TABLE OF CONTENTS

略語一覧 3
1. 背景 4
2. 非臨床試験計画概略 5
2.1. 非臨床試験での使用原薬 5
3. 薬理試験 7
3.1. 効力を裏付ける試験 7
3.1.1. In vitro 試験 7
3.1.2. In vivo 試験 10
3.2. 安全性薬理試験 11
3.2.1. 中枢神経系 11
3.2.2. 心血管系 12
3.2.3. 呼吸器系 12
3.2.4. 造血系 13
3.2.5. 受容体及びイオンチャネル 13
3.3. 薬力学的薬物相互作用 13
3.4. 結論 13
4. 薬物動態試験 14
4.1. 吸収 14
4.2. 分布 17
4.2.1. In vitro タンパク結合（複数の動物種） 17
4.2.2. 血球移行（複数の動物種） 18
4.3. 代謝 18
4.4. 排泄（ラット） 18
4.5. 薬物相互作用 20
4.6. 結論 21
5. 毒性試験 22
5.1. 単回及び反復投与毒性試験 22
5.1.1. 消化管 22
5.1.2. 血液生化学的検査 23
5.1.3. 造血系 23
5.1.4. 生殖器毒性 23
5.2. 遺伝毒性試験 23

5.3.　がん原性試験 24
5.4.　生殖発生毒性 24
5.5.　局所刺激性試験 24
5.6.　不純物に関する毒性試験 24
5.7.　その他の試験 25
5.8.　結論 26
6.　統括及び結論 27
7.　参考文献 29

LIST OF TABLES

Table 1:　ロミデプシンの HDAC 阻害プロファイル 8
Table 2:　ヒト細胞株でのロミデプシンの in vitro 細胞傷害活性 9
Table 3:　ヒト及びマウス細胞株でのロミデプシンの細胞傷害活性 9
Table 4:　ロミデプシンをラットに単回及び 26 週間反復間欠静脈内ボーラス投与したときの薬物動態パラメータ（平均値及び SD） 14
Table 5:　胆管カニュレーション処置雄ラットに[^{14}C] ロミデプシン（投与量：0.3 mg/kg）を静脈内ボーラス投与したときの胆汁、尿及び糞中への累積放射能排泄率；CRD040009 20

LIST OF FIGURES

Figure 1:　ロミデプシンをラットに 26 週間反復間欠静脈内ボーラス投与したときの平均血漿中濃度推移（ng/mL、平均値±SD）（Day 176） 15
Figure 2:　ロミデプシンをイヌに単回 4 時間持続静脈内投与したときの平均血漿中濃度推移（ng/mL、平均値±SD） 16
Figure 3:　[^{14}C]-ロミデプシンをラットに単回静脈内ボーラス投与したときの血漿及び血液中放射能濃度推移（ng eq./mL） 17

略語一覧

略　号	説　明
APD	Action potential duration　活動電位持続時間
AUC	Area under the plasma concentration-time curve　血漿中濃度時間曲線下面積
bFGF	Basic fibroblast growth factor 塩基性線維芽細胞成長因子
CTCL	Cutaneous T-cell lymphoma　皮膚 T 細胞リンパ腫
CYP	Cytochrome P450　チトクローム　P450
DMSO	Dimethyl sulfoxide　ジメチルスルホキシド
GLP	Good Laboratory Practice　医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準
HDAC	Histone deacetylase　ヒストン脱アセチル化酵素
hERG	Human ether-a-go-go-related gene　ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
IC_{50}	50% Inhibition concentration　50%阻害濃度
MAPK	Mitogen-activated protein kinase　マイトジェン活性化プロテインキナーゼ
MKP-1	Mitogen activated protein kinase phosphatase 1 マイトジェン活性化プロテインキナーゼホスファターゼ-1
MRP1	Multidrug resistance-associated protein 1　多剤耐性関連タンパク質 1
MST	Median survival time　生存期間中央値
MTD	Maximum tolerated dose　最大耐量
NCI	National Cancer Institute　米国国立がん研究所
P-gp	P-glycoprotein　P 糖タンパク質
PK	Pharmacokinetics　薬物動態
PTCL	Peripheral T-cell lymphoma　末梢性 T 細胞リンパ腫
TK	Toxicokinetics　トキシコキネティックス
TBA	*tert*-butyl-alcohol　*t*-ブチルアルコール
VEGF	Vascular endothelial growth factor 血管内皮細胞増殖因子

1. 背景

ロミデプシン（別名：FK228、FR901228、NSC- 630176）は *Chromobacterium violaceum* から単離された二環性デプシペプチドでヒストン脱アセチル化酵素（Histone deacetylase、 HDAC）阻害作用を特徴とする抗腫瘍剤である（Ueda、1994a、Ueda、1994b）。ロミデプシンの *in vitro* 及び *in vivo* における薬効薬理試験の結果から、血液腫瘍から固形腫瘍に至る広範にわたり強力な抗腫瘍活性を示すことが確認された。さらに従来の抗がん剤治療で耐性となった腫瘍に対しても有効である可能性が示唆されており、新規抗がん剤として有用であることが期待される。

ロミデプシンの作用機序として、非臨床試験で HDAC の阻害、遺伝子発現の誘導又は抑制、細胞周期の停止、細胞分化、細胞増殖の阻害、アポトーシスの誘導、形質転換細胞の形態復帰及び血管新生の抑制といった多様な活性が認められた。ロミデプシンは、2009 年 11 月 5 日に全身治療歴がある皮膚 T 細胞性リンパ腫（CTCL）の治療薬として米国で承認された。その後、2011 年 6 月 16 日に「治療歴がある末梢性 T 細胞リンパ腫（PTCL）」の効能・効果で迅速承認を取得した。また、2016 年 2 月時点で、韓国、オーストラリア、カナダ、イスラエルでも同様の効能・効果で承認を取得している。

