目次

略号一覧表 4
2.6.6 毒性試験の概要文 6
2.6.6.1 まとめ 6
2.6.6.1.1 単回投与毒性試験及び反復投与毒性試験 10
2.6.6.1.2 遺伝毒性試験 11
2.6.6.1.3 がん原性試験 12
2.6.6.1.4 生殖発生毒性試験 12
2.6.6.1.5 局所忍容性試験 12
2.6.6.1.6 光毒性試験 12
2.6.6.1.7 結論 12
2.6.6.2 単回投与毒性試験 13
2.6.6.2.1 マウスを用いたイキサゾミブクエン酸エステル単回経口投与毒性試験 13
2.6.6.2.2 ラットを用いたイキサゾミブ単回経口投与毒性試験 14
2.6.6.2.3 雄ラットを用いたイキサゾミブ単回静脈内投与毒性試験 15
2.6.6.2.4 雌ラットを用いたイキサゾミブ単回静脈内投与毒性試験 15
2.6.6.2.5 イヌを用いたイキサゾミブクエン酸エステル単回経口投与毒性試験 15
2.6.6.2.6 イヌを用いたイキサゾミブ単回静脈内投与毒性試験 16
2.6.6.3 反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む） 17
2.6.6.3.1 ラットを用いたイキサゾミブ 2 週間（1 サイクル）間欠経口投与毒性試験 19
2.6.6.3.2 ラットを用いたイキサゾミブ 1 ヵ月間（2 サイクル）間欠経口投与毒性試験 21
2.6.6.3.3 ラットを用いたイキサゾミブクエン酸エステル 3 ヵ月間（5 サイクル）間欠経口投与毒性試験 24
2.6.6.3.4 ラットを用いたイキサゾミブクエン酸エステル 6 ヵ月間（7 サイクル）間欠経口投与毒性試験 26
2.6.6.3.5 ラットを用いたイキサゾミブ 2 週間（1 サイクル）間欠静脈内投与毒性試験 29
2.6.6.3.6 ラットを用いたイキサゾミブ 2 サイクル間欠静脈内投与毒性試験 29
2.6.6.3.7 ラットを用いたイキサゾミブクエン酸エステル 5 サイクル間欠静脈内投与毒性試験 31
2.6.6.3.8 イヌを用いたイキサゾミブ 7 日間反復経口投与探索的用量設定試験 31
2.6.6.3.9 イヌを用いたイキサゾミブ 2 週間（1 サイクル）間欠経口投与毒性試験 33
2.6.6.3.10 イヌを用いたイキサゾミブクエン酸エステル 3 ヵ月間（5 サイクル）間欠経口投与毒性試験 36
2.6.6.3.11 イヌを用いたイキサゾミブクエン酸エステル 9 ヵ月間（10 サイクル）間欠経口投与毒性試験 37
2.6.6.3.12 イヌを用いたイキサゾミブ 2 週間（1 サイクル）間欠静脈内投与毒性試験 39
2.6.6.3.13 イヌを用いたイキサゾミブ 1 ヵ月間（2 サイクル）間欠静脈内投与毒性試験 40
2.6.6.3.14 イヌを用いたイキサゾミブクエン酸エステル 3 ヵ月間（5 サイクル）間欠静脈内投与毒性試験 41

2.6.6.4 遺伝毒性試験 42
2.6.6.4.1 in vitro 非哺乳類細胞系 43
2.6.6.4.2 in vitro 哺乳類細胞系 43
2.6.6.4.3 in vivo 哺乳類系 44
2.6.6.5 がん原性試験（トキシコキネティクス評価を含む） 46
2.6.6.6 生殖発生毒性試験（用量設定試験及びトキシコキネティクス評価を含む） 46
2.6.6.6.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 46
2.6.6.6.2 胚・胎児発生に関する試験 46
2.6.6.6.3 出生前及び出生後の発達並びに母動物の機能に関する試験 51
2.6.6.6.4 幼若動物を用いた試験 51
2.6.6.7 局所忍容性試験 51
2.6.6.7.1 経口投与による組織忍容性試験 51
2.6.6.7.2 静脈内投与による組織刺激性試験 51
2.6.6.8 その他の毒性試験 51
2.6.6.8.1 依存性に関する試験 51
2.6.6.8.2 光毒性試験 52
2.6.6.9 考察及び結論 52
2.6.6.9.1 死亡率及び発生頻度 53
2.6.6.9.2 標的器官毒性 54
2.6.6.9.3 胃腸への影響 54
2.6.6.9.4 リンパ系組織への影響 54
2.6.6.9.5 神経への影響 54
2.6.6.9.6 副腎、腎、及び肝臓への影響 55
2.6.6.10 図表 58
2.6.6.11 参考文献一覧 58

表

表 2.6.6.1-1　イキサゾミブの非臨床毒性試験プログラム 8
表 2.6.6.1-2　単回投与及び反復投与毒性試験に基づく最大耐量 11
表 2.6.6.2-1　イキサゾミブ単回投与毒性試験 13
表 2.6.6.2-2　CD-1 マウスへのイキサゾミブクエン酸エステル単回投与時の血漿中イキサゾミブの TK パラメータ平均値 14
表 2.6.6.2-3　ビーグル犬へのイキサゾミブクエン酸エステル単回投与時の血漿中イキサゾミブの TK パラメータ平均値 16
表 2.6.6.3-1　イキサゾミブ反復投与毒性試験 18
表 2.6.6.3-2　Sprague-Dawley ラットへのイキサゾミブ週 2 回 2 週間経口投与時の血漿中イキサゾミブの TK パラメータ平均値 20
表 2.6.6.3-3　Sprague-Dawley ラットへのイキサゾミブ週 2 回 2 サイクル経口投与時の血漿中イキサゾミブの TK パラメータ平均値 22

表 2.6.6.3-4　イキサゾミブ経口投与 Sprague-Dawley ラットの早期死亡の概要 23
表 2.6.6.3-5　Sprague-Dawley ラットへのイキサゾミブ週 2 回 5 サイクル経口投与時の血漿中イキサゾミブの TK パラメータ平均値 25
表 2.6.6.3-6　Sprague-Dawley ラットへのイキサゾミブクエン酸エステル週 1 回 7 サイクル経口投与時の血漿中イキサゾミブの TK パラメータ平均値 27
表 2.6.6.3-7　雄ビーグル犬へのイキサゾミブ 1 日 1 回 7 日間経口投与時の血漿中イキサゾミブの TK パラメータ平均値 32
表 2.6.6.3-8　ビーグル犬へのイキサゾミブ週 2 回 1 サイクル経口投与時の血漿中イキサゾミブの TK パラメータ平均値 34
表 2.6.6.3-9　ビーグル犬へのイキサゾミブクエン酸エステル週 2 回 5 サイクル経口投与時の血漿中イキサゾミブの TK パラメータ平均値 37
表 2.6.6.3-10　ビーグル犬へのイキサゾミブクエン酸エステル週 1 回 10 サイクル経口投与時の血漿中イキサゾミブの TK パラメータ平均値 38
表 2.6.6.4-1　遺伝毒性試験 42
表 2.6.6.6-1　妊娠 Sprague-Dawley ラットへのイキサゾミブクエン酸エステル経口投与時の血漿中イキサゾミブの TK パラメータ平均値 47
表 2.6.6.6-2　妊娠 Sprague-Dawley ラットへのイキサゾミブクエン酸エステル経口投与時の血漿中イキサゾミブの TK パラメータ平均値 48
表 2.6.6.6-3　妊娠 New Zealand white ウサギへのイキサゾミブクエン酸エステル経口投与時の血漿中イキサゾミブの TK パラメータ平均値 49
表 2.6.6.6-4　妊娠 New Zealand white ウサギへのイキサゾミブクエン酸エステル経口投与時の血漿中イキサゾミブの TK パラメータ平均値 50
表 2.6.6.9-1　非臨床試験でイキサゾミブを経口投与した動物種における最大耐量 53
表 2.6.6.9-2　Sprague-Dawley ラット及びビーグル犬を用いて GLP 準拠で実施したイキサゾミブ反復経口投与毒性試験における主要標的器官の病理組織学的所見の概要 56
表 2.6.6.9-3　イキサゾミブを経口投与したラット（7 サイクル）、イヌ（10 サイクル）及びヒト間でのイキサゾミブの全身曝露量の比較 58

図

図 2.6.6.1-1　イキサゾミブクエン酸エステルのイキサゾミブへの加水分解 6

略号一覧表

略号	略していない表現又は説明（英語）	略していない表現又は説明（日本語）
ABS NEUT	absolute neutrophils	好中球絶対数
ALP	alkaline phosphatase	アルカリホスファターゼ
ALT	alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST	aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	area under the plasma concentration-time curve	血漿中濃度-時間曲線下面積
AUC_{24}	area under the plasma concentration-time curve from the time 0 to 24 hours	0 時間から 24 時間の血漿中濃度-時間曲線下面積
AUC_{72}	area under the plasma concentration-time curve from the time 0 to 72 hours	0 時間から 72 時間の血漿中濃度-時間曲線下面積
AUC_{168}	area under the plasma concentration-time curve from the time 0 to 168 hours	0 時間から 168 時間の血漿中濃度-時間曲線下面積
AUE	area under the effect-time curve	効果-時間曲線下面積
AUE_{24}	area under the effect-time curve from time 0 to 24 hours	0 時間から 24 時間の効果-時間曲線下面積
BIW	twice weekly	週 2 回
BUN	blood urea nitrogen	血中尿素窒素
CHOL	cholesterol	コレステロール
C_{max}	maximum observed plasma concentration	最高血漿中濃度
CV	cardiovascular	心血管
DLT	dose-limiting toxicity	用量制限毒性
DMSO	dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
DRG	dorsal root ganglia	後根神経節
ECG	electrocardiograph	心電図
E_{max}	maximum effect	最大効果
EMS	ethyl methanesulfonate	エチルメタンスルホネート
GD	gestation day	妊娠日齢
GI	gastrointestinal	胃腸の
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
HNSTD	highest nonseverely toxic dose	重篤な毒性が発現しない最大投与量
HP-β-CD	hydroxypropyl-beta-cyclodextrin	ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン
HPBL	human peripheral blood lymphocyte	ヒト末梢血リンパ球
IC_{50}	concentration producing 50% inhibition	50%阻害濃度
ICH	International Conference on Harmonisation	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
IV	intravenous(ly)	静脈内
LC/MS/MS	liquid chromatography with tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィータンデム質量分析
M-E	myeloid:erythroid ratio	骨髄:赤血球比
MC	methylcellulose	メチルセルロース
MI	mitotic index	分裂指数
MM	multiple myeloma	多発性骨髄腫
MNPCE	micronucleated polychromatic erythrocyte	小核を有する多染性赤血球
MTD	maximum tolerated dose	最大耐量
NCE	normochromatic erythrocyte	正染性赤血球
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
NOEL	no observed effect level	無作用量
PCE	polychromatic erythrocyte	多染性赤血球
PHOS	phosphorus	リン
PIF	photo-irritation-factor	光毒性係数
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
PO	oral(ly)	経口
Q3D	once every 3 days	3 日ごとに 1 回
QD	once daily	1 日 1 回
QW	once weekly	週 1 回

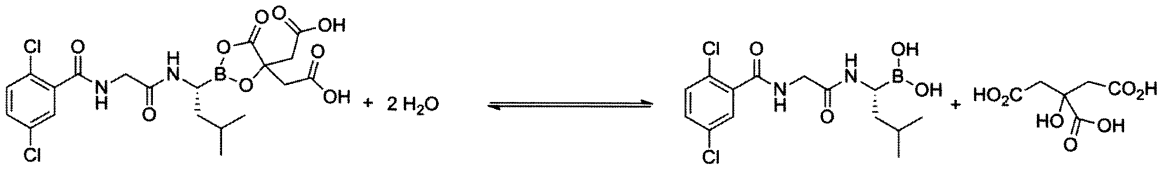
略号一覧表（続き）

略号	略していない表現又は説明（英語）	略していない表現又は説明（日本語）
SDH	sorbitol dehydrogenase	ソルビトール脱水素酵素
STD10	severely toxic dose in 10% of animals	供試動物の 10%に重篤な毒性が発現する投与量
SWI	Sterile Water for Injection	滅菌注射用水
TK	toxicokinetic(s)	トキシコキネティクス
t_{max}	time to reach Cmax	最高血漿中濃度到達時間（C_{max} 到達時間）
USP	United States Pharmacopeia	米国薬局方
UVA	ultraviolet A	紫外線 A 波
w:v	weight-to-volume ratio	重量体積比
w:w	weight-to-weight ratio	重量比
WBC	white blood cell	白血球
WFI	water for injection	注射用水

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6.1 まとめ

イキサゾミブ（別名 MLN2238）は、経口投与可能な 20S プロテアソーム阻害薬である。原薬であるイキサゾミブクエン酸エステル（別名 MLN9708）は、安定したクエン酸エステルとして合成される（2.6.2.2）。イキサゾミブクエン酸エステルは、生理的条件の下で速やかに加水分解され、生物活性のあるボロン酸化合物であるイキサゾミブへと変換される（図 2.6.6.1-1）。イキサゾミブクエン酸エステルは、血漿中で速やかに加水分解されることが示されている。そのため、in vitro 又は ex vivo で血漿試料中のイキサゾミブクエン酸エステルを液体クロマトグラフィータンデム質量分析（LC/MS/MS）によって検出することはできなかった（2.6.4.2）。イキサゾミブは、20S プロテアソームの β5 サブユニットに対して選択的な阻害作用を及ぼし、強力な可逆的阻害作用をもたらす。特に断りのない限り、投与量はすべて、イキサゾミブ換算値で示した。全身曝露量についても血漿中でのイキサゾミブ濃度に基づいて評価した。局所忍容性は、イキサゾミブクエン酸エステル又はイキサゾミブのどちらの原薬を投与したかに基づき、投与した薬剤を評価した。



ixazomib citrate (MLN9708)
$C_{20}H_{23}BCl_2N_2O_9$
517.12 g/mol

水
H_2O
18.02 g/mol

ixazomib (MLN2238)
$C_{14}H_{19}BCl_2N_2O_4$
361.03 g/mol

クエン酸
$C_6H_8O_7$
192.12 g/mol

図 2.6.6.1-1　イキサゾミブクエン酸エステルのイキサゾミブへの加水分解

医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準拠した試験で使用したイキサゾミブクエン酸エステル及びイキサゾミブの純度は、それぞれ[redacted]%及び[redacted]%であった（概要表 2.6.7.4）。GLP 準拠で実施した試験で使用したロットの不純物プロファイルは、主要臨床試験で使用したロットのプロファイルと概ね一致しており、市販用製剤のプロファイルの妥当性を支持する（Section 2.3.S.4.5）。GLP 準拠で実施した反復投与毒性試験において、イキサゾミブクエン酸エステルの原薬若しくは製剤又はイキサゾミブの原薬若しくは製剤中の全不純物は、それぞれ[redacted]%以下又は[redacted]%以下であった。特に、2 つの潜在的な不純物（[redacted]とエナンチオマー[redacted]の混合物及び[redacted], 2.6.7.4 参照）はそれぞれラットにおける代謝物 M1 及び M12 であると同定され（2.6.4.5 参照）、原薬の規格として管理されている。加えて、もう 1 つの潜在的な原薬不純物である代謝物 M3（[redacted] 2.6.7.4 参照）がラット、イヌ及びヒトにおいて in vitro で代謝物として検出されたが in vivo では観察されなかった。これは、代謝物 M3 が代謝物 M12 にさらに代謝されたことによるものと考えられた。[redacted]はイキサゾミブクエン酸エステルを安定させることから、毒性試験では複数の[redacted]ベースの投与製剤を使用した。動物に投与した製剤の性質（例えば、[redacted]注射用製剤、[redacted]製剤又は経口投与用[redacted]製剤）により[redacted]を微調整した。

日米EU医薬品規制調和国際会議（ICH）三極ガイドラインS9「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価についてのガイダンス」[1]に従って、再発又は難治性の多発性骨髄腫（MM）患者の治療での使用目的を支持するため、一連の非臨床試験においてイキサゾミブの毒性を評価した。さらに、以下のICHガイドラインに従って追加試験も実施した。すなわち、ICH-M3 (R2)「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」[2]（初発MMに関する臨床試験を支持するために準拠）、ICH-S2 (R1)「医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンス」[3]、ICH-M7「潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中DNA反応性（変異原性）不純物の評価と管理」[4]、ICH-S7A「ヒト医薬品に関する安全性薬理試験」[5]、ICH-S7B「ヒト用医薬品の心室再分極遅延（QT間隔延長）の潜在的影響に関する非臨床的評価」[6]、並びにICH-S10「医薬品の光安全性評価」[7]である。

GLP準拠のin vivo試験で、イキサゾミブクエン酸エステルを経口（PO）投与又はイキサゾミブ又を静脈内（IV）投与した。当初、経口製剤及び静注製剤の開発計画があり、毒性試験も両方の経路で実施したが、現時点では静注製剤を市販する計画はないため、本概要文では、経口投与毒性試験の記述に焦点を置く。単回投与及び反復投与による一般毒性試験で使用した動物種は、CD-1マウス、Sprague-Dawleyラット及びビーグル犬であった。これらの動物種は、イキサゾミブの作用に対する薬理学的反応があり、トキシコキネティクス（TK）及び代謝プロファイルがヒトのプロファイルに類似している、また、医薬開発候補品の毒性を評価するためによく用いられる。さらに、一般毒性試験に加え、Sprague-Dawleyラット及びNew Zealand whiteウサギを用いた生殖発生毒性試験、in vitroもしくはCD-1マウスを用いたin vivo遺伝毒性試験、並びにin vitroでの光毒性試験を実施した。

イキサゾミブ（イキサゾミブクエン酸エステル又はイキサゾミブとして投与）の毒性を明らかにするため、及びその使用を支持するために実施した非臨床試験の概要を表2.6.6.1-1及び概要表2.6.7.1に示す。実施した毒性試験で認められた主な所見については、後続の項で考察する。これらの毒性試験に基づいて、毒性の標的組織を特定し、臨床的に意義のある毒性をモニタリングする非侵襲的な手法の妥当性を確認し、被験物質投与による影響の可逆性を評価し、並びに最大耐量（MTD）、無毒性量（NOAEL）及び関連する血漿中イキサゾミブ濃度を確定した。これらの試験で観察された主な毒性は、薬理学的標的（20Sプロテアソーム）が同じベルケイド（ボルテゾミブ）を動物モデルに投与したときに観察された毒性と質的に類似していた。なお、非臨床毒性試験の大半が、現行の臨床スケジュール（1、8及び15日目に投与する28日サイクル）と比べて、投与回数が多い枠組みを採用している。投与期間が3ヵ月以下の毒性試験での投与スケジュールでは、21日間を1サイクルとし、各サイクルは週2回（BIW）の投与期間（1、4、8及び11日目に投与）、及びそれに続く10日間の休薬期間で構成されている。したがって、3ヵ月間（5サイクル）にわたる試験期間中、合計20回の投与が行われた。一方、臨床試験において本剤を6サイクル投与した患者の場合、各サイクルを週1回（QW）での3回投与（1、8及び15日目に投与）とそれに続く13日間の休薬期間の計28日間で構成し、投与回数は合計18回であった。ラットを用いた6ヵ月間（7サイクル）反復投与毒性試験及びイヌを用いた9ヵ月間（10サイクル）反復投与毒性試験では、患者の治療で用いられる28日サイクルの臨床スケジュールと同じものを採用したため、ラットには6ヵ月間で21回、イヌには9ヵ月間で30回投与した。

表 2.6.6.1-1　イキサゾミブの非臨床毒性試験プログラム

試験の種類	添付資料番号	動物種	投与期間	被験物質	投与経路	GLP
単回投与毒性試験						
	4.2.3.1-1	CD-1 マウス	単回投与	イキサゾミブクエン酸エステル	経口強制	非準拠
	4.2.3.1-2	Sprague-Dawley ラット	単回投与	イキサゾミブ	経口強制	非準拠
	4.2.3.1-3	Sprague-Dawley ラット	単回投与	イキサゾミブ	静注	非準拠
	4.2.3.1-4	Sprague-Dawley ラット	単回投与	イキサゾミブ	静注	非準拠
	4.2.1.3-3	ビーグル犬	単回投与	イキサゾミブクエン酸エステル	経口強制	非準拠
	4.2.3.1-5	ビーグル犬	単回投与	イキサゾミブ	静注	非準拠
反復投与毒性試験						
	4.2.3.2-1	Sprague-Dawley ラット	2 週間	イキサゾミブ	経口強制	非準拠
	4.2.3.2-2, 4.2.3.2-3	Sprague-Dawley ラット	1 ヵ月(2 サイクル[a])	イキサゾミブ	経口強制	準拠[b]
	4.2.3.2-4	Sprague-Dawley ラット	3 ヵ月(5 サイクル[a])	イキサゾミブクエン酸エステル	経口強制	準拠[b]
	4.2.3.2-5	Sprague-Dawley ラット	6 ヵ月(7 サイクル[c])	イキサゾミブクエン酸エステル	経口強制	準拠
	4.2.3.2-6	Sprague-Dawley ラット	2 週間	イキサゾミブ	静注	非準拠
	4.2.3.2-7, 4.2.3.2-8	Sprague-Dawley ラット	1 ヵ月(2 サイクル[a])	イキサゾミブ	静注	準拠[b]
	4.2.3.2-9	Sprague-Dawley ラット	3 ヵ月(5 サイクル[a])	イキサゾミブクエン酸エステル	静注	準拠[b]
	4.2.3.2-10	ビーグル犬	1 週間	イキサゾミブ	経口強制	非準拠
	4.2.3.2-11, 4.2.3.2-12	ビーグル犬	2 週間	イキサゾミブ	経口強制	準拠[b]

表 2.6.6.1-1　イキサゾミブに関する非臨床毒性試験プログラム（続き）

試験の種類	添付資料番号	動物種	投与期間	被験物質	投与経路	GLP
	4.2.3.2-13, 4.2.3.2-14	ビーグル犬	3 ヵ月(5 サイクル[a])	イキサゾミブクエン酸エステル	経口強制	準拠[b]
	4.2.3.2-15	ビーグル犬	9 ヵ月(10 サイクル[c])	イキサゾミブクエン酸エステル	経口強制	準拠
	4.2.3.2-16	ビーグル犬	2 週間	イキサゾミブ	静注	非準拠
	4.2.3.2-17, 4.2.3.2-18, 4.2.3.2-19, 4.2.3.2-20	ビーグル犬	1 ヵ月(2 サイクル[a])	イキサゾミブ	静注	準拠[b]
	4.2.3.2-21, 4.2.3.2-22	ビーグル犬	3 ヵ月間(5 サイクル[a])	イキサゾミブクエン酸エステル	静注	準拠[b]
遺伝毒性試験						
微生物復帰突然変異試験	4.2.3.3.1-1	*Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537)、*Escherichia coli* (WP2 *uvrA*)	N/A	イキサゾミブ	in vitro	準拠
染色体異常試験	4.2.3.3.1-2	Human Peripheral Blood Lymphocytes	N/A	イキサゾミブクエン酸エステル	in vitro	準拠
小核試験	4.2.3.3.2-1	CD-1 マウス	単回投与	イキサゾミブクエン酸エステル	経口強制	準拠
コメット試験	4.2.3.3.2-2	CD-1 マウス	2 回投与（試料採取の 24 時間前及び 3 時間前）	イキサゾミブクエン酸エステル	経口強制	準拠
生殖発生毒性試験						
胚・胎児発生に関する用量設定試験	4.2.3.5.2-1	Sprague-Dawley ラット	GD6～17 まで 1 日 1 回；GD6、9、12、15 の間欠投与	イキサゾミブクエン酸エステル	経口強制	非準拠

表 2.6.6.1-1　イキサゾミブに関する非臨床毒性試験プログラム（続き）

試験の種類	添付資料番号	動物種	投与期間	被験物質	投与経路	GLP
胚・胎児発生に関する試験	4.2.3.5.2-2	Sprague-Dawley ラット	GD6、9、12、15	イキサゾミブクエン酸エステル	経口強制	準拠
胚・胎児発生に関する用量設定試験	4.2.3.5.2-3	New Zealand white ウサギ	GD7、10、13、16、19	イキサゾミブクエン酸エステル	経口強制	準拠 [b]
胚・胎児発生に関する試験	4.2.3.5.2-4	New Zealand white ウサギ	GD7、10、13、16、19	イキサゾミブクエン酸エステル	経口強制	準拠
局所忍容性試験 [d]						
in vitro 溶血アッセイ	4.2.3.6-1	ヒト全血	N/A	イキサゾミブ	in vitro	非準拠
	4.2.3.6-2	ヒト全血	N/A	イキサゾミブクエン酸エステル	in vitro	非準拠
その他の毒性試験						
光毒性試験	4.2.3.7.7-1	BALB/3T3 クローン A31 マウス細胞	N/A	イキサゾミブクエン酸エステル	in vitro	非準拠

GD = 妊娠日齢；GLP = 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準；HPBL = ヒト末梢血リンパ球； N/A = 該当せず

a　各サイクルを最初の 2 週間における週 2 回（BIW）の投与期間とそれに続く 10 日間の休薬期間で構成した。最終サイクルは 14 日間の回復期間を設けた。

b　毒性試験で採取した試料を用いて、GLP 非準拠で薬力学的解析も実施した。これらの報告書は、対応する毒性試験と併せて 2.6.6.3 で要約する。

c　各サイクルを最初の 3 週間における週 1 回（QW）の投与期間とそれに続く 13 日間の休薬期間で構成した。最終サイクルは 14 日間の回復期間を設けた。

d　局所忍容性については GLP 準拠で実施した反復投与毒性試験において、さらに評価した。

2.6.6.1.1 単回投与毒性試験及び反復投与毒性試験

ラットを用いた 6 ヵ月間（7 サイクル）までの経口投与毒性試験及びイヌを用いた 9 ヵ月間（10 サイクル）までの経口投与毒性試験を実施した結果、両動物種では類似した毒性がみられた。ラット及びイヌの両方における最高血漿中濃度（C_{max}）及び血漿中濃度-時間曲線下面積（AUC）値は、概ね用量比依存性を示すか又は用量比を下回って増加した。また、曝露量に明らかな性差は認められず、反復投与後の蓄積はわずかであった。ラット及びイヌの用量制限毒性（DLT）は、主に、消化管及びリンパ系に対する影響に起因していた。さらに、DLT がみられる投与量未満では、炎症性反応と一致して白血球パラメータの変化がラット及びイヌの両方でみられたが、交感神経節、後根神経節及び末端器官の神経節の神経変性は経口投与後のイヌに限定されていた（これは曝露量が高かったことが原因である可能性が高い）。

単回投与後に忍容性を示した投与量と、21 日間サイクル及び 28 日間サイクルの間欠的反復投与で忍容性を示した投与量は、概ね各動物間で類似していた（表 2.6.6.1-2）。

表 2.6.6.1-2　単回投与及び反復投与毒性試験に基づく最大耐量

動物種	投与期間	MTD		C_{max} (ng/mL)[a]	AUC_{24} (ng·hr/mL)[a]
		(mg/kg)	(mg/m^2)		
ラット	単回投与	1.0	6.0	ND	ND
	3 ヵ月	0.6	3.6	26.1	296
	6 ヵ月	0.8 (雄)	4.8	62.1	252
		0.6 (雌)	3.6	44.7	288
イヌ	単回投与	0.21	4.2	403	2140
	3 ヵ月	0.15	3.0	137	1260
	9 ヵ月	0.20	4.0	353	1870

AUC_{24} = 0 時間から 24 時間の血漿中濃度-時間曲線下面積；C_{max} = 最高血漿中濃度；MTD = 最大耐量；ND = 未実施
a　ラット及びイヌの雌雄平均値。

一般的に、ラット及びイヌを用いた GLP 準拠及び GLP 非準拠の経口投与毒性試験で忍容性を示す投与量での所見は、回復又は回復傾向が認められ、また、臨床では定期的な観察によりモニタリングが可能と考えられた。イキサゾミブによって引き起こされた顕著な毒性は、ボルテゾミブ[8]投与後に従来観察されたものと一致しており、さらに、イキサゾミブによって引き起こされた動物での神経障害はボルテゾミブでみられるものと類似していた。この障害はボルテゾミブで治療を受けた患者で観察される末梢神経障害の原因であると思われる。なお、カルフィルゾミブ[9]（別のプロテアソーム阻害薬）とは異なり、イキサゾミブでは心肺毒性がないと考えられた。

ラット及びイヌを用いた静脈内投与毒性試験（期間は最長 5 サイクル）でみられた影響は、経口投与後にみられた毒性と概ね一致していたが、静脈内投与の場合には程度の悪化、頻度の増加又は追加的な標的器官毒性がみられ、これは一般的に曝露量（C_{max} 及び AUC）が経口投与と比べて高いことに起因するものと推定された。経口投与毒性試験と同様に、静脈内投与での用量制限毒性（DLT）は、主に、ラット及びイヌ共に胃腸への影響及びリンパ球減少作用によるものであり、忍容性を示す投与量での他の標的器官での毒性は回復又は回復傾向が認められ、臨床ではモニタリング可能であると考えられた。

2.6.6.1.2 遺伝毒性試験

イキサゾミブは、細菌を用いた復帰突然変異試験では変異原性は認められなかった。ボルテゾミブ及びカルフィルゾミブと同様に、イキサゾミブ（イキサゾミブクエン酸エステルとして添加もしくは投与）は、ヒト末梢血リンパ球（HPBL）を用いた in vitro 染色体異常誘発試験では陽性であったが、マウスを用いた in vivo 骨髄小核試験では染色体異常を誘発せず、マウスを用いて腺胃及び肝臓で tail DNA（%）を評価した in vivo コメット試験でも陰性であった。したがって、イキサゾミブは遺伝毒性リスクをもたないと考えられる。

2.6.6.1.3 がん原性試験

イキサゾミブクエン酸エステルは、少なくとも 1 回の前治療を受けたことがある多発性骨髄腫（MM）患者の治療を目的としているため、ICH S9[1]に従い、がん原性試験は実施しなかった。

