TABLE OF CONTENTS

LIST OF TABLES 1
略号・用語の定義一覧 2
1. まとめ 3
2. 単回投与毒性試験 4
3. 反復投与毒性試験 4
4. 遺伝毒性試験 4
5. がん原性試験 4
6. 生殖発生毒性試験 4
7. 局所刺激性試験 4
8. その他の毒性試験 4
8.1. 不純物の遺伝毒性試験 4
8.1.1. 類縁物質A* 4
8.1.1.1. 細菌を用いる復帰突然変異試験 4
8.1.1.2. 染色体異常試験 5
8.1.2. 類縁物質B* 6
8.1.2.1. 細菌を用いる復帰突然変異試験 6
8.1.2.2. 染色体異常試験 7
9. 考察及び結論 9
10. 図表 9
11. 参考文献 10

LIST OF TABLES

Table 1. 毒性試験一覧 3

＊；新薬承認情報提供時に置き換えた

略号・用語の定義一覧

略号，用語	省略していない表現または定義
ALK	anaplastic lymphoma kinase：未分化リンパ腫キナーゼ
DMSO	Dimethyl sulfoxide：ジメチルスルホキシド
DNA	deoxyribonucleic acid：デオキシリボ核酸
FDA	Food and Drug Administration：（米国）食品医薬品局
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
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use：日米 EU 医薬品規制調和国際会議
NSCLC	non-small cell lung cancer：非小細胞肺癌
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development：経済協力開発機構

1. まとめ

クリゾチニブ（ザーコリ®）は，未分化リンパ腫キナーゼ（ALK）融合遺伝子陽性の切除不能な進行・再発の非小細胞肺がん（NSCLC）患者を適応として申請され，本邦では 2012 年 3 月に承認された。クリゾチニブの非臨床毒性プロファイルは，初回申請時（eCTD 受付番号 230228001）に検討され，最長 3 ヵ月間の反復投与毒性試験，遺伝毒性試験，胚・胎児発生に関する試験および光毒性試験により明らかにされた。主な標的臓器への影響は，消化管，造血系，肝臓および生殖器系に認められた。またクリゾチニブは異数性誘発性および光毒性を有する可能性が示唆された。3 ヵ月間投与毒性試験によって認められた消化管，造血系および肝臓への影響については，いずれも回復性が認められた。これらのクリゾチニブ投与に関連する影響は，臨床的に管理可能であるか，NSCLC 患者への投与に際しては容認できるリスクであると考えられる。

ROS1 融合遺伝子陽性の NSCLC 患者への効能追加申請にあたり，クリゾチニブに関する新たな毒性試験は実施していない。しかしながら，2 つの不純物（類縁物質A* および 類縁物質B*）について，新たな 4 つの in vitro 遺伝毒性試験（細菌を用いる復帰突然変異試験および染色体異常試験）を実施している（Table 1，概要表 2.6.7.1）。試験デザインと検査項目は ICH，OECD および各国の規制当局（米国 FDA，欧州連合，日本）の定める実施規準を遵守した。全ての試験は米国 FDA の医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に従って実施した。

Table 1.　毒性試験一覧

試験の種類	試験系	菌株または細胞の種類	投与した化合物
不純物の毒性試験			
細菌を用いる復帰突然変異試験	In vitro	細菌の種類 (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*)	類縁物質A*
染色体異常試験	In vitro	ヒトリンパ球	類縁物質A*
細菌を用いる復帰突然変異試験	In vitro	細菌の種類 (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*)	類縁物質B*
染色体異常試験	In vitro	ヒトリンパ球	類縁物質B*

＊；新薬承認情報提供時に置き換えた

2. 単回投与毒性試験

追加の試験なし

3. 反復投与毒性試験

追加の試験なし

4. 遺伝毒性試験

追加の試験なし

5. がん原性試験

追加の試験なし

6. 生殖発生毒性試験

追加の試験なし

7. 局所刺激性試験

追加の試験なし

8. その他の毒性試験

8.1. 不純物の遺伝毒性試験

クリゾチニブ原薬の不純物（類縁物質A* および 類縁物質B* ）について，in vitro 遺伝毒性試験（微生物を用いる復帰突然変異試験およびヒトリンパ球を用いる染色体異常試験）を実施した。全ての試験では，細胞毒性が認められないか，あるいは溶解可能な最高濃度まで，代謝活性化系存在下および非存在下において実施した。なお，in vitro 遺伝毒性試験における代謝活性化は，Aroclor 1254 を投与した雄ラットの肝臓 S9 mix の存在下で行った。

8.1.1. 類縁物質A*

8.1.1.1. 細菌を用いる復帰突然変異試験

報告書番号[redacted]GR032，概要表 2.6.7.17.A

Salmonella typhimurium（TA 98，TA 100，TA 1535，TA 1537）および *Escherichia coli*（WP2 *uvrA* pKM101）を用い，代謝活性化系の非存在下および存在下で，類縁物質A* の復帰突然変異誘発性の有無を検討した。なお，ジメチルスルホキシド（DMSO）を陰性（溶媒）対照とし，2-aminoanthracene（全菌株），2-nitrofluorene（TA 98），sodium azide（TA 100，TA 1535），ICR-191 acridine（TA1537）および 4-nitroquinoline-N-oxide（WP2 *uvrA* pKM101）を陽性対照とした。

用量設定試験では，類縁物質A* の 0，25，50，100，250，500，1000，2500 または 5000 µg/plate の濃度範囲で，各濃度 3 枚のプレートを用いて，代謝活性化系の存在下および非存在下で実施した。陰性対照における復帰突然変異の頻度はいずれの菌株についても背景データの範囲内であり，陽性対照の復帰突然変異の頻度は増加し，対応する陰性対照の 3 倍を超えていた。インキュベーション後には，1000 µg/plate 以上で全菌株に沈殿が認められた。類縁物質A* は代謝活性化系の非存在下で，TA 98，TA 100 および TA 1535 に対して 250 µg/plate 以上，TA1537 および WP2 *uvr*A