2. 非臨床試験計画概略

薬理試験では、ロミデプシンの抗腫瘍活性を検討した。in vitro 試験では、ヒト固形腫瘍及び血液腫瘍での腫瘍細胞増殖抑制作用について検討し（2.6.2.2.1.項）、in vivo 試験では、マウス腫瘍又はヒト腫瘍移植モデル動物を用いて腫瘍増殖抑制作用を検討した（2.6.2.2.2 項）。ロミデプシンの作用機序に関する試験として、HDAC 阻害による遺伝子発現量の変化、細胞周期停止、細胞分化誘導、細胞傷害及びアポトーシス等に対する作用を評価する in vitro 薬理試験を実施した。さらに、in vivo 薬理試験でも、これらの抗腫瘍効果の機序を解明する試験を実施した。In vivo 薬理試験では、ロミデプシンに高感受性腫瘍の種類を特定するとともに、ロミデプシン感受性に関連する遺伝子を特定するために、ロミデプシン投与後の遺伝子発現量の変化を検討した。また、抗腫瘍効果を得るための最適な投与レジメンを決定する目的で種々の投与スケジュール及び投与経路を検討した。一方、ロミデプシンの HDAC 以外を標的とした副次的薬理試験は実施していない。安全性薬理試験は、in vitro 及び in vivo のモデル系を用いて実施した（2.6.2.4 項）。これらの試験は、安全性薬理試験ガイドライン（ICH S7A）及び GLP 基準に従って実施した。In vitro 試験として、ロミデプシンの hERG チャネル電流に対する作用、並びにモルモット乳頭筋の活動電位持続時間を検討する試験を実施し、ヒトでの QT 間隔延長のリスクを評価した。生物学的に重要な多数の受容体及びイオンチャネルに対するロミデプシンの作用についても評価した。ラット及びイヌを用いた in vivo 試験では、ロミデプシンの 4 時間静脈内持続注入によるラットの中枢神経系並びにイヌの中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に対する作用を検討した。

ロミデプシンの薬物動態試験（PK）は、2 種類の動物（ラット及びイヌ）を用いた in vivo 試験並びにラット、イヌ及びヒトの全血及び血清を用いた複数の in vitro 試験で評価した。これらの in vivo 試験では、臨床で予定されている投与経路である静脈内投与によりロミデプシンを投与したときの吸収、分布、代謝及び排泄を評価した。また、ラット及びイヌにロミデプシンを静脈内ボーラス投与又は静脈内持続投与したときの血漿 PK の評価を行った。血漿タンパク結合、組織分布、代謝及び排泄を評価するため、放射性標識体を用いた試験を実施した。チトクローム P450（CYP）の阻害又は誘導あるいは薬物トランスポーターの阻害によりロミデプシンが引き起こす薬物相互作用の可能性を評価するため in vitro 試験を実施した。

ロミデプシの分布は、ラットを用いた in vivo 試験及びラット、イヌ、ヒトの全血／血清及びヒト血漿を用いた 2 つの in vitro 試験で検討した（2.6.4.4 項）。ロミデプシンの代謝は、ラットを用いた in vivo 試験及びラット、イヌ、ヒトの組織を用いた in vitro 試験で検討した（2.6.4.5 項）。ロミデプシンの排泄は、無処置ラット及び胆管カニュレーション処置ラットを用いて評価した（2.6.4.6 項）。ロミデプシンが特定の CYP アイソザイムと相互作用する可能性について、ヒト肝ミクロソーム又は初代培養ヒト肝細胞を用いて評価した（2.6.4.7 項）。

毒性試験は、単回投与毒性試験（ラット及びイヌ）、反復投与毒性試験（マウス、ラット及びイヌ）、in vitro 及び in vivo 遺伝子毒性試験、ラット胚・胎児発生毒性試験及び不純物に関する毒性試験等を実施した。がん原性試験、受胎能及び初期発生試験、出生前及び出生の発生並びに母体の機能に関する試験及び光毒性試験は実施していない。ロミデプシンの毒性試験は、包括的毒性評価のための代表的な動物種としてラット及びイヌを選択し、GLP 基準に従って実施した。

2.1. 非臨床試験での使用原薬

非臨床試験で使用した原薬のロット中には類縁物質がいずれも少量存在し、総不純物量は約[redacted]～[redacted]%であった。これらのロット中に確認された類縁物質（5 種類）及び濃度は、RS 1 *（[redacted]%）、RS 2 *（[redacted]～[redacted]%）、RS 3 *（[redacted]～[redacted]%）、RS 4 *（[redacted]～[redacted]%）、RS 5 *（[redacted]～[redacted]%）

であり、いずれも 1.0%未満の濃度であった。また、原薬の製造工程に由来する類縁物質は RS 1 *（[redacted]～[redacted]%）のみであった。

開発中に使用した原薬のロット 801189F、004196L 及び 201102L は、結晶形 2*又は結晶形 1*と 2*との混合物であった。結晶形 2*から 1*への変化は、工程残留物の毒性リスクをなくすために原薬の製造工程を変更したことによるものであり、製剤の品質や生産効率の問題によるものではなかった。また、非臨床試験はロミデプシン溶液を用いて実施したため、原薬の結晶形は非臨床試験の実施に影響するものではなかった（3.2 項）。

＊ 新薬承認情報提供時に置換え

3. 薬理試験

ロミデプシンは、初期の試験において、*ras* 変異細胞の悪性表現型を *ras* 非変異細胞の表現型に回復させる新規薬剤であることが確認された（Ueda, 1994a；Ueda, 1994b）。米国 NCI で実施された抗がん剤のスクリーニング試験において、ロミデプシンは血液腫瘍から固形腫瘍に至る広範囲の種類の腫瘍細胞に対して強い増殖阻害活性を示すことが見出された。1998 年にロミデプシンは、HDAC 阻害剤であることが確認され（Nakajima, 1998）、多数の in vitro 及び in vivo 薬理試験において、強い抗腫瘍効果を示すことが明らかにされた。これらの試験から、ロミデプシンは、HDAC 阻害、ヒストン以外のタンパク質のアセチル化亢進、遺伝子誘導又は抑制、変異細胞の形態学的復帰、細胞分化誘導、細胞周期停止、細胞増殖抑制、アポトーシス（細胞死）、血管新生阻害などの抗腫瘍作用が示された。