2.6.6.1.4 生殖発生毒性試験

胚・胎児発生に関する毒性を評価するため、妊娠ラット及びウサギを用いて試験を実施した。妊娠ラットの用量設定試験において、胎児体重の減少、胎児生存率の低下傾向及び着床後死亡の増加が認められた。しかし、これらの所見は最終確定試験では再現されなかった（ラット胚･胎児パラメータに対する無毒性量(NOAEL)は≥0.6 mg/kg(妊娠 15 日目の平均 AUC_{72} [0 時間から 72 時間の AUC] = 1103 ng·hr/mL）。

妊娠ウサギを用いて実施した用量設定試験において、イキサゾミブは、1 mg/kg の投与量で胚･胎児死亡及び着床後死亡をもたらしたが(妊娠 19 日目の平均 AUC_{72} = 1340 ng·hr/mL)、これらの所見は、同じ投与量で実施した最終確定試験では明確には再現されなかった。最終確定試験では、胎児骨格の変異／異常の増加（尾椎、腰椎数、完全過剰肋骨）が≥0.3 mg/kg の投与量で観察された。ウサギの胚・胎児発生についての無毒性量（NOAEL）は 0.1 mg/kg であると考えられた（妊娠 19 日目の AUC_{72} = 497 ng·hr/mL）。

他のプロテアソーム阻害薬（ボルテゾミブ[8]及びカルフィルゾミブ[9]）を投与したラット及びウサギでは、母動物にごくわずかな毒性しか示さない投与量で、胚・胎児死亡が観察されている。イキサゾミブ及び同じクラスの他の薬剤に関するデータから、イキサゾミブはヒトの胚・胎児に影響を及ぼす可能性が考えられる。

2.6.6.1.5 局所忍容性試験

ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験の一環として、イキサゾミブ及びイキサゾミブクエン酸エステル経口投与後の局所忍容性を評価した。患者に投与した製剤はカプセル剤として製剤されたイキサゾミブクエン酸エステルであり、イキサゾミブクエン酸エステルは、pH 値が胃液と同じ値を示す場合であっても速やかに加水分解されてイキサゾミブとなることから（Section 2.3.S.3.1.2）、局所忍容性は、イキサゾミブクエン酸エステル及びイキサゾミブの両方の曝露に関連する。ラット及びイヌを用いた反復経口投与毒性試験の結果から、イキサゾミブクエン酸エステル及びイキサゾミブには局所刺激性はないと予測される。なお、胃では局所刺激と思われる被験物質関連の有害作用は観察されなかった。

2.6.6.1.6 光毒性試験

マウス胎児由来の BALB/3T3 clone A31 細胞を用いた光毒性試験では、イキサゾミブは光毒性反応を引き起こさなかった。したがって、イキサゾミブは光毒性リスクをもたないと考えられる。

2.6.6.1.7 結論

一連の非臨床試験においてイキサゾミブの毒性を評価した。ラット及びイヌの両方における標的器官は、胃腸系、リンパ系、骨髄系及び神経系であり、これらの所見は経口投与後及

び静脈内投与後に認められ、特に静脈内投与後には程度、若しくは発現頻度のわずかな増加又はその他の毒性が観察される傾向にあった。これらの作用は、投与量、全身曝露量、投与頻度（サイクル内で投与回数及びサイクル数）と関連しており、一般的に回復又は回復傾向が認められ、プロテアソーム阻害作用に起因した予想されるものであった。

本承認申請の時点で、イキサゾミブに関する非臨床安全性評価によって得られた主な所見は、患者において観察される可能性がある毒性（胃腸、リンパ系、神経毒性）を反映するものであり（Section 2.7.4.2）、また、それらは概ね可逆的でモニタリング可能であり、さらにプロテアソーム活性に対する薬理学的阻害を反映したものと考えられた。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

イキサゾミブ又はイキサゾミブクエン酸エステルをCD-1マウスへ単回経口投与並びにSprague-Dawleyラット及びビーグル犬へ単回経口投与又は単回静脈内投与した一連の毒性試験において、イキサゾミブの毒性を評価した。

表2.6.6.2-1に単回投与毒性試験の概要を示す。

表2.6.6.2-1　イキサゾミブ単回投与毒性試験

投与被験物質	投与経路	数／性別／群	投与量(mg/kg)	観察期間	GLP	添付資料番号
CD-1マウス						
イキサゾミブクエン酸エステル	経口	11/M	2、4及び8[a]	24時間	非準拠	4.2.3.1-1
Sprague-Dawleyラット						
イキサゾミブ	経口	3/M	0.1、0.3又は1	8日	非準拠	4.2.3.1-2
イキサゾミブ	静注	6/M	0.1、0.3、1又は3	8日	非準拠	4.2.3.1-3
イキサゾミブ	静注	3/F	0又は0.3	8日	非準拠	4.2.3.1-4
ビーグル犬						
イキサゾミブクエン酸エステル	経口	2/M	0.021、0.07、0.14及び0.21[a, b]	8日	非準拠	4.2.1.3-3
イキサゾミブ	静注	1/M; 3/M	0.1、0.3及び0.6	7日	非準拠	4.2.3.1-5

F＝雌；GLP＝医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準；M＝雄

a　イキサゾミブ換算投与量。

b　0.021 mg/kgを投与した動物と同じ動物に、7日間の休薬期間後、さらに0.14 mg/kgを投与した。

2.6.6.2.1 マウスを用いたイキサゾミブクエン酸エステル単回経口投与毒性試験

：添付資料番号4.2.3.1-1（参考）

CD-1マウスを用いた単回投与毒性試験を実施し、イキサゾミブクエン酸エステルを強制経口投与した場合のイキサゾミブの毒性及びトキシコキネティクス（TK）について評価した（概要表2.6.7.5；添付資料番号4.2.3.1-1）。各群11匹の雄マウスに対し、注射用水で溶解し、3%（重量比 [w:w]）グリシン含有[redacted]で希釈したイキサゾミブクエン酸エステル 2、4又は8 mg/kg（イキサゾミブ換算投与量）を単回経口投与した。生死、一般状

態の観察、及び血漿 TK 解析（投与後 24 時間）を実施した。剖検及び病理組織学的検査は実施しなかった。

8 mg/kg 投与群の動物はすべて、投与 6 時間後に有害性を示す臨床徴候（自発運動の低下、低体温及び瀕死状態）を示したため、安楽死させる必要があった。2 mg/kg 投与群及び 4 mg/kg 投与群では本剤投与に関連した影響は認められなかった。

2 mg/kg 投与群及び 4 mg/kg 投与群では、C_{max} と 0 時間から 24 時間の AUC（AUC_{24}）が用量依存性を示して増加した（表 2.6.6.2-2）。8 mg/kg 投与群では、すべての動物を早期安楽死処分したため、トキシコキネティクス解析は実施しなかった。

表 2.6.6.2-2　CD-1 マウスへのイキサゾミブクエン酸エステル単回投与時の血漿中イキサゾミブの TK パラメータ平均値

投与量 (mg/kg)[a]	t_{max} (時間)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{24} (ng·hr/mL)
2	1.0	108	557
4	0.3	219	926
8	NC[b]	NC	NC

出典：添付資料番号 4.2.3.1-1

AUC_{24} = 0 時間から 24 時間の血漿中濃度-時間曲線下面積；C_{max} = 最高血漿中濃度；NC = 未算出；t_{max} = 最高血漿中濃度到達時間

注記：n = 2 匹／タイムポイント／群

a　イキサゾミブ換算投与量。

b　8 mg/kg 投与群の動物はすべて瀕死状態のため安楽死させたことから、トキシコキネティクス解析は実施しなかった。

結論として、8 mg/kg 単回投与は、瀕死状態及び一般状態観察で有害性を示したため、安楽死させる必要があったことから、4 mg/kg（平均血漿中 AUC_{24} = 926 ng·hr/mL）が本試験条件下での最大耐量であると考えられた。本試験の成績（毒性及び TK 解析による曝露量）は、in vivo 小核試験（Section 2.6.6.4.3.1）の用量設定に用いられた。

2.6.6.2.2 ラットを用いたイキサゾミブ単回経口投与毒性試験

：添付資料番号 4.2.3.1-2（参考）

雄 Sprague-Dawley ラットを用いた単回投与毒性試験を実施し、強制経口投与したイキサゾミブ（ロット番号 ML00604174-732-G）の最大耐量（MTD）を決定した（概要表 2.6.7.5；添付資料番号 4.2.3.1-2）。各群 3 匹の雄ラットに対し、ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン（HP-β-CD）10%で調製したイキサゾミブ 0.1、0.3 又は 1 mg/kg を投与した。生死、一般状態及び体重を観察した。すべての動物を 8 日目に安楽死させ、剖検を実施した。本試験ではトキシコキネティクス解析は実施しなかった。

すべてのラットが安楽死処分予定日まで生存した。

被験物質投与に関連する影響は、1 mg/kg 投与群のみで認められ、活動低下（1～3 日目）、体重増加量の減少（1～4 日目）、排便量の減少（2～4 日目）、軟便（1～2 日目）及び被毛汚染（1～3 日目）が認められた。剖検ではいかなる肉眼的所見も報告されなかった。これらの所見に基づき、単回経口投与後の Sprague-Dawley ラットにおけるイキサゾミブの MTD は 1 mg/kg であると考えられた。

2.6.6.2.3 雄ラットを用いたイキサゾミブ単回静脈内投与毒性試験

：添付資料番号 4.2.3.1-3（参考）

雄 Sprague-Dawley ラットを用いた単回投与毒性試験を実施し、静脈内投与したイキサゾミブ（ロット番号 ML00604174-732-G）の最大耐量（MTD）及びトキシコキネティクス（TK）を評価した（概要表 2.6.7.5；添付資料番号 4.2.3.1-3）。主試験用として各群 3 匹の雄ラットに、TK 解析用として各群 3 匹の雄ラットに、HP-β-CD 10%とマンニトール 2.8%の混合液で調製したイキサゾミブ 0.1、0.3、1 又は 3 mg/kg を投与した。生死、一般状態、体重、臨床病理学的パラメータ（血液学的検査、血液生化学検査及び血液凝固系検査）を観察、並びに TK 解析（投与後 24 時間）を実施した。試験終了時に生存していたラットは、8 日目に安楽死させ、剖検を実施した。

イキサゾミブ 1 mg/kg 又は 3 mg/kg 単回静脈内投与は忍容性を示さず、1 日目に当該投与群のラットすべてに人道的な安楽死処分を必要とする一般状態の悪化が認められた。本試験における MTD は体重増加量のわずかな減少及び軽微な臨床病理学的変化のみられる 0.3 mg/kg（平均血漿中 AUC_{24} = 243 ng·hr/mL）であり、無作用量（NOEL）は 0.1 mg/kg（AUC_{24} = 116 ng·hr/mL）であると考えられた。

2.6.6.2.4 雌ラットを用いたイキサゾミブ単回静脈内投与毒性試験

：添付資料番号 4.2.3.1-4（参考）

雌 Sprague-Dawley ラットを用いた単回投与毒性試験を実施し、静脈内投与したイキサゾミブ（ロット番号 ML00604174-732-G）の忍容性及びトキシコキネティクス（TK）について評価した（概要表 2.6.7.5；添付資料番号 4.2.3.1-4）。各群 3 匹の雌ラットに溶媒対照（HP-β-CD 10%とマンニトール 2.8%の混合液）又はイキサゾミブ 0.3 mg/kg を投与した。さらに 3 匹の雌ラットにイキサゾミブ 0.3 mg/kg を投与し、TK 解析を実施した。生死、一般状態、体重、臨床病理学的パラメータ（血液学的検査、血液生化学検査及び血液凝固系検査）を観察、並びに TK 解析（投与後 24 時間）を実施した。すべてのラットは安楽死処分予定日の 8 日目まで生存した。すべてのラットに対して剖検を実施した。一般状態並びに血液学的検査及び血液生化学検査パラメータに軽微な変化が認められたため、イキサゾミブ の 0.3 mg/kg（平均血漿中 AUC_{24} = 343 ng·hr/mL）は、良好な忍容性を示すものの、無作用量（NOEL）ではないと考えられた。

2.6.6.2.5 イヌを用いたイキサゾミブクエン酸エステル単回経口投与毒性試験

：添付資料番号 4.2.1.3-3（参考）

雄ビーグル犬を用いた単回投与毒性試験を実施し、イキサゾミブクエン酸エステル（ロット番号 101296）を強制経口投与した場合のイキサゾミブの忍容性及びトキシコキネティクス（TK）について評価した（概要表 2.6.7.5；添付資料番号 4.2.1.3-3）。各群 2 匹の雄ビーグル犬に対し、0.5%（重量／体積比 [w:v]）メチルセルロース（MC）で調製した 0.021、0.07、0.14 及び 0.21 mg/kg（イキサゾミブ換算投与量）を投与した。0.021 mg/kg 投与群のビーグル犬に対しては 7 日間の休薬期間後、さらに 0.14 mg/kg を投与した。死亡、臨床徴候、体重、摂餌量、心電図（ECG）を観察し、血漿 TK 解析（投与後 24 時間）を実施した。剖検及び病理組織学的検査は実施しなかった。

すべてのビーグル犬は動物試験終了日まで生存した。

C_{max} 及び AUC_{24} はどちらも用量比依存性を示して増加した（表 2.6.6.2-3）。0.14 mg/kg 投与後の最高血漿中濃度到達時間（t_{max}）は、血漿濃度に二峰性のピークが認められたことから、やや遅くなった。本試験のトキシコキネティクス解析成績は、ビーグル犬の別群を用いて実施した心血管（CV）安全性薬理試験における分析に用いられた（Section 2.6.2.4.2）。

表 2.6.6.2-3　ビーグル犬へのイキサゾミブクエン酸エステル単回投与時の血漿中イキサゾミブの TK パラメータ平均値

投与量 (mg/kg)[a]	t_{max} (時間)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{24} (ng·hr/mL)
0.021	0.5	10	98
0.07	0.5	45	489
0.14	2.3	75	1047
0.21	0.5	403	2140

出典：添付資料番号 4.2.1.3-3
AUC_{24} = 0 時間から 24 時間の血漿中濃度-時間曲線下面積；C_{max} = 最高血漿中濃度；t_{max} = 最高血漿中濃度到達時間
注記：n = 2
a　イキサゾミブ換算投与量。

いずれの投与量でも、体重、摂餌量又は心電図（ECG）に対して被験物質投与に関連する影響は観察されなかった。0.21 mg/kg 投与群では被験物質投与に関連する影響の可能性のある所見（軟便及び／又は下痢のみ）が観察されたが、それらの発生が散発的であったこと及び相関する所見がないことから、それらは本剤投与による有害性を示すものとはみなさなかった。

認められた臨床所見がごく軽微であったことに基づき、本試験条件下での最大耐量（MTD）は 0.21 mg/kg（平均血漿中 AUC_{24} = 2140 ng·hr/mL）であると考えられた。

2.6.6.2.6 イヌを用いたイキサゾミブ単回静脈内投与毒性試験

：添付資料番号 4.2.3.1-5（参考）

雄ビーグル犬を用いた単回投与毒性試験を実施し、イキサゾミブ（ロット番号 ML00604174-732-G）を 5 分間点滴静注投与した場合のイキサゾミブの最大耐量（MTD）及びトキシコキネティクス（TK）について評価した（概要表 2.6.7.5；添付資料番号 4.2.3.1-5）。各群 3 匹の雄ビーグル犬に対し、HP-β-CD 10%とマンニトール 2.8%の混合液で調製したイキサゾミブ 0.1、0.3、1.0 及び 3.0 mg/kg を投与した。0.3 mg/kg 投与群で被験物質投与に関連する影響が観察されたことから、1 匹の動物に対する投与量を 1.0 mg/kg から 0.6 mg/kg に減らし（n = 1、ラジオテレメトリー送信器を体内に埋め込んだ雄[本群のみ]）、当初予定していた 1.0 mg/kg 及び 3.0 mg/kg での投与は中止した。すべての動物をモニターし、生死、一般状態、体重、臨床病理学的パラメータ（血液学的検査、血液凝固系検査及び血液生化学検査）を観察、並びに血漿 TK 解析及び薬物動態試験／薬力学試験を実施した。0.6 mg/kg 投与群ではさらに、心血管系への潜在的な薬理作用を同定するため、血圧（直接法）、心拍数、深部体温、活動性及び心電図（ECG）等の遠隔モニタリングを実施した。後述の有害作用のために必要となった場合を除き、安楽死処分又は剖検を実施しなかった。

0.3 mg/kg 投与群の 1 匹及び 0.6 mg/kg 投与群の 1 匹に臨床徴候（便の変化、嘔吐、嗜眠、脱水、低体温、頭部痙攣縮反応、運動失調）が認められたため、それぞれ 8 日目及び 1 日目に人道的安楽死処分を実施した。被験物質投与に関連する所見は臨床病理学的パラメータでは認められず、剖検での肉眼所見及び病理組織学的所見が胃腸系、リンパ系及び／又は神経系で認められた。0.1 mg/kg 投与群では、被験物質投与に関連する影響は認められなかった。0.3 mg/kg 投与群で試験終了時まで生存した動物には、被験物質投与に関連する臨床徴候（頻呼吸、皮膚の紅斑、体温上昇、嘔吐、並びに粘性便、無便及び／又は軟便）、並びに白血球数（増加）及び血清リン濃度（低下）の軽微な変化が観察された。

本試験の所見に基づき、イキサゾミブ 0.1 mg/kg での単回静脈内投与（平均血漿中 AUC_{24} = 184 ng·hr/mL）が無作用量（NOEL）及び最大耐量（MTD）であると考えられた。

2.6.6.3 反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

Sprague-Dawley ラットを用いた 6 ヵ月間（7 サイクル）までの反復投与毒性試験及びビーグル犬を用いた 9 ヵ月間（10 サイクル）までの反復投与毒性試験を実施し、イキサゾミブの全身毒性を評価した。必要に応じて、GLP 非準拠での用量設定試験を実施し、続く GLP 準拠試験での適切な投与量を決定した。

反復投与毒性試験の概要、並びに試験デザイン及び実施に関する関連情報を表 2.6.6.3-1 に示す。

表 2.6.6.3-1　イキサゾミブ反復投与毒性試験

被験物質	投与経路	投与計画	症例数/群	投与量[a] (mg/kg)	GLP	添付資料番号
Sprague-Dawley ラット						
イキサゾミブ	経口	BIW、2 週間(1 サイクル)	5 M (MS);3 M (TK)	0[b]、0.3、0.6 又は 1.0	非準拠	4.2.3.2-1
イキサゾミブ	経口	BIW、1 カ月(2 サイクル)[c]	10/sex (MS);5/sex (R);3 又は 9/sex (TK)[d]	0、0.4、0.8 又は 1.2/1.0	準拠	4.2.3.2-2 (PD 報告書: 4.2.3.2-3)
イキサゾミブクエン酸エステル	経口	BIW、3 カ月(5 サイクル)	10 又は 15/sex;6 又は 18 匹／性別 (TK)	0、0.4 又は 0.8/0.6	準拠	4.2.3.2-4
イキサゾミブクエン酸エステル	経口	QW、6 カ月 (7 サイクル)[e]	10/sex (MS),5/sex (R);3/sex (TK)	0、0.2、0.4 又は 0.8/0.6[f]	準拠	4.2.3.2-5
イキサゾミブ	静注	BIW、2 週間(1 サイクル)	5M (MS);3 M (TK)	0、0.1、0.3 又は 0.6	非準拠	4.2.3.2-6
イキサゾミブ	静注	BIW、1 カ月(2 サイクル)	10/sex (MS); 5/sex (R);3 又は 9/sex (TK)	0、0.15、0.22、0.30、0.45 又は 0.50[g]	準拠	4.2.3.2-7 (PD 報告書: 4.2.3.2-8)
イキサゾミブクエン酸エステル	静注	BIW、3 カ月(5 サイクル)	10/sex (MS); 6 又は 18/sex (TK)	0、0.05、0.15 又は 0.30	準拠	4.2.3.2-9
ビーグル犬						
イキサゾミブ	経口	7 日連続	3M	0、0.05、0.10 又は 0.20	非準拠	4.2.3.2-10
イキサゾミブ	経口	BIW、2 週間 (1 サイクル)	5/sex (MS); 2/sex (R)	0、0.1、0.15/0.2 又は 0.2/0.3[h]	準拠	4.2.3.2-11 (PD 報告書: 4.2.3.2-12)
イキサゾミブクエン酸エステル	経口	BIW、3 カ月(5 サイクル)	3 又は 6/sex (MS);3/sex(R)	0、0.05、0.10 又は 0.15	準拠	4.2.3.2-13 (PD 報告書: 4.2.3.2-14)
イキサゾミブクエン酸エステル	経口	QW、9 カ月(10 サイクル)[e]	3 又は 6/sex (MS);3/sex (R)[i];3 又は 6/sex (TK)	0、0.05、0.10 又は 0.20	準拠	4.2.3.2-15
イキサゾミブ	静注	BIW、2 週間(1 サイクル)	3M	0、0.05、0.10 又は 0.20	非準拠	4.2.3.2-16
イキサゾミブ	静注	BIW、1 カ月(2 サイクル)	5/sex (対照);3 又は 6/sex (MS);3/sex (R)	0、0.10、0.14、0.18 又は 0.25	準拠	4.2.3.2-17[j] (PD 報告書:4.2.3.2-18, 4.2.3.2-19, 4.2.3.2-20)

表 2.6.6.3-1　イキサゾミブ反復投与毒性試験（続き）

被験物質	投与経路	投与計画	症例数/群	投与量[a] (mg/kg)	GLP	添付資料番号
イキサゾミブクエン酸エステル	静注	BIW、3 ヵ月(5 サイクル)[c]	3/sex	0、0.05、0.10 及び 0.15	準拠	4.2.3.2-21 (PD 報告書：4.2.3.2-22)

BIW = 週 2 回；GLP = 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準；M = 雄；MS = 主試験；PD = 薬理試験；R = 回復；TK = トキシコキネティクス；QW = 週 1 回

a　イキサゾミブ換算投与量。

b　それぞれ溶媒対照群（7 日間 7 回投与）とイキサゾミブ投与群（11 日間 4 回投与）の動物に対する投与量。

c　各サイクル間を 10 日間の休薬期間で分離し、最終サイクル完了後に 14 日間の回復期間を設けた（回復期間を設けずに実施したラット及びイヌを用いた 5 サイクルの静脈内投与毒性試験を除く [それぞれ、添付資料番号 4.2.3.2-9 並びに 4.2.3.2-21]）。

d　重度の毒性が認められたため、第 4 群の雄には 1 サイクル目の 1 日目のみ 1.2 mg/kg を投与し、以降は投与量を 1.0 mg/kg に減らした。重度の毒性が認められたため、第 4 群の雌には 1 日目のみ 1.0 mg/kg を投与し、以降の投与は中止した。当該の雌には 2 サイクル目も投与しなかった。

e　各サイクル間を 13 日間の休薬期間で分離し、最終サイクル完了後に 14 日間の回復期間を設けた。

f　3 サイクル目から、投与量を 0.8 mg/kg から 0.6 mg/kg に減らした。

g　1 サイクル目中、他のラットに投与する前に 0.45 mg/kg 投与群の TK 解析用の雌ラットに最初に投与したところ、1 日目に重度の毒性が認められたため、第 4 群の残りの雌には投与しなかった。その後、0.45 mg/kg 投与群の主試験用及び回復性試験用の雌ラットを第 5 群に再割付し、0.22 mg/kg を投与した。また、TK 解析用の雌 9 匹を新たに本投与群に割り付けた。毒性が認められなかったことから、1 サイクル目で 0.45 mg/kg を投与した第 4 群の雄ラットには、2 サイクル目では 0.50 mg/kg を投与し、1 サイクル目で 0.22 mg/kg を投与した第 5 群の雌ラットには、2 サイクル目では 0.45 mg/kg を投与した。

h　他のイヌに投与する前に第 4 群の数匹の雄イヌに 0.3 mg/kg を投与した。1 日目に重度の毒性が認められため、残りの試験期間中、第 4 群の雄イヌにはそれ以上の投与を行わなかった。第 2 群及び第 3 群の雄イヌには、それぞれ 0.1 mg/kg 及び 0.2 mg/kg を投与した。第 2 群、第 3 群及び第 4 群の雌イヌには、それぞれ 0.1、0.15 及び 0.2 mg/kg を投与した。

i　0.5 mg/kg 投与群には回復性試験用の動物は割り付けなかった。

j　毒性試験で採取した試料を用いて、薬理試験も別途実施した。これらの副報告書番号の試験は GLP に非準拠で実施した。

2.6.6.3.1 ラットを用いたイキサゾミブ 2 週間（1 サイクル）間欠経口投与毒性試験

：添付資料番号 4.2.3.2-1（参考）

雄 Sprague-Dawley ラットを用いた間欠投与毒性試験を実施し、イキサゾミブ（ロット番号 ML00604174-732-G）を週 2 回 2 週間強制経口投与した場合のイキサゾミブの毒性及びトキシコキネティクス（TK）について評価した（概要表 2.6.7.6；添付資料番号 4.2.3.2-1）。ラットには、溶媒（HP-β-CD 10%とマンニトール 2.8%の混合液）の 1 日 1 回（QD）7 日間、又はイキサゾミブ 0.3、0.6 又は 1.0 mg/kg を 1、4、8 及び 11 日目に投与した。主試験用として各群にラット 5 匹を割り付け、イキサゾミブ投与群には TK 解析用としてさらに 3 匹を割り付けた。溶媒対照群のラットはすべて 8 日目に安楽死させ、イキサゾミブ投与群のラットは 12 日目に安楽死させた。評価したパラメータは、生死、一般状態、体重、簡易 Irwin 試験（Mini-Irwin test）パラメータ（運動失調、振戦、発作、立毛及び姿勢異常の観察で構成）、体温、臨床病理学的パラメータ（血液学的検査、血液凝固系検査、血液生化学検査、尿検査及び尿生化学検査）、薬力学解析及び TK 解析パラメータ（1 日目及び 11 日目）、器官重量、並びに肉眼検査及び顕微鏡検査による病理学的所見であった。

血漿中イキサゾミブ濃度のC_{max}及びAUC_{24}は、すべての投与量で用量依存的に上昇した（表2.6.6.3-2）。イキサゾミブは、血漿中ではいずれの投与量でもほとんど又は全く蓄積しなかった。

表 2.6.6.3-2　Sprague-Dawley ラットへのイキサゾミブ週 2 回 2 週間経口投与時の血漿中イキサゾミブの TK パラメータ平均値

投与量 (mg/kg)	解析実施日	t_{max} (時間)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{24} (ng·hr/mL)
0.3	1 日目	1.0	7.46	151
	11 日目	4.3	9.38	204
0.6	1 日目	1.0	36.0	442
	11 日目	4.3	25.9	480
1.0	1 日目	1.0	55.6	612
	11 日目	2.0	37.9	643

出典：添付資料 4.2.3.2-1
AUC_{24} = 0 時間から 24 時間の血漿中濃度-時間曲線下面積；C_{max} = 最高血漿中濃度；t_{max} = 最高血漿中濃度到達時間
注記：n = 3

いずれのラットも安楽死処分予定日まで生存した。0.3 mg/kg の投与量では被験物質投与に関連する所見はなく、≥ 0.6 mg/kg の投与量では、簡易 Irwin 試験、体温、血液凝固系検査、尿検査又は尿生化学検査における所見はなかった。

≥ 0.6 mg/kg の投与量で認められた被験物質投与に関連する病理所見は、一般的に発生頻度及び重症度において用量依存的であり、胃腸、リンパ系組織及び造血系組織に限定されていた。消化管病変としては、軽微から軽度の粘膜過形成、大腸及び小腸粘膜における軽微から中等度の好中球浸潤、並びに 1.0 mg/kg の投与量では胃及び小腸の内腔拡張がみられた。
≥ 0.6 mg/kg の投与量における一過性の体重減少（7 日目）、1.0 mg/kg の投与量での糞量減少、軟便及び被毛汚染は、いずれも消化管病変による一般状態の悪化に起因するものと考えられた。12 日目のアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）及び／又はソルビトール脱水素酵素（SDH）の上昇も、0.6 mg/kg 投与群の数匹でしか認められなかったものの、消化管病変を反映したものである可能性が高かった。≥ 0.6 mg/kg では血糖値の上昇が認められたが、観察された病理所見との関係は不明であった。

≥ 0.6 mg/kg の投与量で認められたリンパ系組織及び造血系組織への影響としては、中等度から著明な胸腺皮質のリンパ球減少（おそらくはストレスに起因）、脾臓類洞における軽微から軽度の好中球性白血球増多、腸間膜リンパ節における軽微から軽度のリンパ球壊死及び軽微から軽度の好中球浸潤、骨髄における軽微から軽度の細胞密度の低下があった。病理所見と相関性が示された肉眼所見としては、≥ 0.6 mg/kg での胸腺の縮小及び重量減少（絶対及び相対重量）、1.0 mg/kg での脾重量減少（絶対及び相対重量）があった。病理所見と相関性が示された血液学的検査所見としては、好中球絶対数（ABS NEUT）増加、並びに 1.0 mg/kg での白血球増加及び血小板減少が認められた。

1.0 mg/kg で肝重量（相対重量）増加が観察されたが、病理所見との相関性は認められなかった。

結論として、イキサゾミブの週2回1サイクルの経口投与は、投与量が1.0 mg/kg以下の場合では良好な忍容性を示した。毒性標的器官としては、消化管、リンパ系組織及び造血系組織への影響が認められたが、≥0.6 mg/kgの投与量の場合に限定されていた（11日目のAUC24 ≥ 480 ng·hr/mL）。無作用量（NOEL）は0.3 mg/kg（11日目のAUC_{24} = 204 ng·hr/mL）であると考えられた。

2.6.6.3.2 ラットを用いたイキサゾミブ 1ヵ月間（2サイクル）間欠経口投与毒性試験
：添付資料番号 4.2.3.2-2（評価），4.2.3.2-3（参考）