＊；新薬承認情報提供時に置き換えた

pKM101 に対して 500 μg/plate で細胞毒性を示した。代謝活性化系の存在下では，WP2 *uvr*A pKM101 に対して 500 μg/plate 以上，TA 98, TA 100, TA 1535 および TA 1537 に対して 1000 μg/plate 以上で細胞毒性を示した。用量設定試験における復帰突然変異の頻度は，代謝活性化系存在下および非存在下で，いずれの菌株においても陰性対照の 2 倍以下であった。

本試験では，用量設定試験でみられた細胞毒性発現濃度から最高濃度を設定した。代謝活性化系の非存在下における TA 98，TA 100，TA 1535 および TA 1537 に対しては 類縁物質A* の 0，10，25，50，100，250，500 および 1000 μg/plate の濃度範囲で，代謝活性化系の存在下における TA 98，TA 100，TA 1535 および TA 1537 ならびに代謝活性化系の存在下／非存在下における WP2 *uvr*A pKM101 に対しては 0，25，50，100，250，500，1000 および 2500 μg/plate の濃度範囲で，各濃度 3 枚のプレートを用いて実施した。陰性対照における復帰突然変異の頻度はいずれの菌株についても背景データの範囲内であり，陽性対照の復帰突然変異の頻度は増加し，対応する陰性対照の 3 倍を超えていた。インキュベーション後には，1000 μg/plate 以上で全菌株に沈殿が認められた。代謝活性化系の非存在下における TA 1537 では 250 μg/plate 以上で，代謝活性化系の非存在下における TA 98 および TA 100 ならびに代謝活性化系の存在下／非存在下における TA 1535 および WP2 *uvrA* pKM101 では 500 μg/plate 以上で，代謝活性化系の存在下における TA 98，TA 100 および TA 1537 では 1000 μg/plate 以上で細胞毒性が認められた。復帰突然変異の頻度は，代謝活性化系存在下および非存在下で，いずれの菌株においても陰性対照の 2 倍以下であった。

類縁物質A* は，代謝活性化系の存在下および非存在下で *Salmonella typhimurium* および *Escherichia coli* に対して，細胞毒性を示す濃度まで塩基対置換型あるいはフレームシフト型の変異原性を示さなかった。

8.1.1.2. 染色体異常試験

報告書番号[redacted]GR033，概要表 2.6.7.17.B

ヒト末梢血リンパ球を用い，代謝活性化系の非存在下および存在下で，類縁物質A* の染色体の数的異常および構造異常の誘発性の有無を in vitro で検討した。代謝活性化系の非存在下および存在下で 3 時間あるいは代謝活性化系の非存在下で 22 時間処理し，有糸分裂中期細胞における染色体損傷を評価した。なお，DMSO を陰性（溶媒）対照とし，代謝活性化系の非存在下では mitomycin C を，代謝活性化系の存在下では cyclophosphamide を陽性対照とした。

用量設定試験では，類縁物質A* を 0.977 μg/mL～500 μg/mL の濃度範囲で代謝活性化系の非存在下および存在下で 3 時間ならびに代謝活性化系の非存在下で 22 時間，ヒト末梢血リンパ球を培養して評価したところ，125 μg/mL 以上では代謝活性化系の非存在下で 22 時間の条件で沈殿が認められ，250 μg/mL 以上では代謝活性化系の存在下／非存在下で 3 時間および代謝活性化系の非存在下で 22 時間の条件で沈殿および細胞毒性が認められた。62.5 μg/mL 以上では代謝活性化系の非存在下で 22 時間の条件で 60%以上の細胞毒性が，125 μg/mL 以上では代謝活性化系の非存在下／存在下で 3 時間の条件で 60%以上の細胞毒性が認められた。

本試験では用量設定試験で認められた細胞毒性に基づき，代謝活性化系の非存在下／存在下で類縁物質A* の 3.13 μg/mL～200 μg/mL の濃度範囲で 3 時間，代謝活性化系の非存在下で 3.13 μg/mL～125 μg/mL の濃度範囲で 22 時間処理して，高濃度（50%程度の細胞毒性が認められる濃度），中濃度（高濃度と比べて中等度の細胞毒性が認められる濃度）および低濃度（高濃度

＊；新薬承認情報提供時に置き換えた

と比べてわずかな細胞毒性が認められる濃度）の 3 濃度で評価した。代謝活性化系の非存在下で 3 時間処理の条件では 100，105 および 110 μg/mL の濃度で解析したところ，105 μg/mL および 110 μg/mL で染色体構造異常が有意に増加（それぞれ 6.5%および 9.0%）した。代謝活性化系の存在下で 3 時間処理の条件では 25, 100 および 112.5 μg/mL の濃度で解析したところ, 112.5 μg/mL では染色体構造異常（8.5%），100 μg/mL および 112.5 μg/mL では倍数体が有意に増加（それぞれ 5.8%および 3.5%）した。代謝活性化系の非存在下で 22 時間処理の条件では 35，45 および 55 μg/mL の濃度で解析したところ, いずれの濃度においても染色体構造異常および倍数体が認められたため，追加で 3.13, 6.25, 12.5 および 25 μg/mL の濃度についても評価した。その結果，25, 35 および 45 μg/mL の濃度で有意な染色体構造異常（それぞれ 8.5，7.5 および 5.0%）および倍数体（それぞれ 36.5，23 および 3.8%）が認められた。溶媒対照における染色体異常は 0%～0.5%であり，背景データの範囲内であった。一方，陽性対照で処理したところ，細胞の 14.0%～61.2%に染色体異常が誘発され，統計的有意差を示した。

