験（続き）　M990205

Dose (mg/kg/day)	0 (Vehicle)		100		300		600	
Number Evaluated	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60
Diaphragm								
Rhabdomyosarcoma (metastasis)	—	—	1	—	—	—	—	—
Sarcoma(metastasis)	—	—	—	1	—	—	—	—
Number of Animals with Neoplastic Lesions, continued								
Duodenum								
Adenoma	—	—	—	—	—	—	—	1
Adenocarcinoma	—	—	—	—	—	—	1	1
Epididymis								
Rhabdomyosarcoma (metastasis)	—	NA	1	NA	—	NA	—	NA
Eye								
Meningioma	1	—	—	—	—	—	—	—
Carcinoma (metastasis)	1	—	—	—	—	—	—	—
Fat								
Leiomyosarcoma (metastasis)	—	1	—	—	—	—	—	—
Harderian Gland								
Adenoma	1	2	5	—	3	3	7	3
Head								
Hemangiosarcoma	—	—	1	—	—	—	—	—
Hemolymphoreticular Tissue								
Malignant lymphoma	3	10	1	17	3	4	2	5
Histiocytic sarcoma	—	9	1	4	—	5	1	1

2.6.7.10.1　　マウスがん原性試験（続き）　M990205

Dose (mg/kg/day)	0 (Vehicle)		100		300		600	
Number Evaluated	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60
Number of Animals with Neoplastic Lesions, continued								
Jejunum								
Adenoma	—	—	—	—	1	—	—	—
Adenocarcinoma	—	—	—	1	1	—	—	1
Kidney								
Carcinoma: tubular cell	—	—	1	—	—	—	—	—
Sarcoma (metastasia)	—	—	—	1	—	—	—	—
Liver								
Adenoma: hepatocellular	5	1	1	1	2	—	4	9
Carcinoma: hepatocellular	6	—	2	—	—	—	—	—
Hemangioma	1	—	—	—	—	—	2	—
Hemangiosarcoma	2	—	1	—	—	2	—	1
Leiomyosarcoma (metastasis)	—	1	1	—	—	—	—	—
Rhabdomyosarcoma (metastasis)	—	—	1	—	—	—	—	—
Carcinoma: metastasis	1	—	—	—	—	—	—	—
Lung								
Carcinoma: metastasis	1	1	—	—	—	1	—	—
Adenoma: alveolar/bronchiolar	10	10	8	9	11	5	10	7
Adenocarcinoma: alveolar/bronchiolar	9	5	7	2	9	2	9	1
Mammary carcinoma (metastasis)	—	1	—	—	—	—	—	—
Rhabdomyosarcoma (metastasis)	—	—	1	—	—	—	—	—

2.6.7.10.1　　マウスがん原性試験（続き）　M990205

Dose (mg/kg/day)	0 (Vehicle)		100		300		600	
Number Evaluated	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60
Number of Animals with Neoplastic Lesions, continued								
Lung, continued								
Sarcoma (metastasis)	—	—	—	1	—	—	—	—
Carcinosarcoma (metastasis)	—	—	—	—	—	—	—	1
Fibroma	—	—	—	—	—	1	—	—
Lymph Node								
Hemangioma	1	—	—	—	—	—	—	—
Carcinoma (metastasis)	1	—	—	—	—	—	—	—
Mammary Carcinoma (metastasis)	—	1	—	—	—	—	—	—
Lymph Node Mesenteric								
Hemangioma	1	1	—	—	—	—	—	—
Rhabdomyosarcoma (metastasis)	—	—	1	—	—	—	—	—
Mammary Gland								
Adenocarcinoma	—	3	—	—	—	—	—	—
Adenoacanthoma	—	1	—	—	—	1	—	—
Muscle Skeletal								
Hemangioma	—	1	—	—	—	—	—	—
Muscle Skeletal Misc.								
Rhabdomyosarcoma	—	—	1	—	—	—	—	—
Sarcoma (Metastasis)	—	—	—	1	—	—	—	—

2.6.7.10.1　　マウスがん原性試験（続き）　M990205

Dose (mg/kg/day)	0 (Vehicle)		100		300		600	
Number Evaluated	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60
Number of Animals with Neoplastic Lesions, continued								
Ovary								
Cystadenoma	NA	1	NA	1	NA	—	NA	—
Carcinoma: tubulostromal	NA	—	NA	1	NA	—	NA	—
Malignant granulosa-theca cell tumor	NA	1	NA	—	NA	—	NA	—
Leiomyosarcoma (metastasis)	NA	1	NA	—	NA	—	NA	—
Carcinoma (metastasis)	NA	—	NA	—	NA	1	NA	—
Pancreas								
Adenocarcinoma (metastasis)	—	—	—	—	1	—	—	—
Carcinoma (metastasis)	—	—	—	—	—	1	—	—
Leiomyosarcoma (metastasis)	—	1	—	—	—	—	—	—
Rhabdomyosarcoma (metastasis)	—	—	1	—	—	—	—	—
Pituitary								
Adenoma: pars distalis	1	1	—	3	—	3	—	—
Adenoma: pars intermedia	—	—	—	—	—	1	—	—
Skin Misc.								
Keratoacanthoma	—	—	—	—	—	1	—	—
Spleen								
Hemangioma	—	—	1	—	—	—	—	—
Hemangiosarcoma	1	—	3	—	1	1	—	—
Sarcoma (metastasis)	—	—	1	1	—	—	—	—

2.6.7.10.1　　マウスがん原性試験（続き）　M990205

Dose (mg/kg/day)	0 (Vehicle)		100		300		600	
Number Evaluated	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60
Number of Animals with Neoplastic Lesions, continued								
Stomach								
Adenoma	1	—	—	—	—	—	—	—
Carcinoma (metastasis)	—	—	—	—	—	1	—	—
Papilloma	—	1	—	—	—	1	—	—
Leiomyosarcoma (metastasis)	—	1	—	—	—	—	—	—
Rhabdomyosarcoma (metastasis)	—	—	1	—	—	—	—	—
Sarcoma (metastasis)	—	—	—	1	—	—	—	—
Subcutaneous Tissue								
Hemangiosarcoma	1	—	—	—	—	—	—	—
Fibrosarcoma	1	—	—	—	—	—	1	—
Rhabdomyosarcoma (metastasis)	—	—	1	—	—	1	—	—
Tail								
Hemangioma	1	—	—	—	—	1	—	—
Testis								
Adenoma: interstitial cell	1	NA	1	NA	2	NA	—	NA
Adenoma: rete testis	2	NA	—	NA	—	NA	—	NA
Thyroid								
Adenoma: follicular cell	1	—	—	—	—	—	—	—
Carcinoma: follicular cell	—	1	—	—	—	1	—	—