雌雄Sprague-Dawleyラットを用いた間欠投与毒性試験を実施し、イキサゾミブ（ロット番号MLN2238-001-D）を32日間にわたって2サイクル経口強制投与した場合のイキサゾミブの潜在的毒性及びトキシコキネティクス（TK）について評価した（概要表2.6.7.7A；添付資料番号4.2.3.2-2）。各サイクルを週2回（BIW）の2週間の投与期間とそれに続く10日間の休薬期間で構成した。2サイクル目終了後に14日間の回復期間を設けた。ラットに溶媒（プロピレングリコール1%含有[redacted]又はイキサゾミブの0.4、0.8若しくは1.2 mg/kgを投与した。1.2 mg/kgの単回投与で忍容性を示さなかったため、生存した雄ラットへのそれ以降の投与は、投与量を1.0 mg/kgに減らして実施した。高用量群の雌は1サイクル目に1.0 mg/kgを単回投与したが忍容性を示さなかったため、高用量群の残りの雌ラットには、残りの試験期間に被験物質は投与しなかった。各群に雌雄各15匹のラットを割り付け（主試験用10匹及び回復性試験用5匹）、TK解析用として溶媒対照群には雌雄各3匹、イキサゾミブ投与群には雌雄各9匹を割り付けた。2サイクル目の投与完了後、主試験用に割り付けたラット（各群雌雄各10匹[最大]）を33日目に安楽死させ、回復性試験に割り付けた残りのラット（各群雌雄各5匹[最大]）は、14日間の回復期間後47日目に安楽死させた。高用量群の生存雌ラットは、1日目に投与を中止していたため、33日目にすべて安楽死させた。評価したパラメータは、生死、一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査、臨床病理学的パラメータ（血液学的検査、血液凝固系検査、血液生化学的検査、尿検査及び尿生化学的検査）、薬力学解析／TK解析パラメータ（1、11、22及び32日目）、器官重量、並びに肉眼的及び病理組織学的検査（骨髄塗抹標本を含む）であった。

C_{max}及びAUC_{24}によって判断されたイキサゾミブの血漿中曝露量は、すべての投与量で概ね用量比依存的に増加し（表2.6.6.3-3）、雌雄間でほぼ同等の結果が得られた。また、試験期間を通して蓄積は認められなかった。血液試料を用いた薬力学解析において、イキサゾミブは、雌雄両方でかつすべての投与量で中程度から良好なプロテアソーム阻害活性を示したが、明確な用量依存性が認められなかったことから、飽和効果が示唆された（概要表2.6.7.7A；添付資料番号4.2.3.2-3）。

表 2.6.6.3-3　Sprague-Dawley ラットへのイキサゾミブ週 2 回 2 サイクル経口投与時の血漿中イキサゾミブの TK パラメータ平均値

投与量 (mg/kg)	採血日	t_{max} (時間)		C_{max} (ng/mL)		AUC_{24} (ng·hr/mL)	
		雄	雌	雄	雌	雄	雌
0.4	1 日目	1.0	1.0	16.3	34.9	243	361
0.4	11 日目	1.0	1.0	28.7	17.9	330	298
0.4	22 日目	1.0	0.5	15.6	13.8	228	186
0.4	32 日目	0.5	0.5	15.4	10.7	277	205
0.8	1 日目	1.0	1.0	38.8	107	407	774
0.8	11 日目	0.5	1.0	34.8	60.7	387	533
0.8	22 日目	0.5	0.5	27.2	34.4	293	270
0.8	32 日目	0.5	0.5	25.0	36.6	362	395
1.2/1.0[a]	1 日目	0.5	1.0	147	123	711	819
1.0	11 日目	0.5	NV	50.1	NV	577	NV
1.0	22 日目	0.5	NV	36.0	NV	311	NV
1.0	32 日目	0.5	NV	41.2	NV	521	NV

参照：添付資料番号 4.2.3.2-2

AUC_{24} = 0 から 24 時間の血漿中濃度-時間曲線下面積；C_{max} = 最高血漿中濃度；NV = 数値なし；t_{max} = 最高血漿中濃度到達時間

注記：1 日目及び 11 日目は 1 サイクル目、22 日目及び 32 日目は 2 サイクル目を示す。n = 3 匹／性／群／測定時点

a　1.2 mg/kg 投与群の雄への投与量は、1 日目投与後、1.0 mg/kg に減量した。1.0 mg/kg 投与群の雌に対しては、1 日目投与後、投与を中止した。

本試験期間中の死亡数は合計 20 匹であった（死亡状況としては、観察時死亡若しくは発見時死亡又は瀕死状態のため安楽死）（表 2.6.6.3-4）。20 匹中 9 匹（対照投与群の 2 匹を含む）は TK 測定用の採血後に死亡した。これらの死亡は採血操作に関連していると推定され、イキサゾミブの投与に起因するものではないと考えられた。瀕死状態のため安楽死したラットについて、瀕死の原因としては、腸粘膜毒性（急性炎症、浮腫、粘膜肥厚及び粘膜固有層の固有の細胞減少）及びそれに関連する体液及び電解質の異常が考えられた。さらに、軽微から中等度の骨髄細胞減少、胸腺における軽微から中等度の皮質細胞壊死及び軽度の細胞減少、副腎における軽微から中等度の皮質束状帯細胞壊死及び空胞化、並びに脾臓、パイエル板及び／又はリンパ節（下顎及び腸間膜）における軽微から中等度のリンパ球減少もみられた。死亡前の臨床徴候も胃腸障害（粘性便及び軟便）並びにストレス（円背位、尿及びポルフィリンによる汚染）との一致が認められた。これらのラットの多くでは、軽微から中等度の肝細胞空胞化がみられた。これらのラットの数匹で観察された軽微から軽度の肝臓における凝固壊死は、瀕死状態に起因する二次的な影響であり、被験物質投与に関連する一次的な影響ではないと考えられた。

表 2.6.6.3-4　イキサゾミブ経口投与 Sprague-Dawley ラットの早期死亡の概要

投与量 (mg/kg)	性別	死亡日	死亡状況	推定死亡原因
0	M	12 日目	観察時死亡	採血操作に関連
0	F	21 日目	観察時死亡	採血操作に関連
0.4	M	12 日目	観察時死亡	採血操作に関連
0.4	F	21 日目	観察時死亡	採血操作に関連
0.8	M	12 日目	観察時死亡	採血操作に関連
0.8	M	12 日目	観察時死亡	採血操作に関連
0.8	M	12 日目	観察時死亡	採血操作に関連
0.8	F	12 日目	観察時死亡	採血操作に関連
0.8	F	12 日目	観察時死亡	採血操作に関連
1.2/1.0[a]	M	2 日目	瀕死状態のため安楽死[c]	代謝ストレス[c]
1.2/1.0	M	2 日目	瀕死状態のため安楽死[c]	代謝ストレス[c]
1.2/1.0	M	2 日目	瀕死状態のため安楽死[c]	代謝ストレス[c]
1.2/1.0	M	2 日目	瀕死状態のため安楽死[c]	代謝ストレス[c]
1.2/1.0	M	2 日目	発見時死亡[c]	代謝ストレス[c]
1.2/1.0	M	21 日目	発見時死亡	推定不能[d]
1.0	F	2 日目	瀕死状態のため安楽死[c]	代謝ストレス[c]
1.0	F	2 日目	瀕死状態のため安楽死[c]	代謝ストレス[c]
1.0	F	2 日目	瀕死状態のため安楽死[c]	代謝ストレス[c]
1.0	F	2 日目	発見時死亡[c]	代謝ストレス[c]
1.0	F	3 日目	発見時死亡[c]	代謝ストレス[c]

出典：添付資料番号 4.2.3.2-2

F = 雌 ; M = 雄

a　第 4 群の雄では、1 日目の投与後、投与量を 1.2 mg/kg から 1.0 mg/kg に減量した。1.0 mg/kg を投与した第 4 群の雌に対しては、1 日目の投与後、投与を中止した。

b　1.0 mg/kg を投与した第 4 群の雌に対しては、1 日目の投与後、投与を中止した。c　　これらの死亡は被験物質投与に関連するものと考えられた。当該ラットの死因は、腸毒性に起因する代謝ストレスであった。

d　当該ラットは、誤って冷凍庫に入れてしまったため、病理組織学的検査を行うことができず、被験物質投与と死亡との関係は判定できなかった。

すべての投与量（0.4、0.8 及び 1.2/1.0 mg/kg）で、消化管及び副腎に所見がみられたが、発生頻度又は重症度は概ね用量依存的であった。消化管の病変としては、軽微から軽度の腸粘膜肥厚及び／又は軽微から軽度の急性炎症が認められた。剖検では、すべての投与量で動物状態悪化に起因する胃膨張が観察された。消化管への影響に関連する可能性がある臨床病理学的変化として、ALT、AST、アルカリホスファターゼ（ALP）、血中尿素窒素（BUN）及びコレステロールの低下が認められた（これらのパラメータがすべての投与量及び／又は雌雄両方ですべて低下したわけではない）。さらに、炎症反応（消化管所見と関連している可能性がある）と一致する白血球、好中球、単球及びフィブリノゲンの増加、並びに好塩基球の増加及び好酸球の減少が認められた。0.8 mg/kg 及び 1.2/1.0 mg/kg 投与群では体重及び摂餌量の減少、並びに 1.2/1.0 mg/kg 投与群では軟便、ポルフィリン、尿による汚染及び被毛状態の悪化が観察されたが、これらも消化管毒性を反映したものである可能性が高い。軽微から軽度の副腎皮質細胞空胞化もすべての投与量で観察され、0.8 mg/kg 投与群及び 1.2/1.0 mg/kg 投与群の雄では、副腎の相対重量の増加と相関していた。肝重量（絶対あるい

は相対重量）の増加もすべての投与量で認められたが、病理組織学的所見との相関はなかった。

0.8 mg/kg及び1.2/1.0 mg/kg投与群では、リンパ系組織及び骨髄に対する影響が認められた。すなわち、腸間膜リンパ節及び下顎リンパ節における軽微から中等度のリンパ球減少、胸腺皮質における軽微から中等度の細胞減少、パイエル板における軽微から軽度のリンパ球減少が観察され、骨髄塗抹標本では、対照と比較し、総骨髄細胞数の増加及び骨髄の骨髄球系／赤芽球系（M:E 比）の上昇、並びにリンパ球減少が認められた。相関性のある肉眼所見としては、胸腺の縮小及び胸腺重量（絶対及び相対重量）の減少があった。

結論として、雄ラットにおける 1.2 mg/kg 又は雌ラットにおける 1.0 mg/kg の単回経口投与は、死亡を引き起こした。これらの死亡は、腸粘膜毒性並びに腸粘膜毒性に関連する体液及び電解質の異常によって引き起こされた代謝ストレスに起因しており、さらに、これらのラットでは骨髄細胞の減少も観察された。毒性標的器官として、消化管、副腎、骨髄、リンパ系組織に対する影響がみられたが、回復期間終了までに回復又は回復傾向が認められた。供試動物の 10%に重篤な毒性が発現する投与量（STD10）は 1.0 mg/kg（32 日目の AUC_{24} = 521 ng·hr/mL）であった。

2.6.6.3.3 ラットを用いたイキサゾミブクエン酸エステル 3 ヵ月間（5 サイクル）間欠経口投与毒性試験

：添付資料番号 4.2.3.2-4（評価）

雌雄 Sprague-Dawley ラットを用いた間欠投与毒性試験を実施し、イキサゾミブクエン酸エステル（ロット番号 IC016SA01）を 94 日間にわたって 5 サイクル強制経口投与した場合のイキサゾミブの全身毒性及びトキシコキネティクス（TK）について評価した（概要表 2.6.7.7B；添付資料番号 4.2.3.2-4）。各サイクルを最初の 2 週間における週 2 回（BIW）の投与期間とそれに続く 10 日間の休薬期間で構成した。5 サイクル目完了後に 14 日間の回復期間を設けた。ラットには、溶媒（米国薬局方 [USP] 適合滅菌注射用水 [SWI]で調製した塩化ナトリウム 0.45%含有[redacted] 又はイキサゾミブクエン酸エステルを投与した。イキサゾミブクエン酸エステルの投与量は、1 サイクル目及び 2 サイクル目は 0.2、0.4 及び 0.8 mg/kg（イキサゾミブとして）で、3 サイクル目からは最高用量群の投与量を 0.8 mg/kg から 0.6 mg/kg に減らした。各群に雌雄 15 匹のラットを割り付け（主試験用 10 匹及び回復性試験用 5 匹 [ただし 0.2 mg/kg 投与群は主試験用のみ雌雄各 10 匹を割り付けた]）、さらに、TK 測定用として溶媒対照群に雌雄各 6 匹、被験物質投与各群に雌雄各 18 匹を割り付けた。5 サイクル目の投与後、主試験用に割り付けたラット（各群雌雄各最大 10 匹）を 95 日目に安楽死させ、残りの回復性試験用に割り付けたラット（各群雌雄各最大 5 匹）は、14 日間の回復期間後の 109 日目に安楽死させた。評価したパラメータは、生死、一般状態、動物状態、体重、摂餌量、眼科学的検査、臨床病理学的パラメータ（血液学的検査、血液凝固系検査、血液生化学的検査、尿検査及び尿生化学検査）、TK 解析パラメータ（0 日目及び 94 日目）、器官重量、並びに肉眼的及び病理組織学的検査であった。本試験では薬力学解析は実施しなかった。

イキサゾミブの血漿中曝露量（C_{max} 及び AUC_{24}）は、すべての投与量で概ね用量依存的に増加した（表 2.6.6.3-5）。イキサゾミブの曝露量に明確な性差は認められなかった。イキサ

ゾミブの曝露量は、0.2 mg/kg 及び 0.4 mg/kg 投与群では、0 日目より 94 日目の方が高く、血漿中イキサゾミブの蓄積が示された。0.8/0.6 mg/kg 投与群における蓄積は、3 サイクル目から投与量を減らしたため評価できなかった。

表 2.6.6.3-5　Sprague-Dawley ラットへのイキサゾミブ週 2 回 5 サイクル経口投与時の血漿中イキサゾミブの TK パラメータ平均値

投与量[a] (mg/kg)	採血日	t_{max} (時間)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{24} (ng·hr/mL)
0.2	0 日目	2.0	4.19	92.7
0.2	94 日目	2.0	8.53	156
0.4	0 日目	0.5	11.3	193
0.4	94 日目	2.0	18.4	253
0.8	0 日目	0.5	29.2	395
0.8/0.6[b]	94 日目	0.5	26.1	296

出典：添付資料番号 4.2.3.2-4
AUC_{24} = 0 時間から 24 時間の血漿中濃度-時間曲線下面積；Cmax = 最高血漿中濃度；tmax = 最高血漿中濃度到達時間
注記：0 日目及び 94 日目は 1 サイクル目及び 5 サイクル目をそれぞれ示す。
n = 3 匹／性別／群／時点
a　イキサゾミブとして。
b　3 サイクル目から投与量を 0.8 mg/kg から 0.6 mg/kg に減らした。

0.8 mg/kg 群において、2 サイクル投与後、1 匹の雄及び 1 匹の雌に、運動量低下、皮膚弛緩、削痩、四肢の蒼白化、触診による四肢及び／又は体の冷感、努力性呼吸、糞量減少、並びに小さい糞等の一般状態の変化が認められ、それぞれ 29 日目及び 31 日目に瀕死のため安楽死処分した。当該状態の一因と考えられる病理所見としては、軽微から中等度の消化管上皮変性、軽微から軽度の腸上皮単細胞壊死、軽微から軽度の腸の急性炎症、軽度の骨髄細胞密度の低下／単細胞壊死及び／又は軽度から中等度のリンパ球減少がみられ、敗血症になりやすい状態になっていると考えられた。さらに 3 匹のラットが死亡した。3 匹中 2 匹は溶媒対照群（雄 1 匹及び雌 1 匹）であったため、被験物質投与との関連性はなかった（経口強制投与又は採血による傷害が関連）。残りの 1 匹は 0.8/0.6 mg/kg 投与群の雌で、95 日目に臨床病理学的検査のための採血後、間もなく死亡した。当該ラットは 5 サイクルの投与を完了しており、小腸における軽度から中等度の上皮過形成、中等度のリンパ球減少、並びに腸間膜リンパ節及び／又は膝窩リンパ節における軽微な単細胞壊死等の病理所見が認められた。本死亡は、採血操作が関連していると考えられた。

試験終了時まで生存していたラットでは、いずれの投与量でも、投薬に起因する一般状態観察、眼科学的検査、剖検及び血液凝固系検査パラメータの変化は観察されなかった。

主試験の病理組織学的検査ではすべての投与量で、投薬起因の所見が、消化管及びリンパ節において観察された。消化管の所見としては、すべての投与量で観察された小腸における軽微から軽度の上皮過形成、軽微な急性炎症及び粘膜の単細胞壊死、並びに 0.8/0.6 mg/kg 投与群で観察された直腸における軽微な上皮過形成及び急性炎症があった。血液学的検査において一般的に消化管の炎症と相関する変化として、0.2 mg/kg 以上の投与量での血中の白血球、好中球、リンパ球、単球及び／又は好塩基の増加が認められた。0.4 mg/kg 以上の投与量での摂餌量の減少、0.8/0.6 mg/kg 投与群の雄での体重増加量の減少も消化管損傷と関連している可能性が高く、また、コレステロール（CHOL）及びカリウム（K）の低下の一因になってい

る可能性もあった。下顎・腸間膜リンパ節及び／又はパイエル板における軽微から中等度のリンパ球減少、リンパ節における軽微から軽度の単細胞壊死もすべての投与量で観察された。0.4 mg/kg 以上の投与量での好酸球及び血小板数の減少は、被験物質に関連している可能性が高かった。いずれの所見も 14 日間の回復期間終了までに回復又は回復傾向が認められた。

被験物質投与との関連が明確ではない所見として、0.2 mg/kg 以上の投与量での BUN 及び ALP の低下並びに血糖値のわずかな上昇、尿検査では 0.2 mg/kg 又は 0.4 mg/kg 以上の投与量でそれぞれ総カルシウム濃度及び／又は塩素濃度の低下、並びに 0.8/0.6 mg/kg 投与群の雌で尿蛋白質の軽度な高値が認められた。0.2 mg/kg 以上の投与量の雌では、副腎及び肝臓の絶対及び相対重量の増加が認められたが、病理組織学的検査との関連は認められなかった。0.8/0.6 mg/kg 投与群では雄 10 匹中 1 匹に中等度の慢性進行性腎症が認められた。これは一般的にもみられる病変であったが、重症度は本試験施設の背景データに一致しなかった。したがって、本所見は被験物質投与との関連は不明であると判断された。これらの所見はすべて、回復期間の終了までに回復又は回復傾向が認められた。

結論として、週 2 回 5 サイクル経口投与は、0.4 mg/kg 以下の投与量では良好な忍容性を示した。0.8 mg/kg の投与量（0 日目の平均血漿中 AUC_{24} = 395 hr/ng/mL）は、用量制限毒性である消化管粘膜における変性、壊死及び炎症、並びにリンパ球の減少（骨髄細胞密度の低下を含む）をもたらした。生存ラットにおける投与量を 0.6 mg/kg（94 日目の平均血漿中 AUC_{24} = 296 ng·hr/mL）に減らしたところ、残りの試験期間において忍容性を示したため、0.6 mg/kg が本試験における最大耐量（MTD）であると考えられた。概して、すべての投薬起因の変化は、回復期間終了までに回復又は回復傾向が認められた。本薬の申請効能・効果を前提とした場合、0.4 mg/kg 以下の投与量では危惧すべき毒性変化なしと判断した。

2.6.6.3.4 ラットを用いたイキサゾミブクエン酸エステル 6 ヵ月間（7 サイクル）間欠経口投与毒性試験

：添付資料番号 4.2.3.2-5（評価）

雌雄 Sprague-Dawley ラットを用いた間欠投与毒性試験を実施し、イキサゾミブクエン酸エステル（ロット番号 101296）を 6 ヵ月間にわたって 7 サイクル強制経口投与した場合のイキサゾミブの全身毒性及びトキシコキネティクス（TK）について評価した（概要表 2.6.7.7C；添付資料番号 4.2.3.2-5）。各サイクルを週 1 回投与 3 回で構成し、各サイクル間に 13 日間の休薬期間を設けた（28 日サイクル）。第 7 サイクル目完了後に 14 日間の回復期間を設けた。

ラットには、溶媒（滅菌注射用水 [USP] で調製した塩化ナトリウム 0.45%含有[redacted] 又はイキサゾミブ 0.2、0.4 及び 0.8 mg/kg（イキサゾミブ換算投与量）を投与した。各群に雌雄ラットを各 15 匹割り付けた（主試験用 10 匹及び回復性試験用 5 匹）。高用量群の雌ラットにおいて明らかな毒性及び死亡がみられたことから、3 サイクル目開始時（56 日目）に、高用量群の雌ラットの投与量を 0.8 mg/kg から 0.6 mg/kg に減らした（以降、「0.8/0.6 mg/kg 投与群」と呼ぶ）。評価したパラメータは、生死、一般状態、体重、摂餌量、血漿中薬物濃度（0、14、42、168 及び 182 日目）、臨床病理学的パラメータ（血液学的検査、血液凝固系検査、血液生化学的検査）、器官重量、並びに肉眼的及び病理組織学的検査であった。

0時間から168時間の平均AUC（AUC_{168}）は、概ね用量依存性に又はそれ以下で増加し、平均C_{max}は用量依存性に又はそれ以上で増加した（表2.6.6.3-6）。各サイクル内（例えば、0日目～14日目）で血漿中曝露量（AUC）にわずかな蓄積が認められたが、全サイクル間（例えば、0日目～168日目）では曝露量に明確な蓄積は認められなかった。AUCは雌雄で同程度であったが、C_{max}は、0日目及び42日目ではすべての投与量で雌ラットの方が高くなる傾向にあった。

表2.6.6.3-6　Sprague-Dawleyラットへのイキサゾミブクエン酸エステル週1回7サイクル経口投与時の血漿中イキサゾミブのTKパラメータ平均値

投与量 (mg/kg)	採血日	t_{max} (時間)		C_{max} (ng/mL)		AUC_{168} (ng·hr/mL)	
		M	F	M	F	M	F
0.2	0日目	1.0	0.5	3.68	5.12	264	374
	14日目	1.0	1.0	7.04	7.83	641	569
	42日目	1.0	0.5	6.35	9.98	547	613
	168日目	0.5	4.0	5.42	6.55	489	476
0.4	0日目	1.0	1.0	8.97	13.0	655	742
	14日目	0.5	1.0	19.3	23.7	977	922
	42日目	0.5	0.25	12.0	18.7	879	884
	168日目	0.5	1.0	19.2	21.3	754	803
0.8/0.6[a]	0日目	1.0	0.5	21.4	66.4	1150	1660
	14日目	1.0	1.0	51.2	51.9	1420	1370
	42日目	0.5	0.25	30.5	69.7	1260	1300
	168日目	0.5	1.0	62.1	44.7	1200	1070

出典：添付資料番号4.2.3.2-5

AUC_{168} = 0時間から168時間の血漿中濃度-時間曲線下面積；C_{max} = 最高血漿中濃度；F = 雌；M = 雄；t_{max}=最高血漿中濃度到達時間

a　3サイクル目開始時（56日目）での明らかな毒性及び死亡がみられたことから、高用量群の雌ラットの投与量を0.8 mg/kgから0.6 mg/kgに減らした（以降、「0.8/0.6 mg/kg投与群」と呼ぶ）

高用量群の雌ラットでは合計7匹が死亡した。高用量（0.8 mg/kg）を投与した雌ラット2匹は、初回投与後に死亡した（それぞれ1日目及び2日目）。これらのラットの死因は、その時点では被験物質投与との関連が明らかではないと判断し、その後、他のラットに置き換えた。4匹の雌ラット（0.8 mg/kg）は9日目から36日目の間に死亡し、残りの1匹の雌ラット（0.8/0.6 mg/kg）は170日目に死亡した。これら7匹の雌ラットが死亡したのはすべて、投与後2日以内であった。これらの途中死亡ラットでは、鼻周囲に付着する赤色の物質、泌尿生殖器部に付着する黄色の物質、及び透明な眼漏等の臨床所見が観察された。雌ラットで観察された死亡は、高用量群の雌ラットにおけるC_{max}が雄ラットのそれよりも高かったこと、又は、試験開始時点での週齢が以前の試験よりも若かったこと（7週齢）に関連していた可能性があった（添付資料番号4.2.3.2-4）。死因の特定が可能であったラットの場合、途中死亡は、投薬起因の腸、肝臓、及び／又はリンパ系組織への毒性の組合わせが原因であった。投薬起因の腸の病理組織学的所見としては、粘膜固有層における軽微から軽度の好中球浸潤、軽微から軽度の上皮過形成及び壊死、並びに軽度の絨毛萎縮が認められた。被験物質投与に

関連する肝臓の変化としては、軽度から中等度の肝細胞変性／壊死、中等度の汎発性肝細胞空胞化、及び軽微な類洞における好中球浸潤が認められた。軽微から中等度のリンパ球減少及び／又は壊死がリンパ組織で観察され、軽微から軽度の細胞密度の低下及び／又は軽微な単細胞壊死が骨髄で観察された。また、途中死亡した雌ラットの顎下リンパ節の髄質では、通常観察される形質細胞増多がみられなかった。途中死亡した雌ラットにおける投薬起因の病理組織学的所見としてはこの他に、副腎束状帯の軽度の出血及び軽微から軽度の変性／壊死、副腎髄質細胞の軽微から軽度の分泌顆粒の減少及び単細胞壊死、並びに舌における軽度の潰瘍及び軽微な変性／壊死が認められた。

すべての投与量で、概ね用量依存的な消化管に対する影響が認められ、大腸及び小腸における軽微から中等度の上皮過形成、軽微から軽度の好中球浸潤、並びに粘膜固有層における軽微な単細胞壊死が観察された。0.2 mg/kg 投与群の消化管所見はすべて、本質的に概ね軽微なものであった。0.4 mg/kg 以上の投与量で観察された消化管所見としては、顎下腺（腺房細胞）の粘液産生亢進、軽微から中等度の腺胃及び前胃における亜急性炎症があり、0.8/0.6 mg/kg 投与群では、軽微から軽度の腺胃のびらん及び前胃の潰瘍があった。消化管の病変は、0.4 mg/kg 以上の投与量での白血球、好中球、リンパ球、単球及び好塩基球（雄のみ）の絶対数増加と相関していた。また、体重変化も消化管に対する影響との相関を示す傾向にあり、投与期間終了までに、溶媒対照群と比べ、0.4 mg/kg 投与群の雄では、体重増加量が3.8%減少し、0.8/0.6 mg/kg 投与群では、体重増加量が雄で 11.1%、雌で 10.1%減少した。消化管所見との相関を示す臨床所見としては、0.8/0.6 mg/kg 投与群の雌雄ラットにおいて、下痢、小さめの便、軟便、糞量の減少、活動低下、削痩、並びに泌尿生殖器、肛門性器部周囲及び前肢に付着する黄色の物質があった。消化管及び関連する所見はすべて、2 週間の回復期間終了までに回復又は回復傾向が認められた。

0.2 mg/kg 以上の投与量ではリンパ系組織に対する影響も認められた。軽微から軽度の腸間膜リンパ節のリンパ球壊死（雄ラットではリンパ球減少としても特徴付けることが可能）は概ね用量依存的に発生頻度が上昇した。0.2 mg/kg 投与群でのリンパ系組織所見はすべて、本質的に概ね軽微なものであった。また、0.4 mg/kg 以上の投与量でのリンパ系組織所見としては、赤脾髄における軽微から軽度の好中球浸潤及び軽微な骨髄の細胞密度の低下があった。0.4 mg/kg 以上の投与量での好中球浸潤は、循環好中球数の増加と相関していた。リンパ系組織及び副腎に対する影響はすべて、回復期間終了までに回復又は回復傾向が認められた。

被験物質との関連が明確でない病理組織学的所見が、内分泌系、生殖組織及び血管において観察された。これらの影響として、すべての被験物質投与群の雄ラットで軽微から軽度の副腎皮質束状帯細胞空胞形成の減少、0.8/0.6 mg/kg 投与群の雌ラットで乳腺における小葉-腺房過形成及び分泌の亢進、0.8/0.6 mg/kg 投与群の雄ラット 1 匹の精巣における精子細胞の遊離遅延、並びに 0.8/0.6 mg/kg 投与群の雄ラット 1 匹で脳及び脊髄の髄膜の軽微な単核細胞性血管周囲炎、並びに腸粘膜下組織の単核細胞性血管炎がみられた。被験物質との関連が明確でないこれらの病理組織学的所見は、2 週間の回復期間後にいずれも観察されなかった。

0.8/0.6 mg/kg 投与群の雌雄ラットで観察された透明な眼漏、鼻及び口周囲に付着する赤色の物質等の所見は、他のどの所見とも明確な関連がなく、回復期間中には観察されなかった。

イキサゾミブの約 6 ヵ月間にわたる 7 サイクル経口投与は、0.4 mg/kg 以下の投与量では良好な忍容性を示した（168 日目の $AUC_{168} \geq 754$ ng·hr/mL）。雌ラットでは 0.8 mg/kg の投与量

で用量制限毒性として腸、肝臓、リンパ組織における変化がみられた。雌ラットにおいて3サイクル目から投与量を0.6 mg/kgに減らしたところ、残りの試験期間において良好な忍容性が示され（1匹の雌ラットを除く）、0.8 mg/kg投与群の雄ラットはすべて試験終了時まで生存した。主な標的器官毒性としては、消化管及びリンパ系組織（リンパ節、脾臓、骨髄）への影響がみられたが、これらはすべて、2週間の回復期間終了までに回復又は回復傾向が認められた。腸及びリンパ組織において認められた、有害性を示さない病理組織学的変化が軽微かつ可逆的であったことから、0.2 mg/kgが無毒性量（NOAEL）（168日目の$AUC_{168} \geq 476$ ng·hr/mL）であると考えられた。