類縁物質A* の染色体構造異常および倍数体の増加に対する無作用量は，ともに 12.5 μg/mL であった。

8.1.2. 類縁物質B*

8.1.2.1. 細菌を用いる復帰突然変異試験

報告書番号[redacted]GR030，概要表 2.6.7.17.C

Salmonella typhimurium（TA 98，TA 100，TA 1535，TA 1537）および *Escherichia coli*（WP2 *uvrA* pKM101）を用い，代謝活性化系の非存在下および存在下で，類縁物質B* の復帰突然変異誘発性の有無を検討した。なお, DMSO を陰性(溶媒)対照とし, 2-aminoanthracene(全菌株), 2-nitrofluorene（TA 98），sodium azide（TA 100，TA 1535），ICR-191 acridine（TA 1537）および 4-nitroquinoline-N-oxide（WP2 *uvrA* pKM101）を陽性対照とした。

用量設定試験では，類縁物質B* の 0，25，50，100，250，500，1000，2500 または 5000 μg/plate の濃度範囲で，各濃度 3 枚のプレートを用いて，代謝活性化系の非存在下および存在下で実施した。溶媒対照における復帰突然変異の頻度はいずれの菌株についても背景データの範囲内であり，陽性対照の復帰突然変異の頻度は増加し，対応する陰性対照の 3 倍を超えていた。インキュベーション後には，2500 μg/plate 以上の濃度で，全菌株に沈殿が認められた。類縁物質B* は代謝活性化系の非存在下で，TA 98，TA 100，TA 1535 および TA 1537 に対して 250 μg/plate 以上，WP2 *uvr*A pKM101 に対しては 1000 μg/plate で細胞毒性を示した。代謝活性化系の存在下では, TA 98, TA 100，TA 1535 および TA 1537 に対して 500 μg/plate 以上，WP2 *uvr*A pKM101 に対しては 1000 μg/plate 以上で細胞毒性を示した。用量設定試験における復帰突然変異の頻度は，代謝活性化系存在下および非存在下で，いずれの菌株においても陰性対照の 2 倍以下（代謝活性化の存在下における TA 1537 を除く[a]）であった。

---

[a]代謝活性化の存在下における TA1537 では，類縁物質B* の 250 μg/plate での復帰突然変異の頻度は陰性対照の 3 倍であった。しかしながら，陰性対照の復帰突然変異頻度は試験成立の条件に必要な最低数であったこ

本試験では，用量設定試験でみられた細胞毒性発現濃度から最高濃度を設定した。代謝活性化系の非存在下における TA 98，TA 100，TA 1535 および TA 1537 に対しては 類縁物質B* の 0，5，10，25，50，100，250 および 500 μg/plate の濃度範囲で，代謝活性化系の存在下における TA 98，TA 100，TA 1535 および TA 1537 に対しては 0，10，25，50，100，250，500 および 1000 μg/plate の濃度範囲で，WP2 *uvrA* pKM101 に対しては 0，25，50，100，250，500，1000 および 2500 μg/plate の濃度範囲で，各濃度 3 枚のプレートを用いて実施した。溶媒対照における復帰突然変異の頻度はいずれの菌株についても背景データの範囲内であり，陽性対照の復帰突然変異の頻度は増加し，対応する陰性対照の 3 倍を超えていた。インキュベーション後には，2500 μg/plate の濃度で，代謝活性化系の存在下／非存在下における WP2 *uvrA* pKM101 に沈殿が認められた。代謝活性化系の非存在下における TA 100，TA 1535 および TA 1537 では 250 μg/plate 以上で，代謝活性化系の存在下における TA 100, TA 1535 および TA 1537 ならびに代謝活性化系の存在下／非存在下における TA 98 では 500 μg/plate 以上で，代謝活性化系の存在下／非存在下における WP2 *uvrA* pKM101 では 1000 μg/plate 以上で細胞毒性が認められた。復帰突然変異の頻度は，代謝活性化系存在下および非存在下で，いずれの菌株においても陰性対照の 2 倍以下であった。

類縁物質B* は，代謝活性化系の存在下および非存在下で *Salmonella typhimurium* および *Escherichia coli* に対して，細胞毒性を示す濃度まで塩基対置換型あるいはフレームシフト型の変異原性を示さなかった。

8.1.2.2. 染色体異常試験

報告書番号[redacted]GR031，概要表 2.6.7.17.D

ヒト末梢血リンパ球を用い，代謝活性化系の非存在下および存在下で，類縁物質B* の染色体の数的異常および構造異常の誘発性の有無を in vitro で検討した。代謝活性化系の非存在下および存在下で 3 時間あるいは代謝活性化系の非存在下で 22 時間処理し，有糸分裂中期細胞における染色体損傷を評価した。なお，DMSO を陰性（溶媒）対照とし，代謝活性化系の非存在下では mitomycin C を，代謝活性化系の存在下では cyclophosphamide を陽性対照とした。

用量設定試験では，類縁物質B* を 0.977 μg/mL～500 μg/mL の濃度範囲で代謝活性化系の非存在下および存在下で 3 時間，ヒト末梢血リンパ球を培養して評価したところ，62.5 μg/mL 以上では代謝活性化系の非存在下で 22 時間の条件で，125 μg/mL 以上では代謝活性化系の非存在下／存在下で 3 時間の条件で，沈殿および細胞毒性が認められた。15.6 μg/mL 以上では代謝活性化系の非存在下で 3 時間の条件および代謝活性化系の非存在下で 22 時間の条件で，それぞれ 60%以上および 100%の細胞毒性が，31.3 μg/mL 以上では代謝活性化系の存在下で 3 時間の条件で 63%以上の細胞毒性が認められた。

本試験では用量設定試験で認められた細胞毒性に基づき，代謝活性化系の非存在下／存在下で類縁物質B* の 2.5 μg/mL～35 μg/mL の濃度範囲で 3 時間，代謝活性化系の非存在下で