In vitro 試験で認められた腫瘍増殖阻害作用の機序を更に確認するために in vivo 薬理試験を実施した。In vivo 薬理試験では、ロミデプシンに感受性の高い腫瘍の種類を特定するとともに、これらの腫瘍のロミデプシンに対する感受性に関連する鍵となる遺伝子を特定するために、ロミデプシン投与後の遺伝子発現量の変化も検討した。また、抗腫瘍効果を得るための最適な投与レジメンを特定するために、異なる投与スケジュール及び投与経路を検討する試験も実施した。

ロミデプシンの望ましくない薬理作用を明らかにするために、安全性薬理試験を実施した。非臨床試験及び海外臨床第 1 相試験において、心電図の異常が認められたが、これらの異常は一過性であり、臨床的には問題となるものではなかったが、臨床使用する際には十分な注意が必要である。これらの電気生理学的な機序を検討するために in vitro 及び in vivo での非臨床試験を追加実施した。In vitro 安全性薬理試験では、多数の重要な受容体及びイオンチャネルへのロミデプシンの結合性、カリウムチャネル及び hERG チャネル電流に対する作用並びにモルモット心筋細胞活動電位阻害能を評価した。In vivo 安全性薬理試験では、ラットの中枢神経系並びにイヌの中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に対するロミデプシンの作用を明らかにした。

3.1. 効力を裏付ける試験

In vitro 及び in vivo 試験系において、ロミデプシンは HDAC 阻害、ヒストン及びヒストン以外のタンパク質のアセチル化、遺伝子発現の誘導及び抑制、細胞周期停止、細胞分化誘導、細胞増殖抑制、アポトーシス（細胞死）、変異細胞の形態学的復帰、血管新生阻害などの抗腫瘍作用が示された（2.6.2 項）。ロミデプシン及び他の HDAC 阻害剤の作用機序は完全には解明されていない。現時点の見解では、HDAC 阻害剤は、程度の差はあるものの、HDAC 酵素アイソファームの違いにより、HDAC 酵素クラス I（HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC8）、HDAC 酵素クラス II（HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC9、HDAC10）及び HDAC 酵素クラス IV（HDAC11）を阻害して、クロマチンリモデリング及び遺伝子発現量の変化を引き起こし、腫瘍細胞の増殖・生存に有害となる抗腫瘍作用をもたらすと考えられている。また、HDAC は非ヒストンタンパク質をアセチル化すること、アセチル化による細胞タンパク質の翻訳後修飾が HDAC 阻害剤の抗腫瘍作用に重要な役割を有する可能性があることも知られている（Rasheed, 2008）。ロミデプシンの効力を裏付ける試験では、HDAC 阻害による遺伝子発現量に対する作用、並びに細胞周期停止、細胞増殖抑制及びアポトーシス誘導等を検討した。

3.1.1. In vitro 試験

ロミデプシンは強力な HDAC 阻害剤であり、HDAC 酵素クラス I に対する Ki 値は低い濃度範囲（nmol レベル）であり、HDAC 酵素クラス II も中等度に阻害することが確認されている（Furumai, 2002；Miller, 2003）。

しかし、HDAC 阻害プロファイルの検討のために適用される生化学的試験は標準化されていないため、多くの開発中の HDAC 阻害剤で異なった阻害プロファイルが報告されている。この不一致は、HDAC 酵素の種類が異なること、すべてのクラスの HDAC に対して同一の基質を用いて試験が行われていることに起因する。最近の文献で、活性測定の条件を詳細に検討した結果が報告されており（Bradner, 2010）、ロミデプシンの HDAC 酵素アイソフォーム選択性について示している結果（Table 1 ）が現時点で最も正確な結果であると考えられる。ロミデプシンは、HDAC 酵素クラス I を極めて低い濃度（pmol レベル）で阻害する。

Table 1:　ロミデプシンの HDAC 阻害プロファイル

HDAC 酵素アイソフォーム	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ki 値 (nM)	0.002	0.038	0.150	21	550	9.5	1250	0.150	1100

引用元：Bradner, 2010

ロミデプシンのような HDAC 阻害剤の抗腫瘍効果は、ある部分のヒストンのアセチル化の亢進を介して直接的に遺伝子発現量を調節する作用に基づくと考えられるが、ヒストンを直接介しない方法でも腫瘍細胞の生存に影響を与えている。例えば、ロミデプシンは転写制御因子産物（p53、EF2）、細胞周期タンパク質（Rb）、シャペロンタンパク質（Hsp90 等）、腫瘍抑制因子タンパク質（p53）等のヒストン以外のタンパク質のアセチル化を誘発することが知られている（Yu, 2002）。

ロミデプシンは、*in vitro* 試験で多数の遺伝子発現を誘導及び抑制した（CRE040010）。マイクロアレイ解析で検討した 7000 以上の遺伝子のうち、約 100 の遺伝子がロミデプシンの処置でアップレギュレートされ、100 の遺伝子がダウンレギュレートされた。アップレギュレートされた遺伝子は、$p21^{WAF1/Cip1}$、IL-8、カスパーゼ 9 などであり、ダウンレギュレートされた遺伝子は、MAPK、サイクリン A2 等であった。これらの遺伝子の多くは、シグナル伝達、増殖抑制及びアポトーシスにおいて重要な役割を果たすタンパク質をコードする。ロミデプシンによる $p21^{WAF1/Cip1}$ のトランス活性化は、複数種の細胞及び腫瘍において一貫して認められた。培養ヒトリンパ腫細胞において、ロミデプシンは、細胞周期停止、アポトーシス及び細胞分化に関連する遺伝子 $p21^{WAF1/Cip1}$ 及びゲルゾリンの発現をアップレギュレートした。これらのヒトリンパ腫細胞では、アポトーシス、細胞周期停止及び細胞分化に先立って遺伝子発現量に変化が生じた（CRE040013）。また、ヒト前立腺がん由来 PC-3、DU-145 及びヒト腎臓がん由来 ACHN 細胞株における $p21^{WAF1/Cip1}$ 遺伝子の基準発現量及びロミデプシン処置による発現パターンの変化を検討した結果、*in vitro* において PC-3 及び DU-145 では $p21^{WAF1/Cip1}$ mRNA 発現量の時間依存的な増加がみられたが、ACHN 細胞では増加が認められず、これらの細胞株ではロミデプシン感受性と逆の相関がみられた（CRE010158）。以上の結果から、遺伝子発現量はロミデプシンの抗腫瘍効果の予測マーカーとなり得ると考えられた。