2.6.6.3.5 ラットを用いたイキサゾミブ 2週間（1サイクル）間欠静脈内投与毒性試験
：添付資料番号 4.2.3.2-6（参考）

雄Sprague-Dawleyラットを用いた間欠投与毒性試験を実施し、イキサゾミブ（ロット番号ML00604174-732-G）を週2回2週間静脈内投与した場合の毒性及びトキシコキネティクス（TK）について評価した（概要表2.6.7.6；添付資料4.2.3.2-6）。ラットには、溶媒（HP-β-CD 10%とマンニトール2.8%の混合液）又はイキサゾミブ 0.1、0.3若しくは0.6 mg/kgを1、4、8及び11日目に投与した。主試験用として各群に5匹を割り付け、TK解析用としてイキサゾミブ投与群にはさらに各3匹を割り付けた。ラットはすべて12日目に安楽死させた。評価したパラメータは、生死、一般状態、体重、簡易Irwin試験パラメータ（運動失調、振戦、発作、立毛、及び姿勢異常の観察所見で構成）、体温、臨床病理学的パラメータ（血液学的検査、血液凝固系検査、血液生化学検査、尿検査及び尿生化学検査）、薬力学解析及びTK解析パラメータ（1日目及び11日目）、器官重量、並びに肉眼検査及び顕微鏡検査による病理学的所見であった。0.6 mg/kg投与群のラットはすべて、円背位、自発運動低下、嗜眠、触診による体温低下及び軟便等の臨床徴候が現れ、1日目及び2日目に人道的な安楽死処分が必要となった。そのため、当該投与群に対しては、病理学的検査等、それ以上の評価は実施しなかった。

0.6 mg/kgの静脈内投与で状態悪化のため安楽死させたが、0.3 mg/kg以下では忍容性を示した。標的器官は消化管、リンパ系組織及び肝臓であり、消化管の粘膜過形成、好中球浸潤、胸腺のリンパ球壊死、肝細胞の単細胞壊死など、経口投与毒性試験で観察されたものと一致していた。他に、生殖器に所見も認められた。胸腺、結腸及び精嚢における病理組織学的所見が限定的かつ軽微から軽度であったことから、0.1 mg/kg（11日目の平均血漿中AUC_{24} = 198 ng·hr/mL）が無毒性量（NOAEL）であると考えられた。

2.6.6.3.6 ラットを用いたイキサゾミブ 2サイクル間欠静脈内投与毒性試験
：添付資料番号 4.2.3.2-7（評価）、4.2.3.2-8（参考）

雌雄Sprague-Dawleyラットを用いた間欠投与毒性試験を実施し、イキサゾミブ（ロット番号MLN2238-001-D）を週2回2週間を2サイクル（サイクル間は10日間の休薬）静脈内急速投与した場合の毒性及びトキシコキネティクス（TK）について評価した（概要表2.6.7.7D；報告書番号4.2.3.2-7）。2サイクル目完了後に14日間の回復期間を設けた。ラットには、溶媒（プロピレングリコール1%含有[redacted]）又はイキサゾミブを投与した。各群に雌雄各15匹のラットを割り付け（主試験用10匹及び回復性試験用5匹）、

さらにTK解析用として溶媒対照群に雌雄各3匹、イキサゾミブ投与群に雌雄各9匹を割り付けた。1サイクル目に、イキサゾミブ投与群の雄ラットに0.15、0.30又は0.45 mg/kgを投与した。当初は雌にも同じ投与量を投与する予定であったが、主試験用及び回復性試験用のラットに投与を開始する3日前に、TK解析用ラットに0.45 mg/kgを投与したところ、瀕死状態となったことから、0.45 mg/kg投与群の主試験用及び回復性試験用のラットを新規投与群に再割付し、0.22 mg/kgを投与した。TK解析用ラットとして追加的に割り付けた0.45 mg/kg投与群の雌9匹にも同じく0.22 mg/kgを投与した。その結果、1サイクル目では、主試験用及び回復性試験用に割り付けた雌ラットには0.15、0.22及び0.30 mg/kgを投与し、0.45 mg/kgを投与しなかった。2サイクル目では、雄に対する高用量を0.45 mg/kgから0.50 mg/kgに増やし、雌に対しては0.22 mg/kgから0.45 mg/kgに増やし、毒性の徴候が発現しやすくした。2サイクル目の投与後、主試験用に割り付けたラット（各群雌雄各10匹[最大]）を33日目に安楽死させ、残りの回復性試験用に割り付けたラット（各群雌雄各5匹[最大]）を14日間の回復期間が経過した47日目に安楽死させた。評価したパラメータは、生死、一般状態、体重、摂餌量、眼科検査、臨床病理学的パラメータ（血液学的検査、血液凝固系検査、血液生化学検査及び尿検査）、薬力学解析（概要表2.6.7.7D；報告書番号4.2.3.2-8）及びTK解析パラメータ（1、11、及び22日目）、器官重量、並びに肉眼検査及び顕微鏡検査による病理学的所見（骨髄の塗抹標本を含む）であった。

安楽死処分予定日の前に、合計5匹が死亡した（発見時死亡又は観察中死亡）。死亡した5匹中4匹（0.15 mg/kg投与群雌雄各1例、0.30 mg/kg投与群雌1例及び0.22 mg/kg投与群雌1例）は、12日目のTK解析用の血液採取後に死亡したことから、採血手技が直接の原因と考えられた。残り1匹の雌は、24日目に死亡した。この死亡は、当該ラットが死亡する2日前に0.45 mg/kgを投与していたことから、被験物質投与に関連するものと考えられた。一般状態としては、眼の周囲の乾燥した赤色物質、流涙及び軟便があった。病理組織学的所見として、中等度の骨髄の細胞密度の低下、軽微な後根神経節（DRG）神経細胞におけるクロマトライシスがみられた。当該ラットは発見時点で既に死亡していたため、消化管の自己消化が顕著に進行しており、病理組織学的検査を適切に実施することができず、死因を確定することはできなかった。

イキサゾミブの静脈内投与は、0.15 mg/kg及び0.30 mg/kgの投与量を2サイクル投与したラットにおいて忍容性を示したが、それを上回る投与量では毒性（雌の死亡）をもたらした。標的器官毒性は、経口投与毒性試験で以前に認められた所見と一致しており、骨髄（細胞密度低下）、胸腺（リンパ球壊死）、神経節（神経細胞の変性（クロマトライシス））、肝臓（肝細胞肥大並びに空胞化）及び消化管（粘膜過形成）に対する影響があったが、これらは概して回復期間終了までに回復又は回復傾向が認められた。本試験の条件下では、0.45 mg/kgの投与量がSTD10（22日目で雄の場合AUC_{24} = 1260 ng·hr/mL [0.50 mg/kg時] 及び雌の場合AUC_{24} = 1310 ng·hr/mL）であると考えられた。

2.6.6.3.7 ラットを用いたイキサゾミブクエン酸エステル 5 サイクル間欠静脈内投与毒性試験

：添付資料番号 4.2.3.2-9（評価）

雌雄 Sprague-Dawley ラットを用いて間欠投与毒性試験を実施し、94 日間にわたって 5 サイクル、イキサゾミブクエン酸エステル（ロット番号 21E004）として静脈内投与した場合のイキサゾミブの潜在的な全身毒性及びトキシコキネティクス（TK）について評価した（概要表 2.6.7.7E；報告書番号 4.2.3.2-9）。各サイクルを最初の 2 週間における週 2 回（BIW）の投与期間とそれに続く 10 日間の休薬期間で構成した。ラットに、溶媒（注射用生理食塩水 0.9% [米国薬局方]）又はイキサゾミブクエン酸エステル 0.05、0.15 若しくは 0.30 mg/kg（イキサゾミブ換算投与量）を投与した。各群に雌雄 10 匹のラットを割り付け、さらに TK 解析用として溶媒対照群に雌雄各 6 匹、被験物質投与の各群に雌雄各 18 匹を割り付けた。5 サイクルの投与完了後、すべての生存ラットを 95 日目に安楽死させた。評価したパラメータは、生死、一般状態、詳細観察、体重、摂餌量、眼科検査、臨床病理学的パラメータ（血液学的検査、血液凝固系検査、血液生化学検査、尿検査及び尿生化学検査）、TK 解析パラメータ（0 日目及び 94 日目）、器官重量、並びに肉眼的及び病理組織学的検査であった。本試験では薬力学解析は実施しなかった。

被験物質投与に関連する死亡が 5 サイクル目に 0.30 mg/kg 投与群でみられた。雄 1 匹は 85 日目に瀕死状態のため安楽死させ、雌 2 匹はそれぞれ 86 日目と 92 日目に死亡発見された。これらの死亡に先行する臨床症状として、運動低下、触診による冷感、浅呼吸が認められた。急性腎不全、消化管障害（粘膜上皮の変性、急性炎症及び／又は単細胞壊死）、敗血症の疑い、手技に関連するストレス、並びに肝細胞空胞化が 3 匹中 1 匹以上で観察されたことから、死因は多数の要因によるものと考えられた。被験物質投与に関連する顕微鏡所見としてはこの他に、骨髄細胞充実性の低下及びリンパ系器官の単細胞壊死があった。肝細胞空胞化が認められた例では、肝障害と一致する血液生化学検査値の変化が観察された。安楽死処分予定日前に死亡したラットについては器官重量を測定しなかった。0.30 mg/kg 投与群の TK 解析用のラット 7 匹も 44 日目又は 86 日目に死亡又は瀕死状態のため安楽死させた。TK 解析用のラットに対して実施した肉眼的検査が限定的であったため、これらの死因を確定することはできなかった。

週 2 回、5 サイクルの静脈内投与は、0.05 mg/kg 及び 0.15 mg/kg の投与量では忍容性を示したが、0.3 mg/kg の投与量では死亡をもたらした。標的器官は、ラット又はイヌの経口投与毒性試験で観察された器官（胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、顎下リンパ節、腸間膜リンパ節、パイエル板、胸腺、頸椎並びに腰椎の後根神経節及び骨髄）と一致しており、さらに腎、副腎皮質及び涙腺であった。本試験の条件下での最大耐量（MTD）は、0.15 mg/kg（94 日目の AUC_{24} = 454 ng·hr/mL）であると考えられた。

2.6.6.3.8 イヌを用いたイキサゾミブ 7 日間反復経口投与探索的用量設定試験

：添付資料番号 4.2.3.2-10（参考）

雄ビーグル犬を用いた反復投与毒性試験を実施し、1 日 1 回 7 日間連続強制経口投与した場合のイキサゾミブ（ロット番号 ML00604174-732-G）の毒性及びトキシコキネティクス（TK）について評価した（概要表 2.6.7.6；添付資料番号 4.2.3.2-10）。各群 3 匹のイヌに対し、溶媒

（HP-β-CD 10%とマンニトール 2.8%の混合液）又はイキサゾミブ 0.05、0.10 又は 0.20 mg/kg を投与した。生存動物はすべて 8 日目に安楽死させた。評価したパラメータは、生死、一般状態、神経学的評価、体重、臨床病理学的パラメータ（血液学的検査、血液凝固系検査、血液生化学検査、尿検査及び尿生化学検査）、薬力学解析及び TK 解析パラメータ（1 日目及び 7 日目）、器官重量、並びに肉眼検査及び顕微鏡検査による病理学的所見であった。

イキサゾミブの血漿中曝露量 C_{max} 及び AUC_{24} は 0.05 mg/kg から 0.20 mg/kg の投与量で、概ね用量依存的に上昇した（表 2.6.6.3-7）。ただし、1 日目の C_{max} は用量依存的な上昇を示さなかった。イキサゾミブは血漿中で、1 日 1 回の経口投与による顕著な蓄積が認められた。プロテアソーム阻害の程度は、1 日目は低かったが、7 日目には増大し、イキサゾミブの蓄積と一致する結果が得られた。

表 2.6.6.3-7　雄ビーグル犬へのイキサゾミブ 1 日 1 回 7 日間経口投与時の血漿中イキサゾミブの TK パラメータ平均値

投与量 (mg/kg)	解析実施日	t_{max} (時間)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{24} (ng·hr/mL)
0.05	1 日目 [a]	0.8	11.1	118
	7 日目	0.8	37.5	357
0.10	1 日目	0.7	51.2	193
	7 日目	0.8	71.8	613
0.20	1 日目	0.5	48.4	283
	7 日目 [b]	11.9	104	787

出典：　添付資料番号 4.2.3.2-10
AUC_{24} = 0 時間から 24 時間の血漿中濃度-時間曲線下面積；C_{max} = 最高血漿中濃度；t_{max} = 最高血漿中濃度到達時間
注記：n =3（特に断りのない限り）
a　n = 2（1 匹はすべてのタイムポイントで定量限界値以下であったため、平均値の算出から除外した）。
b　n =2（1 匹は 7 日目の解析実施日前に死亡）

0.20 mg/kg 投与群の 1 匹は、嘔吐、粘性便、運動失調、四肢の再配置困難、覚醒低下及び側臥位の臨床徴候が認められ、6 日目に瀕死状態となったため安楽死させた。消化管障害に起因する状態悪化が神経学的徴候の一因と推察された。複数の臨床病理学的変化が当該動物の脱水状態及び瀕死状態に関連している可能性が高かった。消化管の臨床徴候の一因となる顕微鏡所見として、消化管リンパ組織及び腸間膜リンパ節におけるリンパ球の壊死／減少、結腸の筋層間神経叢及び腹部交感神経節の神経細胞における軽微から軽度のクロマトライシス及び好酸性顆粒状物質の細胞質内蓄積があった。当該イヌで認められた神経学的臨床徴候の一因である可能性が高い顕微鏡所見として、後根神経節神経細胞における軽度から中等度のクロマトライシス及び好酸性顆粒状物質の細胞質内蓄積があった。後根神経節及び腹部交感神経節神経細胞でみられたものと類似する病変が胸部交感神経節でも観察されたが、これらの神経節における病変が臨床徴候の発現にどのように寄与したかは不明であった。当該動物における被験物質投与に関連する顕微鏡所見としてはこの他、胸腺・小腸におけるリンパ球の壊死／減少、陰窩膿瘍（軽微）、盲腸の膿瘍（軽微）及び粘膜鬱血・出血（軽度）、造血異常、胆汁鬱滞及び肝細胞壊死（軽微）、腎尿細管上皮単細胞壊死（軽微）、副腎皮質の好中球浸潤（軽微）及び単細胞壊死（軽微）、上皮小体主細胞萎縮（軽度）、並びに前立腺

上皮単細胞壊死（軽度）があった。造血異常は、造血細胞の壊死（核濃縮を伴う細胞質の好酸性化）又は正染性赤芽球増加のいずれかと考えられる変化がみられた場合に所見とした。

≤0.10 mg/kg の投与量では、被験物質投与に関連する影響は認められなかった。

0.20 mg/kg 投与群の生存イヌで認められた被験物質投与に関連する変化は、8 日目に 1 匹で観察されたフィブリノゲンの増加（試験前の 3.4 倍に上昇）及び顕微鏡的変化であった。この顕微鏡的変化としては、後根神経節及び交感神経節の神経細胞における好酸性顆粒状物質の細胞質内蓄積及びクロマトライシス、盲腸における粘膜下リンパ組織のリンパ球壊死、粘膜下／粘膜内好中球浸潤及び膿瘍、並びに結腸における粘膜下好中球浸潤が認められた。

結論として、イキサゾミブの 1 日 1 回 7 日間連続投与は、≤0.10 mg/kg の投与量では、イヌにおいて忍容性を示した。0.20 mg/kg の投与量は、消化管における臨床徴候及び神経学的臨床徴候をもたらし、イヌ 1 匹の安楽死処分の原因となった。消化管障害に起因する状態悪化が神経学的徴候の一因であった。毒性標的器官としては、消化管、リンパ系組織及び神経細胞に対する影響があったが、これらは 0.2 mg/kg の投与量の場合に限定されていた（7 日目の血漿中 AUC_{24} = 787 ng·hr/mL）。無作用量（NOEL）は 0.10 mg/kg であると考えられた（7 日目の血漿中 AUC_{24} = 613 ng·hr/mL）。

2.6.6.3.9 イヌを用いたイキサゾミブ 2 週間（1 サイクル）間欠経口投与毒性試験
：添付資料番号 4.2.3.2-11（評価）

GLP 準拠での雌雄ビーグル犬を用いた間欠投与毒性試験を実施し、イキサゾミブ（ロット番号 MLN2238-001-D）を週 2 回 2 週間強制経口投与した場合の潜在的毒性及びトキシコキネティクス（TK）について評価した（概要表 2.6.7.7F；添付資料番号 4.2.3.2-11）。1 サイクル終了後 14 日間の回復期間を設けた。イヌには、溶媒（プロピレングリコール 1%含有[redacted]又は溶媒で調製したイキサゾミブを投与した。高用量群の雄には 0.3 mg/kg を投与したが、1 日目以降に消化管障害、脱水、摂餌量及び体重減少等の重度の毒性がみられたため、それ以降は被験物質を投与せず、雄 2 匹は 5 日目に、それ以外の 3 匹は 25 日間かけて回復させてから 26 日目に剖検を実施し、肉眼及び顕微鏡所見による病理学的評価を実施した。他の雄群には 0.1 及び 0.2 mg/kg を投与し、雌群には 0.1、0.15 及び 0.2 mg/kg を投与した。各群に雌雄各 5 匹を割り付け、さらに主試験での剖検用（12 日目）として 3 匹、回復性試験での剖検用（26 日目）として 2 匹を割り付けた。評価したパラメータは、生死、一般状態、体重、摂餌量、身体検査、眼科検査、心電図、神経学的評価、臨床病理学的パラメータ（血液学的検査、血液凝固系検査、血液生化学検査、尿検査及び尿生化学的検査）、薬力学的解析及び TK 解析パラメータ（1 日目及び 11 日目）、器官重量、肉眼及び顕微鏡所見による病理学的検査であった。

C_{max} 及び AUC_{24} によって測定したイキサゾミブの血漿中曝露量は、0.1 mg/kg から 0.3 mg/kg まで概ね用量比依存性を示して増加した（表 2.6.6.3-8）。顕著な性差は認められなかった。試験期間全体を通して、AUC_{24} では中程度の蓄積が認められたが、C_{max} では認められなかった。GLP 非準拠で実施した血液試料を用いた薬力学解析では、最高効果（E_{max}）及び 0 時間から 24 時間の効果-時間曲線下面積（AUE_{24}）によって解析したところ、イキサゾミブ投与による用量依存的な 20S プロテアソーム阻害作用がみられた（概要表 2.6.7.7F；添付資料番号 4.2.3.2-12）。

表 2.6.6.3-8　ビーグル犬へのイキサゾミブ週 2 回 1 サイクル経口投与時の血漿中イキサゾミブの TK パラメータ平均値

投与量 (mg/kg)	解析実施日	C_{max} (ng/mL)		AUC_{24} (ng·hr/mL)	
		雄	雌	雄	雌
0.1	1 日目	161	90.9	492	387
	11 日目	159	NC[a]	678	NC[a]
0.15	1 日目	N/A	236	N/A	642
	11 日目	N/A	NC[a]	N/A	NC[a]
0.2	1 日目	220	293	753	1120
	11 日目[b]	311	345	1460	1910
0.3	1 日目	397	N/A	1590	N/A
	11 日目	NV[c]	N/A	NV[c]	N/A

出典：添付資料番号 4.2.3.2-11

AUC_{24} = 0 時間から 24 時間の血漿中濃度-時間曲線下面積；C_{max} = 最高血漿中濃度；N/A = 該当せず；NC = 計算せず；NV = 数値なし

注記：1 日目及び 11 日目は 1 サイクル目を示す。n = 5（特に断りのない限り）

a　本群の TK プロファイルが外れ値であったため算出せず。

b　雄 n = 4；うち 1 匹の雄は 9 日目に瀕死状態のため安楽死させた。雌 n = 3；2 匹の TK データは外れ値と判定されたため、TK パラメータ平均値の算出から除外した。

c　雄において 0.3 mg/kg 初回投与後に重篤な症状が認められたため、それ以降の投与は中止した。

0.3 mg/kg 投与群の雄 2 匹は、単回投与した後、5 日目に安楽死させ、0.2 mg/kg 投与群の雄 1 匹は、2 回投与した後、9 日目に安楽死させた。これらの動物の用量制限毒性は、リンパ系組織の障害（リンパ球減少及び壊死）並びに消化管障害（消化管炎症、潰瘍及び腸疾患）に起因するものであった。末梢自律神経節の神経変性（細胞腫大、好酸性物の蓄積を伴うクロマトライシス及び／又は壊死が特徴）は、消化管機能に影響していた可能性があった。

0.2 mg/kg 投与群の雄で認められた所見としてはこの他に、多器官における動脈の類線維素性壊死、脳の三叉神経路、脊髄後索及び／又は脊髄神経後根における軽微な軸索変性があった。脳及び脊髄における軸索変性は、末梢神経節損傷の二次的な影響と考えられ、一次感覚神経障害の特徴を示していた[10]。死亡前の臨床徴候としては、消化管障害（嘔吐、下痢、軟便、粘血便／粘性便及び／又は黄色便若しくは緑色便）、脱水、運動失調、反射低下、並びに循環障害（点状出血、斑状出血、紅斑及び／又は頻脈）が摂餌量及び体重の減少を伴って認められた。

0.3 mg/kg を単回投与した雄の生存例では、削痩、嗜眠、脱水、粘性粘膜、耳介丘疹、心不整脈、下痢、運動失調、後肢の開脚歩行、逃避反射及び手根伸筋反射の低下等の死亡例と似た臨床所見が投与後から回復期間中に観察された。0.3 mg/kg 投与群の生存例では、12 日目に血小板数の増加も観察された。

0.1 mg/kg 投与群では、雄 1 匹で観察された頸部後根神経節及び別の雄 1 匹で観察された腰部後根神経節の軽微な神経変性を除き、被験物質投与に関連する所見は観察されなかった。≥ 0.15 mg/kg の投与量で観察された神経学的所見も本質的に軽微なものであり、唾液腺、胃、回腸、盲腸、結腸及び／又は直腸の神経節変性、並びに脊髄後索の軸索変性（0.15 mg/kg 投与群の雌 1 匹）があった。0.2 mg/kg 投与群では、交感神経節（胸部及び腹部）の軽微な神経変性も認められた。概して、顕微鏡的な神経所見は、投与量に関係なく軽微なものであった

が、高用量では、影響部位の増加又は影響動物数の増加傾向がみられた。神経毒性との相関性を示した身体的又は神経学的所見としては、≥0.2 mg/kg を投与した数匹で、運動失調及び手根伸筋反射低下が観察された。なお、0.1 及び 0.15 mg/kg 投与群では雌の各 1 匹で跛行が観察されたが、当該投与量よりも高い投与量では観察されなかった。≤0.15 mg/kg の投与量で認められた神経に対する影響はいずれも、2 週間の回復期間終了までに回復又は回復傾向が認められたが、≥0.2 mg/kg の投与量では回復期間後にも神経細胞損傷が観察され、運動失調、開脚姿勢及び手根伸筋反射低下等の神経学的所見を伴っていた。さらに、回復性試験用に割り付けた動物を剖検した結果、末梢神経及び脊髄／脳知覚神経路の神経線維変性の発生頻度の上昇又は重症度の悪化が認められた。しかし、この変性の発生時期、外観及び部位は、投与期間中に生じた末梢神経節における一次的な影響及び回復期間中に認められた関連神経線維の二次変性と一致していた[11]。≥0.2 mg/kg の投与量で回復性試験用に割り付けた動物を剖検して得られた顕微鏡所見として、頸部及び／又は腰部後根神経節（神経線維の軽微から軽度の変性を伴う）並びに交感神経節の軽微な神経細胞変性、加えて、坐骨神経及び／又は腓腹神経、脊髄後索並びに脳の三叉神経路における軽微から中等度の軸索変性があった。

0.2 mg/kg 投与群で観察された所見としてはこの他に、消化管及びリンパ系組織に対する影響があった。消化管所見は、腸の軽微又は軽度の急性若しくは亜急性炎症及び鬱血若しくは出血（雄）、並びに軽微な胃幽門腺部の慢性炎症（雄 1 匹）に限られた。0.2 mg/kg の投与量の雄では、消化管の顕微鏡所見は、回腸、盲腸、結腸及び／又は直腸粘膜の赤変等の肉眼所見との相関性を示した。0.2 mg/kg 投与群ではリンパ系組織に対する影響も観察され、パイエル板における軽微なリンパ球減少（雌 1 匹）、脾臓における軽微な好中球浸潤（雄）、胸腺皮質における軽微な細胞減少（雄では、胸腺の絶対及び相対重量の減少と相関していた。0.1 mg/kg 投与群の雄及び 0.2 mg/kg 投与群の雌でも胸腺の絶対及び相対重量の減少が観察されたが、顕微鏡所見との相関性はなかった）があった。0.2 mg/kg 投与群の雄で認められた舌の軽微及び／又は軽度のびらん及び炎症は、被験物質の作用に関連しない外傷に起因した可能性がある。0.2 mg/kg 投与群では、消化管損傷と一致する臨床所見として、軟便及び嘔吐（雄のみ）があった。0.2 mg/kg 投与群で認められたフィブリノゲン、白血球（WBC）、好中球及び単球の増加も、消化管の炎症反応と一致していた。BUN（雄のみ）及びリン（PHOS）の低下も消化管損傷と関連していた可能性があった。腸及び胸腺に対する影響は、回復期間終了後に明らかに回復したとはいえなかった。

0.1 及び 0.2 mg/kg 投与群の雄では、11 日目の投与 1～2 時間後に QTc の高値がみられたが、これらの高値は曝露量が同程度又はそれよりも高い雌ではみられず、投与前値からの変化率が 10%未満であったことから被験物質投与に関連する影響ではないと考えられた。また、日本で実施した QT PRODACT 試験を参考にしても、これらの変化は臨床で意味を持つ変化とは考えられなかった[12]。

結論として、0.3 mg/kg の単回投与（雄）は忍容性を示さず、0.2 mg/kg の雄 1 匹でも忍容性を示さなかった。これらの動物における用量制限毒性は、リンパ系組織及び消化管系に対する影響に関連しており、神経変性を伴っていた。0.2 mg/kg 投与群の生存動物において観察された消化管、リンパ系組織及び神経細胞に対する影響は、概して軽微なものであった。≤0.15 mg/kg の投与量で観察された所見は一般に、軽微かつ可逆的な神経細胞損傷に限定さ

れていた。したがって、重篤な毒性が発現しない最大投与量（HNSTD）は、0.15 mg/kg（1日目の平均 AUC_{24} = 642 ng·hr/mL）であると考えられた。

2.6.6.3.10 イヌを用いたイキサゾミブクエン酸エステル 3ヵ月間（5サイクル）間欠経口投与毒性試験

：添付資料番号 4.2.3.2-13（評価）

雌雄ビーグル犬を用いた間欠投与毒性試験を実施し、イキサゾミブクエン酸エステル（ロット番号 IC016SA）を 94 日間にわたって 5 サイクル強制経口投与した場合のイキサゾミブの潜在的な全身毒性及びトキシコキネティクス（TK）について評価した（概要表 2.6.7.7G；添付資料書番号 4.2.3.2-13）。各サイクルは最初の 2 週間を週 2 回（BIW）の投与期間、及びそれに続く 10 日間の休薬期間で構成されている。5 サイクル目の最終投与後に 14 日間の回復期間を設けた。イヌに対し、溶媒（滅菌注射用水 [米国薬局方] で調製した塩化ナトリウム 0.45%含有[redacted]又はイキサゾミブクエン酸エステル 0.05、0.10 及び 0.15 mg/kg（イキサゾミブ換算投与量）を投与した。主試験用として各群に雌雄各 3 匹のイヌを割り付け、さらに回復性試験用として溶媒対照群、0.10 mg/kg 投与群及び 0.15 mg/kg 投与群に雌雄各 3 匹のイヌを割り付けた。5 サイクルの投与後、主試験用に割り付けた各群雌雄各 3 匹のイヌを 95 日目に安楽死させ、残りの回復性試験用に割り付けたイヌ（各群雌雄各 3 匹[最大]）を 14 日間の回復期間後の 109 日目に安楽死させた。評価したパラメータは、生死、一般状態、身体検査、体重、摂餌量、眼科検査、心電図、臨床病理学的パラメータ（血液学的検査、血液凝固系検査、血液生化学検査及び尿検査）、薬力学解析及び TK 解析パラメータ（0 日目及び 94 日目）、器官重量、並びに肉眼検査及び顕微鏡検査による病理学的所見であった。

C_{max} 及び AUC_{24} によって測定したイキサゾミブの血漿中曝露量は、0 日目及び 94 日目のいずれも概ね用量比依存性を示して増加した（表 2.6.6.3-9）。イキサゾミブの曝露量に顕著な性差は認められなかった。イキサゾミブの曝露量は、すべての群で 0 日目よりも 94 日目の方が高く、血漿中のイキサゾミブの蓄積が示された。血液試料を用いて実施した薬力学解析において E_{max} 及び AUE_{24} によって測定したところ、94 日目の 0.10 mg/kg～0.15 mg/kg 投与群を除いて、イキサゾミブの投与により 20S プロテアソームが用量依存的に阻害された。E_{max} 及び AUE_{24} は、0 日目よりも 94 日目の方が高かった（概要表 2.6.7.7G；添付資料番号 4.2.3.2-14）。全血中のイキサゾミブ濃度と全血中の 20S プロテアソーム活性阻害との関係は、シグモイド E_{max} モデルで表現された。

表 2.6.6.3-9　ビーグル犬へのイキサゾミブクエン酸エステル週 2 回 5 サイクル経口投与時の血漿中イキサゾミブの TK パラメータ平均値

投与量 (mg/kg)	解析実施日	t_{max} (時間)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{24} (ng·hr/mL)
0.05	0 日目	5.1	27.7	155
	94 日目	4.4	43.5	388
0.10	0 日目	1.9	53.2	307
	94 日目	9.3	80.5	750
0.15	0 日目	5.6	82.0	495
	94 日目	5.0	137	1260

出典：添付資料番号 4.2.3.2-13
AUC_{24} = 0 時間から 24 時間の血漿中濃度-時間曲線下面積；C_{max} = 最高血漿中濃度；t_{max} = 最高血漿中濃度到達時間
注記：0 日目及び 94 日目は、それぞれ 1 サイクル目及び 5 サイクル目を示す。n = 6（0.05 mg/kg）；n = 12（0.10 mg/kg 及び 0.15 mg/kg）。