と，250 μg/plate での復帰突然変異の頻度は TA1537 における背景データの範囲内であること，ならびに本試験では再現しなかったことから，毒性学的に意義のある増加ではないと考えられた。

＊；新薬承認情報提供時に置き換えた

0.625 μg/mL～20 μg/mL の濃度範囲で 22 時間処理して，高濃度（50%程度の細胞毒性が認められる濃度），中濃度（高濃度と比べて中等度の細胞毒性が認められる濃度）および低濃度（高濃度と比べてわずかな細胞毒性が認められる濃度）の 3 濃度で評価した。代謝活性化系の非存在下で 3 時間処理の条件では 2.5，7.5 および 10 μg/mL の濃度で，代謝活性化系の存在下で 3 時間処理の条件では 10，12.5 および 17.5 μg/mL の濃度で，代謝活性化系の非存在下で 22 時間処理の条件では 0.625，1.25 および 7.5 μg/mL の濃度で解析したところ，いずれの条件においても染色体異常，または数的異常の上昇はみられなかった。溶媒対照における染色体異常は 0.5%～1.0%であり，背景データの範囲内であった。一方，陽性対照で処理したところ，細胞の 30.9%～66.7%に染色体異常が誘発され，統計的有意差を示した。

本試験では，代謝活性化系の非存在下および存在下において，類縁物質B* はヒト末梢血培養リンパ球の染色体の構造異常および数的異常を誘発しなかった。.

＊；新薬承認情報提供時に置き換えた

9. 考察及び結論

クリゾチニブの非臨床毒性プロファイルは，ALK 融合遺伝子陽性の切除不能な進行・再発の NSCLC を適応とした初回申請時において検討されている。

ROS1 融合遺伝子陽性の NSCLC 患者への効能追加申請にあたり，クリゾチニブに関する新たな毒性試験は実施していない。しかしながら，2 つの不純物（類縁物質A* および 類縁物質B*）について，新たな 4 つの in vitro 遺伝毒性試験（細菌を用いる復帰突然変異試験および染色体異常試験）を実施した。

類縁物質B* については，変異原性，染色体構造異常または異数性誘発性は認められなかった。

類縁物質A* は，細菌を用いた復帰突然変異試験において変異原性を示さなかったが，in vitro 染色体異常試験において25 μg/mL 以上で染色体構造異常または倍数体を誘発した。 類縁物質A*は変異原性を示さなかったことからDNA には直接作用しないと考えられ，また異数性誘発物質による異数性の増加には閾値が存在するとの考え方が広く受け入れられていることから[1,2,3]，染色体構造異常についても 類縁物質A* の閾値が存在すると考えられた。染色体構造異常および倍数体の増加に対する無作用量は，ともに 12.5 μg/mL であり，250 mg を1 日2 回投与時の最大臨床曝露量（非結合型Cmax）[a]のそれぞれ約 77000 倍に相当する。

以上のことから，類縁物質A* に認められた染色体構造異常および倍数体の増加は，クリゾチニブ原薬の安全性評価に大きな影響を及ぼさないものと考えられた。

10. 図表

表は，本文の適切な箇所および 2.6.7 に記載した。

[a] 初回申請時（eCTD 受付番号 230228001）2.7.2.2 項：クリゾチニブの日本人における非結合型 Cmax は 54 ng/mL（A8081001 試験 第 2 サイクル第 1 日）であることから，規格上限値の不純物を含む場合の 類縁物質A* （0.30%）および 類縁物質B* （0.30%）の非結合型 Cmax は 0.162 ng/mL と推定される。

＊；新薬承認情報提供時に置き換えた

11. 参考文献

[1] Elhajouji A, Van Hummelen P, Kirsch-Volders M. Indications for a threshold of chemically-induced aneuploidy in vitro in human lymphocytes. Environmental and Molecular Mutagenesis. 1995;26:292-304

[2] Parry JM, Fielder RJ, McDonald A. Thresholds for aneuploidy-inducing chemicals. Mutagenesis. 1994;9:503-4.

[3] Bentley KS, Kirkland D, Murphy M, et al. Evaluation of thresholds for benomyl- and carbendazim-induced aneuploidy in cultured human lymphocytes using fluorescence in situ hybridization. Mutation Research. 2000;464:41-51.

TABLE OF CONTENTS

2.6.7.1 TOXICOLOGY: OVERVIEW 2
2.6.7.17.A OTHER TOXICITY STUDIES: IN VITRO 3
2.6.7.17.B OTHER TOXICITY STUDIES: IN VITRO 7
2.6.7.17.C OTHER TOXICITY STUDIES: IN VITRO 9
2.6.7.17.D OTHER TOXICITY STUDIES: IN VITRO 13

2.6.7.1 TOXICOLOGY: OVERVIEW

Test Articles: 類縁物質A* **and** 類縁物質B*

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses[a]	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Sponsor Reference Number
In Vitro								
Impurities								
類縁物質A*								
Bacterial reverse mutation assay[b]	*Salmonella typhimurium* (TA1537, TA98, TA100, and TA1535); *Escherichia coli* (WP2 *uvr*A pKM101)	In Vitro	NA	25 to 5000 µg/plate	Yes	[redacted]	MBR[redacted]-133	[redacted]GR032
Cytogenetics assay[b]	Human peripheral blood lymphocytes	In Vitro	NA	3.13 to 200 µg/mL	Yes	[redacted]	MBR[redacted]-134	[redacted]GR033
類縁物質B*								
Bacterial reverse mutation assay[c]	*Salmonella typhimurium* (TA1537, TA98, TA100, and TA1535); *Escherichia coli* (WP2 *uvr*A pKM101)	In Vitro	NA	25 to 5000 µg/plate	Yes	[redacted]	MBR[redacted]-135	[redacted]GR030
Cytogenetics assay[c]	Human peripheral blood lymphocytes	In Vitro	NA	2.5 to 35 µg/mL	Yes	[redacted]	MBR[redacted]-136	[redacted]GR031

GLP = Good laboratory practice; NA = Not applicable.
[a] All doses are expressed as specified.
[b] Drug substance impurity類縁物質A*.
[c] Drug substance impurity類縁物質B*.