細胞周期に対する影響を検討した試験では、ロミデプシンは G_1 及び G_2/M 期で細胞周期停止を誘発することが確認された。ロミデプシンは、ナノモルという低濃度でヒトリンパ腫細胞株 U-937 の細胞周期を G_1 期及び G_2/M 期で停止させた（CRE040013）。また、ロミデプシンはマウス胎児皮膚 NIH3T3 細胞由来の培養 Ras 1 細胞の細胞周期を G_0/G_1 期で停止させた（CRR910025）。PC-3 細胞では、ロミデプシンの処置により、細胞周期は G_1 期ではなく G_2/M 期で停止した（CRE010158）。ロミデプシンによる細胞周期停止の正確な機序は不明であるが、他の HDAC 阻害剤のように、細胞周期に関連する複数の重要な遺伝子の発現量がロミデプシンの処置により変化（$p21^{WAF1/Cip1}$ のアップレギュレーション、サイクリン A、c-myc 及びチミジン合成酵素のダウンレギュレーション等）したことから、ロミデプシンの抗腫瘍効果は細胞周期に対する作用に一部起因することが示唆された（CRE040010）。

ロミデプシンにより制御される遺伝子のうち、抗腫瘍効果に関与する可能性のある他の遺伝子には、細胞増殖及びアポトーシスに関与する遺伝子（DUSP1、カスパーゼ 9）、腫瘍血管新生に関与する遺伝子（VEGF、bFGF）並びにがん遺伝子（c-myc）が含まれる。公表されているロミデプシンの他の試験でも、アップレギュレートされる遺伝子は、p21、Prdx1、IL-8、JunB、カスパーゼ 9、MAPK ホスファターゼ 1（MKP-1）及びマイトジェン活性化タンパク質キナーゼ（MAP キナーゼ：MAPK）ファミリー遺伝子であり、共通してダウンレギュレートされる遺伝子は、サイクリン A 及び MAPK ファミリー遺伝子であることが報告されており（Sasakawa, 2005；Hoshino, 2007）、上記の結果と一致している。

ロミデプシンは、ヒトリンパ腫細胞株 U-937 及び前立腺がん細胞株 PC-3 において、低濃度（nmol レベル）で時間依存的にアポトーシスを誘発した（CRE040013、 CRE010158）。アポトーシスを誘発する機序は解明されていないが、ロミデプシンは多面的な作用を有することから、他の HDAC 阻害剤で認められているように、ロミデプシン処置後の遺伝子発現量の有意な変化により、アポトーシス促進性及び抗アポトーシス性の遺伝子及びタンパク質のバランスがアポトーシス側に傾くことが示唆された。

複数のヒト腫瘍細胞株でのロミデプシンの *in vitro* 活性を評価した結果、ロミデプシンは低濃度（nmol レベル）で血液がん及び固形がん細胞株（ヒトリンパ腫、前立腺がん、腎細胞がん、白血病、結腸腺がん、肺がん）に対して強力な抗腫瘍効果を示した。また、ロミデプシンは、検討したすべての細胞株に対して増殖抑制作用を示し、IC_{50} の平均値は 3.16 ng/mL であった（Table 2 ）。ロミデプシンはヒト肺がん、胃がん、乳がん及び結腸腺がん細胞に対して強力な細胞傷害活性を示したが、正常ヒト線維芽細胞、正常ヒト内皮細胞及びマウス胚細胞に対する細胞傷害活性は弱く、正常細胞よりも腫瘍細胞を選択的に阻害した（Table 2）。

Table 2:　ヒト細胞株でのロミデプシンの in vitro 細胞傷害活性

細胞の種類	細胞株	平均 IC_{50} (ng/mL)
白血病、リンパ腫	CCRF-CEM、THP-1、ML-3、HL-60、JOSK-1、K562、JOK-1、U-937	3.23
腎細胞がん	OUR10、ACHN、A-498	4.97
前立腺がん	PC-3、DU-145	1.61
結腸腺がん	SW-480、Colo201、HT-29	1.61
肺がん	PC-10、NCI-H69	3.83

IC_{50} = 50%細胞増殖抑制に要する薬物濃度。
引用元：報告書 CRE010130

Table 3:　ヒト及びマウス細胞株でのロミデプシンの細胞傷害活性

細胞の種類	細胞株	平均 IC_{50} (ng/mL)
肺がん	A549、PC-9 PC-1、PC-10 ADH、LX-1	0.5 1.8 1.1
胃がん	MKN28、MKN74	0.9
乳がん	MCF-7、ZR-75	0.65
結腸がん	SW-480、Colo201	0.65
ヒト（正常）	線維芽細胞 内皮細胞 HE-9	>1000 7
マウス胚	BALB/3T3 NIH/3T3	9.2 3.2

IC_{50} = 50%細胞増殖抑制に要する薬物濃度。

引用元：報告書 CRR910025

ロミデプシンの抗腫瘍効果は、血管内皮増殖因子（VEGF）及び塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）などの血管新生因子の発現量に対する作用に一部起因する可能性がある（CRE040012）。ロミデプシンは、in vitro 及び in vivo で、血管新生の転写調節作用を介して血管新生阻害作用を示し、*in vitro* での HDAC 活性を阻害する濃度で、低酸素で促進される大動脈内皮細胞の増殖、浸潤、遊走、癒着及び管腔形成を阻害した。また、ロミデプシンはニワトリ胚及びマウスの血管新生を阻害した。ロミデプシンは血管新生促進因子（VEGF、キナーゼ挿入ドメイン受容体等）の発現を阻害し、血管新生阻害因子（von Hippel Lindau、ニューロフィブロミン 2 等）を誘導した（Kwon, 2002）。他の HDAC 阻害剤においてもロミデプシンの作用と同様の血管新生促進遺伝子［VEGF、bFGF、hypoxia-inducible factor-1α（HIF-1α）、endothelial nitric oxide synthase（eNOS）］の発現量低下に関連する血管新生阻害作用が報告されている（Qian, 2006；Michaelis, 2004；Rossig, 2002）。