2.6.7.10.1　　マウスがん原性試験（続き）　M990205

Dose (mg/kg/day)	0 (Vehicle)		100		300		600	
Number Evaluated	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60
Number of Animals with Neoplastic Lesions, continued								
Urinary Bladder								
Carcinoma: transitional cell	1	—	—	—	—	—	—	—
Uterus								
Adenocarcinoma: endometrial	NA	—	NA	—	NA	1	NA	1
Carcinosarcoma	NA	—	NA	—	NA	—	NA	1
Sarcoma: endomertrial stromal	NA	1	NA	—	NA	2	NA	1
Leiomyoma	NA	—	NA	1	NA	—	NA	2
Leiomyosarcoma	NA	2	NA	2	NA	—	NA	—
Fibroma	NA	—	NA	1	NA	—	NA	—
Carcinoma: squamous cell	NA	—	NA	—	NA	1	NA	—
Benign granular cell Tumor	NA	—	NA	—	NA	1	NA	—
Hemangioma	NA	—	NA	1	NA	—	NA	—
Hemangiosarcoma	NA	1	NA	2	NA	2	NA	1
Sarcoma (metastasis)	NA	—	NA	1	NA	—	NA	—
Polyp: endometrial stromal	NA	6	NA	5	NA	3	NA	4
Vagina								
Osteosarcoma (metastasis)	NA	—	NA	1	NA	—	NA	—

2.6.7.10.1　　マウスがん原性試験（続き）　M990205

Dose (mg/kg/day)	0 (Vehicle)		100		300		600	
Number Evaluated	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60
Gross Pathology								
Duodenum								
Dilation	3	—	4	3	1	6	9	11
Thickening	4	1	2	2	3	2	5	9
Mass	—	—	—	—	—	—	1	2
Jejunum								
Dilatation	2	2	5	3	2	7	8	9
Ileum								
Dilatation	2	1	5	3	3	5	6	6
Cecum								
Dilatation	1	1	3	2	1	2	4	5
Liver								
Surface irregular	—	2	1	2	—	5	4	9
Mass	13	2	4	3	—	2	5	10
Non-Neoplastic Lesions								
Bone Marrow								
Hypercellularity: myeloid	6	11	4	7	8	12	21	20
Duodenum								
Hyperplasia: villous/mucosal	—	2	7	6	26	23	32	27
Atrophy: villous/mucosal	—	—	—	1	1	1	2	4
Kidney								
Karyomegaly: tubular	—	—	—	—	—	1	3	8

2.6.7.10.1　　マウスがん原性試験（続き）　M990205

Dose (mg/kg/day)	0 (Vehicle)		100		300		600	
Number Evaluated	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60
Liver								
Basophilic cell focus	3	1	—	1	—	3	—	4
Eosinophilic cell focus	2	—	1	2	3	7	8	8
Hypertrophy: hepatocellular	9	6	14	6	22	27	39	46
Cyto/karyomegaly	16	2	9	4	21	27	35	36
Inclusions: nuclear	4	1	8	—	12	13	33	26
Necrosis: single cell	7	5	1	2	11	7	22	18
Proliferation: sinusoidal lining cells	3	2	3	3	7	15	20	25
Testis								
Mineralization: vascular	—	NA	1	NA	6	NA	17	NA
Tumor analysis								
Liver-hepatocellular adenoma	—	—	—	—	—	—	—	P = 0.0037[b]
Harderian gland adenoma	—	—	—	—	—	—	P = 0.0098[b]	—

— = Comparable to control animals or no treatment-related findings; NA = Not Applicable

a　At 6 months, for controls group means are shown. For treated groups percent differences from controls are shown. Statistical differences are based upon the actual data not percent differences.

b　Pair wise test

*　$p < 0.05$, Dunnett's "t" test

2.6.7.10.2　　ラットがん原性試験

Test Article: TDF

Report Title: An Oral Carcinogenicity Study of Tenofovir Disoproxil Fumarate (TDF) in the Albino Rat
Gilead Study No. R990204
Species/Strain: Rat/ Sprague Dawley
Duration of Dosing: 104 Weeks
Location: 4.2.3.4.1.2
Initial Age: 6 Weeks
Method of Administration: Oral gavage
GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: 23 February 2000 (Main)
Vehicle/Formulation: Suspension vehicle
Lot Number: [redacted]

Basis for High-Dose Selection:
Toxicity-based endpoint. The high dose was based on toxicity (GI tract toxicity, kidney tubular karyomegaly and bone toxicity) observed in a 13/42 week rat study. On day 10 the dose level for Group 2 was increased to 300 mg/kg/day.

Special Features:
Separate populations for toxicokinetic evaluation were included in the study: Initial TK group (Set 1) comprised of 16 males and 16 females. Blood samples were taken on days 1 & 30. Animals euthanized on day 30 & subjected to necropsy. An additional group of TK animals were added to the study (Group 6, Set 2) to obtain plasma data from Day 1, 30, 60, and 90 at the revised dose level of 300 mg/kg/day. Animals euthanised on day 91 & subjected to necropsy. Additional populations of animals of 24 males and 24 females were added to Group 1 (Control), 2 (10/300 mg/kg/day), 3 (30 mg/kg/day) and 4 (100 mg/kg/day) to evaluate TK response for a period of 26 Weeks (Set 3). Animals euthanized on day 182 & subjected to necropsy. Before assignment of animals to a treatment group, 10 males & 10 females animals, selected randomly, were subjected to a health screen.

Dose (mg/kg/day)	0 (Vehicle)		10/300[a]		30		100	
Number Evaluated	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60
Toxicokinetics (TFV)								
$AUCss_{0\text{-}24}$ (µg•h/mL) Day 180	NA	NA	16.69	15.72	2.70	3.06	6.60	7.46
Number of Animals								
At Start	60	60	60	60	60	60	60	60
Died/Sacrificed Moribund[b]	42	44	42	32	42	45[c]	38	43
Terminal Sacrifice	18	16	18	28	18	15	22	17
Survival (%)	30	27	30	47	30	25	37	28
Body Weight (%) (Week 26)[d]	644.8 g	363.2 g	-5.5*	-3.7	+2.0	+0.6	-2.9	-1.1
Food Consumption (%) (Week 25-26)[d]	206.4 g	144.0 g	-1.5	+5.6	-0.2	+2.8	-3.5	+3.9