*；新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.7.17.A OTHER TOXICITY STUDIES: IN VITRO

Report Title: 類縁物質A* : *Salmonella-E. Coli*/Mammalian Microsome Reverse Mutation Assay

Test Article: 類縁物質A*

Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells

Number of Independent Assays: 2

Study Number: MBR[redacted]-133 ([redacted]GR032)

Species/Strains: *Salmonella typhimurium* strains TA 98, TA 100, TA 1535 and TA 1537 and *Escherichia coli* strain WP2 uvrA pKM101

Number of Replicate Cultures: 3

Lot Number: 902/2341066/B/4/1

Metabolizing System: Aroclor-induced rat liver S9 mixture (7.5% S9)

S9 Batch Number: 2827 & 2899

Vehicles: **For Test Article:** DMSO **For Positive Controls:** DMSO

Treatment: Plate incubation for 48 hours at 37°C

GLP Compliance: Yes

Cytotoxic Effects: ≥250 µg/plate in TA98, TA100, TA1535, and TA1537 –S9; ≥500 µg/plate in TA1535 and WP2 uvrA pKM101 +/- S9; ≥1000 µg/plate in TA1537, TA98, and TA100 +S9

Date of Treatment: [redacted]-20[redacted] & [redacted]-20[redacted]

Genotoxic Effects: None

Test Article	Dose (µg/plate)	Initial Assay Revertant Colony Counts (Mean of 3 plates ± Standard Deviation)				
		Salmonella typhimurium				*Escherichia coli*
		TA 98	TA 100	TA 1535	TA 1537	WP2 uvrA pKM101
Without Metabolic Activation						
Control (DMSO)	0.05 mL/plate	11 ± 3	90 ± 11	5 ± 2	3 ± 3	267 ± 38
類縁物質A*	25	11 ± 3	76 ± 1	6 ± 4	4 ± 1	217 ± 11
	50	10 ± 3	68 ± 9	5 ± 4	5 ± 2	224 ± 48
	100	13 ± 0	79 ± 8	6 ± 3	2 ± 2	198 ± 32
	250	5 [b] ± 3	43 [a,b] ± 7	2 [b] ± 2	2 [a] ± 1	177 ± 12
	500	0 [c] ± 0	4 [c] ± 1	0 [c] ± 0	0 [c] ± 0	87 [b] ± 31
	1000 [d]	0 [c] ± 1	0 [c] ± 0	0 [c] ± 0	0 [c] ± 0	30 [b] ± 29
	2500 [c,d]	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	37 ± 9
	5000 [c,d]	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Positive controls						
2-Nitrofluorene	2.5	469 ± 32	NT	NT	NT	NT
Sodium azide	1.0	NT	440 ± 22	230 ± 12	NT	NT
ICR-191 acridine	0.5	NT	NT	NT	210 ± 8	NT
4-Nitroquinoline-N-oxide	2.0	NT	NT	NT	NT	1924 ± 872

＊；新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.7.17. A OTHER TOXICITY STUDIES: IN VITRO

Study Number: MBR[redacted]-133 ([redacted]GR032) **(continued)**

Test Article	Dose (µg/plate)	Initial Assay Revertant Colony Counts (Mean of 3 plates ± Standard Deviation)				
		Salmonella typhimurium				*Escherichia coli*
		TA 98	TA 100	TA 1535	TA 1537	WP2 uvrA pKM101
With Metabolic Activation						
Control (DMSO)	0.05 mL/plate	11 ± 3	69 ± 6	5 ± 2	2 ± 2	231 ± 4
類縁物質A*	25	9 ± 6	84 ± 6	6 ± 2	3 ± 0	202 ± 28
	50	11 ± 2	83 ± 6	7 ± 2	2 ± 2	181 ± 9
	100	11 ± 4	79 ± 11	6 ± 3	1 ± 2	171 ± 38
	250	13 ± 4	67 ± 6	4 ± 1	2 ± 2	137 ± 10
	500	7 ± 3	46 ± 20	3 ± 2	3 ± 2	75 [b] ± 9
	1000 [d]	0 [c] ± 0	0 [c] ± 0	0 [c] ± 0	0 [c] ± 0	58 [b] ± 17
	2500 [c,d]	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	5000 [c,d]	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Positive control						
2-Aminoanthracene	2.5	1115 ± 102	552 ± 112	100 ± 9	74 ± 7	NT
	10	NT	NT	NT	NT	1229 ± 58

＊；新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.7.17. A OTHER TOXICITY STUDIES: IN VITRO