ヒトリンパ腫由来 U-937 細胞を用いた試験で、ロミデプシンにより単球（CD11b 陽性／CD14 陽性）及び顆粒球（CD11b 陽性／CD14 陰性）に特異的なマーカーがアップレギュレートされ、U-937 細胞の分化誘導が確認された。ロミデプシンによる本細胞の分化誘導の機序は明らかにされておらず、また、臨床での意義も不明である。

3.1.2. In vivo 試験

マウスを用いた複数のヒト腫瘍細胞異種移植試験においてロミデプシンの in vivo での抗腫瘍効果を検討した。ロミデプシンは、固形がん及び血液がん由来のヒト腫瘍に対して広範な抗腫瘍効果を示した。ヒト腫瘍細胞異種移植モデルでの遺伝子発現プロファイルは、ロミデプシンの感受性と関連していた。In vitro で認められた抗腫瘍効果と同様に、ロミデプシンは in vivo でもアポトーシスの誘導、細胞周期停止、細胞分化誘導及び遺伝子発現量に作用を示した。また、ロミデプシンは、薬剤耐性白血病細胞株において抗腫瘍効果を示すことも示された。

ロミデプシンは、ヒトリンパ腫細胞株に対して in vivo で強い抗腫瘍効果を示した。ヒトリンパ腫由来 U-937 細胞 を腹腔内移植したマウスでは、ロミデプシンを 0.1、0.18、0.32、0.56 又は 1.0 mg/kg（0.30～3.0 mg/m^2）の用量で週 1 回又は 2 回腹腔内投与したところ、検討した両レジメンのすべての用量で対照群と比べて MST を有意に延長した。最大 MST は、週 1 回及び週 2 回投与でそれぞれ 30.5 日（0.56 mg/kg）及び 33.0 日（0.32 mg/kg）であったが、対照群（溶媒投与マウス）の MST は 20.0 日であった。また、忍容性も良好であった（CRE040013）。

ヒトメラノーマ LOX （IVMI）腫瘍細胞を移植したマウスにおいて、ロミデプシンは忍容性が良好であり、かつ、完全・部分退縮、倍加時間中央値（日）、増殖遅延及び殺腫瘍細胞数の対数変換値での評価において本異種移植細胞に対して有効性を示すことが示された（CRE000198）。本試験では、ロミデプシンの静脈内投与及び腹腔内投与を比較したが、いずれの投与方法でも、腫瘍退縮動物数の増加、増殖までの期間の延長及び殺腫瘍細胞数の増加が認められた。その抗腫瘍効果は、腹腔内投与よりも静脈内投与の方が高かった。4 日ごと（Q4D）の間欠静脈内投与スケジュールでは、連日投与スケジュールよりも高い用量のロミデプシンが投与可能であり、より高い抗腫瘍効果が得られることが確認された。本試験では、ロミデプシンを 4 日ごとに計 3 回で間欠静脈内投与した方が、連日投与よりも忍容性も良好であった（CRE000198）。実際、ロミデプシンを 1.44 又は 2.16 mg/kg の用量で連続 5 日間静脈内投与したときに、完全退縮が 10 例中 3 例で認められた。一方、5.3 又は 8.0 mg/kg の用量を間欠静脈内投与したときには、完全退縮は 10 例中 10 例に認められた。また、間欠投与スケジュールでは、腫瘍増殖までの期間の延長が連日投与スケジュールの 1.6～2 倍に延長された。MTD は、連日投与で 1.44 mg/kg（4.32 mg/m^2）と判断されたが、間欠投与スケジュールで投与したマウスの MTD は 8.0 mg/kg（32.4 mg/m^2）であり更に高かった（CRE000198）。

ヒト胃がん由来 SC-6 並びにヒト肺がん由来 Lu-65、LC-6 及び A549 の各種ヒト腫瘍細胞異種移植モデルでは、ロミデプシン（3.2～5.6 mg/kg）を間欠投与スケジュール（4 日ごとに計 3 回投与）で静脈内投与したマウスでは、70%を上回る腫瘍増殖抑制が得られた（Ueda, 1994b）。胸腺欠損ヌードマウスを用いて、同投与スケジュールでのロミデプシンの抗腫瘍効果を評価した結果、ヒト骨肉腫（OST 及び Takao 細胞株）異種移植モデルに対しては 5.6 mg/kg の用量（Imai, 2003）、ヒト前立腺がん PC-3 及びヒト腎臓がん RXF-631L 細胞異種移植モデルに対しては 1.8 及び 3.2 mg/kg の用量（CRE010131）で抗腫瘍効果が認められた。また、ロミデプシンは SC-6、ヒト肺がん由来 PC-9 及び LX-1 細胞、ヒト乳がん由来 MX-1 及び MCF7 細胞、ヒト結腸癌 Colo 201 細胞異種移植ヌードマウスにおいて腫瘍増殖を著明に抑制（56～69%）した。（CRR910025）。ヒト非小細胞肺がん由来 NCI-H522 及び MX-1 細胞異種移植モデルに対するロミデプシンの作用についても評価したが、ロミデプシン［2.40～8.0 mg/kg（7.2～24.0 mg/m^2）の用量を 4 日ごとに計 3 回投与］は、MX-1 細胞異種移植モデルに対して中等度の抗腫瘍効果を示した（CRE000198）。