2.6.7.10.2　　ラットがん原性試験（続き）　R990204

Dose (mg/kg/day)	0 (Vehicle)		10/300[a]		30		100	
Number Evaluated	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60
Number of Animals with Neoplastic Lesions								
Abdomen								
Sarcoma	—	—	—	—	—	—	1	—
Adrenal								
Adenoma: cortical	—	2	—	—	1	—	—	—
Malignant Pheochromocytoma	1	—	—	2	1	—	—	—
Benign pheochromocytoma	—	—	3	1	1	1	3	—
Metastasis	—	1	—	—	—	—	—	—
Brain								
Malignant astrocytoma	—	1	1	1	3	—	2	1
Malignant mixed glioma	—	—	—	—	—	—	1	—
Metastasis	2	2	—	1	—	2	—	1
Benign granular cell Tumor	—	1	—	—	—	—	—	—
Cavity Cranial								
Metastasis	—	—	—	1	—	—	—	—
Clitoral Gland								
Carcinoma: squamous cell	NA	—	NA	—	NA	—	NA	1
Eye								
Malignant schwannoma	—	—	—	1	—	—	—	—
Harderian Gland								
Metastasis	—	—	—	1	—	—	—	—

2.6.7.10.2　　ラットがん原性試験（続き）　R990204

Dose (mg/kg/day)	0 (Vehicle)		10/300[a]		30		100	
Number Evaluated	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60
Number of Animals with Neoplastic Lesions, continued								
Heart								
Metastasis	—	1	—	—	—	—	—	—
Benign schwannoma: Endocardial	—	1	—	—	—	—	2	—
Hemolymphoreticular Tissue								
Malignant lymphoma	—	2	1	—	—	2	—	1
Histiocytic sarcoma	2	—	1	1	2	2	2	—
Ileum								
Adenocarcinoma	1	—	—	—	1	—	—	—
Jejunum								
Adenocarcinoma	—	—	—	—	1	—	—	—
Kidney								
Carcinoma: tubular cell	—	—	—	—	1	—	—	—
Adenoma: tubular cell	1	—	—	—	—	—	—	—
Renal mesenchymal tumor	—	—	—	—	1	—	—	—
Liver								
Carcinoma: hepatocellular	3	—	1	—	1	—	1	—
Adenoma: hepatocellular	1	1	2	—	—	—	—	—
Cholangioma	—	—	—	—	—	—	1	—
Cholangiocarcinoma	1	—	1	—	—	—	—	—
Metastasis	1	—	—	—	—	—	—	—

2.6.7.10.2　　ラットがん原性試験（続き）　R990204

Dose (mg/kg/day)	0 (Vehicle)		10/300[a]		30		100	
Number Evaluated	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60
Number of Animals with Neoplastic Lesions, continued								
Lung								
Carcinoma: metastasis	—	—	1	1	1	2	—	2
Adenoma: Alveolar/bronchiolar	—	—	2	—	2	—	3	—
Metastasis	—	1	—	—	—	—	—	—
Lymph node								
Metastasis	1	—	—	—	2	—	—	—
Lymph Node Mandibular								
Metastasis	—	—	—	1	—	—	—	—
Mammary Gland								
Fibroadenoma	1	23	2	25	1	23	—	20
Adenoma	—	3	—	2	—	1	—	2
Adenocarcinoma	—	14	—	11	—	13	—	10
Nerve sciatic								
Metastasis	—	—	—	1	—	—	—	—
Ovary								
Benign luteoma	NA	1	NA	—	NA	—	NA	—
Benign granulosa-theca cell tumor	NA	—	NA	2	NA	2	NA	2
Malignant schwannoma	NA	—	NA	1	NA	—	NA	—
Pancreas								
Adenoma: acinar cell	—	—	—	—	1	—	—	—
Carcinoma: islet cell	8	3	7	1	10	2	12	6

2.6.7.10.2　　ラットがん原性試験（続き）　R990204

Dose (mg/kg/day)	0 (Vehicle)		10/300[a]		30		100	
Number Evaluated	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60
Number of Animals with Neoplastic Lesions, continued								
Pancreas, continued								
Adenoma: islet cell	4	—	6	2	5	2	2	1
Parathyroid Gland								
Adenoma	—	—	—	—	1	—	—	—
Pituitary								
Carcinoma: pars distalis	3	2	—	2	—	2	—	1
Adenoma: pars distalis	35	52	25	39	30	47	28	42
Adenoma: pars intermedia	3	—	—	1	—	—	—	—
Skin Misc.								
Papilloma: squamous cell	1	—	1	—	3	—	—	—
Carcinoma: squamous cell	1	2	1	—	1	—	1	1
Keratoacanthoma	—	—	1	1	1	—	4	—
Adenoma: sebaceous	—	—	—	—	—	—	1	—
Carcinoma: basal cell	—	1	1	—	—	—	2	—
Adenoma: basal cell	—	—	—	—	—	—	1	—
Fibrosarcoma	—	—	—	—	1	—	—	—
Histiocytoma	—	1	—	—	—	—	—	—
Spleen								
Hemangioma	—	—	—	—	1	—	—	—
Spinal Cord, Cervical								
Benign astrocytoma	—	—	—	1	—	—	—	—

2.6.7.10.2　　ラットがん原性試験（続き）　R990204

Dose (mg/kg/day)	0 (Vehicle)		10/300[a]		30		100	
Number Evaluated	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60
Number of Animals with Neoplastic Lesions, continued								
Subcutaneous Tissue								
Sarcoma	—	—	1	—	—	—	—	—
Fibroma	2	1	2	—	—	—	2	—
Fibrosarcoma	1	1	1	—	—	1	—	—
Lipoma	—	—	3	2	—	2	—	1
Tail								
Fibrosarcoma	1	—	—	—	—	—	1	—
Osteosarcoma	—	—	—	—	—	1	—	—
Testis								
Adenoma: intestitial cell	2	NA	2	NA	1	NA	—	NA
Carcinoma: interstitial cell	—	NA	—	NA	1	NA	—	NA
Adenoma: rete testis	—	NA	—	NA	1	NA	—	NA
Thorax								
Liposarcoma	—	—	—	—	1	—	—	—
Thyroid								
Adenoma: follicular cell	2	—	3	—	—	1	1	1
Carcinoma: follicular cell	—	—	—	—	2	1	—	—
Adenoma: C-cell	4	4	4	6	2	3	3	2
Carcinoma: C-cell	2	1	1	—	—	—	1	—
Tongue								
Papilloma: squamous cell	—	—	—	—	1	—	1	—

2.6.7.10.2　　ラットがん原性試験（続き）　R990204

Dose (mg/kg/day)	0 (Vehicle)		10/300[a]		30		100	
Number Evaluated	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60
Number of Animals with Neoplastic Lesions, continued								
Tongue, continued								
Sarcoma	—	—	—	—	—	—	—	1
Urinary Bladder								
Papilloma: transitional cell	—	—	—	—	—	1	1	—
Uterus								
Polyp: endometrial stromal	NA	2	NA	11	NA	4	NA	3
Benign granular cell tumor	NA	3	NA	—	NA	—	NA	—
Vagina								
Polyp	NA	—	NA	1	NA	—	NA	1
Benign granular cell tumor	NA	—	NA	—	NA	1	NA	—
Papilloma: squamous cell	NA	—	NA	1	NA	—	NA	—
Gross Pathology	—	—	—	—	—	—	—	—
Histopathology − Non-Neoplastic Findings								
Kidney								
Karyomegaly, tubular	—	—	29	17	1	—	5	—
Chronic progressive nephropathy	46	23	29	11	47	16	38	13
Tumor Analysis								
Uterus – Polyp:endometrial Stromal Data	NA	P = 0.0053[#]	NA	P = 0.0065[#]	NA	—	NA	—

NA = Not Applicable; # = Pair wise test; * = P < 0.05, Dunnett's t-test; — = Comparable to control animals or no treatment-related findings; F = female; M = male

a　Dose increased on Day 10 from 10 to 300 mg/kg/day.
b　Including accidental deaths
c　Terminated at Week 103
d　For control group means are shown. For treated groups percent differences from controls are shown. Statistical differences are based upon the actual data not percent differences.