Study Number: MBR[redacted]-133 ([redacted]GR032) **(continued)**

Test Article	Dose (µg/plate)	Confirmatory Assay Revertant Colony Counts (Mean of 3 plates ± Standard Deviation)				
		Salmonella typhimurium				*Escherichia coli*
		TA 98	TA 100	TA 1535	TA 1537	WP2 uvrA pKM101
Without Metabolic Activation						
Control (DMSO)	0.05 mL/plate	8 ± 1	108 ± 12	8 ± 2	3 ± 2	269 ± 37
類縁物質A*	10	8 ± 1	100 ± 22	12 ± 5	5 ± 4	NT
	25	11 ± 5	103 ± 11	9 ± 3	4 ± 3	281 ± 22
	50	10 ± 3	124 ± 17	12 ± 4	3 ± 2	260 ± 33
	100	10 ± 2	119 ± 16	9 ± 2	3 ± 0	259 ± 25
	250	5 ± 1	95 ± 24	7 ± 5	0 [c] ± 0	230 ± 44
	500	0 [c] ± 1	6 [c] ± 1	0 [c] ± 0	0 [c] ± 0	126 [b] ± 7
	1000 [d]	0 [c] ± 0	4 [c] ± 5	0 [c] ± 0	0 [c] ± 0	53 [b] ± 11
	2500 [d]	NT	NT	NT	NT	2 [c] ± 3
Positive Controls:						
2-Nitrofluorene	2.5	566 ± 24	NT	NT	NT	NT
Sodium azide	1.0	NT	582 ± 100	682 ± 60	NT	NT
ICR-191 acridine	0.5	NT	NT	NT	544 ± 136	NT
4-Nitroquinoline-N-oxide	2.0	NT	NT	NT	NT	1724 ± 137

＊；新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.7.17. A OTHER TOXICITY STUDIES: IN VITRO

Study Number: MBR[redacted]-133 ([redacted]GR032) **(continued)**

Test Article	Dose (µg/plate)	Confirmatory Assay Revertant Colony Counts (Mean of 3 plates ± Standard Deviation)				
		Salmonella typhimurium				*Escherichia coli*
		TA 98	TA 100	TA 1535	TA 1537	WP2 uvrA pKM101
With Metabolic Activation						
Control (DMSO)	0.05 mL/plate	14 ± 5	109 ± 16	9 ± 2	5 ± 1	264 ± 20
類縁物質A*	25	13± 4	96 ± 15	11 ± 4	4 ± 3	256 ± 43
	50	11 ± 6	99 ± 37	12 ± 4	2 ± 1	267 ± 44
	100	14 ± 2	118 ± 20	11 ± 4	2 ± 2	242 ± 33
	250	15 ± 5	105 ± 19	8 ± 3	5 ± 3	204 ± 23
	500	11 ± 1	95 [a] ± 28	4 [b] ± 1	4 [a] ± 1	105 [b] ± 5
	1000 [c,d]	8 ± 8	2 ± 3	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	2500 [c,d]	0 ± 0	1 ± 2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Positive Control:						
2-Aminoanthracene	2.5	1191 ± 46	584 ± 48	152 ± 15	137 ± 11	NT
	10	NT	NT	NT	NT	1206 ± 149

DMSO = Dimethyl sulfoxide; GLP = Good Laboratory Practice; NT = Not tested; S9 = Postmitochondrial supernatant.
[a] Slightly reduced background lawn.
[b] Cytotoxicity: >50% reduction in mean number of revertant colonies.
[c] Cytotoxicity: reduced background lawn.
[d] Precipitates present.

＊；新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.7.17.B OTHER TOXICITY STUDIES: IN VITRO

Report Title: 類縁物質A*: **In Vitro Chromosome Aberration Test in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes**

Test Article: 類縁物質A*

Test for Induction of: Chromosome aberrations
Strains: Human peripheral blood lymphocytes
Metabolizing System: Aroclor-induced rat liver S9
Vehicles for: **Test Article:** DMSO
Number of Independent Assays: 2
Number of Replicate Cultures: 2
Number of Cells Analyzed/Culture: ~ 100
Positive Controls: DMSO
Study Number: MBR[redacted]-134 ([redacted]GR033)
Batch Number: 902/2341066/B/4/1
S9 Batch Number: 2899
Treatment: 3-Hour and 22-hour treatment without metabolic activation, and 3 hours with metabolic activation
GLP Compliance: Yes
Date of Treatment: [redacted] 20[redacted] and [redacted] 20[redacted]
Cytotoxic Effects: ≥50% Reduction in mitotic index at concentrations ≥115 µg/mL for the 3-hour treatment without metabolic activation, ≥55 µg/mL for the 22- hour treatment without metabolic activation and ≥125 µg/mL with metabolic activation.
Genotoxic Effects: Positive for inducing structural chromosome aberrations with and without metabolic activation. Positive for inducing numerical aberrations at with and without metabolic activation (22-hour treatment).

Test Article	Dose (µg/mL)	Total Cells Analyzed	Mitotic Suppression[a] Mean %	Abnormal Cells Mean %	Polyploid Cells Mean %
3-Hour Treatment Without Metabolic Activation					
Control DMSO	1%	200	0	0.5	0.3
Positive Control Mitomycin C	0.8	55	46	54.5*	0.3
類縁物質A*	100	200	-4	3.5	1.8
	105	200	15	6.5*	0.8
	110	200	46	9.0*	0.5
3-Hour Treatment With Metabolic Activation					
Control DMSO	1%	200	0	0.0	0.0
Positive Control Cyclophosphamide	20	200	26	14.0*	0.0
類縁物質A*	25	200	-2	1.0	1.0
	100	200	32	1.5	5.8*
	112.5	200	48	8.5*	3.5*

*；新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.7.17.B OTHER TOXICITY STUDIES: IN VITRO

Test Article: 類縁物質A* **(continued)**

Test Article	Dose (µg/mL)	Total Cells Analyzed	Mitotic Suppression[a] Mean %	Abnormal Cells Mean %	Polyploid Cells Mean %
22-Hour Treatment Without Metabolic Activation					
Control DMSO	1%	200	0	0.0	0.5
Positive Control Mitomycin C	0.3	49	30	61.2*	0.5
類縁物質A*	3.13	200	8	0.5	0.3
	6.25	200	-10	0.0	0.0
	12.5	200	3	0.0	0.0
	25	200	-26	8.5*	36.5*
	35	200	-2	7.5*	23.0*
	45	200	13	5.0*	3.8*
	55	200	56	2.5	2.5†

* $p \leq 0.01$, † $p \leq 0.05$ significantly different from control based on appropriate trend or pairwise comparison. A full description of the statistical decision tree can be found in the final report for this study.
DMSO = Dimethyl sulfoxide; GLP = Good Laboratory Practice; S9 = Postmitochondrial.
[a] Mitotic suppression = [One minus the quotient (mean test article mitotic index / mean negative control mitotic index)] x 100.