イキサゾミブ投与群のイヌに早期死亡はみられなかった。溶媒対照群の雌 1 匹は、適切な飼育管理条件下にないことが判明したため、回復期間中に安楽死させた。

いずれの投与量でも、体重、摂餌量、器官重量、眼科検査若しくは心電図パラメータ、臨床病理学的検査又は肉眼所見に、被験物質投与に関連する変化は認められなかった。

≥ 0.10 mg/kg の投与量では、被験物質投与に関連する顕微鏡所見として、交感神経、後根、末梢自律神経（唾液腺）及び末端器官の神経節の軽微から軽度の神経変性、並びに末梢神経及び脊髄の後索・軸索における上行路の軽微で二次的な軸索／神経線維変性が認められた。後根神経節の一次的な神経変性、並びに末梢神経及び脊髄で観察された二次的な影響は、0.10 mg/kg 投与群では 14 日間の回復期間終了までに回復し、0.15 mg/kg 投与群では回復の傾向が認められた。≥ 0.10 mg/kg の投与量では、透明な眼漏の発生頻度も上昇したが、これはイヌではよく見られる所見であるため、毒性学的に意味のある変化とはみなさなかった。

結論として、週 2 回 5 サイクル経口投与は、本試験における最高用量の 0.15 mg/kg（94 日目の平均 AUC_{24} = 1260 ng·hr/mL）以下では良好な忍容性を示した。14 日間の回復期間終了までに回復又は回復傾向が認められたものの、0.10 mg/kg 以上の用量で標的器官毒性と考えられる神経変性がみられた。無作用量（NOEL）は、当該用量での顕微鏡所見がなかったことに基づき、0.05 mg/kg（94 日目の平均 AUC_{24} = 388 ng·hr/mL）であると考えられた。

2.6.6.3.11 イヌを用いたイキサゾミブクエン酸エステル 9 ヵ月間（10 サイクル）間欠経口投与毒性試験

：添付資料番号 4.2.3.2-15（評価）

GLP 準拠での雌雄ビーグル犬を用いた間欠投与毒性試験を実施し、イキサゾミブ（イキサゾミブクエン酸エステル [ロット番号 101296] として投与）を 9 ヵ月間（10 サイクル）経口強制投与した場合のイキサゾミブの潜在的な全身毒性及び TK プロファイルについて評価し、2 週間の回復期間後の所見の持続性又は可逆性について判定した（概要表 2.6.7.7H；添付資料番号 4.2.3.2-15）。

イヌには溶媒（滅菌注射用水 [米国薬局方] で調製した塩化ナトリウム 0.45%含有 [redacted] 又はイキサゾミブクエン酸エステル 0. 05、0.10 及び

0.20 mg/kg（イキサゾミブ換算投与量）を 10 サイクル投与した。各サイクルを最初の 3 週間における週 1 回（QW）の投与期間とそれに続く 13 日間の休薬期間で構成した。主試験用として各群に雌雄各 3 匹のイヌを割り付け、さらに回復性試験用として対照群、0.10 mg/kg 投与群及び 0.20 mg/kg 投与群に雌雄各 3 匹のイヌを割り付けた。主試験用に割り付けたイヌは 267 日目に安楽死させ、回復性試験用に割り付けたイヌは 280 日目に安楽死させた。評価したパラメータは、生死、一般状態、体重、摂餌量、臨床病理学的パラメータ（血液学的検査、血液生化学検査、及び血液凝固系検査）、心電図、神経行動学的機能評価、器官重量、並びに肉眼検査及び顕微鏡検査による病理学的所見であった。さらに、TK 解析用の血液試料をすべてのイヌから採取した（0、14、252 及び 266 日目）。

C_{max} 及び AUC_{168} として測定されたイキサゾミブの血漿中曝露量は、すべての試料採取日において、概ね投与量に比例して増加した（表 2.6.6.3-10）。イヌにおけるイキサゾミブの曝露量に顕著な性差は認められなかった。1 サイクル目の初回投与と最終投与（0 日目と 14 日目）、1 サイクル目と最終サイクルの最終投与（14 日目と 266 日目）、1 サイクル目と最終サイクルの初回投与（0 日目と 252 日目）をそれぞれ比較した結果、血漿中曝露量に多量の蓄積は認められなかった。

表 2.6.6.3-10　ビーグル犬へのイキサゾミブクエン酸エステル週 1 回 10 サイクル経口投与時の血漿中イキサゾミブの TK パラメータ平均値

投与量 (mg/kg)	採血日	t_{max} (時間)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{24} (ng·hr/mL)	AUC_{168} (ng·hr/mL)
0.05	0 日目	0.58	38.9	218	706
	14 日目	0.71	36.2	206[a]	1070
	252 日目	1.0	57.1	309	934
	266 日目	0.75	83.5	410	NV[b]
0.10	0 日目	0.58	107	609[c]	1900
	14 日目	0.50	97.5	638[d]	2610
	252 日目	0.71	136	695	1940
	266 日目	0.50	162	828	NV[b]
0.20	0 日目	0.48	277	1410	3300
	14 日目	0.83	217	1390	3250
	252 日目	0.44	333	1560	3900
	266 日目	0.35	353	1870	NV[b]

出典：添付資料番号 4.2.3.2-15

AUC_{24} = 0 時間から 24 時間の血漿中濃度-時間曲線下面積；AUC_{168} = 0 時間から 168 時間の血漿中濃度-時間曲線下面積；C_{max} = 最高血漿中濃度；NV = 数値なし；t_{max} = 最高血漿中濃度到達時間

注記：いずれも MLN2238（MLN9708 として投与）換算投与量。特に断りのない限り、n = 3 頭／性別（0.05 mg/kg）並びに 6 頭／性別（0.10 及び 0.20 mg/kg）。

a　n = 4。

b　試験計画書に従い、266 日目の試料のみ投与 24 時間後に採取した。

c　n = 9。

d　n = 7。

いずれのイヌも剖検予定日まで生存した。主試験用又は回復性試験用に割り付けたイヌの剖検では、体重、摂餌量、臨床観察、心電図、神経行動学的機能評価、血液凝固系検査又は

器官重量に関して被験物質投与に関連する変化は認められなかった。また、0.05 mg/kg 投与群では、いずれのパラメータにおいても被験物質投与に関連する変化は認められなかった。

≥0.10 mg/kg の投与量では、イキサゾミブクエン酸エステルが消化管及びリンパ組織に及ぼす影響として、胃（主に幽門）及び腸における軽微な好中球浸潤、0.20 mg/kg 投与群の雌にパイエル板の好中球浸潤、0.20 mg/kg 投与群の雌雄に腸間膜リンパ節の好中球浸潤、並びに 0.20 mg/kg 投与群の雄に軽微な胃びらんが認められた。0.20 mg/kg 投与群において観察された好中球浸潤は、白血球、好中球及び単球の絶対数の増加と相関していた。2 週間の回復期間後では胃びらんはみられず、リンパ節及び腸の好中球浸潤は回復又は回復傾向が認められた。

神経学的所見は、主として 0.20 mg/kg 投与群で観察された。これらの所見としては、交感神経節（腹腔神経節、星状神経節）、後根神経節及び末端器官（唾液腺）神経節の神経変性、並びに末梢神経（迷走神経、坐骨神経、後根、混合脊髄神経）、脊髄後索の上行路及び脳延髄の白質路における軽微な二次的軸索／神経線維変性（雌 1 匹のみ）が認められた。0.20 mg/kg 投与群の雌雄各 1 匹で観察された脊髄後索のグリオーシス、並びに 0.20 mg/kg 投与群の雌 1 匹で観察された脳の白質路のグリオーシスは、上行路の軸索変性に付随した病変であった。2 週間の回復期間終了時点で、0.20 mg/kg 投与群の雌雄では、後根神経節の神経線維変性及び脊髄後索の軸索変性が依然として観察されたが、脳又は末梢神経節（交感神経節、後根神経節、又は末端器官神経節）の神経細胞での病理組織学的変化は認められなかった。休薬後には末梢神経節の神経細胞変性がなく、後根神経節の神経線維及び脊髄後索の軸索において認められた変性は末梢神経節の神経細胞変性の二次的変化と考えられたことから、休薬後に進行する毒性はなかったことが確認された。さらに、機能観察総合評価法では変化が認められなかったことから、軽微な神経変性は機能的影響を与えないことが示唆された。

0.20 mg/kg 投与群の被験物質投与に関連する所見としてはこの他に、雌でのリンパ球絶対数の減少（-26%）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ値の上昇（雄のみ [36%]）、及び血清リン値の低下（-19%～-20%）があった。回復性試験用に割り付けたイヌの剖検では、血液学的検査又は血液生化学検査データに関し、被験物質投与に関連する変化は認められなかった。

イキサゾミブクエン酸エステルの 0.20 mg/kg 以下の投与量での約 9 ヵ月間にわたる 10 サイクルの経口投与は、ビーグル犬において良好な忍容性を示した。標的器官毒性は、消化管及びリンパ系への好中球浸潤、並びに末梢神経系変性に概ね限定された。腰部後根神経節の神経線維変性を除き、すべての変性は 2 週間の回復期間終了までに回復又は回復傾向が認められた。0.10 mg/kg 投与群の一次的変化は消化管の軽微な好中球浸潤に限定されたため、無毒性量（NOAEL）は 0.10 mg/kg であると考えられた。本投与量は、252 日目の AUC_{168}（1940 ng·hr/mL）及び C_{max}（136 ng/mL）に相当した。

2.6.6.3.12 イヌを用いたイキサゾミブ 2 週間（1 サイクル）間欠静脈内投与毒性試験
：添付資料番号 4.2.3.2-16（参考）

雄のビーグル犬を用いた間欠投与毒性試験を実施し、イキサゾミブ（ロット番号 ML00604147-732-G）の 5 分間点滴静注を週 2 回、2 週間投与した場合のイキサゾミブの潜在的な全身毒性及びトキシコキネティクス（TK）について評価した（概要表 2.6.7.6；添付資料

番号 4.2.3.2-16）。イヌに、溶媒（HP-β-CD 10%とマンニトール 2.8%の混合液）又はイキサゾミブ 0. 05、0.10 若しくは 0.20 mg/kg を投与した。各群に 3 匹のイヌを割り付けた。12 日目にすべてのイヌを安楽死させた。評価したパラメータは、生死、一般状態、神経学的評価、体重、臨床病理学的パラメータ（血液学的検査、血液凝固系検査、血液生化学検査、尿検査及び尿生化学検査）、薬力学解析及び TK 解析パラメータ（1 日目及び 11 日目）、器官重量、並びに肉眼検査及び顕微鏡検査による病理学的所見であった。

イキサゾミブの単一サイクルでの静脈内投与は、投与量が 0.20 mg/kg 以下では良好な忍容性を示した。標的器官毒性は、経口投与毒性試験で観察された所見と一致しており、腸間膜及び顎下リンパ節の胚中心性リンパ球の単細胞壊死、交感神経節の神経細胞におけるクロマトライシスなど、リンパ系及び神経系に対する影響があった。本試験の条件下で、無毒性量（NOAEL）は 0.10 mg/kg（11 日目の平均血漿中 AUC_{24} = 552 ng·hr/mL）、MTD は 0.20 mg/kg（11 日目の平均血漿中 AUC_{24} = 1140 ng·hr/mL）であると考えられた。

2.6.6.3.13 イヌを用いたイキサゾミブ 1 ヵ月間（2 サイクル）間欠静脈内投与毒性試験：添付資料番号 4.2.3.2-17（評価）

雌雄のビーグル犬を用いた間欠投与毒性試験を実施し、イキサゾミブ（ロット番号 MLN2238-001-D）を 5 分間点滴静注で 32 日間にわたって 2 サイクル投与した場合のイキサゾミブの潜在的毒性及びトキシコキネティクス（TK）について評価した（概要表 2.6.7.7I；添付資料番号 4.2.3.2-17）。各サイクルを最初の 2 週間における週 2 回（BIW）の投与期間とそれに続く 10 日間の休薬期間で構成した。2 サイクル目の最終投与後に 14 日間の回復期間を設けた。イヌに溶媒（プロピレングリコール 1%含有[redacted]又はイキサゾミブを投与した。各群に雌雄各 6 匹のイヌを割り付けた。

1 サイクル目では、0.10、0.18 及び 0.25 mg/kg のイキサゾミブを投与したが、0.18 mg/kg 及び 0.25 mg/kg 投与群における重度の毒性及び死亡がみられたため、0.25 mg/kg 投与群の雌雄イヌに対する 3 回目以降の投与を中断し、0.18 mg/kg 投与群の雌では 4 回目以降の投与を中断した。0.25 mg/kg 投与群の生存動物については、雄を 16 日目、雌を 12 日目に安楽死させた。0.18 mg/kg 投与群の雄及び 0.10 mg/kg 投与群の雌雄では、1 サイクル目中に予定された 4 回の投薬をすべて完了した。2 サイクル目は、イキサゾミブ 0.10 mg/kg（第 2 群；雌雄各 6 匹）及び 0.14 mg/kg（第 5 群；2 サイクル目のために設けられた投与群で、1 サイクル目中に溶媒を投与したイヌ雌雄各 1 匹と予備のイヌ雌雄各 2 匹[合計雌雄各 3 匹]で構成）のみを投与した。0.18 mg/kg 投与群の生存イヌは、回復性試験用に割り付けたイヌの剖検まで飼育管理したが、投与は再開しなかった。第 5 群を設けたことから、2 サイクル目の溶媒対照群のイヌを雌雄各 5 匹に減らした。2 サイクルの投与後、溶媒対照群、0.10 mg/kg 投与群及び 0.14 mg/kg 投与群の雌雄各 3 匹を 32 日目に安楽死させた。残りの回復性試験用に割り付けたイヌ（溶媒対照群の雌雄各 2 匹及び 0.10 mg/kg 投与群の雌雄各 3 匹）は、14 日間の回復期間後の 46 日目に安楽死させた。0.18 mg/kg 投与群のすべての生存イヌも 46 日目に剖検した（回復期間は雄 36 日間及び雌 39 日間）。

評価したパラメータは、生死、一般状態、体重、身体検査、摂餌量、神経学的評価、眼科検査、ECG、臨床病理学的パラメータ（血液学的検査、血液凝固系検査、血液生化学検査及び尿検査）、薬力学解析（概要表 2.6.7.7I；添付資料番号 4.2.3.2-18）及び TK 解析パラメー

タ（0、10、21 及び 31 日目）、器官重量、並びに肉眼検査及び病理組織学的検査（骨髄の塗抹標本を含む）であった。0.25 mg/kg 投与群では、1 サイクル目に死亡したイヌ又は瀕死状態のため安楽死処分したイヌから採取した組織を用いて病理組織学的検査のみを実施した。

試験期間全体にわたって、0.18 mg/kg 投与群又は 0.25 mg/kg 投与群で、1 サイクル目の 4 日目から 14 日目の間に、合計 8 匹の死亡（発見時死亡又は瀕死状態のため安楽死）が認められた。一般状態としては、下痢及び消化管出血を示唆する所見（例えば、赤色及び黄色の粘性便、又は赤色及び黒色物質を含有する下痢）があった。また、重度の臨床症状及び消化管関連毒性を伴う摂餌量の極度の減少も観察された。死亡又は人道的な安楽死を必要とした状態悪化の原因は、腸運動過剰に起因すると思われる空腸重積症又は回腸重積症、リンパ球減少及び／又は敗血症であった。これらの早期死亡動物では、大腸及び小腸の粘膜上皮細胞及び粘膜固有層細胞のアポトーシス、リンパ系器官（脾、胸腺、パイエル板及びリンパ節）のリンパ球の壊死及び減少、アポトーシスを伴う骨髄細胞充実性減少、並びに敗血症を示唆する変化（直腸 [肛門周囲の皮膚]・リンパ節及び足底における化膿性から慢性活動性炎症 [時折、潰瘍及び細菌コロニーを伴う]、腸の血管炎、一部の末梢組織における血管周囲性好中球浸潤）等の腸及びリンパ系の顕微鏡的変化が観察された。早期死亡動物では、複数の組織（後根神経節、末端器官神経節、交感神経節、坐骨神経、腓腹神経及び脊髄）に神経変性も観察された。

イキサゾミブは、0.10 mg/kg の投与量での 2 サイクル又は 0.14 mg/kg の投与量での 1 サイクルの静脈内投与で忍容性を示したが、0.18 mg/kg 以上の投与量では死亡をもたらした。0.14 mg/kg の投与量（31 日目の平均血漿中 AUC_{24} = 1550 ng·hr/mL）が、重篤な毒性が発現しない最大投与量（HNSTD）であると考えられた。標的器官毒性としては、胃腸、リンパ系組織（骨髄を含む）及び神経系に対する影響があった。末梢神経病変を除き、被験物質投与に関連する影響は、概して回復期間終了までに回復又は回復傾向が認められた。

2.6.6.3.14 イヌを用いたイキサゾミブクエン酸エステル 3 ヵ月間（5 サイクル）間欠静脈内投与毒性試験

：添付資料番号 4.2.3.2-21（評価）

雌雄ビーグル犬を用いた間欠投与毒性試験を実施し、イキサゾミブクエン酸エステル（ロット番号 21E004）を 5 分間点滴静注で 94 日間にわたって 5 サイクル投与した場合のイキサゾミブの潜在的な全身毒性及びトキシコキネティクス（TK）について評価した（概要表 2.6.7.7J；添付資料番号 4.2.3.2-21）。各サイクルを最初の 2 週間における週 2 回（BIW）の投与期間とそれに続く 10 日間の休薬期間で構成した。イヌには溶媒（注射用生理食塩水 0.9% [米国薬局方]）又はイキサゾミブ 0. 05、0.10 若しくは 0.15 mg/kg を投与した。各群に雌雄各 3 匹のイヌを割り付けた。5 サイクルの投与後 95 日目にすべてのイヌを安楽死させた。評価したパラメータは、生死、一般状態、身体検査、体重、摂餌量、眼科検査、ECG、臨床病理学的パラメータ（血液学的検査、血液凝固系検査、血液生化学検査及び尿検査）、薬力学解析（概要表 2.6.7.7J；添付資料番号 4.2.3.2-22）及び TK 解析パラメータ（0 日目及び 94 日目）、器官重量、並びに剖検及び病理組織学的検査であった。

イキサゾミブクエン酸エステルの週 2 回、5 サイクルの静脈内投与は、0.15 mg/kg 以下の投与量では良好な忍容性を示した。標的器官毒性は、経口投与毒性試験で以前観察されたも

のと一致しており、消化管及びパイエル板の好中球浸潤、リンパ組織の壊死並びに中枢及び末梢神経の変性等がみられた。さらに、高用量群でのみ、肛門周囲腺において被験物質投与に関連する所見が認められた。本試験の条件下で、重篤な毒性が発現しない最大投与量（HNSTD）は 0.15 mg/kg（94 日目の平均血漿中 AUC_{24} = 1470 ng·hr/mL）であると考えられた。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

イキサゾミブの遺伝毒性について、in vitro 及び in vivo アッセイにより総合的に評価した。遺伝子変異誘発性については、細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames 試験）で評価し、染色体の構造異常及び数的異常の誘発性については、ヒト末梢血リンパ球（HPBL）を用いた in vitro 染色体異常試験及びマウスを用いた in vivo 小核試験で評価した。DNA 損傷性については、イキサゾミブクエン酸エステルを経口投与したマウスを用いた in vivo コメット試験で判定した。

実施した遺伝毒性試験の概要を表 2.6.6.4-1 に示す。

表 2.6.6.4-1　遺伝毒性試験

被験物質	試験の種類	指標細胞又は種/株(数)	S9	投与経路/レジメン	濃度又は投与量[a]	GLP	報告書番号
イキサゾミブ	細菌を用いる復帰突然変異試験	*Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537)、*Escherichia Coli* (WP2*uvrA*)	±	N/A	最大 5000 µg/plate[b]	準拠	4.2.3.3.1-1
イキサゾミブクエン酸エステル	染色体異常試験	HPBLs	±	N/A	最大 50 µg/mL[c, d]	準拠	4.2.3.3.1-2
イキサゾミブクエン酸エステル	小核試験	マウス/CD-1(雄 6～14/group)	N/A	単回経口投与	0、2、4 及び 8 mg/kg	準拠	4.2.3.3.2-1
イキサゾミブクエン酸エステル	コメット試験	マウス/CD-1(雄 5 匹/group)	N/A	試料採取の 24 時間前及び 3 時間前の経口投与	0、0.5、1、2、4 及び 6 mg/kg	準拠	4.2.3.3.2-2

GLP = 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準；HPBL = ヒト末梢血リンパ球；N/A = 該当せず
注記：本表の数値及び濃度は、当該試験の確定フェーズで用いたものを示す。
a　特に断りのない限り、いずれもイキサゾミブ換算投与量。
b　確認アッセイにおいて、イキサゾミブは TA98 株では最高 5000 µg/plate、WP2*uvrA* 株では最高 2500 µg/plate、TA1537 株及び TA1535 株では最高 1000 µg/plate、並びに TA100 株では最高 500 µg/plate の濃度で試験した。
c　イキサゾミブクエン酸エステル換算投与量。
d　染色体異常試験では、3 時間曝露に対しては 0.010～20 µg/mL（-S9）及び 0.10～50 µg/mL（+S9）、22 時間曝露に対しては 0.010～0.50 µg/mL（-S9）のイキサゾミブクエン酸エステル濃度を用いた。

2.6.6.4.1 in vitro 非哺乳類細胞系

2.6.6.4.1.1 細菌を用いた復帰突然変異試験（Ames 試験）

：添付資料番号 4.2.3.3.1-1（評価）

細菌を用いた復帰突然変異試験を *Salmonella typhimurium*（ネズミチフス菌）試験株 TA98、TA100、TA1535 及び TA1537 並びに *Escherichia Coli*（大腸菌）試験株 WP2*uvrA* を用いてプレート法で実施し、イキサゾミブ（ロット番号 MLN2238-001-D）の変異原性を in vitro で評価した（概要表 2.6.7.8A；報告書番号 4.2.3.3.1-1）。初回及び確認実験で、Aroclor™1254 誘導ラット肝臓 S9 ミクロソーム分画の存在下及び非存在下で、ジメチルスルホキシド（DMSO）で 100 mg/mL に調製したイキサゾミブを試験株（n = 3）に曝露した。初回実験において、イキサゾミブは、すべての株に対して最高 5000 µg/plate の濃度で試験し、確認実験ではその結果に基づき、TA98 株に対しては最大 5000 µg/plate、WP2*uvrA* 株に対しては最大 2500 µg/plate、TA1537 株及び TA1535 株に対しては最大 1000 µg/plate、並びに TA100 株に対しては最大 500 µg/plate の濃度で試験した。初回アッセイと確認アッセイの両方で細胞毒性が認められたが、沈殿は確認されなかった。適切な陽性対照及び陰性対照についても評価し、期待していた結果が得られた。

確認アッセイにおいて細胞毒性が観察された濃度は、代謝活性化系存在下の TA100 株では ≥ 100 µg/plate、代謝活性化系存在下の TA1535 株及び WP2*uvrA* 株並びに代謝活性化系非存在下の TA1537 株及び TA100 株では ≥ 250 µg/plate、代謝活性化系存在下の TA1537 株では ≥ 500 µg/plate、代謝活性化系非存在下の TA98 株、TA1535 株、及び WP2*uvrA* 株では ≥ 1000 µg/plate、代謝活性化系存在下の TA98 株では ≥ 2500 µg/plate であった。

結論として、イキサゾミブには、本試験の条件下で変異原性は認められなかった。

2.6.6.4.2 in vitro 哺乳類細胞系

2.6.6.4.2.1 ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験

：添付資料番号 4.2.3.3.1-2（評価）

ヒト末梢血リンパ球（HPBL）を用いた in vitro 染色体異常試験を実施し、イキサゾミブクエン酸エステル（ロット番号 101296）を添加してイキサゾミブの染色体異常誘発性について評価した（概要表 2.6.7.8B；報告書番号 4.2.3.3.1-2）。Aroclor 1254 誘導ラット肝臓 S9 ミクロソーム分画の存在下（+S9）及び非在下（-S9）で、3 時間又は 22 時間、イキサゾミブクエン酸エステルで細胞を処理した。表記濃度は、イキサゾミブではなく、添加したイキサゾミブクエン酸エステルの量を示す。細胞増殖率測定及び分裂指数（MI）の結果に基づき、染色体異常試験では、イキサゾミブクエン酸エステル濃度として、3 時間の曝露に対しては 0.010～20 µg/mL（-S9）及び 0.10～50 µg/mL（+S9）、22 時間の曝露に対しては 0.010～0.50 µg/mL（-S9）を用いた。複数回の染色体異常試験の結果、分裂中期の染色体異常解析のために選択した濃度は、0.010、0.050 及び 0.10 µg/mL（3 時間曝露、-S9）、35、40 及び 45 µg/mL（3 時間曝露、+S9）、並びに 0.050、0.065、0.075 及び 0.080 µg/mL（22 時間曝露、-S9）であった。本試験では、適切な陽性対照及び陰性対照を使用した。

統計的に有意な、染色体に構造異常のある細胞の割合の増加が、3 時間曝露（-S9）での 0.10 µg/mL（$p \leq 0.01$）、22 時間曝露（-S9）での 0.075 及び 0.080 µg/mL（$p \leq 0.01$）、さらに 3 時間曝露（+S9）での 35 及び 45 µg/mL（$p \leq 0.01$）並びに 3 時間曝露（+S9）での 40 µg/mL

（$p \leq 0.05$）において観察された。さらに、統計的に有意な、2 個以上の異常が認められた細胞の割合の増加が、22 時間曝露後（-S9）での 0.080 μg/mL（$p \leq 0.05$）、3 時間曝露後（+S9）での 45 μg/mL（$p \leq 0.01$）において認められた。被験物質投与に関連する倍数体及び核内倍加に統計的に有意な増加は認められなかった。

結論として、ボルテゾミブ[8]で認められた結果と同じく、イキサゾミブは、本試験系の条件下で、代謝活性化系の存在又は非存在を問わず、ヒト末梢血リンパ球（HPBLs）における染色体の構造異常誘発性に関して陽性であると考えられた。被験物質投与に関連する染色体の数的異常（倍数体又は核内倍加）には統計的に有意な増加は認められなかった。

2.6.6.4.3 in vivo 哺乳類系

2.6.6.4.3.1 in vivo マウス骨髄小核試験

：添付資料番号 4.2.3.3.2-1（評価）

強制経口投与したマウスの骨髄細胞を用いて、イキサゾミブクエン酸エステル（ロット番号 21E004）を投与した場合のイキサゾミブの小核誘発性について評価した（概要表 2.6.7.9A；報告書番号 4.2.3.3.2-1）。用量設定試験 1 回目では、各群の雌雄各 3 匹の Crl:CD1 (ICR) マウスに、溶媒（グリシン 3% [w:w]含有[redacted]に溶解して調製したイキサゾミブ 10、20 及び 30 mg/kg を投与した。過度の毒性が雌雄で認められたことから、以後の試験には雄を用いた。用量設定試験 2 回目では、各群の雄 3 匹にイキサゾミブ 5、6 及び 8 mg/kg を投与した。引き続き行った本試験では、8 mg/kg を高用量とし、雄 12 匹に溶媒、各群の雄 6 匹にイキサゾミブ 2 mg/kg 及び 4 mg/kg、雄 14 匹に 8 mg/kg、並びに雄 6 匹に陽性対照（シクロフォスファミド 60 mg/kg）を強制経口投与した。本試験では各群の 1 匹目から 5 匹目までの生存マウスについて、投与 24 時間後から 28 時間後までの間に骨髄を採取し、溶媒対照群及び 8 mg/kg 投与群の次の 5 匹の生存マウスについて、投与 44 時間後から 48 時間後までの間に骨髄を採取した。残りのマウスは骨髄を採取せずに安楽死させた。評価したパラメータは、生死、一般状態、体重、肉眼病理所見、並びに骨髄における多染性赤血球（PCE）、正染性赤血球（NCE）及び小核を有する多染性赤血球（MNPCE）の有無であった。

用量設定試験 1 回目では、1 日目に 20 mg/kg 投与群の雄 1 匹及び雌 2 匹、並びに 30 mg/kg 投与群の雌 2 匹が死亡した。また、20 mg/kg 及び 30 mg/kg 投与群の残りのマウス並びに 10 mg/kg 投与群の雌雄各 2 匹は瀕死状態のため 1 日目に安楽死させた。10 mg/kg 投与群の雄 1 匹で間欠性痙攣が認められたことを除き、初回投与日（0 日目）に被験物質投与に関連する一般状態の変化は認められなかった。瀕死状態に先行して確認された被験物質投与に関連する一般状態の変化としては、自発運動低下、眼瞼の一部閉鎖、触診による四肢及び体の冷感、努力性呼吸、筋協調運動低下、並びに間欠性振戦が認められた。発見時に死亡又は瀕死状態のため安楽死処分したすべてのマウスの肉眼所見で、最も顕著な変化は腎の暗赤色化であった。いずれのマウスも 0 日目から 1 日目までに体重が減少した。2 日目に予定されていた安楽死処分時まで生存した 10 mg/kg 投与群のマウスでは、被験物質投与に関連する一般状態の変化は認められず、当該マウスでは 1 日目から 2 日目までに体重が増加した。用量設定試験 2 回目では、2 日目に 8 mg/kg 投与群の雄 1 匹が死亡したが、肉眼所見は認められなかった。その他のマウスはすべて、2 日目に予定されていた安楽死処分時まで生存し、被験物質投与

に関連する一般状態の変化は認められなかった。この試験では0日目から2日目にかけてすべてのマウスで体重減少が観察された。

本試験では、2日目に8 mg/kg投与群の雄1匹が死亡した。当該マウスは1日目に触診による体の冷感が認められたが、肉眼所見に顕著な変化は認められなかった。その他のマウスはすべて、安楽死処分予定日まで生存し、被験物質投与に関連する一般状態又は体重への影響は認められなかった。イキサゾミブ投与群は溶媒対照群に比べても% MNPCEsの平均出現率の上昇はみられず、骨髄細胞毒性（すなわち、全赤血球に対するPCEの割合の低下）は観察されなかった。