2.6.7.11　生殖発生毒性試験：　重要な試験以外の試験

Test Article: TAF (monofumarate)

Species / Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Dosing Period	Doses (mg/kg)	No. Per Group	Noteworthy Findings	Gilead Study No. (CRO Name and Study No.)/Location
Rats / Sprague-Dawley	Oral Gavage (0.1% (v/v) Tween 20, 0.1% (w/v) hydroxypropylmethyl-cellulose (HPMC) K100LV prepared in ultra-pure water)	12 days (GD 6-17)	5, 100, 200	8F/group	Decreased body weight gain (-18%) and food consumption at 200 mg/kg/day. NOAEL for maternal toxicity: 100 mg/kg/day NOAEL for embryo-fetal development: 200 mg/kg/day	TX-120-2001[a] ([redacted] 902244) /4.2.3.5.2.1

Dose (mg/kg/day)	GD	C_{max} (µg/mL)	AUC_{0-t} (µg•h/mL)
TFV			
5	6	0.109	0.17
	17	0.218	0.41
100	6	4.36	12.90
	17	5.71	20.6
200	6	6.94	26.9
	17	5.92	35.7
TAF			
5	6	NC	NC
	17	NC	NC
100	6	0.209	NC
	17	0.773	NC
200	6	0.215	NC
	17	0.397	0.649

NC = insufficient data to calculate

2.6.7.11　　生殖発生毒性試験：　　重要な試験以外の試験（続き）

Test Article: TAF (monofumarate)

<table>
<tr><th>Species / Strain</th><th>Method of Administration (Vehicle/Formulation)</th><th>Dosing Period</th><th>Doses (mg/kg)</th><th>No. Per Group</th><th>Noteworthy Findings</th><th>Gilead Study No. (CRO Name and Study No.) /Location</th></tr>
<tr><td>Rabbit/NZW</td><td>Oral Gavage
(0.1% (v/v) Tween 20, 0.1% (w/v) hydroxypropylmethyl-cellulose (HPMC) K100LV prepared in ultra-pure water)</td><td>7 days</td><td>0, 20, 50, 75</td><td>3F/group</td><td>Slight decrease in cumulative body weight gain at 50 and 75 mg/kg/day
The NOAEL for this study was determined to be 75 mg/kg/day
(AUC_{0-t} = 1.2 and 10.1 µg•h/mL for TAF and TFV, respectively)</td><td>TX-120-2003
([redacted] 902246)
/4.2.3.5.2.3</td></tr>
<tr><td>Rabbits / NZW</td><td>Oral Gavage
(0.1% (v/v) Tween 20, 0.1% (w/v) hydroxypropylmethyl-cellulose (HPMC) K100LV prepared in ultra-pure water)</td><td>14 days (GD 7-20)</td><td>0, 5, 25, 50, 100</td><td>6F/group</td><td>Maternal effects: slight decreased body weights and food intake at 100 mg/kg/day. No evidence of embryolethality, fetotoxicity or teratogenicity at any dose level.
NOAEL for maternal toxicity: 50 mg/kg/day
NOAEL for embryo-fetal development: > 100 mg/kg/day
<table>
<tr><th>Dose (mg/kg/day)</th><th>GD</th><th>C_{max} (µg/mL)</th><th>AUC_{0-t} (µg•h/mL)</th></tr>
<tr><td colspan="4">TFV</td></tr>
<tr><td rowspan="2">5</td><td>7</td><td>0.227</td><td>1.23</td></tr>
<tr><td>20</td><td>0.187</td><td>1.56</td></tr>
<tr><td rowspan="2">25</td><td>7</td><td>0.922</td><td>5.23</td></tr>
<tr><td>20</td><td>0.907</td><td>6.01</td></tr>
<tr><td rowspan="2">50</td><td>7</td><td>1.93</td><td>8.85</td></tr>
<tr><td>20</td><td>1.95</td><td>11.8</td></tr>
<tr><td rowspan="2">100</td><td>7</td><td>3.92</td><td>20.9</td></tr>
<tr><td>20</td><td>3.09</td><td>23.5</td></tr>
</table></td><td>TX-120-2004[a]
([redacted] 902247)
/4.2.3.5.2.4</td></tr>
</table>

2.6.7.11 生殖発生毒性試験： 重要な試験以外の試験（続き）

Test Article: TAF (monofumarate)

<table>
<tr><th>Species / Strain</th><th>Method of Administration (Vehicle/Formulation)</th><th>Dosing Period</th><th>Doses (mg/kg)</th><th>No. Per Group</th><th>Noteworthy Findings</th><th>Gilead Study No. (CRO Name and Study No.)/Location</th></tr>
<tr>
<td>(continued)
Rabbits / NZW</td>
<td>Oral Gavage
(0.1% (v/v) Tween 20, 0.1% (w/v) hydroxypropylmethyl-cellulose (HPMC) K100LV prepared in ultra-pure water)</td>
<td>14 days
(GD 7-20)</td>
<td>0, 5, 25, 50, 100</td>
<td>6F/group</td>
<td>
<table>
<tr><th>Dose (mg/kg/day)</th><th>GD</th><th>C_{max} (µg/mL)</th><th>AUC_{0-t} (µg•h/mL)</th></tr>
<tr><td colspan="4">TAF</td></tr>
<tr><td rowspan="2">5</td><td>7</td><td>0.009</td><td>NC</td></tr>
<tr><td>20</td><td>0.109</td><td>0.173</td></tr>
<tr><td rowspan="2">25</td><td>7</td><td>0.104</td><td>0.125</td></tr>
<tr><td>20</td><td>1.01</td><td>1.14</td></tr>
<tr><td rowspan="2">50</td><td>7</td><td>0.349</td><td>0.390</td></tr>
<tr><td>20</td><td>4.81</td><td>5.66</td></tr>
<tr><td rowspan="2">100</td><td>7</td><td>2.04</td><td>2.15</td></tr>
<tr><td>20</td><td>8.88</td><td>10.7</td></tr>
</table>
NC = insufficient data to calculate
</td>
<td>TX-120-2004[a]
([redacted] 902247)
/4.2.3.5.2.4</td>
</tr>
</table>