＊；新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.7.17.C OTHER TOXICITY STUDIES: IN VITRO

Report Title: 類縁物質B* : *Salmonella-E. Coli*/Mammalian Microsome Reverse Mutation Assay

Test Article: 類縁物質B*

Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells

Number of Independent Assays: 2

Study Number: MBR[redacted]-135 ([redacted]GR030)

Species/Strains: *Salmonella typhimurium* strains TA 98, TA 100, TA 1535, and TA 1537 and *Escherichia coli* strain WP2 uvrA pKM101

Number of Replicate Cultures: 3

Lot Number: 00701592-076-2

Metabolizing System: Aroclor-induced rat liver S9 mixture (7.5% S9)

S9 Batch Number: 2899

Vehicles: **For Test Article:** DMSO **For Positive Controls:** DMSO

Treatment: Plate incubation for 48 hours at 37°C

GLP Compliance: Yes

Cytotoxic Effects: ≥250 µg/plate in TA1537, TA98, TA100 and TA1535 –S9; ≥500 µg/plate in TA1537, TA98, TA100 and TA1535 +S9; ≥1000 µg/plate in WP2 uvrA pKM101 +/- S9

Date of Treatment: [redacted] & [redacted] 20[redacted]

Genotoxic Effects: None

Test Article	Dose (mg/plate)	Initial Assay Revertant Colony Counts (Mean of 3 plates ± Standard Deviation)				
		Salmonella typhimurium				*Escherichia coli*
		TA 98	TA 100	TA 1535	TA 1537	WP2 uvrA pKM101
Without Metabolic Activation						
Control (DMSO)	0.05 mL/plate	15 ± 0	92 ± 16	7 ± 3	4 ± 1	158 ± 16
類縁物質B*	25	11 ± 2	83 ± 14	10 ± 8	6 ± 1	142 ± 25
	50	16 ± 5	78 ± 6	11 ± 4	5 ± 2	147 ± 6
	100	16 ± 2	80 ± 16	10 ± 2	3 ± 0	119 ± 21
	250	9 [b] ± 3	14 [b] ± 4	6 [b] ± 3	1 [b] ± 1	149 ± 6
	500	0 [b] ± 0	0 [b] ± 0	0 [b] ± 0	0 [b] ± 0	131 ± 2
	1000 [b]	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	12 ± 10
	2500 [b,d]	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	5000 [b,d]	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Positive controls						
2-Nitrofluorene	2.5	430 ± 42	NT	NT	NT	NT
Sodium azide	1.0	NT	475 ± 41	412 ± 43	NT	NT
ICR-191 acridine	0.5	NT	NT	NT	246 ± 8	NT
4-Nitroquinoline-N-oxide	2.0	NT	NT	NT	NT	2101 ± 163

＊；新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.7.17.C OTHER TOXICITY STUDIES: IN VITRO

Study Number: MBR[redacted]-135 **(continued)**

Test Article	Dose (mg/plate)	Initial Assay Revertant Colony Counts (Mean of 3 plates ± Standard Deviation)				
		Salmonella typhimurium				*Escherichia coli*
		TA 98	TA 100	TA 1535	TA 1537	WP2 uvrA pKM101
With Metabolic Activation						
Control (DMSO)	0.05 mL/plate	14 ± 5	98 ± 2	5 ± 3	2 ± 3	203 ± 6
類縁物質B*	25	16 ± 3	91 ± 11	9 ± 2	4 ± 1	170 ± 15
	50	16 ± 4	78 ± 5	10 ± 3	4 ± 4	161 ± 8
	100	18 ± 3	86 ± 9	7 ± 2	4 ± 4	163 ± 12
	250	19 ± 5	73 ± 7	9 [e] ± 1	6 ± 4	155 ± 14
	500	6 [b] ± 3	4 [b] ± 2	2 [b] ± 1	2 [b] ± 2	190 ± 26
	1000	0 [b] ± 0	0 [b] ± 0	0 [b] ± 0	0 [b] ± 0	67 [a,c] ± 17
	2500 [b,d]	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	5000 [b,d]	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Positive control						
2-Aminoanthracene	2.5	1792 ± 161	821 ± 90	238 ± 91	87 ± 15	NT
	10	NT	NT	NT	NT	1693 ± 85

＊；新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.7.17.C OTHER TOXICITY STUDIES: IN VITRO

Study Number: MBR[redacted]-135 **(continued)**

Test Article	Dose (mg/plate)	Confirmatory Assay Revertant Colony Counts (Mean of 3 plates ± Standard Deviation)				
		Salmonella typhimurium				*Escherichia coli*
		TA 98	TA 100	TA 1535	TA 1537	WP2 uvrA pKM101
Without Metabolic Activation						
Control (DMSO)	0.05 mL/plate	10 ± 2	92 ± 1	7 ± 2	3 ± 2	251 ± 8
類縁物質B*	5.0	14 ± 4	90 ± 15	12 ± 2	3 ± 2	NT
	10	8 ± 3	89 ± 4	5 ± 2	1 ± 0	NT
	25	10 ± 3	95 ± 4	10 ± 3	4 ± 1	185 ± 14
	50	11 ± 1	88 ± 8	10 ± 1	5 ± 4	185 ± 43
	100	17 ± 2	74 ± 21	9 ± 3	3 ± 2	224 ± 38
	250	12 ± 6	0[b] ± 0	5[b] ± 2	0[b] ± 0	182 ± 25
	500	0[b] ± 0	0[b] ± 0	0[b] ± 0	0[b] ± 0	109 ± 20
	1000	NT	NT	NT	NT	23[b] ± 7
	2500	NT	NT	NT	NT	0[b,d] ± 0
Positive Controls:						
2-Nitrofluorene	2.5	454 ± 43	NT	NT	NT	NT
Sodium azide	1.0	NT	456 ± 49	332 ± 12	NT	NT
ICR-191 acridine	0.5	NT	NT	NT	197 ± 18	NT
4-Nitroquinoline-N-oxide	2.0	NT	NT	NT	NT	1787 ± 570