ロミデプシンは、*in vivo* で多数の遺伝子の発現を誘導又は抑制した。これらの遺伝子の一部は、細胞周期及びアポトーシスなどの重要な細胞機能の制御において重要な役割を果たすことが示されている。ロミデプシンによる p21$^{WAF1/Cip1}$ のトランス活性化は、様々な細胞種及び腫瘍において一貫してみられた。p21$^{WAF1/Cip1}$ 遺伝子発現量は、HDAC 阻害剤による G_1 期での細胞周期停止に重要であることが既に明らかにされており（Richon, 2000）、このことから、p21$^{WAF1/Cip1}$ 遺伝子はロミデプシンの腫瘍増殖抑制作用の重要な標的である可能性がある。これらの試験においてロミデプシンにより制御され、ロミデプシンの抗腫瘍効果に関与する可能性のある他の遺伝子には、アポトーシスに関与する遺伝子（DUSP1、カスパーゼ 9）、腫瘍血管新生に関与する遺伝子（VEGF、bFGF）並びにがん遺伝子（c-myc）が含まれることが明らかとなった。マウスを用いた試験では、ロミデプシンの抗腫瘍効果は遺伝子発現と相関することが示された。PC-3 腫瘍細胞を移植したマウスにおいて、ロミデプシン（3.2 mg/kg）の投与により、p21$^{WAF1/Cip1}$、β-アクチン及び c-myc の mRNA 発現量が変化した。*In vitro* 試験及び *in vivo* 試験で認められた p21$^{WAF1/Cip1}$ 遺伝子発現の誘導及び c-myc 遺伝子発現の抑制は、ロミデプシンの抗腫瘍効果と相関している。また、*in vivo* での抗腫瘍効果は p21$^{WAF1/Cip1}$ mRNA の基準発現量と負の相関を示し、c-myc mRNA の基準発現量と正の相関を示した（CRE010158）。

3.2.　安全性薬理試験

ヒトの安全性に関連するロミデプシンの薬理学的特性を評価するために、中枢神経系、心血管系及び呼吸器系の重要な機能に対する一連の安全性薬理試験を *in vitro* 及び *in vivo* で実施した（2.6.2.4 項）。*In vitro* 試験として、ロミデプシンの hERG チャネル電流に対する作用並びにモルモット乳頭筋の活動電位持続時間を検討する電気生理学的試験を実施した。生物学的に重要な多数の受容体及びイオンチャネルへのロミデプシン及び還元型ロミデプシンの結合を評価する試験も実施した。*In vivo* 試験では、ロミデプシンを 4 時間静脈内持続注入してラットの中枢神経系並びにイヌの中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に対する作用を検討した。

3.2.1.　中枢神経系

ラットを用いて中枢神経系に対するロミデプシン［0.10～1.0 mg/kg（0.60～6.0 mg/m^2）］の作用を Irwin 評価法（Irwin, 1968）により検討した（GLR030774）。ロミデプシンを 0.1 mg/kg（0.60 mg/m^2）の用量で 4 時間静脈内持続注入した結果、ラットの一般症状及び行動に対する作用はみられなかった。0.3 mg/kg（1.8 mg/m^2）では、中枢神経系に対して、静脈内持続注入開始 1~4 時間後に 6 例中 1 例において四肢の緊張及び握力の低下、活動性の低下が観察された。MTD の 1 mg/kg（6 mg/m^2）では、活動性の低下、驚愕反応の低下（6 例中 1 例）、四肢の緊張及び握力の低下（6 例中 1 例）がみられ、これらの作用は投与量に依存すると考えられた。静脈内持続注入開始後 24 時間に 6 例中 3 例が死亡した。生存例では血漿中薬物濃度に依存しない遅延発性作用として、

活動性の低下、運動失調、歩行異常、攣縮、痙攣、疼痛反応の低下、驚愕反応の低下、四肢の緊張及び握力の低下、半眼、心拍数増加並びに呼吸数増加が認められた。

無麻酔イヌを用いて中枢神経系に対するロミデプシンの作用を評価した。ロミデプシンを 0.1、0.3 又は 1.0 mg/kg（2.0、6.0 又は 20 mg/m^2）の用量で 4 時間静脈内持続注入した結果、自発運動量の増加が 0.1 及び 0.3 mg/kg で認められ、体温上昇が 0.3 及び 1.0 mg/kg で認められた。本試験の最高用量かつ MTD の 1 mg/kg（20 mg/m^2）では自発運動低下は認められなかったが、摂餌量減少及び体温上昇がみられた（GLR030775）。

3.2.2. 心血管系

hERG チャネルをトランスフェクトしたヒト胎児腎（HEK293）細胞でのカリウムチャネル電流に対するロミデプシン処置による作用を、ホールセルパッチクランプ法を用いて検討した結果、ロミデプシンは 1 及び 10 µg/mL の濃度で hERG チャネル電流を 有意に阻害し、阻害率は、それぞれ 18%及び 37.3%であった。しかしながら、臨床投与量でのロミデプシンの血漿中濃度である 0.3 µg/mL ではロミデプシンによる hERG チャネル電流阻害率（7.9%）は、溶媒対照値と統計学的に有意な差はなかった（ロミデプシンを 14 mg/m^2 の用量で 4 時間静脈内投与したときの最高血漿中濃度（C_{max}）の平均値は 377 ng/mL）。陽性対照である E-4031 は、1×10^{-7} mol/L の濃度で hERG チャネル電流を 82.5%阻害した。したがって、ロミデプシンは比較的高濃度でも、hERG チャネル電流を阻害する可能性は低いと考えられた（GLR030533）。

モルモット乳頭筋標本の活動電位に対するロミデプシンの作用を検討した結果、ロミデプシンは 1 µg/mL までの濃度で、90%再分極時の活動電位持続時間（APD_{90}）、静止膜電位、活動電位振幅及び最大立ち上がり速度に対して影響を与えなかった。一方、試験最高濃度（10 µg/mL）では活動電位振幅を減少させ、APD_{90} を有意に短縮したが、静止膜電位及び最大立ち上がり速度に対しては影響を与えなかった。本濃度は、14 mg/m^2（ロミデプシンの推定臨床用量）を持続投与の推定 C_{max} の 20 倍を上回る濃度であった（GLR030460）。

マウスを用いた探索試験において心毒性を評価した結果、剖検時に心臓の肉眼的異常所見は認められなかった（[redacted]1145-6464-LXXX）。

ロミデプシンの心血管系に対する作用を無麻酔イヌを用いたテレメトリー法を用いて評価した（GLR030775）。ロミデプシンを 0.10、0.30 又は 1.0 mg/kg（2.0、6.0 又は 20 mg/m^2）の用量で 4 時間静脈内持続注入した結果、0.10 及び 0.30 mg/kg の用量で心拍数の軽度の増加が認められたが、この増加は、対照値と比較して統計学的に有意ではなかった。1.0 mg/kg（20 mg/m^2）の用量では、心拍数が有意に増加（34%）し、静脈内持続投与後 4.5～10 時間持続した。PR 間隔及び QRS 間隔に対する作用は、ロミデプシンのいずれの用量でも認められなかった。1.0 mg/kg でのその他の関連する所見として、統計学的に有意な QTc 延長（5～8%）が認められたが、この所見は散発的であり、静脈内持続注入終了 24 時間後ではベースラインまで回復した。2 週間の回復期間後におけるロミデプシン投与群の QTc は、対照群で認められた値と同程度であった。心拍数及び QT 間隔の変化に伴う心臓での病理組織学的異常所見はみられなかった。