[redacted]=[redacted]; GD = gestation day; NOAEL = No-Observed-Adverse-Effect Level; F = female; NZW = New Zealand White

a Indicates GLP compliant

2.6.7.12　生殖発生毒性試験：受胎能及び初期胚発生に関する試験

Test Article: TAF(hemifumarate)

Report Title: Oral Gavage Study of Fertility and Early Embryonic Development to Implantation with GS-7340-03 in Rats

Gilead Study No. TX-120-2012
[redacted] **Study No.** 8264528

Species/Strain: Rat/Sprague-Dawley

Duration of Dosing:

Location: 4.2.3.5.1.1

Initial Age:
Males: 10 weeks; Females: 12 weeks

M: at least 28 days prior to mating and throughout the mating period through the day prior to termination (at least 10 weeks prior to sacrifice)

GLP Compliance: Yes

Date of First Dose:
Males: 12 June 2012; Females: 26 June 2012

F: at least 14 days prior to mating, throughout the mating period and through Day 7 of gestation (confirmed mated) or gestation Day 13 (confirmed non-mated)

Day of Mating: GD 0

Day of C-Section: GD 13

Lot Number: [redacted]
(hemifumarate salt)

Method of Administration: Oral Gavage

Design Similar to ICH 4.1.1? Yes

Special Features:
Early embryonic toxicity

Vehicle: 0.1% hydroxypropylmethylcellulose K100LV (HPMC),0.1% Tween 20 in reverse osmosis (RO) water

Dose Volume: 10 mL/kg

No-Observed-Adverse-Effect Level:
F_0 Males: 80 mg f.b.e./kg/day; F_0 Females: 80 mg f.b.e./kg/day; F_1 Litters: 160 mg f.b.e./kg/day

Daily Dose (mg f.b.e./kg/day)	0 (Control)	20	80	160
Males:				
No. Evaluated	22	22	22	22
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
Clinical Observations				
Discolored haircoat – left periorbital brown, perineal brown, front legs brown, and/or periorbital red	0	1	1	0
Rough haircoat	0	2	2	2

2.6.7.12　　生殖発生毒性試験：受胎能及び初期胚発生に関する試験（続き）　　TX-120-2012

Daily Dose (mg f.b.e./kg/day)	0 (Control)	20	80	160
Males, continued:				
Body Weight (%)[a] (postpairing Day 35)	608 g	-0.5	-4.8	-12.3[#H]
Food Consumption (%)[a] (postpairing Day 28 - 35)	225.1 g	-0.2	-2.0	-9.6[+H]
Necropsy Observations	—	—	—	—
Mean No. Days Prior to Mating	3.2	3.0	3.2	4.2
No. of Males that Mated	22	21	20	21
No. of Fertile Males	21	21	19	20
Sperm Motility (Motile %)	91.8 (± 8.43)	95.2 (± 3.08)	95.5 (± 4.01)	94.0 (± 6.10)
Females				
No. Evaluated	22	22	22	22
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
Clinical Observations				
Discolored haircoat (perineal yellow, shoulder(s) – yellow or brown, midline abdomen yellow, or front legs orange)	1	1	2	4
Premating Body Weight (%)[a] (premating Day 14)	305 g	-2.0	-3.6	-5.9[*H]
Gestation Body Weight (%)[a] (Gestation Day 13)	380 g	-0.5	-1.6	-5.3
Premating Food Consumption (%)[a] (premating Day 7 - 14)	169.2 g	+0.2	-2.4	-10.0[+H]
Gestation Food Consumption (%)[a] (Gestation Day 10 - 13)	95.1 g	-0.1	+0.7	-2.6
Necropsy Observations	—	—	—	—
Mean No. Estrous Cycles/14 days	2.8	2.6	2.3	2.5
Mean No. Days Prior to Mating	3.2	3.0	3.2	4.2
No. of Pregnant Females	21	22	21	21

2.6.7.12　　生殖発生毒性試験：受胎能及び初期胚発生に関する試験（続き）　　TX-120-2012

Daily Dose (mg f.b.e./kg/day)	0 (Control)	20	80	160
Females, continued:				
No. Aborted or with Total Resorption of Litter	0	1	0	0
Mean No. Corpora Lutea	16.3	16.0	15.8	16.0
Mean No. Implantations	16.2	15.0	15.1	15.7
Mean % Preimplantation Loss	0.5	7.1	4.3	1.8
Mean No. Live Conceptuses	15.3	14.5	13.9	14.5
Mean No. Early Resorptions	0.9	0.5	1.3	1.0
Mean % Postimplantation Loss	5.8	7.9	8.6	7.3

— = No noteworthy findings;, f.b.e = free base equivalent
a For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences or fold change from controls are shown. Statistical significance is based on actual data not on the percent.
+H Dunnett Exact Homogeneous Test Significant: 0.01 level
#H Dunnett Exact Homogeneous Test Significant: 0.001 level
*H Dunnett Exact Homogeneous Test Significant: 0.05 level

2.6.7.13　生殖発生毒性試験： 胚・胎児発生に関する試験

2.6.7.13.1　ラット胚・胎児発生に関する試験

Test Article: TAF (monofumarate)

Report Title: An Embryo-fetal Development Study of GS-7340-02 by Oral Gavage in Rats

Gilead Study No. TX-120-2002
CRL Study No. 902245

Species/Strain: Rats/Sprague-Dawley
Duration of Dosing: 12 days (GD 6 to 17)
Location: 4.2.3.5.2.2

Initial Age: 11 to 12 weeks at treatment start
Day of Mating: Time-mated (GD 0)
GLP Compliance: Yes

Date of First Dose: 31 January 2011 (GD 6)
Day of C-Section: GD 21
Lot Number: [redacted]

Special Features: Toxicokinetic evaluation
Method of Administration: Oral Gavage

Vehicle: 0.1% (v/v) Tween 20, 0.1% (w/v) hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) K100LV prepared in ultra pure water

No Observed Adverse Effect Level: F_0 Females: 100 mg/kg/day, F_1 Litters: 100 mg/kg/day

Daily Dose (mg/kg/day)		0 (Control)	25[a]	100[a]	250
Number of Animals (Toxicokinetic)		3	9	9	9
Dams:					
Toxicokinetics					
TAF: AUC_{0-t} (µg•h/mL)	− GD 6	NA[b]	NC	NC	1.376
	− GD 17	NA[b]	NC	0.242	1.382
TAF: C_{max} (µg/mL)	− GD 6	NA[b]	NC	0.038	0.756
	− GD 17	NA[b]	NC	0.149	0.597
TFV: AUC_{0-t} (µg•h/mL)	− GD 6	NA[b]	2.715	9.453	54.2
	− GD 17	NA[b]	2.803	17.392	55.728
TFV: C_{max} (µg/mL)	− GD 6	NA[b]	1.110	2.767	9.86
	− GD 17	NA[b]	0.870	4.13	7.35