＊；新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.7.17.C OTHER TOXICITY STUDIES: IN VITRO

Study Number: MBR[redacted]-135 **(continued)**

Test Article	Dose (mg/plate)	Confirmatory Assay Revertant Colony Counts (Mean of 3 plates ± Standard Deviation)				
		Salmonella typhimurium				*Escherichia coli*
		TA 98	TA 100	TA 1535	TA 1537	WP2 uvrA pKM101
With Metabolic Activation						
Control (DMSO)	0.05 mL/plate	16 ± 1	101 ± 16	8 ± 3	5 ± 2	207 ± 36
類縁物質B*	10	21 ± 4	106 ± 19	6 ± 2	2 ± 2	NT
	25	17 ± 6	113 ± 15	10 ± 4	6 ± 2	260 ± 19
	50	19 ± 6	90 ± 13	5 ± 2	2 ± 1	242 ± 26
	100	26 ± 6	93 ± 14	10 ± 3	6 ± 3	245 ± 56
	250	18 ± 6	81 ± 19	9 ± 3	3 ± 1	210 ± 13
	500	6 [b] ± 4	0 [b] ± 0	8 [b] ± 2	0 [b] ± 0	169 ± 7
	1000	0 [b] ± 0	0 [b] ± 0	0 [b] ± 0	0 [b] ± 0	60 [c] ± 6
	2500	NT	NT	NT	NT	0 [b,d] ± 0
Positive Control:						
2-Aminoanthracene	2.5	1413 ± 191	1029 ± 118	94 ± 3	88 ± 10	NT
	10	NT	NT	NT	NT	1512 ± 36

DMSO = Dimethyl sulfoxide; GLP = Good Laboratory Practice; NT = Not tested; S9 = Postmitochondrial supernatant.
[a] Slightly reduced background lawn.
[b] Cytotoxicity: Reduced background lawn.
[c] Cytotoxicity: >50% reduction in mean number of revertant colonies.
[d] Test article precipitates present.
[e] Mean of 2 plate ± Standard Deviation.

＊；新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.7.17.D OTHER TOXICITY STUDIES: IN VITRO

Report Title: 類縁物質B* : **In Vitro Chromosome Aberration Test in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes**

Test Article: 類縁物質B*

Test for Induction of: Chromosome aberrations
Strains: Human peripheral blood lymphocytes
Metabolizing System: Aroclor-induced rat liver S9
Vehicles for: **Test Article:** DMSO
Number of Independent Assays: 3
Number of Replicate Cultures: 2
Number of Cells Analyzed/Culture: ~ 100
Positive Controls: DMSO

Study Number: MBR[redacted]-136 ([redacted]GR031)
Lot Number: 00701592-076-2
S9 Batch Number: 2827, 2899

Treatment: 3-Hour and 22-hour treatment without metabolic activation, and 3 hours with metabolic activation

GLP Compliance: Yes
Date of Treatment: [redacted] 20[redacted]

Cytotoxic Effects: ≥45% Reduction in mitotic index at concentrations ≥10 µg/mL in the 3-hour treatment without metabolic activation, ≥7.5 µg/mL in the 22-hour treatment without metabolic activation, and ≥17.5 µg/mL with metabolic activation.

Genotoxic Effects: Negative for inducing structural chromosome aberrations with and without metabolic activation at any concentration. Negative for inducing numerical aberrations at 0.625-12.5 µg/mL with and without metabolic activation.

Test Article	Dose (µg/mL)	Total Cells Analyzed	Mitotic Suppression[a] Mean %	Abnormal Cells Mean %	Polyploid Cells Mean %
3-Hour Treatment Without Metabolic Activation					
DMSO	1%	200	0	0.5	0.3
Positive Control Mitomycin C	0.8	65	53	46.2*	0.0
類縁物質B*	2.5	200	-1	0.0	0.0
	7.5	200	32	0.5	0.3
	10	200	52	0.0	0.3
3-Hour Treatment With Metabolic Activation					
DMSO	1%	200	0	0.5	0.0
Positive Control Cyclophosphamide	20	97	2	30.9*	0.0
類縁物質B*	10	200	-8	0.5	0.8
	12.5	200	28	0.0	0.3
	17.5	200	49	1.0	1.8†

＊；新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.7.17.D OTHER TOXICITY STUDIES: IN VITRO

Study Number: MBR[redacted]-136 ([redacted]GR031) (continued)

Test Article	Dose (µg/mL)	Total Cells Analyzed	Mitotic Suppression[a] Mean %	Abnormal Cells Mean %	Polyploid Cells Mean %
22-Hour Treatment Without Metabolic Activation					
Control DMSO	1%	200	0	1.0	0.0
Positive Control Mitomycin C	0.3	45	46	66.7*	0.3
類縁物質B*	0.625	200	4	2.5	0.5
	1.25	200	32	1.5	0.0
	7.5	200	45	0.5	1.3

* p ≤0.01, † p ≤0.05, significantly different from control based on appropriate trend or pairwise comparison. A full description of the statistical decision tree can be found in the final report for this study.
DMSO = Dimethyl sulfoxide; GLP = Good Laboratory Practice; S9 = Postmitochondrial.
[a] Mitotic suppression = [One minus the quotient (mean test article mitotic index / mean negative control mitotic index)] x 100.

＊；新薬承認情報提供時に置き換えた