本試験と同じ投与量及び同じ溶媒（ただし投与液量を5 mL/kgから8 mL/kgに増加）を用い、GLP非適用の別試験としてマウスにおけるトキシコキネティクス解析を実施した。（2.6.6.2.1；概要表2.6.7.3；報告書番号4.2.3.1-1）。当該試験において、8 mg/kg投与群のすべてのマウスに自発運動低下及び低体温が認められ、瀕死状態のため投与6時間後に安楽死させた。この結果は、本小核試験の用量設定の参考とした。2 mg/kg群及び4 mg/kg群のC_{max}はそれぞれ108 ng/mL及び219 ng/mLであり、AUC_{24}はそれぞれ557 ng·hr/mL及び926 ng·hr/mLであった（表2.6.6.2-2）。

結論として、イキサゾミブは、最大耐量（MTD）である6 mg/kgを上回る8 mg/kgまで、マウスの骨髄PCEにおける小核形成を亢進させなかった。本試験の条件下で、イキサゾミブには染色体異常誘発性はないと考えられた。

2.6.6.4.3.2 マウスを用いたin vivoコメット試験

：添付資料番号4.2.3.3.2-2（評価）

コメット試験で、イキサゾミブクエン酸エステル（ロット番号21E004）をマウスに強制経口投与して、肝臓及び腺胃におけるイキサゾミブのDNA損傷性について評価した（概要表2.6.7.9B；報告書番号4.2.3.3.2-2）。雄のCrl:CD1 (ICR) マウス5匹に、溶媒（グリシン3% [w:w]含有[redacted]、イキサゾミブ 0.5、1、2、4及び6 mg/kg、又は陽性対照（メタンスルホン酸エチル[EMS]）200 mg/kgを投与した。2日間連続投与し、試料採取の24時間及び3時間前に実施した。評価したパラメータは、生死、一般状態、肉眼病理所見、並びに2、4、6 mg/kgの2回目の投与から3時間後に肝臓及び腺胃から採取した試料のコメット解析であった。

6 mg/kg投与群では、初回投与後に自発運動及び体重のわずかな低下が観察されたが、いずれの群でも死亡はみられなかった。肉眼所見としては、6 mg/kg投与群の1匹に、粘膜の暗褐色斑が2ヵ所認められたのみであった。

肝臓及び腺胃から採取した試料を用いて、1匹当たり100個の細胞核を検査した結果、被験物質投与群と溶媒対照群の間で、いずれの組織にも、tail DNA（%）における統計的に有意な差は認められなかった。

結論として、本試験の条件下で、イキサゾミブは肝臓及び腺胃におけるDNA損傷誘発性については陰性であると考えられた。

2.6.6.5 がん原性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

イキサゾミブクエン酸エステルは再発又は難治性の多発性骨髄腫患者の治療を目的としているため、ICH S9 ガイダンス[1]に従い、長期間がん原性試験又は短期間がん原性試験は実施しなかった。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験（用量設定試験及びトキシコキネティクス評価を含む）

胚・胎児毒性試験を実施し、イキサゾミブによる治療中又は曝露時に妊娠中又は妊娠する可能性がある患者の胚・胎児発生に対する潜在的リスクを評価した。イキサゾミブは再発又は難治性の多発性骨髄腫患者の治療を目的としているため、受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験並びに出生前及び出生後毒性試験は実施しなかった。

2.6.6.6.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

イキサゾミブは多発性骨髄腫患者の治療を目的としているため、受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験は実施しなかった。これは ICH S9 ガイダンス文書[1]に従ったものである。

2.6.6.6.2 胚・胎児発生に関する試験

2.6.6.6.2.1 妊娠 Sprague-Dawley ラットにおけるイキサゾミブクエン酸エステルの反復経口投与による GLP 非準拠での胚・胎児発生に関する用量設定試験

：添付資料番号 4.2.3.5.2-1（参考）

妊娠 Sprague-Dawley ラットにイキサゾミブクエン酸エステル（ロット番号 101296）を 1 日 1 回又は 3 日ごとに 1 回強制経口投与した場合のイキサゾミブの胚・胎児発生毒性及びトキシコキネティクス（TK）について評価し、その後の試験における用量選択に関する情報を取得した（概要表 2.6.7.11；添付資料番号 4.2.3.5.2-1）。まず各群に適切な時期に交尾させた雌 6 匹を割り付け、さらに TK 解析用として各群に 3 匹を割り付けた。ラットには溶媒（塩化ナトリウム 0.45% [w/v] 含有[redacted] 若しくはイキサゾミブ 0.1 mg/kg 及び 0.3 mg/kg を 1 日 1 回、又は 0.4、0.6 mg/kg 及び 0.8 mg/kg を 3 日ごとに 1 回投与した。0.8 mg/kg（3 日ごとに 1 回）投与群では、重度の母動物毒性が認められたため、生存ラットを 0.4 mg/kg（3 日ごとに 1 回）投与群に再割付した。投与完了後、主試験用に割り付けた母ラットを妊娠 20 日目に安楽死させた。母ラットの評価パラメータは、一般状態観察、体重、摂餌量、TK 解析パラメータ（妊娠 15 日目又は 17 日目）、剖検（胎盤の肉眼検査、並びに着床数及び黄体数）、胎児の評価パラメータは、胎児数、体重並びに外表奇形及び発達変異（内臓及び骨格の異常及び変異）であった。

0.1 mg/kg 及び 0.3 mg/kg 1 日 1 回投与群において、C_{max} は概ね用量比依存的に上昇し、AUC_{24} は用量比依存性を示すレベルを下回って上昇した（表 2.6.6.6-1）。0.4 mg/kg 及び 0.6 mg/kg 間欠投与群において、C_{max} は用量比依存性を示すレベルを上回って上昇し、AUC_{24} 及び AUC_{72} は概ね用量比依存的に上昇した。

表 2.6.6.6-1　妊娠 Sprague-Dawley ラットへのイキサゾミブクエン酸エステル経口投与時の血漿中イキサゾミブの TK パラメータ平均値

投与量 (mg/kg)	解析実施時 妊娠日齢	t_{max} (時間)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{24} (ng·hr/mL)	AUC_{72} (ng·hr/mL)
0.1	17	1.5	10	184	NE
0.3	17	1.0	29	348	NE
0.6	15	1.0	67	553	1081
0.8/0.4[a]	15[b]	1.0[b]	21[b]	291[b]	651[b]

出典：添付資料番号 4.2.3.5.2-1

AUC_{24} = 0 時間から 24 時間の血漿中濃度-時間曲線下面積；AUC_{72} = 0 時間から 72 時間の血漿中濃度-時間曲線下面積；C_{max} = 最高血漿中濃度；NE = 評価なし；t_{max} = 最高血漿中濃度到達時間

a　0.8 mg/kg を 3 日ごとに 1 回投与したところ重度の母動物毒性が認められたため、生存ラットを 0.4 mg/kg を 3 日ごとに 1 回投与群に再割付した。

b　0.4 mg/kg を 3 日ごとに 1 回投与した場合のトキシコキネティクス（TK）パラメータ。

妊娠 6 日目から 17 日目まで 1 日 1 回投与したラットでは、0.3 mg/kg 投与群の母動物において体重及び摂餌量の減少が認められた。同群の母ラット 1 匹に黒色便及び便の減少が一時的に観察された。胎盤又は胎児の異常所見はいずれの群でも認められなかった。無毒性量（NOAEL）は、母ラットでは 0.1 mg/kg（AUC_{24} = 184 ng·hr/mL）、胎児では > 0.3 mg/kg であると判断した。

0.8 mg/kg を 3 日ごとに 1 回（妊娠 6、9、12 及び 15 日目）投与したラットでは、1 匹の母ラットが死亡し、別の母ラットは妊娠 7 日目に瀕死状態のため安楽死させた。0.8 mg/kg 投与群では、摂餌量の減少、運動活動低下及び低体温が観察された。0.6 mg/kg 投与群の母ラットでは、体重及び摂餌量の減少が認められた。0.6 mg/kg 投与群では胎児体重の減少が認められた。統計的に有意ではなかったが、0.6 mg/kg では、胎児の生存率が低下、着床後死亡率が上昇する傾向があった可能性はある。いずれの群でも、性比、外表、内臓又は骨格の観察所見に対して、被験物質投与に関連する影響は認められなかった。母ラット及び胎児の無毒性量（NOAEL）は、0.4 mg/kg（AUC_{24} = 291 ng·hr/mL）であると判断した。

2.6.6.6.2.2 妊娠 Sprague-Dawley ラットを用いたイキサゾミブクエン酸エステル 反復経口投与による胚・胎児発生に関する試験

：添付資料番号 4.2.3.5.2-2（評価）

妊娠 Sprague-Dawley ラットにイキサゾミブクエン酸エステル（ロット番号 102031）を妊娠 6、9、12 及び 15 日目に強制経口投与した場合のイキサゾミブの胚・胎児発生毒性及び TK プロファイルについて評価した（概要表 2.6.7.13A；添付資料番号 4.2.3.5.2-2）。ラットに、溶媒（塩化ナトリウム 0.45% [w/v]含有[redacted] 又はイキサゾミブ 0.2、0.4 及び 0.6 mg/kg を投与した。各群に適切な時期に交尾させた雌 20 匹を割り付け、さらに TK 解析用として各群に 4 匹を割り付けた。投与完了後、主試験用に割り付けた母ラットを妊娠 20 日目に安楽死させた。母ラットの評価パラメータは、臨床観察、体重、摂餌量、TK 解析パラメータ（妊娠 6 日目及び 15 日目）、主な内臓器官・子宮・胎盤及び卵巣の肉眼検査による病理学的所見、並びに胎児数・着床前死亡率・着床後死亡率・総着床数及び黄体数で、胎児の評価パラメータは、体重、性比、外表奇形及び発達変異（内臓及び骨格の異常及び変異）であった。

0.2 mg/kg～0.6 mg/kg の初回投与後、イキサゾミブの平均血漿中曝露量は、用量比依存性を示すレベルを上回って（C_{max}）又は概ね用量比依存的に（AUC）上昇した（表 2.6.6.6-2）。最終投与後（妊娠 15 日目）のイキサゾミブの曝露量は、初回投与後（妊娠 6 日目）の曝露量と同程度（0.4 mg/kg 投与群及び 0.6 mg/kg 投与群）又はそれよりも高かった（0.2 mg/kg 投与群）。

表 2.6.6.6-2　妊娠 Sprague-Dawley ラットへのイキサゾミブクエン酸エステル経口投与時の血漿中イキサゾミブの TK パラメータ平均値

投与量 (mg/kg)	解析実施時 妊娠日齢	t_{max} (時間)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{24} (ng·hr/mL)	AUC_{72} (ng·hr/mL)
0.2	6	1.7	6	99	275
	15	2.0	12	201	489
0.4	6	1.0	22	246	590
	15	1.0	33	346	738
0.6	6	1.0	46	428	964
	15	1.0	49	511	1103

出典：添付資料番号 4.2.3.5.2-2
AUC_{24} = 0 時間から 24 時間の血漿中濃度-時間曲線下面積；AUC_{72} = 0 時間から 72 時間の血漿中濃度-時間曲線下面積；C_{max} = 最高血漿中濃度；t_{max} = 最高血漿中濃度到達時間

0.6 mg/kg 投与群の 2 匹の母ラットは妊娠 7 日目及び 8 日目に死亡した。当該投与群の臨床徴候としては、被毛の汚れ及び排便量の減少があった。摂餌量の減少に対応する母動物の体重減少は、すべての投与量で観察された。剖検により、0.4 mg/kg 投与群及び 0.6 mg/kg 投与群では胸腺の縮小が判明し、0.6 mg/kg 投与群の 1 匹において胃粘膜面の黒色点が観察された。いずれの群でも黄体数又は着床数に被験物質投与に関連する影響は認められず、被験物質投与に関連する胎盤の肉眼所見も認められなかった。

胎児を評価した結果、着床後死亡率、生存胎児数、性比、胎児体重は、投与群間で同程度であった。溶媒対照群と比べ、いずれの群でも外表観察において被験物質投与に関連する影響は認められず、0.6 mg/kg 投与群では内臓／骨格観察若しくは仙骨-尾椎数において被験物質投与に関連する影響は認められなかった。

これらの結果に基づき、無毒性量（NOAEL）は、母ラットの全身毒性については < 0.2 mg/kg（妊娠 15 日目の AUC_{24} = 201 ng·hr/mL）、生殖毒性及び胚・胎児発生毒性については ≥ 0.6 mg/kg であると判断した。

2.6.6.6.2.3 妊娠 New Zealand white ウサギを用いたイキサゾミブクエン酸エステルの反復経口投与による胚・胎児発生に関する用量設定試験

：添付資料番号 4.2.3.5.2-3（評価）

妊娠 New Zealand white ウサギに妊娠 7、10、13、16 及び 19 日目にイキサゾミブクエン酸エステル（ロット番号 21E004）を強制経口投与した場合のイキサゾミブの胚・胎児発生毒性及び TK プロファイルについて評価した（概要表 2.6.7.13B；添付資料番号 4.2.3.5.2-3）。各群に適切な時期に交尾させた雌 6 匹を割り付け、溶媒（滅菌注射用水 [USP] で調製したグリシン 3%含有[redacted] 又はイキサゾミブ 0.25、0.5、1.0 若しくは

1.2 mg/kg を投与した。投与終了後、母ウサギを妊娠 29 日目に安楽死させた。母動物の評価パラメータは、一般状態観察、体重、摂餌量、血漿中薬物濃度測定（妊娠 7 日目及び 19 日目）、子宮（妊娠子宮重量を含む）・胎盤及び卵巣の肉眼検査、並びに着床数及び黄体数で、胎児の評価パラメータは、胎児数・早期及び後期胚・胎児吸収数、体重並びに外表観察であった。

C_{max} 及び AUC_{72} によって測定したイキサゾミブの平均血漿中曝露量は、妊娠 7 日目と 19 日目の両方で、用量比依存性を示すレベルをやや下回って上昇した。妊娠 7 日目の C_{max} 及び AUC_{72} はいずれも妊娠 19 日目の数値と同程度であり、イキサゾミブは血漿中に蓄積しないことが示された。

表 2.6.6.6-3　妊娠 New Zealand white ウサギへのイキサゾミブクエン酸エステル経口投与時の血漿中イキサゾミブの TK パラメータ平均値

投与量 (mg/kg)	解析実施時 妊娠日齢	t_{max} (時間)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{72} (ng·hr/mL)
0.25	7	48	7.82	426
	19	8.0	10.9	549
0.5	7	48	13.0	785
	19	4.0	18.1	956
1.0	7	24	17.5	1070
	19	4.0	33.4	1340
1.2	7	8.0	23.8	1390
	19	4.0	66.6	1600

出典：添付資料番号 4.2.3.5.2-3
AUC_{72} = 0 時間から 72 時間の血漿中濃度-時間曲線下面積；C_{max} = 最高血漿中濃度；t_{max} = 最高血漿中濃度到達時間

1.2 mg/kg 投与群の母動物 1 匹が妊娠 11 日目に死亡した。さらに同群の母動物 2 匹には、著明な体重の減少及び摂餌量の減少が認められ、瀕死状態のため安楽死させた（妊娠 13 日目及び 19 日目）。当該動物では、排便量減少、軟便、下痢、粘性便及び体表への茶色物質の付着が認められた。

すべての投与量で、概して一過性の平均体重及び摂餌量の減少が母動物で認められ、≥ 0.5 mg/kg の投与量では、排便量減少、下痢及び軟便等も観察された。1.2 mg/kg 投与群の生存動物では、溶媒対照群と比較し、妊娠子宮重量の減少（14.1%）も認められた。

1.0 mg/kg 投与群では、着床後死亡（早期及び後期吸収）並びに胎児生存率の低下がみられた。いずれの投与量でも、子宮内発育の変化、及びイキサゾミブ投与に関連する明らかな胎児奇形又は発達変異は認められなかった。

結論として、1.2 mg/kg の投与量は妊娠ウサギにおいて忍容性を示さず、母動物の無毒性量（NOAEL）は < 0.25 mg/kg（妊娠 19 日目の AUC_{72} < 549 ng·hr/mL）であると考えられた。本試験において、胚・胎児に対する影響の無作用量（NOEL）は、0.5 mg/kg（妊娠 19 日目の AUC_{72} = 956 ng·hr/mL）であると考えられた。

2.6.6.6.2.4 妊娠 New Zealand white ウサギを用いたイキサゾミブクエン酸エステルの反復経口投与による胚・胎児発生に関する試験

：添付資料番号 4.2.3.5.2-4（評価）

妊娠 New Zealand white ウサギにイキサゾミブクエン酸エステル（ロット番号 102031）を妊娠 7、10、13、16 及び 19 日目に強制経口投与した場合のイキサゾミブの胚・胎児毒性及び TK プロファイルについて評価した（概要表 2.6.7.13C；添付資料番号 4.2.3.5.2-4）。各群に適切な時期に交尾させた雌 20 匹を割り付け、溶媒（滅菌注射用水 [日本薬局方] で調製したグリシン 3% [w:w]含有[redacted] 又はイキサゾミブ 0.1、0.3 若しくは 1.0 mg/kg を投与した。投与終了後、母ウサギを妊娠 28 日目に安楽死させた。母動物の評価パラメータは、一般状態観察、体重、摂餌量、血漿中薬物濃度測定（妊娠 7 日目及び 19 日目）、子宮・胎盤及び卵巣の肉眼検査、並びに着床数及び黄体数で、胎児の評価パラメータは、胎児数、死亡率、体重、性別、外表、内臓及び骨格の観察であった。

イキサゾミブの初回投与後の血漿中曝露量は、C_{max} 及び AUC が 0.1 mg/kg～0.3 mg/kg では用量比例的又はそれを上回るレベルで上昇したが、0.3 mg/kg～1.0 mg/kg では用量比依存性を示すレベルを下回っていた（表 2.6.6.6-4）。妊娠 19 日目の C_{max}、AUC_{24} 及び AUC_{72} は、0.1 mg/kg で数値が上昇したことを除き、妊娠 7 日目の数値と概ね同程度であった。

表 2.6.6.6-4　妊娠 New Zealand white ウサギへのイキサゾミブクエン酸エステル経口投与時の血漿中イキサゾミブの TK パラメータ平均値

投与量 (mg/kg)	解析実施時 妊娠日齢	t_{max} (時間)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{24} (ng·hr/mL)	AUC_{72} (ng·hr/mL)
0.1	7	32	3	30	162
	19	4.0	9	189	497
0.3	7	32	11	191	679
	19	8.0	15	324	792
1.0	7	5.3	22	443	1203
	19	6.7	29	586	1314

出典：添付資料番号 4.2.3.5.2-4

AUC_{24} = 0 時間から 24 時間の血漿中濃度-時間曲線下面積；AUC_{72} = 0 時間から 72 時間の血漿中濃度-時間曲線下面積；C_{max} = 最高血漿中濃度；t_{max} = 最高血漿中濃度到達時間

≥ 0.3 mg/kg の投与量では、母動物の体重及び／又は体重増加量並びに摂餌量の減少が便の減少を伴って認められた。1.0 mg/kg 投与群では、軟便及び被毛の汚れも観察された。剖検時に被験物質投与に関連する所見は認められなかった。いずれの群でも黄体数又は着床数に対して被験物質投与に関連する影響は認められなかった。

いずれの群でも胎盤の肉眼所見に対して被験物質投与に関連する影響は認められなかった。胎児の評価では、いずれの群でも性比、胎児体重又は内臓観察に対して被験物質投与に関連する影響は認められなかった。1.0 mg/kg 投与群では、尾椎異常の発現頻度が上昇し、尾椎異常が認められた胎児 2 匹では外表観察で短尾が認められた。骨格観察では、腰椎数及び完全過剰肋骨の変異の発現頻度は、≥ 0.3 mg/kg の投与量で上昇し、結果として、当該群の総骨格変異発現頻度は上昇した。

これらの結果に基づき、イキサゾミブの無毒性量（NOAEL）は母動物毒性及び胚・胎児発生毒性に関しては 0.1 mg/kg（妊娠 19 日目の AUC_{24} = 189 ng·hr/mL）、生殖機能に関しては ≥ 1.0 mg/kg であると結論づけた。

2.6.6.6.3 出生前及び出生後の発達並びに母動物の機能に関する試験

イキサゾミブは再発又は難治性の多発性骨髄腫患者の治療を目的としているため、ICH S9 ガイダンス[1]に従い出生前及び出生後の発達に関する試験は実施しなかった。

2.6.6.6.4 幼若動物を用いた試験

イキサゾミブは小児集団における使用を目的としていないため、ICH S9 ガイダンス[1]に従い幼若動物を用いた毒性試験は実施しなかった。

2.6.6.7 局所忍容性試験

注射部位又は経口投与関連部位の評価に基づき、イキサゾミブの局所忍容性について評価した。さらに、イキサゾミブクエン酸エステルを in vitro ヒト全血溶血アッセイにおいて試験し、静脈内投与による忍容性について評価した。

2.6.6.7.1 経口投与による組織忍容性試験

ラットを用いた最長 6 ヵ月間（7 サイクル）までの経口投与毒性試験及びイヌを用いた最長 9 ヵ月間（10 サイクル）までの経口投与毒性試験を GLP 準拠で実施した結果、イキサゾミブ（イキサゾミブ又はイキサゾミブクエン酸エステルとして投与）は、忍容性を示した用量では上部消化管に局所的な有害作用をもたらさなかった。これらの試験に基づき、イキサゾミブには経口投与による局所刺激性発現の危険性はないものと予測される。

2.6.6.7.2 静脈内投与による組織刺激性試験

ラット及びイヌを用いて反復静脈内投与毒性試験を実施したところ、イキサゾミブ（イキサゾミブ又はイキサゾミブクエン酸エステルとして投与）は、注射部位に局所有害作用をもたらさなかった（2.6.6.3.6、2.6.6.3.7、2.6.6.3.13 及び 2.6.6.3.14）。さらに、イキサゾミブ及びイキサゾミブクエン酸エステルは、in vitro ヒト全血アッセイにおいて溶血を引き起こさなかった（概要表 2.6.7.16；報告書番号 4.2.3.6-1 及び 4.2.3.6-2）。したがって、イキサゾミブには静脈内投与による組織刺激性発現の危険性はないものと予測される。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 依存性に関する試験

イキサゾミブは、少なくとも 1 回の前治療を受けたことがある進行癌、特に多発性骨髄腫（生命を脅かす疾患）患者での使用を目的としていることを考慮し、依存性に関する試験は必要とされないことから、これらの試験は実施しなかった。

2.6.6.8.2 光毒性試験

：添付資料番号 4.2.3.7.7-1（参考）

イキサゾミブの光毒性を in vitro で評価した（概要表 2.6.7.17；報告書番号 4.2.3.7.7-1）。マウス胎児由来 BALB/3T3 細胞に最大 400 μg/mL のイキサゾミブ（イキサゾミブクエン酸エステルとして）を添加して 1 時間インキュベートした後、紫外線 A 波（UVA）5 J/cm^2 を 50 分間照射した。細胞を洗浄後、さらに 19～22 時間インキュベートし、細胞の生存率を測定した。

照射の有無にかかわらず、いずれの濃度でも細胞培地における薬剤の沈殿は観察されなかった。イキサゾミブの細胞生存率が 50%に減少した濃度（IC_{50}）は、非照射で 30.579 μg/mL、照射では 19.806 μg/mL であった。光毒性係数（PIF）は 1.54 で、光毒性を示さなかった（PIF < 2）。したがって、イキサゾミブは本試験の条件下で、光毒性反応を引き起こさなかった。

さらに、イキサゾミブは 290～400 nm の波長における吸収はほとんどなかった（Section 2.3.S.3.1）。雄ラットを用いた全身オートラジオグラフィー試験では、イキサゾミブ及びその由来成分の皮膚及び眼への分布がある程度示されたが、メラニンとの結合性は低いことがデータから示唆された（Section 2.6.4.4.1）。非臨床毒性試験において、皮膚又は眼毒性を示唆する変化は観察されなかった。

全体として、イキサゾミブには光安全性に対するリスクがないことがデータから示された。

2.6.6.9 考察及び結論

複数の動物種（マウス、ラット、ウサギ及びイヌ）を用いて、GLP 準拠又は非準拠での一連の毒性試験を実施した。これらの試験には、単回及び反復での経口投与毒性試験及び静脈内投与毒性試験（経口投与期間はラットでは最長 6 ヵ月、イヌでは最長 9 ヵ月）、遺伝毒性試験、生殖発生毒性試験、並びに in vitro 光毒性試験が含まれている。これら試験では、ヒトの臨床スケジュールより高頻度又はそれと同一（長期試験の場合）の周期的な間欠投与スケジュールを採用した反復投与毒性試験を実施した。非臨床反復投与毒性試験の大半は、21 日サイクルであり、各サイクルは最初の 2 週間の週 2 回投与（1、4、8 及び 11 日目に投与）とそれに続く 10 日間の休薬期間で構成されている。ただし、ラットを用いた 6 ヵ月間反復投与毒性試験及びイヌを用いた 9 ヵ月間反復投与毒性試験では 28 日サイクルを採用した（すなわち、各サイクルは最初の 3 週間の週 1 回投与（1、8 及び 15 日目に投与）とそれに続く 13 日間の休薬期間で構成 [臨床スケジュールと同一]）。これらの GLP 準拠で実施した毒性試験は、主に ICH S9 ガイダンス[1]に従って実施し、さらに、ICH M3 (R2)[2]、S2 (R1)[3]、M7[4]、S7A[5]、S7B[6]及び S10[7]ガイダンスも考慮した。これらの一連の非臨床毒性試験は、難治性又は利用可能な治療法に対して抵抗性を示す進行癌（すなわち重篤又は生命を脅かす疾患）患者、又は現在の治療法がベネフィットをもたらさないと考えられる進行癌患者に対して治療を目的とした薬剤の販売承認のために定められた ICH S9[1]での要求事項を上回っている。さらに、これらのイキサゾミブに関する毒性試験の結果から、再発又は難治性の多発性骨髄腫患者におけるイキサゾミブの使用に関して危惧すべき毒性はみられなかった。

2.6.6.9.1 死亡率及び発生頻度

用量制限毒性は、イキサゾミブを経口投与したマウス、ラット及びイヌにおいて観察され、単回投与の最大耐量（MTD）は反復投与の最大耐量（MTD）と概ね同程度であった（表2.6.6.9-1）。体表面積換算値ではラットの最大耐量（MTD）（0.6～1.0 mg/kg [3.6～6.0 mg/m^2]）及びイヌの最大耐量（MTD）（0.15～0.20 mg/kg [3.0～4.2 mg/m^2]）も概ね同程度であったが、血中曝露量に基づくと、イヌは比較的高い忍容性を示す傾向があった。

ラットでは、1 mg/kg が単回投与での最大耐量（MTD）であったが、3 ヵ月間（5 サイクル）反復投与毒性試験では、0.6 mg/kg（平均 C_{max} = 26.1 ng/mL 及び平均 AUC_{24} = 296 ng·hr/mL）が最大耐量（MTD）であった。6 ヵ月間（7 サイクル）反復毒性試験では、0.8 mg/kg（C_{max} = 62.1 ng/mL 及び AUC_{24} = 252 ng·hr/mL）に対して雄ラットでは忍容性を示したが、雌ラットの最大耐量（MTD）は 0.6 mg/kg（C_{max} = 44.7 ng/mL 及び AUC_{24} = 288 ng·hr/mL）であった。ラット死亡の明確な原因は、単回投与毒性試験又は反復投与毒性試験のいずれにおいても確定されなかったが、消化管（炎症、粘膜／上皮過形成、好中球浸潤、単細胞壊死）及びリンパ系（細胞減少／壊死）の毒性に起因するものと推定された。

イヌにおいて、0.3 mg/kg 単回経口投与は忍容性を示さず、用量制限毒性（DLT）は消化管の炎症、潰瘍、及び腸疾患、並びにリンパ系組織の細胞減少及び壊死に起因していた。本投与量でのイヌにおけるイキサゾミブの曝露量は、C_{max} 平均値が 397 ng/mL で、AUC_{24} 平均値が 1590 ng·hr/mL であった。ラットの場合と同様、わずかに低い 0.20 mg/kg の週 1 回投与を 3 週間実施する 28 日間ごとのサイクルを 10 サイクル（9 ヵ月間）投与したところ、良好な忍容性を示した（定常状態での AUC_{24} 平均値が 1870 ng·hr/mL）。

表 2.6.6.9-1　非臨床試験でイキサゾミブを経口投与した動物種における最大耐量

試験期間	動物種	性別	MTD (mg/kg)	群平均 C_{max} (ng/mL)	群平均 AUC_{24} (ng·hr/mL)[a]
単回投与	マウス	M	4	219	926
単回投与	ラット	M	1	ND	ND
2 週間	ラット	M	1.0	37.9	643
1 ヵ月	ラット	M	0.8	25.0	362
		F	0.8	36.6	395
3 ヵ月	ラット	M	0.6	35.6	312
		F	0.6	16.6	280
6 ヵ月	ラット	M	0.8	62.1	252
		F	0.6	44.7	288
単回投与	イヌ	M	0.21	403	2140
2 週間	イヌ	M	0.1	159	678
		F	0.2	345	1910
3 ヵ月	イヌ	M	0.15	143	994
		F	0.15	131	1530
9 ヵ月	イヌ	M	0.20	332	1640
		F	0.20	375	2090

AUC_{24} = 0 時間から 24 時間の血漿中濃度-時間曲線下面積；C_{max} = 最高血漿中濃度；F = 雌；M = 雄；MTD = 最大耐量；ND = 未実施

a　投与期間中の最終時点の数値。

ラットにおける状態悪化及び死亡に先行して見られる一般的な徴候としては、体重／体重増加量の減少、摂餌量の減少、運動量低下、円背位、側臥位、体位／歩行の異常（四肢の再配置困難）、並びに軟便、水様便、下痢、及び排便量減少等の消化管障害があった。