3.2.3. 呼吸器系

呼吸器系に対するロミデプシンの作用を無麻酔イヌを用いて評価した（GLR030775）。ロミデプシンを 0.10、0.3 又は 1.0 mg/kg（2.0、6.0 又は 20 mg/m^2）の用量で 4 時間静脈内持続注入した結果、呼吸器系に対するロミデプシンの影響は認められなかった。

3.2.4. 造血系

ロミデプシンを 0.1、0.3 及び 1 mg/kg（2.0、6.0 及び 20 mg/m^2）の用量でイヌに間欠投与スケジュールにより 4 時間静脈内持続注入した結果、血液学的パラメータの有意な変化が認められた。
0.3 mg/kg の用量では、平均赤血球ヘモグロビン濃度（MCHC）の有意な増加並びにリンパ球数及び平均赤血球容積（MCV）の有意な減少が静脈内持続注入開始後 24 時間に認められた。最高用量の 1 mg/kg では、赤血球数（RBC）、ヘモグロビン（Hb）及び MCHC の有意な増加がみられ、静脈内持続注入開始後 24 時間にリンパ球数及び MCV の有意な減少が認められた（GLR030775）。

3.2.5. 受容体及びイオンチャネル

生物学的に重要な 62 種類の受容体及びイオンチャネルに対するロミデプシンの結合親和性を *in vitro* 試験で検討した（GLR030404）。ロミデプシンは、10 µg/mL の濃度まで、心臓の各種受容体及びイオンチャネルに対して、対照化合物と比較して有意な結合親和性を示さなかった。また、検討した多くの受容体及びイオンチャネルに対して、結合親和性は認められなかった。エストロゲン受容体及びニューロキニン 2 受容体に対するロミデプシンの阻害率は濃度依存的であった。カルシウムチャネル及びカリウムチャネルに対する結合阻害は認められなかった。

3.3. 薬力学的薬物相互作用

一般的な薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。ロミデプシンは医療現場では他の抗悪性腫瘍剤と併用投与されることが考えられるため、ロミデプシンと他の抗がん剤との併用投与試験を実施した。*In vitro* 試験として、ヒト前立腺がん由来 DU-145 細胞の細胞増殖抑制作用をロミデプシン単独又は各種抗悪性腫瘍剤との併用下で検討した。従来から臨床的に広く使用されているドキソルビシン、シスプラチン、エトポシド、フルオロウラシル又はパクリタキセルとの併用試験では、多くの場合において相乗的な、一部は相加的な細胞増殖阻害作用が認められた（CRE040062）。また、*in vivo* 試験として、マウス白血病由来 L-1210 細胞移植モデル（CRE040011）並びにヒト膵臓がん由来 PANC-1 細胞及び BxPC-3 細胞の異種移植モデル（vvglou0501.v2）を用いてロミデプシンと各種抗がん剤との併用投与での抗腫瘍効果を検討した。その結果、ドキソルビシン又はゲムシタビン塩酸塩との併用投与により、抗腫瘍作用が増強された。

3.4. 結論

ロミデプシンは、多様な抗腫瘍効果を有する新規かつ強力な HDAC 阻害剤である。In vitro 及び in vivo において、ロミデプシン処置により、多数の重要な制御遺伝子が誘導及び抑制された。ロミデプシンは転写調節作用を介して、細胞増殖抑制、細胞周期停止、アポトーシス誘導、変異細胞の形態学的復帰、血管新生阻害、血管新生因子（VEGF、bFGF 等）の発現抑制などの多彩な抗腫瘍作用を示す。また、ロミデプシン処置により、腫瘍抑制タンパク質 p53、転写因子（EF2 等）、分子シャペロンタンパク質（Hsp90 等）を含む複数のヒストンとは異なるタンパク質のアセチル化の亢進が認められている。これらの作用の多くは、末梢 T 細胞リンパ腫（PTCL）患者にロミデプシン投与によりみられる臨床的な有効性に重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、ロミデプシンの有効性に関連する作用機序は、完全には明らかにされていない。In vivo 安全性薬理試験において、心血管系及び中枢神経系に対して軽度ではあるが用量依存的な作用が認められたが、ロミデプシン投与による呼吸器系への作用は認められなかった。

4. 薬物動態試験

ラット及びイヌにロミデプシンを静脈内ボーラス投与又は静脈内持続投与したときの血漿 PK の評価を実施した。ラット及びイヌ血漿中ロミデプシン濃度の測定には、バリデートされた高感度かつ特異的な液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析法を使用した（2.6.4.2 項）。

4.1. 吸収

ラット 26 週間反復間欠静脈内ボーラス投与試験（501650）において、用量 0.33 mg/kg 未満では、ロミデプシンの PK に関する十分な特性評価はできなかった。反復投与時の PK パラメータの要約を Table 4 に示す。1 日目の血漿中濃度は、初回ボーラス投与終了直後に C_{max}（3.27～36.9 ng/mL）を示した後、最初の 1 時間で速やかに低下した。投与 1 時間後までに平均血漿中濃度は 5 ng/mL 未満となり、投与後 4 時間には定量下限（0.5 ng/mL）に近い値となった。急速に消失したため、正確な終末相消失半減期（$t_{1/2}$）を算出することは困難であった。初回投与後（0.33 及び 0.67 mg/kg）の $t_{1/2}$ は 0.2～0.9 時間と推定された。