2.6.7.13.1　　ラット胚・胎児発生に関する試験（続き）　　TX-120-2002

Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	25[a]	100[a]	250
Number of Animals (Main Study)	25	25	25	25
Dams, continued:				
Noteworthy Findings				
No. Pregnant (excluding animal with ammonium sulfide)	25	22	24	24 (23)
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
No. Aborted or with Total Resorption of Litter	0	0	0	1
Clinical Observations	—	—	—	Transient salivation (7/25)
Body Weight Change GD 6 to 18 (%)[c]	103.4 g	+0.2	-1.9	-41.4***
Corrected Body Weight, GD 21 (%)[c]	339.4 g	-2.9	-1.3	-9.8***
Corrected Body Weight Gain, GD 6 to 21 (%)[c]	51.8 g	-11.2	-8.3	-56.4***
Overall Food Consumption GD 6 to 18 (%)[c]	371.4 g	-2.4	-1.3	-17.2***
Necropsy Observations	—	—	—	—
Mean No. Corpora Lutea	17.4	17.9	18.6	17.3
Mean No. Implantations	15.0	16.2	16.0	14.5
Mean % Preimplantation Loss	13.2	9.8	13.4	15.3
Litters:				
Litters Evaluated	25	22	24	23
Noteworthy Findings				
Live Fetuses	14.3	15.7	15.6	14.0
Dead Fetuses	0	0	0	0
Mean No. Resorptions	0.7	0.5	0.3	0.5
Mean % Postimplantation Loss	4.70	2.99	2.01	7.12

2.6.7.13.1 ラット胚・胎児発生に関する試験（続き） TX-120-2002

Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	25[a]	100[a]	250
Number of Animals (Main Study)	25	25	25	25
Litters, continued:				
Mean Fetal Body Weight (total) (g)	5.83	5.62	5.53**	4.94***
Fetal Sex Ratios (% Males)	49.9	49.3	48.8	44.0
Overall Major Malformations	No treatment related findings			
Overall Minor External and Visceral Anomalies	No treatment related findings			
Overall Minor Skeletal Anomalies: litters (fetuses)	20 (48)	14 (35)	20 (49)	13 (19***)
Interparietal Bone Incomplete Ossification: litters (fetuses)	11 (20)	7 (16)	9 (19)	2** (2***)
Hyoid Bone Incomplete Ossification: litters (fetuses)	9 (16)	7 (15)	7 (20)	0** (0***)
Common Skeletal Variants				
Sternebra 5 and Xiphisternum (unossified/incomplete/irregular/semi-bitartite/bipartite)	14.74 (17.01)	17.33 (19.80)	18.90 (25.95)	31.43** (24.00)

[redacted] = [redacted] GD = gestation day; — = no noteworthy findings; NC = not calculated, NA = not applicable

a From GD 6 to 12 all Group 3 animals (100 mg/kg/day) received 65% of the target dose (64.6 mg/kg/day), and from GD 10 to 17, all Group 2 animals (25 mg/kg/day) received 77% of the target dose (19.3 mg/kg/day). Mean overall achieved doses were 22 and 84 mg/kg/day for 25 and 100 mg/kg/day, respectively.

b Values below the lower limit of quantitation

c For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data not on the percent.

** $p \leq 0.01$ (Dunnett's) & $p \leq 0.01$ (Fisher's) & $p \leq 0.01$ (Wilcoxon)

*** $p \leq 0.001$ (Dunnett's) & $p \leq 0.001$ (Fisher's)

2.6.7.13.2　　ウサギ胚・胎児発生に関する試験

Test Article: TAF (monofumarate)

Report Title: An Embryo-fetal Development Study of GS-7340-02 by Oral Gavage in Rabbits

Gilead Study No. TX-120-2005
CRL Study No. 902248

Species/Strain: New Zealand White Rabbits
Duration of Dosing: Days 7 to 20 postcoitum (i.e., gestation)
Location: 4.2.3.5.2.5

Initial Age: 5 months
Day of Mating: Time-mated (GD 0)
GLP Compliance: Yes

Date of First Dose: 14 March 2011
Day of C-Section: Day 29 postcoitum (i.e., gestation)
Lot Number: [redacted]

Special Features: Toxicokinetics
Method of Administration: Oral Gavage

Vehicle: 0.1% (v/v) Tween 20, 0.1% (w/v) hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) K100LV prepared in ultra pure water

No Observed Adverse Effect Level: F_0 Females: 30 mg/kg/day, F_1 Litters: 100 mg/kg/day

Daily Dose (mg/kg/day)		0 (Control)	10	30	100
Number of Animals (Toxicokinetic)		3	3	3	3
Dams:					
Toxicokinetics					
TAF − AUC_{0-t} (µg·h/mL):	– GD 7	NA[a]	NC	NC	0.918
	– GD 20	NA[a]	NC	1.135	11.04
TAF − C_{max} (µg/mL)	– GD 7	NA[a]	0.008	0.077	0.846
	– GD 20	NA[a]	0.155	0.937	9.190
TFV − AUC_{0-t} (µg·h/mL)	– GD 7	NA[a]	1941	3.013	13.44
	– GD 20	NA[a]	2018	5.005	27.25
TFV − C_{max} (µg/mL)	– GD 7	NA[a]	0.261	0.398	2.193
	– GD 20	NA[a]	0.260	0.676	2.970

2.6.7.13.2　　ウサギ胚・胎児発生に関する試験（続き）　　TX-120-2005

Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	10	30	100
Dams, continued:				
No. Pregnant	18	17	19	20
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
No. with Total Resorption of Litter	0	1	0	0
Clinical Observations				
Feces Output Decreased	2	3	2	8
Fur Staining Yellow	1	2	6	7
Body Weight Gain (Total per Interval) (%)[b]				
GD 7 to 21	0.28 g	-17.9	-14.3	-60.7***
GD 7 to 29	0.36 g	-8.3	+13.9	-16.7
GD 21 to 29	0.08 g	+25.0	+112.5*	+137.5**
Food Consumption (Total per Interval) (%)[b]				
GD 7 to 21	2341 g	-4.1	-5.5	-17.6***
GD 7 to 29	3332 g	-3.1	-1.2	-11.6
GD 21 to 29	991 g	-0.6	+7.7	+1.9
Necropsy Observations	No treatment-related findings			
Mean No. Corpora Lutea[c]	9.3	8.6	9.0	9.4
Mean No. Implantations[c]	8.8	8.2	8.4	8.9
Mean % Pre-implantation Loss[c]	5.6	6.9	6.5	5.2