イヌでみられた死亡前の臨床徴候は、摂餌量及び体重の減少を伴った消化管障害（嘔吐、下痢、軟便・粘血便及び／又は黄色便若しくは緑色便）、脱水、運動失調、反射低下、並びに循環障害（点状及び斑状出血、紅斑並びに／又は頻脈）であった。

2.6.6.9.2 標的器官毒性

ラット及びイヌで観察された主な標的器官毒性の概要を表 2.6.6.9-2 及び以下に示す。

2.6.6.9.3 胃腸への影響

ラット及びイヌの両方において胃腸毒性が主要な用量制限毒性（DLT）であった。胃腸毒性は、糞便変化（柔便／軟便、排便の減少）、体表面の汚れ、痩身、体重及び摂餌量の減少、並びに嘔吐（イヌの場合）の一般状態変化により臨床的に明らかであった。慢性毒性試験において忍容性を示した投与量での腸への影響は両方の動物種で類似していた。

ラットを用いた経口投与毒性試験及び静脈内投与毒性試験（早期死亡動物を含む）の両方において、≥ 0.2 mg/kg の投与量での腸の所見は、粘膜／上皮過形成、急性炎症、好中球浸潤（粘膜、粘膜固有層）及び単細胞壊死であった。腸炎症に相関する他の所見は、血中白血球、好中球、リンパ球、単球、好塩基球、好酸球及び／又はフィブリノゲンの増加であった。

イヌにおいては、胃腸毒性が、1 サイクル経口投与毒性試験（炎症、潰瘍、腸疾患）及び 2 サイクル静脈内投与毒性試験（腸重積症、粘膜上皮細胞及び粘膜固有層細胞のアポトーシス）における死亡に関与していた。忍容性を示す経口投与量、主に 0.2 mg/kg のときの胃腸所見は、急性炎症若しくは亜急性炎症、腸の鬱血又は出血、並びに胃及び腸の好中球浸潤であった。ラットと同様に、イヌにおいても相関した血中白血球パラメータの増加が認められた。

一般的に、胃腸への影響は、回復期間後に回復又は回復傾向が認められ、ボルテゾミブで報告されたものと質的に類似していた。

2.6.6.9.4 リンパ系組織への影響

リンパ系組織に対する毒性も主要な DLT であった。複数のリンパ系組織におけるリンパ球減少／壊死（骨髄を含む）は反復経口投与試験及び反復静脈内投与試験において早期に死亡した動物（ラット及びイヌ）における主な所見に含まれた 2 つであった。

ラット及びイヌの両方において忍容性を示した投与量（経口投与毒性試験及びラットにおける静脈内投与毒性試験）でのリンパ系組織への影響は、リンパ球減少（骨髄を含む）及び／又は壊死、並びに好中球浸潤であった。これらの所見は、発生頻度及び重症度の点で用量依存性があり、イヌよりもラットにおいてよくみられる所見であった。

一般的に、リンパ系組織に対する毒性作用は、回復期間後に回復又は回復する傾向がみられた。

2.6.6.9.5 神経への影響

神経細胞変性は、主にイヌにみられ、ラットでは静脈内投与後にのみ観察された。

イヌにおいては、2 週間試験（1 サイクル）での経口投与量 ≥0.10 mg/kg で、交感神経節、後根神経節、及び末梢自律神経系（唾液腺）、末端器官神経節の軽微から軽度の神経細胞変性、並びに、末梢神経及び脊髄後索上行路の軽微で二次的な軸索／神経線維の変性がみられた。これら所見は運動失調、開脚姿勢及び反射反応の減少と一部相関していた。投与スケジュールを臨床投与スケジュール（28 日サイクル）に模した 9 ヵ月間試験（10 サイクル）では、同様の神経変性所見が主に 0.2 mg/kg（AUC_{24} = 1870 ng·hr/mL）でみられた。さらに、神経行動学的な機能評価では、神経機能の変化は検出されなかった。

ラットにおいては、静脈内投与量 ≥0.15 mg/kg（AUC24 ≥ 283 ng·hr/mL）で軽微から軽度の後根神経節細胞のクロマトライシスがみられ、0.45/0.50 mg/kg では、さらに二次的で軽微な坐骨神経及び腓腹神経の変性が観察された。

神経細胞所見の大部分は、後根神経節及び脊髄における所見を除き、休薬期間後に回復又は回復傾向が認められた。休薬後には末梢神経節に進行性の神経細胞変性が存在しなかったこと、並びに神経線維及び軸索に二次的な退行性変化しか存在しなかったことは、休薬後に進行性の毒性がないことを支持した。

2.6.6.9.6 副腎、腎、及び肝臓への影響

副腎所見はラットにおいてのみ観察された。ラットを用いた 2 サイクルの経口投与毒性試験で、すべての投与量で軽微から軽度の副腎皮質の空胞化が観察され、雄における 0.8 及び 1.2/1.0 mg/kg 群では副腎の相対重量の増加と相関していた。ラットを用いた 6 ヵ月間（7 サイクル）経口投与毒性試験において忍容性を示さなかった投与量（0.8 及び 0.8/0.6 mg/kg）では、副腎束状帯細胞の軽微から軽度の変性及び壊死、軽微から軽度の副腎髄質細胞の分泌顆粒の減少、並びに副腎髄質の単細胞壊死が認められた。当該試験のすべての投与量で、副腎皮質束状帯の空胞の減少も認められた。静脈内投与毒性試験における唯一の所見は、ラットを用いた 5 サイクル試験における副腎皮質球状帯の軽微から中等度の肥大であった。

腎臓への影響は、ラットを用いた 5 サイクルの静脈内投与毒性試験に限定されており、これはおそらく DLT と考えられるものであった。0.3 mg/kg の投与量で死亡が起こったが、これは、近位尿細管拡張及び尿細管再生を特徴とした急性腎不全に一部起因していた可能性がある。≥0.05 mg/kg の投与量では腎重量増加がみられたが、生存動物においては病理組織学的所見との相関はみられなかった。ラットを用いた経口投与毒性試験において腎臓に所見（慢性進行性腎症、尿管／膀胱結石、炎症）が散見されたが、これらの所見は、この動物種で一般的にみられる所見であると考えられること、さらに、用量反応関係がなかった、もしくは発生頻度が非常に低かったことから、被験物質投与に関連した所見とはみなさなかった。

ラットにおける肝毒性は、静脈内投与毒性試験において、又は忍容性を示さない経口投与量でのみ認められた。ラットを用いた 7 サイクルの経口投与毒性試験において、軽微から軽度の肝細胞変性及び壊死、肝細胞空胞化、並びに類洞における好中球浸潤が観察されたのは早期死亡ラットにおいてのみであった。≥0.2 mg/kg の投与量では、ラットの反復投与毒性試験（経口及び静脈内）のすべてで肝重量の増加が認められたが、概して病理組織学的所見との相関はなかった。肝毒性はイヌでは認められなかった。

一般的に、副腎、腎臓及び肝臓への毒性作用は、休薬期間後に回復又は回復する傾向が認められた。

表 2.6.6.9-2　Sprague-Dawley ラット及びビーグル犬を用いて GLP 準拠で実施したイキサゾミブ反復経口投与毒性試験における主要標的器官の病理組織学的所見の概要

器官／組織及び所見	ラット						イヌ			
	4.2.3.2-2[a] (BIW × 2 サイクル)		4.2.3.2-4[a] (BIW × 5 サイクル)		4.2.3.2-5 (QW × 3 × 7 サイクル)		4.2.3.2-11[a] (BIW × 1 サイクル)		4.2.3.2-13[a] (BIW × 5 サイクル)	4.2.3.2-15 (QW × 3 × 10 サイクル)
	ED	Main	ED	Main	ED	Main	ED	Main	Main	Main
腸[b]										
腸疾患							+			
上皮変性			+							
上皮過形成	+		+	+	+	+				
粘膜固有層細胞減少	+									
粘膜出血	+						+	+		
粘膜／粘膜下炎症	+	+	+	+			+	+		
粘膜肥厚	+	+								
好中球浸潤					+	+				+
単細胞壊死			+	+	+	+				
粘膜下浮腫							+			
胃										
びらん／潰瘍						+	+			+
炎症						+	+	+		
リンパ球減少				+			+			
好中球浸潤										+
リンパ節[c]										
リンパ球減少	+	+	+		+					+
単細胞壊死	+		+	+	+	+				
好中球浸潤						+				+
パイエル板										
リンパ球減少	+	+	+	+				+		+
壊死				+			+			
好中球浸潤										+
脾臓										
リンパ球減少	+		+		+					
好中球浸潤						+	+	+		

表 2.6.6.9-2　Sprague-Dawley ラット及びビーグル犬を用いて GLP 準拠で実施したイキサゾミブ反復経口投与毒性試験における主要標的器官の顕微鏡所見の概要（続き）

器官／組織及び所見	ラット						イヌ			
	4.2.3.2-2[a] (BIW × 2 サイクル)		4.2.3.2-4[a] (BIW × 5 サイクル)		4.2.3.2-5 (QW × 3 × 7 サイクル)		4.2.3.2-11[a] (BIW × 1 サイクル)		4.2.3.2-13[a] (BIW × 5 サイクル)	4.2.3.2-15 (QW × 3 × 10 サイクル)
	ED	Main	ED	Main	ED	Main	ED	Main	Main	Main
胸腺										
細胞減少	+	+	+	+		+	+	+		
単細胞壊死	+		+	+						
出血	+									
骨髄										
細胞減少	+		+		+	+				
単細胞壊死			+		+					
後根、交感神経、末端器官又は末梢自律神経節										
神経変性							+	+	+	+
腓腹、坐骨又は迷走神経										
神経変性								+	+	+
脊髄										
軸索変性							+	+	+	+
グリオーシス										+
脳										
軸索変性							+			+
グリオーシス										+

+ = 所見あり；BIW = 週 2 回；ED = 早期死亡；GLP = 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準；QW = 週 1 回

a　当該報告書番号に対応する Amendment あり。

b　十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、及び/又は直腸における所見を含む。

c　腸間膜リンパ節及び/又は下顎リンパ節における所見を含む

ラット及びイヌを用いた長期試験における無毒性量（NOAEL）及び多発性骨髄腫患者に対する最高推奨量（表 2.6.6.9-3）から、安全域はそれぞれ 0.45 倍及び 1.8 倍である。

表 2.6.6.9-3　イキサゾミブを経口投与したラット（7 サイクル）、イヌ（10 サイクル）及びヒト間でのイキサゾミブの全身曝露量の比較

動物種	投与量 (mg/kg)	投与量との関連	イキサゾミブ全身（血漿中）曝露量[a]	
			平均 C_{max} (ng/mL)	平均 AUC[b] (ng·hr/mL)
ラット[c]	0.2	NOAEL	5.99	483
イヌ[d]	0.1	NOAEL	136	1940
ヒト[e]	0.057[f]	N/A	37	1080

AUC = 血漿中濃度-時間曲線下面積；C_{max} = 最高血漿中濃度；N/A = 該当せず；NOAEL = 無毒性量

a　雌雄の統合データ。

b　ラット、イヌ、及びヒトの 0 時間から 168 時間の AUC 値（AUC168 ）。

c　添付資料番号 4.2.3.2-5。

d　添付資料番号 4.2.3.2-15。

e　イキサゾミブを 28 日サイクルで、週 1 回、3 週間経口投与したヒトにおける曝露量。15 日目の数値を表す。臨床試験 C16004, C16005, 及び C16007 の統合データ。C_{max} について n = 56。AUC_{168} について n = 42。

f　用量 4 mg 及び体重 70 kg の患者に基づく。

上記の曝露量の安全域、毒性の可逆性、患者における毒性のモニタリング及び予測可能性、並びにイキサゾミブの潜在的な薬効に基づくと、少なくとも 1 回の前治療を受けたことがある多発性骨髄腫患者へのイキサゾミブの使用を妨げるような所見はイキサゾミブの非臨床毒性評価において認められず、追加の非臨床毒性試験は必要ではないと考えられた。

2.6.6.10 図表

本文中に記載。

2.6.6.11 参考文献一覧

[1] Nonclinical evaluation for anticancer pharmaceuticals S9. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2009.

[2] Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals M3(R2). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2009.

[3] Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use S2(R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2008.

[4] Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk M7. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2014.

[5] Safety pharmacology studies for human pharmaceuticals S7A. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use 2001."

[6] Nonclinical Evaluation of the Potential for Delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals S7B. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use 2005."

[7] Photosafety evaluation of pharmaceuticals S10, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2015.

[8] Bross BF, Kane R, Farrell AT, Abraham S, Benson K, Brower ME, et al. Approval summary for bortezomib for injection in the treatment of multiple myeloma. Clin Cancer Res. 2004;10(12 Pt 1):3954-64.

[9] Herndon TM, Deisseroth A, Kaminskas E, Kane RC, Koti KM, Rothmann MD, et al. US Food and Drug Administration approval: carfilzomib for the treatment of multiple myeloma. Clin Cancer Res. 2013;19(17):4559-63.

[10] Krinke GJ, Ehrensperger F, Vandevelde M. Non-neoplastic and neoplastic lesions in the peripheral nervous system. In: Mohr U, Carlton WW, Dungworth DL, Benjamin SA, Capen CC, Hahn FF, eds. Pathobiology of the Aging Dog. Iowa State University Press: Ames, IA; 2001;Vol 2:10–21.

[11] Xu Y, Sladky JT, Brown MJ. Dose-dependent expression of neuronopathy after experimental pyridoxine intoxication. Neurology. 1989;39(8):1077–83.

[12] Toyoshima S, Kanno A, Kitayama T, Sekiya K, Nakai K, Haruna M, et al. QT PRODACT: in vivo QT assay in the conscious dog for assessing the potential for QT interval prolongation by human pharmaceuticals. J Pharmacol Sci. 2005;99(5):459–71.

目次

2.6.7 毒性試験概要表 2
2.6.7.1 毒性試験：一覧表 2
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 10
2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧 18
2.6.7.5 単回投与毒性試験 20
2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 24
2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験 28
2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験 111
2.6.7.9 In Vivo 遺伝毒性試験 116
2.6.7.10 がん原性試験 118
2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 119
2.6.7.12 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 121
2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 122
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 131
2.6.7.15 新生児を用いた試験 131
2.6.7.16 局所刺激性試験 132
2.6.7.17 その他の毒性試験 133

2.6.7 毒性試験概要表

2.6.7.1 毒性試験：一覧表

2.6.7.1 Toxicology: Overview

Test Article: Ixazomib citrate and ixazomib

Species and Strain	Route	Duration of Dosing	Dose[a]/ Concentration	Test Article	GLP	Testing Facility	Report
Single-dose toxicity							
CD-1 mouse	PO	Single dose	2, 4, and 8 mg/kg	Ixazomib citrate	No	TPC	4.2.3.1-1
Sprague-Dawley rat	PO	Single dose	0.1, 0.3, and 1 mg/kg	Ixazomib	No	Millennium	4.2.3.1-2
Sprague-Dawley rat	IV injection	Single dose	0.1, 0.3, 1, and 3 mg/kg	Ixazomib	No	Millennium	4.2.3.1-3
Sprague-Dawley rat	IV injection	Single dose	0 and 0.3 mg/kg	Ixazomib	No	Millennium	4.2.3.1-4
Beagle dog	PO	Single dose	0.021, 0.07, 0.14, and 0.21 mg/kg	Ixazomib citrate	No	TPC	4.2.1.3-3
Beagle dog	IV infusion (5-minute)	Single dose	0.1, 0.3, and 0.6 mg/kg	Ixazomib	No	[redacted]	4.2.3.1-5
Repeat-dose toxicity							
Sprague-Dawley rat	PO	BIW for 11 days (1 cycle) (dosing on Days 1, 4, 8, and 11)	0, 0.3, 0.6, and 1.0 mg/kg	Ixazomib	No	Millennium	4.2.3.2-1
Sprague-Dawley rat	PO	BIW for 32 days (2 cycles) (dosing on Days 1, 4, 8, and 11; and Days 22, 25, 29, and 32)	Males: 0, 0.4, 0.8, and 1.2/1.0 mg/kg[b] Females: 0, 0.4, 0.8, and 1.0 mg/kg[b]	Ixazomib	Yes	[redacted]	4.2.3.2-2 4.2.3.2-3[c]
Sprague-Dawley rat	PO	BIW for 94 days (5 cycles) (dosing on Days 0, 3, 7, and 10; Days 21, 24, 28, and 31; Days 42, 45, 49, and 52; Days 63, 66, 70, and 73, Days 84, 87, 91, and 94)	0, 0.2, 0.4, and 0.8/0.6 mg/kg[d]	Ixazomib citrate	Yes	[redacted]	4.2.3.2-4

2.6.7.1 Toxicology: Overview (continued)

Test Article: Ixazomib citrate and ixazomib

Species and Strain	Route	Duration of Dosing	Dose[a]/ Concentration	Test Article	GLP	Testing Facility	Report
Repeat-dose toxicity (continued)							
Sprague-Dawley rat	PO	QW × 3 for 182 days (7 cycles) (dosing on Days 0, 7, and 14; Days 28, 35, and 42; Days 56, 63, and 70; Days 84, 91, and 98; Days 112, 119, and 126; Days 140, 147, and 154; Days 168, 175, and 182)	Males: 0, 0.2, 0.4, 0.8 mg/kg Females: 0, 0.2, 0.4, 0.8/0.6 mg/kg	Ixazomib citrate	Yes	[redacted]	4.2.3.2-5
Sprague-Dawley rat	IV injection	BIW for 11 days (1 cycle) (dosing on Days 1, 4, 8, and 11)	0, 0.1, 0.3, and 0.6 mg/kg	Ixazomib	No	Millennium	4.2.3.2-6
Sprague-Dawley rat	IV injection	BIW for 32 days (2 cycles) (dosing on Days 1, 4, 8, and 11; and Days 22, 25, 29, and 32)	0, 0.15, 0.22, 0.30, 0.45, and 0.50 mg/kg[e]	Ixazomib	Yes	[redacted]	4.2.3.2-7 4.2.3.2-8[c]
Sprague-Dawley rat	IV injection	BIW for 94 days (5 cycles) (dosing on Days 0, 3, 7, and 10; Days 21, 24, 28, and 31; Days 42, 45, 49, and 52; Days 63, 66, 70, and 73; Days 84, 87, 91, and 94)	0, 0.05, 0.15, and 0.30 mg/kg	Ixazomib citrate	Yes	[redacted]	4.2.3.2-9
Beagle dog	PO	QD × 7 days (1 cycle)	Males: 0, 0.05, 0.10, and 0.20 mg/kg	Ixazomib	No	[redacted]	4.2.3.2-10
Beagle dog	PO	BIW for 11 days (1 cycle) (dosing on Days 1, 4, 8, and 11)	Males: 0, 0.1, 0.2, and 0.3 mg/kg[f] Females: 0, 0.1, 0.15, and 0.2 mg/kg	Ixazomib	Yes	[redacted]	4.2.3.2-11 4.2.3.2-12[c]

2.6.7.1 Toxicology: Overview (continued)

Test Article: Ixazomib citrate and ixazomib

Species and Strain	Route	Duration of Dosing	Dose[a]/ Concentration	Test Article	GLP	Testing Facility	Report
Repeat-dose toxicity (continued)							
Beagle dog	PO	BIW for 94 days (5 cycles) (dosing on Days 0, 3, 7, and 10; Days 21, 24, 28, and 31; Days 42, 45, 49, and 52; Days 63, 66, 70, and 73; and Days 84, 87, 91, and 94)	0, 0.05, 0.10, and 0.15 mg/kg	Ixazomib citrate	Yes	[redacted]	4.2.3.2-13 4.2.3.2-14
Beagle dog	PO	QW × 3 for 266 days (10 cycles) (dosing on Days 0, 7, and 14; Days 28, 35, and 42; Days 56, 63, and 70; Days 84, 91, and 98; Days 112, 119, and 126; Days 140, 147, and 154; Days 168, 175, and 182; Days 196, 203, and 210; Days 224, 231, and 238; Days 252, 259, and 266)	0, 0.05, 0.10, and 0.20 mg/kg	Ixazomib citrate	Yes	[redacted]	4.2.3.2-15
Beagle dog	IV infusion (5-minute)	BIW for 11 days (1 cycle) (dosing on Days 1, 4, 8, and 11)	Males: 0, 0.05, 0.10, and 0.20 mg/kg	Ixazomib	No	[redacted]	4.2.3.2-16
Beagle dog	IV infusion (5-minute)	BIW for 32 days (2 cycles) (dosing on Days 0, 3, 7, and 10; and Days 21, 24, 28, and 31)	0, 0.10, 0.14, 0.18, and 0.25 mg/kg[g]	Ixazomib	Yes	[redacted]	4.2.3.2-17 4.2.3.2-18[c] 4.2.3.2-19[c] 4.2.3.2-20[c]
Beagle dog	IV infusion (5-minute)	BIW for 94 days (5 cycles) (dosing on Days 0, 3, 7, and 10; Days 21, 24, 28, and 31; Days 42, 45, 49, and 52; Days 63, 66, 70, and 73; and Days 84, 87, 91, 94)	0, 0.05, 0.10, and 0.15 mg/kg	Ixazomib citrate	Yes	[redacted]	4.2.3.2-21 4.2.3.2-22[c]

2.6.7.1 Toxicology: Overview (continued)

Test Article: Ixazomib citrate and ixazomib

Species and Strain	Route	Duration of Dosing	Dose[a]/ Concentration	Test Article	GLP	Testing Facility	Report
Genotoxicity							
Microsome reverse mutation assay							
S typhimurium (TA1537, TA98, TA100, and TA1535); *E coli* (WP2 *uvrA*)	In vitro	N/A	10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, and 5000 µg/plate	Ixazomib	Yes	[redacted]	4.2.3.3.1-1
In vitro chromosomal aberration assay							
Human peripheral blood lymphocytes	In vitro	N/A	0.010-50 µg/mL[h]	Ixazomib citrate	Yes	[redacted]	4.2.3.3.1-2
In vivo micronucleus assay							
CD-1 mouse	PO	Single dose	0, 2, 4, and 8 mg/kg	Ixazomib citrate	Yes	[redacted]	4.2.3.3.2-1
In vivo comet assay							
Crlj:CD1(ICR) mouse	PO	Two doses	0, 0.5, 1, 2, 4, and 6 mg/kg	Ixazomib citrate	Yes	[redacted]	4.2.3.3.2-2
Carcinogenicity							
No dedicated carcinogenicity studies were conducted.							

2.6.7.1 Toxicology: Overview (continued)

Test Article: Ixazomib citrate and ixazomib

Species and Strain	Route	Duration of Dosing	Dose[a]/ Concentration	Test Article	GLP	Testing Facility	Report
Reproductive and developmental toxicity							
Embryo-fetal development							
Sprague-Dawley rat	PO	0, 0.1, and 0.3 mg/kg: 12 days (QD dosing on Gestation Days 6-17) 0.4, 0.6, and 0.8 mg/kg: 10 days (Q3D dosing on Gestation Days 6, 9, 12, and 15)	0, 0.1, 0.3, 0.4, 0.6, and 0.8 mg/kg[j]	Ixazomib citrate	No	TPC	4.2.3.5.2-1
Sprague-Dawley rat	PO	10 days (Q3D dosing on Gestation Days 6, 9, 12, and 15)	0, 0.2, 0.4, and 0.6 mg/kg	Ixazomib citrate	Yes	TPC	4.2.3.5.2-2
New Zealand white rabbit	PO	13 days (Q3D dosing on Gestation Days 7, 10, 13, 16, and 19)	0, 0.25, 0.5, 1.0, and 1.2 mg/kg	Ixazomib citrate	Yes	[redacted]	4.2.3.5.2-3
New Zealand white rabbit	PO	13 days (Q3D dosing on Gestation Days 7, 10, 13, 16, and 19)	0, 0.1, 0.3, and 1.0 mg/kg	Ixazomib citrate	Yes	TPC	4.2.3.5.2-4
Local tolerance							
In vitro hemolysis							
Human whole blood	In vitro	N/A	0.361, 3.61, 10.83, 36.1, and 108.3 µg/mL	Ixazomib	No	Millennium	4.2.3.6-1
Human whole blood	In vitro	N/A	1.2 and 2.4 mg/mL	Ixazomib citrate	No	Millennium	4.2.3.6-2
Other toxicity studies							
Phototoxicity BALB/3T3clone A31 cells	In vitro	N/A	0.024, 0.098, 0.391, 1.563, 6.25, 25, 100, and 400 µg/mL	Ixazomib citrate	No	TPC	4.2.3.7.7-1

BIW = twice weekly; [redacted] GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous(ly); [redacted]
Millennium = Millennium Pharmaceuticals, Inc (Cambridge, MA, USA); [redacted] N/A = not applicable; PO = oral(ly); QD = once daily;
Q3D = once every 3 days; QW = once weekly; TPC = Takeda Pharmaceutical Company Limited (Fujisawa Kanagawa, Japan); [redacted]

Note: All PO doses were administered via oral gavage unless otherwise noted.

a All doses and concentrations are expressed as mg/kg or µg/mL of ixazomib, regardless of test article, with the exception of reports 4.2.3.3.1-2 and 4.2.3.6-2, in which concentrations are expressed as µg/mL and mg/mL, respectively, of ixazomib citrate.

b Because of severe toxicity, Group 4 males received 1.2 mg/kg on Day 1 only; the dose was reduced to 1.0 mg/kg for subsequent administrations. Because of severe toxicity, Group 4 females received 1.0 mg/kg on Day 1 only; dosing was discontinued after Day 1.

c The pharmacodynamic analyses reported in these subreports were non GLP-compliant.

d Before the start of Cycle 3, the high dose for females was lowered from 0.8 to 0.6 mg/kg.

e Female satellite rats were dosed at 0.45 mg/kg (Group 4) before the remainder of the rats. Severe toxicity resulted and no other rats in Group 4 were dosed; Group 5, female rats dosed at 0.22 mg/kg, was formed. Because of a lack of toxicity, Group 4 male rats, dosed at 0.45 mg/kg during Cycle 1, were dosed at 0.50 mg/kg during Cycle 2, and Group 5 female rats, dosed at 0.22 mg/kg during Cycle 1, were dosed at 0.45 mg/kg during Cycle 2.

f Male dogs were dosed at 0.3 mg/kg (Group 4) before the remainder of the dogs. Severe toxicity resulted, and Group 4 male dogs received no additional test article for the remainder of the study. Male dogs in Groups 2 and 3 were dosed at 0.1 and 0.2 mg/kg, respectively. Female dogs in Groups 2, 3, and 4 were dosed at 0.1, 0.15, and 0.2 mg/kg, respectively.

g Mortality and severe clinical signs were observed in dogs dosed at 0.18 and 0.25 mg/kg (Groups 3 and 4, respectively). Therefore, dosing was suspended on Day 7 (females only) and Day 3, respectively. Surviving dogs in Group 4 were euthanized on Day 12 (females) and Day 16 (females). Surviving dogs in Group 3 did not receive test article for the remainder of the study. Group 5, dosed at 0.14 mg/kg, was formed for Cycle 2, and the values presented were calculated from samples obtained on Day 10 of that cycle (Day 31 of the study).

h Concentrations up to 50 µg/mL were tested in an initial range-finding assay, but due to cytotoxicity the following doses were chosen for definitive testing: 3-hour treatment without metabolic activation, 0.010, 0.050 and 0.10 µg/mL; b) 3-hour treatment with activation, 35, 40 and 45 µg/mL; and c) 22-hour treatment without metabolic activation, 0.050, 0.065, 0.075 and 0.080 µg/mL.

i This non GLP-compliant toxicokinetic (TK) study was conducted in a separate set of mice from those dosed in the GLP-compliant micronucleus study (Tabulated Summary 2.6.7.9A; Report 4.2.3.3.2-1).

j Two pregnant animals dosed at 0.8 mg/kg were found dead or euthanized moribund after the first dose. The remaining 3 animals in this group had not yet received test article, and were reassigned to the 0.4 mg/kg group.

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

2.6.7.2 Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Studies

Test Article: Ixazomib and ixazomib citrate

Type of Study	Test System	Method of Administration	Test Article	Dose (mg/kg)[a]	GLP Compliance	Report
Single-dose toxicity						
	Crlj:CD1(ICR) mice	PO	Ixazomib citrate	2, 4, and 8	No	4.2.3.1-1
	Sprague-Dawley rat	IV injection	Ixazomib	0.1, 0.3, 1, and 3	No	4.2.3.1-3
	Sprague-Dawley rat	IV injection	Ixazomib	0.3	No	4.2.3.1-4
	Beagle dog	PO	Ixazomib citrate	0.021, 0.07, 0.14, and 0.21	No	4.2.1.3-3
	Beagle dog	5-minute IV infusion	Ixazomib	0.1 and 0.3	No	4.2.3.1-5
Repeat-dose toxicity						
11-day (1-cycle)	Sprague-Dawley rat	PO	Ixazomib	0.3, 0.6, and 1.0	No	4.2.3.2-1
32-day (2-cycle)	Sprague-Dawley rat	PO	Ixazomib	0.4, 0.8, and 1.2/1.0[b]	Yes	4.2.3.2-2
94-day (5-cycle)	Sprague-Dawley rat	PO	Ixazomib citrate	0.2, 0.4, and 0.8/0.6[c]	Yes	4.2.3.2-4
182-day (7-cycle)	Sprague-Dawley rat	PO	Ixazomib citrate	0.2, 0.4, and 0.8/0.6[d]	Yes	4.2.3.2-5
11-day (1-cycle)	Sprague-Dawley rat	IV injection	Ixazomib	0.1, 0.3, and 0.6	No	4.2.3.2-6
32-day (2-cycle)	Sprague-Dawley rat	IV injection	Ixazomib	0.15, 0.22, 0.30, 0.45, and 0.50[e]	Yes	4.2.3.2-7 and 4.2.3.2-8
94-day (5-cycle)	Sprague-Dawley rat	IV injection	Ixazomib citrate	0.05, 0.15, and 0.30	Yes	4.2.3.2-9
7 days	Beagle dog	PO	Ixazomib	0.05, 0.10, and 0.20	No	4.2.3.2-10
11-day (1-cycle)	Beagle dog	PO	Ixazomib	0.1, 0.15, 0.2, and 0.3[f]	Yes	4.2.3.2-11 and 4.2.3.2-12
94-day (5-cycle)	Beagle dog	PO	Ixazomib citrate	0.05, 0.10, and 0.15	Yes	4.2.3.2-13 and 4.2.3.2-14
266-day (10-cycle)	Beagle dog	PO	Ixazomib citrate	0.05, 0.10, 0.20	Yes	4.2.3.2-15
11-day (1-cycle)	Beagle dog	5-minute IV infusion	Ixazomib	0.05, 0.10, and 0.20	No	4.2.3.2-16

2.6.7.2 Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Studies (continued)

Test Article: Ixazomib and ixazomib citrate

Type of Study	Test System	Method of Administration	Test Article	Dose (mg/kg)[a]	GLP Compliance	Report
Repeat-dose toxicity (continued)						
32-day (2-cycle)	Beagle dog	5-minute IV infusion	Ixazomib	0.10, 0.14, 0.18, and 0.25[g]	Yes	4.2.3.2-17, 4.2.3.2-18, 4.2.3.2-19, 4.2.3.2-20
94-day (5-cycle)	Beagle dog	5-minute IV infusion	Ixazomib citrate	0.05, 0.10, and 0.15	Yes	4.2.3.2-21
Embryo-fetal development						
10 and 12 days	Sprague-Dawley rat	PO	Ixazomib citrate	0.1, and 0.3 mg/kg: QD on GD 6 - 17. 0.4, 0.6, and 0.8 mg/kg: Q3D on GD 6, 9, 12, and 15	No	4.2.3.5.2-1
10-day	Sprague-Dawley rat	PO	Ixazomib citrate	0.2, 0.4, 0.6	Yes	4.2.3.5.2-2
13-day	New Zealand white rabbit	PO	Ixazomib citrate	0.25, 0.5, 1.0, and 1.2	Yes	4.2.3.5.2-3
13-day	New Zealand white rabbit	PO	Ixazomib citrate	0.1, 0.3, 1.0	Yes	4.2.3.5.2-4

GD = Gestation Day; GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous(ly); PO = oral(ly); Q3D = once every 3 days; QD = once daily.

Note: All PO doses were administered via oral gavage.

a All doses presented as mg/kg ixazomib regardless of test article.

b Because of severe toxicity, Group 4 males received 1.2 mg/kg on Day 1 only; the dose was reduced to 1.0 mg/kg for subsequent administrations. Because of severe toxicity, Group 4 females received 1.0 mg/kg on Day 1 only; dosing was discontinued after Day 1.

c Before the start of Cycle 3, the high dose was lowered from 0.8 to 0.6 mg/kg.

d Starting on Day 56 (first dose of the third cycle), the 0.8 mg/kg (Group 4) female dose was lowered to 0.6 mg/kg.

e Female satellite rats were dosed at 0.45 mg/kg (Group 4) before the remainder of the rats. Severe toxicity resulted and no other female rats in Group 4 were dosed; Group 5, female rats dosed at 0.22 mg/kg, was formed. Because of a lack of toxicity, Group 4 male rats, dosed at 0.45 mg/kg during Cycle 1, were dosed at 0.50 mg/kg during Cycle 2, and Group 5 female rats, dosed at 0.22 mg/kg during Cycle 1, were dosed at 0.45 mg/kg during Cycle 2.

f Male dogs were dosed before females, and due to severe toxicity at 0.3 mg/kg (Group 4) dose levels were lowered for females before dosing initiated. Group 4 male dogs received no additional test article for the remainder of the study. Male dogs in Groups 2 and 3 were dosed at 0.1 and 0.2 mg/kg, respectively. Female dogs in Groups 2, 3, and 4 were dosed at 0.1, 0.15, and 0.2 mg/kg, respectively.

g Mortality and severe clinical signs were observed in dogs dosed at 0.18 and 0.25 mg/kg (Groups 3 and 4, respectively). Therefore, dosing was suspended on Day 7 (females only) and Day 3, respectively. Surviving dogs in Group 4 were euthanized on Day 12 (females) and Day 16 (males). Surviving dogs in Group 3 did not receive test article for the remainder of the study. Group 5, dosed at 0.14 mg/kg, was formed for Cycle 2.

h Two pregnant animals dosed at 0.8 mg/kg were found dead or euthanized moribund after the first dose. The remaining 3 animals in this group had not yet received test article; therefore, dosing at 0.8 mg/kg was not continued and the remaining animals were reassigned to the 0.4 mg/kg group.

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

2.6.7.3 Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data

Test Article: Ixazomib and ixazomib citrate
Analyte: Ixazomib

Single-Dose Studies

Species:	Crlj:CD1(ICR) Mice		Sprague-Dawley Rats				Beagle Dogs			
Route:	PO		IV injection		IV injection		PO		5-minute IV infusion	
Report:	4.2.3.1-1		4.2.3.1-3		4.2.3.1-4		4.2.1.3-3		4.2.3.1-5	
GLP:	No		No		No		No		No	
Test article:	Ixazomib citrate		Ixazomib		Ixazomib		Ixazomib citrate		Ixazomib	
Sex:	M		M		F		M		M	
n:	2 / time point		3		3		2		3	
Dose (mg/kg)[a]	C_{max} (ng/mL)	AUC_{24} (ng·hr/mL)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{24} (ng·hr/mL)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{24} (ng·hr/mL)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{24} (ng·hr/mL)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{24} (ng·hr/mL)
0.021	–	–	–	–	–	–	10	98	–	–
0.070	–	–	–	–	–	–	45	489	–	–
0.1	–	–	53.0[b]	116[b]	–	–	–	–	155	184
0.14	–	–	–	–	–	–	75	1047	–	–
0.21	–	–	–	–	–	–	403	2140	–	–
0.3	–	–	145	243	191	343	–	–	276	664
1.0	–	–	1210	1320[c]	–	–	–	–	–	–
2	108	557	–	–	–	–	–	–	–	–
3.0	–	–	3660	4690[c]	–	–	–	–	–	–
4	219	926	–	–	–	–	–	–	–	–

– = report does not include results for this dose; AUC_{24} = area under the plasma concentration-time curve from the time 0 to 24 hours; C_{max} = maximum observed plasma concentration; F = female(s); GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous(ly); M = male(s); PO = oral(ly).

Note: All PO doses were administered via oral gavage. All values were calculated from concentrations measured in plasma.

a All doses are presented in terms of ixazomib, regardless of test article.

b n = 2; concentrations of ixazomib for Animal 1004 between the 5 minute and 1 hour time points were determined to be outliers and were excluded from toxicokinetic (TK) parameter calculations.

c Area under the plasma concentration-time curve (AUC) from the time 0 to 8 hours (AUC_8).

2.6.7.3 Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data (continued)

Test Article: Ixazomib and ixazomib citrate
Analyte: Ixazomib

Repeat-Dose Studies

Route:	PO								
Species:	Sprague-Dawley Rats				Beagle Dogs				Humans
Report:	4.2.3.2-1	4.2.3.2-2	4.2.3.2-4	4.2.3.2-5	4.2.3.2-10	4.2.3.2-11	4.2.3.2-13	4.2.3.2-15	C16004, C16005, and C16007[a]
Study:	1-cycle	2-cycle	5-cycle	7-cycle	1-cycle	1-cycle	5-cycle	10-cycle	QW × 3
GLP / GCP:	No	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes
Test article:	Ixazomib	Ixazomib	Ixazomib citrate	Ixazomib citrate	Ixazomib	Ixazomib	Ixazomib citrate	Ixazomib citrate	Ixazomib
Day:[b]	11	32	94	168	7	11	94	252	15
Sex:	M	M + F	M + F	M / F	M	M / F[c]	M + F	M + F	M + F
n:	3	3/sex	3/sex	3/sex	3	5/sex[d]	3[e] or 6/sex	3[e] or 6/sex	56 or 42[f]
Dose (mg/kg)[g]					C_{max} (ng/mL)				
0.05	–	–	–	–	37.5	–	43.5	57.1	–
0.057[h]	–	–	–	–	–	–	–	–	37
0.10	–	–	–	–	71.8	159 / –	80.5	136	–
0.15	–	–	–	–	–	–	137	–	–
0.2	–	–	8.53	5.42 / 6.55	104	311 / 345[i]	–	333	–
0.30	9.38	–	–	–	–	–	–	–	–
0.4	–	13.1	18.4	19.2 / 21.3	–	–	–	–	–
0.6	25.9	–	26.1[j]	– / 44.7[j]	–	–	–	–	–
0.8	–	29.6	–	62.1 / –	–	–	–	–	–
1.0	37.9	41.2[k]	–	–	–	–	–	–	–

2.6.7.3 Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data (continued)

Test Article: Ixazomib and ixazomib citrate
Analyte: Ixazomib

Repeat-Dose Studies

Route:	PO								
Species:	Sprague-Dawley Rats				Beagle Dogs				Humans
Report:	4.2.3.2-1	4.2.3.2-2	4.2.3.2-4	4.2.3.2-5	4.2.3.2-10	4.2.3.2-11	4.2.3.2-13	4.2.3.2-15	C16004, C16005, and C16007[a]
Study:	1-cycle	2-cycle	5-cycle	7-cycle	1-cycle	1-cycle	5-cycle	10-cycle	QW × 3
GLP / GCP:	No	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes
Test article:	Ixazomib	Ixazomib	Ixazomib citrate	Ixazomib citrate	Ixazomib	Ixazomib	Ixazomib citrate	Ixazomib citrate	Ixazomib
Day:[b]	11	32	94	168	7	11	94	252	15
Sex:	M	M + F	M + F	M / F	M	M / F[c]	M + F	M + F	M + F
n:	3	3/sex	3/sex	3/sex	3	5/sex[d]	3[e] or 6/sex	3[e] or 6/sex	56 or 42[f]
Dose (mg/kg)[g]					AUC_{24} (AUC_{168}) (ng·hr/mL)				
0.05	–	–	–	–	357	–	388	309 (934)	–
0.057[h]	–	–	–	–	–	–	–	–	(1080)
0.10	–	–	–	–	613	678 / –	750	695 (1940)	–
0.15	–	–	–	–	–	–	1260	–	–
0.2	–	–	156	98.2 (489)/116 (476)	787	1460 / 1910[i]		1560 (3900)	–
0.30	204	–	–	–	–	–	–	–	–
0.4	–	244	253	189 (754)/211 (803)	–	–	–	–	–
0.6	480	–	296[j]	– / 288 (1070)[j]	–	–	–	–	–
0.8	–	373	–	252 (1200) / –	–	–	–	–	–
1.0	643	521[k]	–	–	–	–	–	–	–

2.6.7.3 Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data (continued)

Test Article: Ixazomib and ixazomib citrate
Analyte: Ixazomib

Repeat-Dose Studies

Route:	IV (injection)			IV (5-minute infusion)		
Species:	Sprague-Dawley rats			Beagle Dogs		
Report:	4.2.3.2-6	4.2.3.2-7	4.2.3.2-9	4.2.3.2-16	4.2.3.2-17	4.2.3.2-21
Study:	1-cycle	2-cycle	5-cycle	1-cycle	2-cycle	5-cycle
GLP:	No	Yes	Yes	No	Yes	Yes
Test article:	Ixazomib	Ixazomib	Ixazomib citrate	Ixazomib	Ixazomib	Ixazomib citrate
Day:	11	22	94	11	31	94
Sex:	M	M + F	M + F	M	M + F	M + F
n:	3	3/sex	3/sex	3	3[l] or 6/sex	3/sex
Dose (mg/kg)[g]			C_{max} (ng/mL)			
0.05	–	–	44.7	155	–	273
0.10	61.8	–	–	241	368	380
0.14	–	–	–	–	636[m]	–
0.15	–	173	172	–	–	526
0.18	–	–	–	–	1060[m]	–
0.20	–	–	–	742	–	–
0.30	232	339	283	–	–	–
0.45	–	483[n]	–	–	–	–
0.50	–	812[n]	–	–	–	–

2.6.7.3 Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data (continued)

Test Article: Ixazomib and ixazomib citrate
Analyte: Ixazomib

Repeat-Dose Studies

Route:	IV (injection)			IV (5-minute infusion)		
Species:	Sprague-Dawley rats			Beagle Dogs		
Report:	4.2.3.2-6	4.2.3.2-7	4.2.3.2-9	4.2.3.2-16	4.2.3.2-17	4.2.3.2-21
Study:	1-cycle	2-cycle	5-cycle	1-cycle	2-cycle	5-cycle
GLP:	No	Yes	Yes	No	Yes	Yes
Test article:	Ixazomib	Ixazomib	Ixazomib citrate	Ixazomib	Ixazomib	Ixazomib citrate
Day:	11	22	94	11	31	94
Sex:	M	M + F	M + F	M	M + F	M + F
n:	3	3/sex	3/sex	3	3[l] or 6/sex	3/sex
Dose (mg/kg)	AUC_{24} (ng·hr/mL)					
0.05	–	–	184	363	–	688
0.10	198	–	–	552	1240	1380
0.14	–	–	–	–	1550[m]	–
0.15	–	350	454	–	–	1470
0.18	–	–	–	–	2680[m]	–
0.20	–	–	–	1140	–	–
0.30	455	660	942	–	–	–
0.45	–	1310[n]	–	–	–	–
0.50	–	1260[n]	–	–	–	–

– = report does not include results for this dose; AUC_{24} = area under the plasma concentration-time curve from the time 0 to 24 hours; AUC_{168} = area under the plasma concentration-time curve from the time 0 to 168 hours; C_{max} = maximum observed plasma concentration; F = female(s); GCP = Good Clinical Practice; GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous(ly); M = male(s); PO = oral(ly); QW = once weekly.

Note: All PO doses were administered via oral gavage. All values were calculated from concentrations measured in plasma.

a Data were pooled from 3 clinical studies.

b Numbers indicate dosing day

c Because of the toxicity seen in males dosed at 0.3 mg/kg, dosing for this group was suspended after Day 1, and the doses for females were adjusted to 0.1, 0.15, and0.2 mg/kg.

d n = 4 for the 0.2 mg/kg males because 1 animal was euthanized in extremis on Day 9; n = 3 for the 0.2 mg/kg females because 2 animals were determined to be outliers and were excluded from mean toxicokinetic (TK) parameter calculations.

e n = 3/ sex in the 0.05 mg/kg group only.

f n = 56 for C_{max}, 42 for AUC_{168}.

g Doses are presented in terms of ixazomib, regardless of test article.

h Based on a 4 mg tablet and a 70-kg patient.

i Severe toxicity seen in Group 4 males (0.3 mg/kg) caused the dose levels to be lowered for females; therefore, the 0.2 mg/kg results represent Group 3 males and Group 4 females, so these values are presented separately. TK results for Group 3 females (0.15 mg/kg) were not calculated due to outliers within this group.

j Before the start of Cycle 3, the high dose was lowered from 0.8 to 0.6 mg/kg.

k Only for males. Because of severe toxicity, Group 4 males received 1.2 mg/kg on Day 1 only; the dose was reduced to 1.0 mg/kg for subsequent administrations. Because of severe toxicity, Group 4 females received 1.0 mg/kg on Day 1 only; dosing for females was discontinued after Day 1.

l n = 3/ sex in the 0.14 mg/kg group only.

m Mortality and severe clinical signs were observed in dogs dosed at 0.18 and 0.25 mg/kg (Groups 3 and 4, respectively). Therefore, dosing was suspended on Day 7 (females only) and Day 3, respectively. Surviving dogs in Group 4 were euthanized on Day 12 (females) and Day 16 (males). Surviving dogs in Group 3 did not receive test article for the remainder of the study. Group 5, dosed at 0.14 mg/kg, was formed for Cycle 2, and the values presented were calculated from samples obtained on Day 10 of that cycle (Day 31 of the study).

n Female satellite rats were dosed at 0.45 mg/kg (Group 4) before the remainder of the rats. Severe toxicity resulted and no other female rats in Group 4 were dosed; Group 5, female rats dosed at 0.22 mg/kg, was formed. Because of a lack of toxicity, Group 4 male rats, dosed at 0.45 mg/kg during Cycle 1, were dosed at 0.50 mg/kg during Cycle 2, and Group 5 female rats, dosed at 0.22 mg/kg during Cycle 1, were dosed at 0.45 mg/kg during Cycle 2.

2.6.7.3 Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data (continued)

Test Article: Ixazomib and ixazomib citrate
Analyte: Ixazomib

Reproductive Toxicity Studies

Route:	PO			
Species:	Sprague-Dawley Rats		New Zealand White Rabbits	
Report:	4.2.3.5.2-1	4.2.3.5.2-2	4.2.3.5.2-3	4.2.3.5.2-4
Study:	Embryo-fetal development	Embryo-fetal development	Embryo-fetal development	Embryo-fetal development
GLP:	No	Yes	Yes	Yes
Test article	Ixazomib citrate	Ixazomib citrate	Ixazomib citrate	Ixazomib citrate
Day:[a]	17 / 15[b]	15	19	19
Sex:	F	F	F	F
n:	2	3	3	3
Dose (mg/kg)[c]	C_{max} (ng/mL)			
0.10	10	–	–	9
0.2	–	12	–	–
0.25	–	–	10.9	–
0.30	29	–	–	15
0.4	21	33	–	–
0.50	–	–	18.1	–
0.6	67	49	–	–
1.0	–	–	33.4	29
1.2	–	–	66.6	–

2.6.7.3 Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data (continued)

Test Article: Ixazomib and ixazomib citrate
Analyte: Ixazomib

Reproductive Toxicity Studies

Route:	PO			
Species:	Sprague-Dawley Rats		New Zealand White Rabbits	
Report:	4.2.3.5.2-1	4.2.3.5.2-2	4.2.3.5.2-3	4.2.3.5.2-4
Study:	Embryo-fetal development	Embryo-fetal development	Embryo-fetal development	Embryo-fetal development
GLP:	No	Yes	Yes	Yes
Test article	Ixazomib citrate	Ixazomib citrate	Ixazomib citrate	Ixazomib citrate
Day:[a]	17 / 15[b]	15	19	19
Sex:	F	F	F	F
n:	2	3	3	3
Dose (mg/kg)[c]	AUC_{24} (AUC_{72}) (ng·hr/mL)			
0.10	184	–	–	189 (497)
0.2	–	201 (489)	–	–
0.25	–	–	(549)	–
0.30	348	–	–	324 (792)
0.4	291 (651)	346 (738)	–	–
0.50	–	–	(956)	–
0.6	533 (1081)	511 (1103)	–	–
1.0	–	–	(1340)	586 (1314)
1.2	–	–	(1600)	–

– = report does not include results for this dose; AUC_{24} = area under the plasma concentration-time curve from the time 0 to 24 hours; AUC_{72} = area under the plasma concentration-time curve from the time 0 to 72 hours; C_{max} = maximum observed plasma concentration; F = female(s); GLP = Good Laboratory Practice; PO = oral(ly).

Note: All PO doses were administered via oral gavage. All values were calculated from concentrations measured in plasma.

a Numbers indicate gestation day.

b Samples were taken for toxicokinetics (TK) on Day 17 for animals that received 0.1 or 0.3 mg/kg once daily and on Day 15 for animals that received 0.4 or 0.6 mg/kg once every 3 days.

c Doses are presented in terms of ixazomib, regardless of test article.

2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧

2.6.7.4 Toxicology: Drug Substance

Test Article: Ixazomib and ixazomib citrate

Lot	Assay (%)	Impurities (% Area)			Unspecified Impurities	Total Impurities		Report	Type of Study
(ixazomib)	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	4.2.3.2-2	GLP-compliant repeat-dose oral gavage 2-cycle toxicity in Sprague-Dawley rats
								4.2.3.2-7	GLP-compliant repeat-dose IV 2-cycle toxicity in Sprague-Dawley rats
								4.2.3.2-11	GLP-compliant repeat-dose oral gavage 1-cycle toxicity in beagle dogs
								4.2.3.2-17	GLP-compliant repeat-dose IV 2-cycle toxicity in beagle dogs
								4.2.3.3.1-1	GLP-compliant genotoxicity in microsome reverse mutation assay
(ixazomib citrate)	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	4.2.3.2-4	GLP-compliant repeat-dose 5-cycle oral gavage toxicity study in Sprague-Dawley rats
								4.2.3.2-13	GLP-compliant repeat-dose 5-cycle oral gavage toxicity study in beagle dogs
(ixazomib citrate)	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	4.2.3.2-9	GLP-compliant repeat-dose 5-cycle IV toxicity study in Sprague-Dawley rats
								4.2.3.2-21	GLP-compliant repeat-dose 5-cycle IV toxicity study in beagle dogs
								4.2.3.3.2-1	GLP-compliant single-dose oral gavage micronucleus assay in CD-1 mice
								4.2.3.5.2-3	GLP-compliant repeat-dose oral gavage embryo-fetal development toxicity study in New Zealand white rabbits
								4.2.3.3.2-2	GLP-compliant 2-dose in vivo comet assay in Crlj:CD1(ICR) mice

2.6.7.4 Toxicology: Drug Substance (continued)

Test Article: Ixazomib and ixazomib citrate

Lot	Assay (%)	Impurities (% Area)			Unspecified Impurities	Total Impurities		Report	Type of Study
[redacted] (ixazomib citrate)	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]+	[redacted]	[redacted]	[redacted]	4.2.3.3.1-2[f]	GLP-compliant in vitro chromosomal aberration assay in human lymphocytes
								4.2.3.2-5	GLP-compliant repeat-dose 7-cycle oral toxicity study in Sprague-Dawley rats
								4.2.3.2-15	GLP-compliant repeat-dose 10-cycle oral toxicity study in beagle dogs
[redacted] (ixazomib citrate)	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	4.2.3.5.2-2	GLP-compliant repeat-dose oral gavage embryo-fetal development toxicity study in Sprague-Dawley rats
								4.2.3.5.2-4	GLP-compliant repeat-dose oral gavage embryo-fetal development toxicity study in New Zealand white rabbits

GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous(ly); ND = none detected; RRT = relative retention time.

a The specifications are not applicable for Lot [redacted] which was manufactured to support GLP studies, but was not a Good Manufacturing Practice (GMP) lot.

b Reported as [redacted] on the Certificate of Testing.

c Reported as [redacted] on the Certificate of Testing.

d Reported as [redacted] on the Certificate of Testing.

e Certificate of Analysis appended to reports is for drug product, not drug substance. Batch analysis data for the drug substance, including the purity used to make these lots of drug product reported in section 3.2.S.4.4.

f ML00701339 + ML00701340 reported at RRT 1.13 and RRT for unspecified impurities not reported in Certificate of Analysis for this report only; total impurities reported as [redacted]% for this report only.

g This value is for Lot [redacted] as drug substance.

h This value is for Lot [redacted] as drug substance.

2.6.7.5 単回投与毒性試験

2.6.7.5 Single-Dose Toxicity

Species/Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Dose[a] (mg/kg);Test Article	Sex; Number per Group	Observed Maximum Tolerated Dose (mg/kg)	Approximate Lethal Dose (mg/kg)	Report
Mouse/CD-1	PO (WFI with [redacted] and 3% (w:w glycine)	2, 4, and 8; ixazomib citrate	Males; 11	4	8	4.2.3.1-1
Noteworthy Findings: Mortality: At 8 mg/kg: all mice on Day 1. Clinical signs: At 8 mg/kg: decreased locomotor activity, hypothermia, and moribundity. Day 1 plasma TK: At 2 mg/kg: C_{max} 108 ng/mL; AUC_{24} 557 ng·hr/mL. At 4 mg/kg: C_{max} 219 ng/mL; AUC_{24} 926 ng·hr/mL.						
Rat/Sprague-Dawley	PO (10% HP-β-CD)	0.1, 0.3, and 1.0; ixazomib	Males; 3	1.0	None identified	4.2.3.1-2
Noteworthy Findings: Clinical signs: At 1.0 mg/kg: decreased activity, decreased defecation, soft stools, body surface staining. BW: At 1.0 mg/kg: decreased BW gain through the first 4 days postdose.						
Rat/Sprague-Dawley	IV (10% HP-β-CD with 2.8% mannitol)	0.1, 0.3, 1, and 3; ixazomib	Males; 6/group (3 main study; 3 TK)	0.3	1	4.2.3.1-3
Noteworthy Findings: Mortality: At 1 and 3 mg/kg: all rats euthanized on Day 1. Clinical signs: At 1 and 3 mg/kg: hunched posture, lethargy, soft stools, pallor, hypothermia, and moribundity. BW: At 0.3 mg/kg: decreased BW gain on Day 7. Serum chemistry: At 0.3 mg/kg: transient increases in ALT, AST, ALP, and TBIL; transient decreases in total protein, ALB, GLOB, CHOL, and phosphorus. Day 1 plasma TK: At 0.1 mg/kg: C_{max} 53.0 ng/mL; AUC_{24} 116 ng·hr/mL. At 0.3 mg/kg: C_{max} 145 ng/mL; AUC_{24} 243 ng·hr/mL. At 1 mg/kg: C_{max} 1210 ng/mL; AUC_8 1320 ng·hr/mL. At 3 mg/kg: C_{max} 3660 ng/mL; AUC_8 4690 ng·hr/mL.						

2.6.7.5 Single-Dose Toxicity (continued)

Species/Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Dose[a] (mg/kg);Test Article	Sex; Number per Group	Observed Maximum Tolerated Dose (mg/kg)	Approximate Lethal Dose (mg/kg)	Report
Rat/Sprague-Dawley	IV (10% HP-β-CD with 2.8% mannitol)	0 and 0.3; ixazomib	Females; 6/group (3 main study; 3 TK)	0.3	None identified	4.2.3.1-4
Noteworthy Findings: Clinical signs: decreased defecation in 1 rat. Hematology: increased PLT. Serum chemistry: transient decreases in total protein, ALB, GLOB, and BUN. Day 1 plasma TK: C_{max} 191 ng/mL; AUC_{24} 343 ng·hr/mL.						
Beagle dog	PO (0.5% [w:v] methylcellulose)	0.021, 0.07, 0.14, and 0.21; ixazomib citrate	Males; 2	0.21	None identified	4.2.1.3-3
Noteworthy Findings: Clinical signs: At 0.21 mg/kg: loose stool/diarrhea. Day 1 plasma TK: At 0.021 mg/kg: C_{max} 10 ng/mL; AUC_{24} 98 ng·hr/mL. At 0.07 mg/kg: C_{max} 45 ng/mL; AUC_{24} 489 ng·hr/mL. At 0.14 mg/kg: C_{max} 75 ng/mL; AUC_{24} 1047 ng·hr/mL. At 0.21 mg/kg: C_{max} 403 ng/mL; AUC_{24} 2140 ng·hr/mL.						

2.6.7.5 Single-Dose Toxicity (continued)

Species/Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Dose[a] (mg/kg);Test Article	Sex; Number per Group	Observed Maximum Tolerated Dose (mg/kg)	Approximate Lethal Dose (mg/kg)	Report
Dog/Beagle	IV (10% HP-β-CD with 2.8% mannitol)	0.1, 0.3, and 0.6; ixazomib	Males; 3/group for 0.1 and 0.3 mg/kg; 1/group for 0.6 mg/kg	0.1	0.3	4.2.3.1-5

Noteworthy findings:
Mortality:
At 0.3 mg/kg: 1 on Day 8.
At 0.6 mg/kg: 1 on Day 1.
Clinical signs:
In early death animals: skin erythema, flushed mucous membranes, warm to touch, cold to touch, vomiting, mucoid feces, few or no feces, green feces, soft feces, dehydration, lethargy, head twitching, and/or ataxia.
At 0.3 mg/kg in surviving dogs: rapid breathing, skin erythema, warm to touch, mucoid feces, no feces, and/or soft feces.
BW: At 0.3 mg/kg: decreased in the early death dog.
Hematology:
At 0.3 mg/kg: transient increases in WBC and NEUT.
At 0.6 mg/kg: increased NEUT
Coagulation: At 0.3 mg/kg: increased fibrinogen in early death dog.
Serum chemistry:
In the early death animals: increased ALP, ALT, AST, total protein, ALB, GLOB, GGT, TBIL, BUN, and/or CRE; decreased potassium
At 0.3 mg/kg: decreased phosphorus.
Macroscopic pathology: At 0.6 mg/kg: dark discoloration of the jejunum mucosa, red foci in the mucosa of the cecum and rectum, dark red discoloration of the thymus.
Microscopic pathology (b) At 0.3 mg/kg: neuronal degeneration (chromatolysis and cytoplasmic eosinophilic accumulations) and cell death in dorsal root and sympathetic ganglia.
Day 1 plasma TK:
At 0.1 mg/kg: C_{max} 155 ng/mL; AUC_{24} 184 ng·hr/mL.
At 0.3 mg/kg: C_{max} 276 ng/mL; AUC_{24} 664 ng·hr/mL.
Day 1 blood 20S proteasome inhibition:
At 0.1 mg/kg: E_{max} 63.7 I%; AUE_{24} 598 hr·I%.
At 0.3 mg/kg: E_{max}70.0 I%; AUE_{24} 1090 hr·I%.

ALB = albumin; ALP = alkaline phosphatase; ALT = alanine aminotransferase; AST = aspartate aminotransferase; AUC_8 = area under the plasma concentration-time curve from the time 0 to 8 hours; AUC_{24} = area under the plasma concentration time-curve from the time 0 to 24 hours; AUE_{24} = area under the effect-time curve from time 0 to 24 hours; BUN = blood urea nitrogen; BW = body weight; CHOL = cholesterol; Cmax = maximum observed plasma concentration; CRE = creatine; Emax = maximum effect; GGT = gamma glutamyltransferase; GLOB = globulin; HP-β-CD = hydroxypropyl-beta-cyclodextrin; I% = percentage of proteasome inhibition; IV = intravenous(ly); NEUT = neutrophil; PLT = platelet; PO = oral(ly); TK = toxicokinetic(s); WBC = white blood cell; WFI = water for injection; w:v = weight-to-volume ratio; w:w = weight-to-weight ratio.

Note: All PO doses were administered via oral gavage.

a All doses are expressed as mg/kg of ixazomib, regardless of test article.

b Microscopic pathology not performed on 0.6 mg/kg animal.