2.6.7.13.2　　ウサギ胚・胎児発生に関する試験（続き）　　TX-120-2005

Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	10	30	100
Litters:				
Litters Evaluated[c]	18	17	19	20
Live Fetuses[c]	8.6	8.1	8.0	8.5
Dead Fetuses[c]	0.0	0.0	0.0	0.0
Mean No. Resorptions[c]	0.2	0.2	0.4	0.4
Mean % Postimplantation Loss[c]	2.6	7.2	4.5	3.8
Mean Fetal Body Weight (Total) (g)	41.2	42.7	43.6	40.5
Fetal Sex Ratios (% Males)	52.0	49.9	56.4	47.5
Fetal Abnormalities (External, Visceral, Skeletal)	No treatment-related findings			

[redacted] = [redacted] — = No noteworthy findings; GD = gestation day; NC = Not calculable; NA = not applicable

a　Values below the lower limit of quantitation
b　For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data not on the percent.
c　Including animal with total resorption
*　$p \leq 0.05$ (Dunnett's)
**　$p \leq 0.01$ (Dunnett's)
***　$p \leq 0.001$ (Dunnett's)

2.6.7.14　生殖発生毒性試験： 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

Test Article: TDF

Report Title:
Oral (Gavage) Developmental and Perinatal/Postnatal Reproduction Toxicity Study of GS-4331-05 (bis-POC PMPA) in Rats Including a Postnatal Behavioral/Functional Evaluation

Gilead Study No. R990202
[redacted] **Study No.** 707-016

Species/Strain:
Rat/Crl:CD(SD)IGS BR VAF/Plus

Duration of Dosing: F: From day 7 of presumed gestation to LD 20 or day 24 of presumed gestation (in rats that did not deliver a litter)

Location: 4.2.3.5.3.1

Initial Age: 59 Days

Day of Mating: Day 0

GLP Compliance: Yes

Date of First Dose: 14 February 2000

Method of Administration: Oral gavage

Lot Number: [redacted]

Litters Culled / Not Culled:
At weaning (day 21 lactation) 25 pups per sex, per group, where possible, were randomly chosen for continued evaluation. All other pups were sacrificed.

Design Similar to ICH 4.1.2?
Yes

NOAEL:
F_0 Females = 150 mg/kg/day; F_1 General Toxicity = 150 mg/kg/day; F_1 Behavioral, Reproductive & Developmental = 150 mg/kg/day

Special Features: None

Dose (mg/kg/day)	0 (Vehicle)	50	150	450	600
F_0 Females:					
Number of Animals (Toxicokinetic)	0	12	12	12	12
Toxicokinetics (TFV)					
C_{max} (µg/mL) Day 20 post partum	NA	1.46	2.26	4.93	2.89
AUC_{0-24}(µg•h/mL) Day 20 post partum	NA	5.88	11.7	26.8	27.3
No. Evaluated	25	25	25	25	25
Mortality[a]					
Number died	0	0	1	0	0
Moribund sacrificed	1	0	0	1	1

2.6.7.14　　生殖発生毒性試験： 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（続き）　　R990202

Dose (mg/kg/day)	0 (Vehicle)	50	150	450	600
F_0 Females, continued:					
Clinical Observations					
Presumed Gestation					
Maximal Possible Incidence (Days × Rats) / No. of Rats/Group	561/25	556/25	559/25	562/25	569/25
Red Perioral Substance	0/0	1/1	37/14*	123/24**	124/25**
Excess Salivation	0/0	0/0	7/5	12/10**	28/13**
Urine Stained Abdominal Fur	0/0	0/0	0/0	9/4*	13/8**
Ungroomed Coat	0/0	0/0	0/0	6/1	17/5**
Lactation					
Maximal Possible Incidence (Days × Rats) / No. of Rats/Group	504/24	525/25	494/24	382/24	260/22
Dehydration	4/4	1/1	2/2	10/6	16/8**
Emaciation	0/0	6/1	0/0	5/4*	12/7**
Urine Stained Abdominal Fur	4/2	6/3	8/3	45/9**	28/11**
Red of Dried Perioral Substance	0/0	0/0	3/3	9/8**	12/7**
Ungroomed Coat	0/0	1/1	0/0	6/4*	11/7**
Cold to Touch	0/0	0/0	0/0	0/0	9/4**
Necropsy Observations	—	—	—	—	—
Gestation/Lactation Body Weight (%)[b]	327.8 g	—	—	—	—
Gestation/Food Consumption (%)[c]	23.8 g/day	—	—	-12**	-18**
Lactation/Food Consumption (%)[c]	54.2 g/day	—	—	-7%*	-15**

2.6.7.14 生殖発生毒性試験： 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（続き） R990202

Dose (mg/kg/day)	0 (Vehicle)		50		150		450		600	
F_0 Females, continued:										
Delivery Observations										
Females with Sperm	25		25		25		25		25	
Pregnant Females (%)	25 (100)		25 (100)		24 (96)		24 (96)		23 (92)	
Females with Delivery (%)	24 (100)[d]		25 (100)		24 (100)		24 (100)		22 (100)[e]	
Mean Duration of Gestation Days (SD)	23.0 (0.2)		23.0 (0.2)		23.2 (0.4)		23.3 (0.5)*,[f]		23.3 (0.5)	
F_1 Litters:										
Implantations per Delivered Litter (SD)	16.3 (2.1)		15.5 (2.6)		15.2 (1.6)		15.4 (1.7)		15.5 (1.6)	
Live Births per Litter (SD)	14.7(2.2)		14.4 (2.9)		14.2 (1.7)		13.8 (3.0)		12.8 (2.9)	
Stillbirths (SD)	0.2 (0.6)		0.2(0.4)		0 (0.2)		0.7 (2.3)		2.0 (2.8)*	
Survivors Day 4 pp (%)	99.4		99.2		99.1		80.8		53.9	
Viability Index[g]	351/353		357/360		338/341		256/317		152/282**	
Survivors at Weaning (%)	98.6		98.0		98.1		95.0		97.4	
Lactation Index[h]	346/351		350/357		319/325		230/242		148/152	
Weight at Birth (g)	6.7 (0.5)		6.5 (0.5)		6.4 (0.4)		5.5 (0.7)**		5.1 (0.6)**	
Weight at Weaning (g) (SD)	37.4 (5.4)		35.9 (7.1)		35.4 (5.8)		27.1(3.6) **		25.7 (2.5) **	
Sex Ratio of Fetuses	M 49.9	F 50.1	M 46.5	F 53.5	M 52.4	F 47.6	M 48.0	F 52.0	M 47.0	F 53.0
Clinical Observations (Total Frequency: Days × Pups)										
Cold to Touch	3/1		1/1		0/0		64/6		80/11**	
Pale	3/1		0/0		0/0		32/3		80/11**	
Not Nesting	0/0		0/0		0/0		0/0		31/4**	
Umbilical Hernia	0/0		0/0		0/0		28/4**		3/1	

2.6.7.14 生殖発生毒性試験： 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（続き） R990202

Dose (mg/kg/day)	0 (Vehicle)	50	150	450	600
F_1 Litters, continued:					
Necropsy Observations					
Incidence Pup Appearance Normal (%)	295 (99.7)	298 (99.3)	269 (100)	169 (94.4)**	97 (99)
Incidence Pup Liver Appearance Pale (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	10 (5.6)**	0 (0)
Incidence Pup Testes Small & Flaccid (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1.0)**
Mean kidney Weights (g) (SD)	0.54 (0.08)	0.52 (0.09)	0.51(0.09)	0.40 (0.04)**	0.36 (0.05)**

NA = not applicable
a No deaths were related to test article. All deaths were related to intubation errors with the exception of the rat in control group, which had dystocia.
b Terminal weights for control groups (means, at day 21, postpartum) are shown. For treatment groups, % differences from controls are shown.
c Maternal absolute food consumptions for control groups (during gestation & lactation) are shown. For treatment groups, % differences from controls are shown.
d Excludes 1 rat which was scarified moribund day 22 gestation
e Excludes 1 rat which was scarified moribund day 19 gestation
f Not considered test article related
g No. of live pups on day 4 postpartum/ No. of liveborn pups on day 1 postpartum.
H No. of live pups on day 21 postpartum/ No. of liveborn pups on day 4 postpartum.
* $p \leq 0.05$
** $p \leq 0.01$

2.6.7.15　　新生児を用いた試験

該当資料なし

2.6.7.16　局所刺激性試験

Test Article: TAF (monofumarate), TAF (hemifumarate)

Type of Study (Test article)	Species/Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Duration of Dosing	Dose (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Gilead Study No. (CRO Name & Study No.) / Location
BCOP TAF (hemifumarate)	Bovine Cornea	*In Vitro* (prepared in 0.9% saline)	Opacity = 4 h. ± 5 min.; Permeability = 90 ± 5 min.	20% (w/w) in 0.9% sodium chloride solution	3 Corneas	TAF (hemifumarate) elicited an *in vitro* irritancy score of 21.0 ± 8.7 and was predicted to be a non-corrosive/ non-severe eye irritant.	TX-120-2013[a] ([redacted] EUN0017) / 4.2.3.6.1
Dermal Irritation TAF (monofumarate)	Rabbit/NZW	Dermal (moistened in 0.5-0.6 mL distilled water)	4 h. ± 10 min.	0.5 g / rabbit	3M	No signs of erythema or edema were noted. Test article was considered nonirritating/noncorrosive to skin of the rabbits.	TX-120-2011[a] ([redacted] 8253834) / 4.2.3.6.2

BCOP = bovine corneal opacity and permeability; M = male; w/w = weight/weight
a　Indicates GLP compliant

2.6.7.17　その他の毒性試験

Test Article: TAF (monofumarate), TAF (hemifumarate), TFV

Type of Study (Test article)	Species/Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Duration of Dosing	Dose (mg/kg/day)	Gender and No./Group	Noteworthy Findings	Gilead Study No. (CRO Name & Study No.) / Location
LLNA TAF (hemifumarate)	Mouse/CBA/Ca	Topical TAF (hemifumarate) (acetone:olive oil, 4:1 v/v)	3 days	25 µL application of 10, 25, 50% (w/v)	5F	TAF not regarded as a potential skin sensitizer.	TX-120-2014[a] ([redacted] UK EUN0018) / 4.2.3.7.1.1
Other / Reverse Mutation Assay TFV	*S. typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537) & *E. Coli* (WP2uvr)	*In Vitro*	NA	Up to 5000 µg/plate with and without S9 activation	NA	Increase in revertants in TA1535 only in presence of S9	95-TOX-1278-006[a] (CHV 17444-0-409) / 4.2.3.7.5.1
Other / Mouse Lymphoma L5178Y TFV	Mouse lymphoma L5178Y cells	*In Vitro*	NA	Up to 5000 µg/mL with and without S9 activation	NA	Negative without activation; equivocal with activation at 5000 µg/mL	95-TOX-1278-007[a] (CHV 17444-0-431) / 4.2.3.7.5.2
Impurity Qualification TAF (monofumarate)	Rat/ SD	Oral Gavage (0.1% (v/v) Tween 20 and 0.1% (w/v) HPMC in RO water	2 weeks	0, 5, 50 Lot-1: [redacted] ([redacted]% purity) Lot-2: [redacted] ([redacted]% purity)	10M	No treatment-related effects on clinical signs, body weights, food consumption, clinical or anatomic pathology for either lot. At 50 mg/kg/day the Day 14 tenofovir C_{max} was 0.2 µg/mL and the AUC_{0-t} was 2.0 µg•h/mL for Lot-1, and for Lot-2 the respective C_{max} was 0.4 µg/mL and the AUC_{0-t} was 2.5 µg•h/mL.	TX-120-2008[a] ([redacted] 8246754) / 4.2.3.7.6.1

2.6.7.17　その他の毒性試験（続き）

Type of Study (Test article)	Species/Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Duration of Dosing	Dose (mg/kg/day)	Gender and No./Group	Noteworthy Findings	Gilead Study No. (CRO Name & Study No.) / Location
Impurity Qualification TAF (hemifumarate)	Rat/ SD	Oral Gavage (0.1% (w/v) HPMC K100LV and 0.1% (v/v) Tween® 20 in 99.8% (v/v) (RO) water)	4 weeks	0, 25, 50 mg f.b.e./kg/day Lot-1: [redacted] % purity) Lot-2: [redacted] % purity) Lot-3: [redacted] % purity)	10M; 10F	No treatment-related clinical observations, ophthalmic observations, or effects on clinical pathology parameters, bone biomarker parameters, or macroscopic and microscopic observations were noted. NOAEL = 50 mg f.b.e./kg/day At 50 mg/kg/day the Day 28 TFV combined male/female C_{max} was 1.79 µg/mL and the combined male/female AUC_{0-t} was 6.76 µg•h/mL for Lot-1, for Lot-2 the respective C_{max} was 1.38 µg/mL and the AUC_{0-t} was 6.03 µg•h/mL, and for Lot-3 the respective C_{max} was 1.95 µg/mL and the AUC_{0-t} was 6.04 µg•h/mL.	TX-120-2021[a] ([redacted] 8298810) / 4.2.3.7.6.2

M = male; F = female; NA = not applicable; w/w = weight/weight; w/v = weight/volume; v/v = volume/volume; HPMC = hydroxypropylmethyl cellulose; RO = reverse osmosis; [redacted] = [redacted]; f.b.e. = free base equivalents
a　Indicates GLP compliant