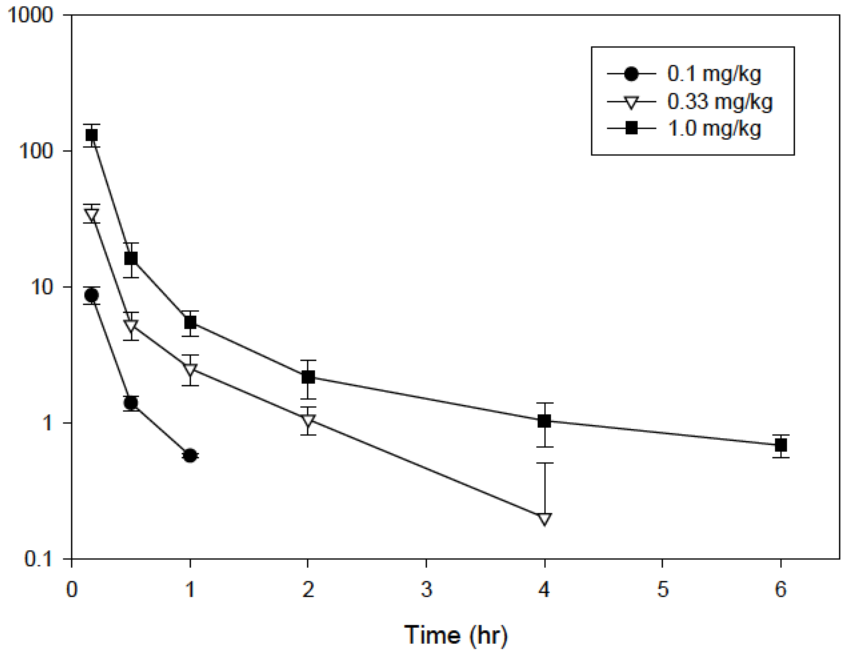
Table 4:　ロミデプシンをラットに単回及び 26 週間反復間欠静脈内ボーラス投与したときの薬物動態パラメータ（平均値及び SD）

投与量 (mg/kg)	C_{max} Day 1 (ng/mL)	C_{max} Day 176 (ng/mL)	$t_{1/2}$ Day 1 (h)	$t_{1/2}$ Day 176 (h)
0.1	3.74 (0.49)	8.63 (1.26)	NC[a]	0.218
0.33	17.2 (3.7)	34.6 (5.3)	0.465	0.900
0.67/1.0[b]	29.9 (5.6)	130 (25)	0.673	1.57

[a] NC：算出せず。血漿中濃度推移の終末相を特定できないため、kel を推定することができなかった。
[b] 最初の 2 週間（2 回投与）は 0.67 mg/kg であったが、その後、残りの試験期間（24 週間）にわたり 1.0 mg/kg に増量した。

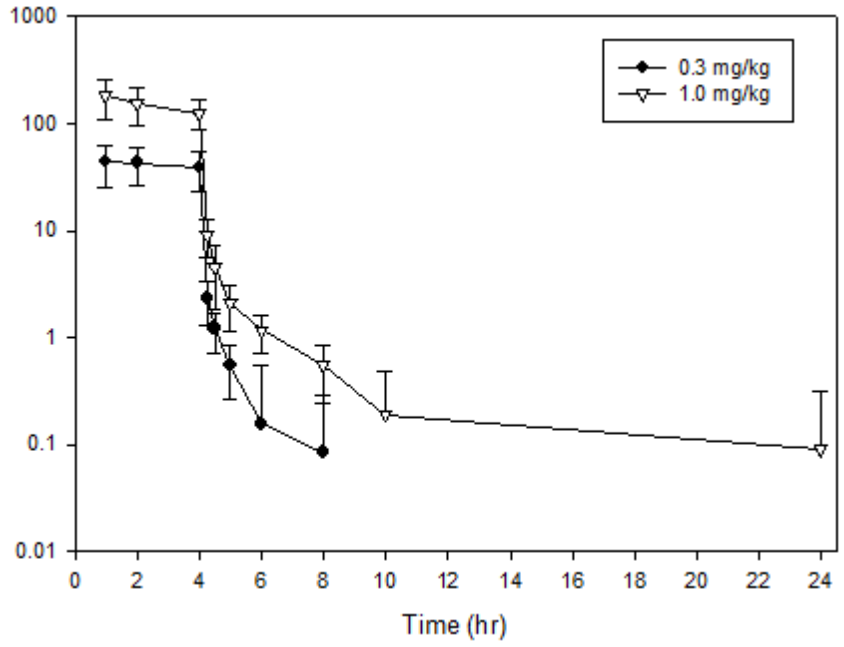
中及び高用量（0.33 及び 1.0 mg/kg）では、26 週間反復間欠静脈内ボーラス投与でのロミデプシンの血漿 PK（Day 176）の血漿 C_{max} 平均値は 3.5～130 ng/mL の範囲であり、データをプロットすることにより、終末消失相を良好に特定することができた。0.33 mg/kg 以上を静脈内ボーラス投与したときの血漿中濃度推移は、初期の速やかな分布相に続いて、終末消失相からなる二相性を示した（Figure 1 ）。これらのデータから、ラットでのロミデプシンの $t_{1/2}$ は 1～1.6 時間であると推定され検討した用量範囲で線形性を示すと考えられた。反復投与により、終末相の血漿曝露量は増加すると考えられたが、投与前の血漿中濃度（トラフ値）に基づく評価では反復投与による蓄積性は確認されなかった。

Figure 1: ロミデプシンをラットに 26 週間反復間欠静脈内ボーラス投与したときの平均血漿中濃度推移（ng/mL、平均値±SD）（Day 176）



イヌにロミデプシンを単回 4 時間持続静脈内投与したときの血漿中濃度推移もラットと同様であったが、ラットに静脈内ボーラス投与したときの $t_{1/2}$ に比べて、イヌの $t_{1/2}$ は長いと考えられた（GLR040231）。また血漿中濃度推移は、投与終了後から二相性を示した（Figure 2 ）。初期の速やかな分布相に続いて、ラットに静脈内ボーラス投与したときに比べて長く緩徐な終末相が認められた。イヌの血漿中濃度は投与 6 時間後以降も測定可能であった。算出した $t_{1/2}$ は 4 時間以上であると推定された。C_{max} は投与開始 1～2 時間後に認められ、C_{max} 平均値は用量 0.3 及び 1.0 mg/kg のそれぞれで 46.1 及び 182 ng/mL であった。

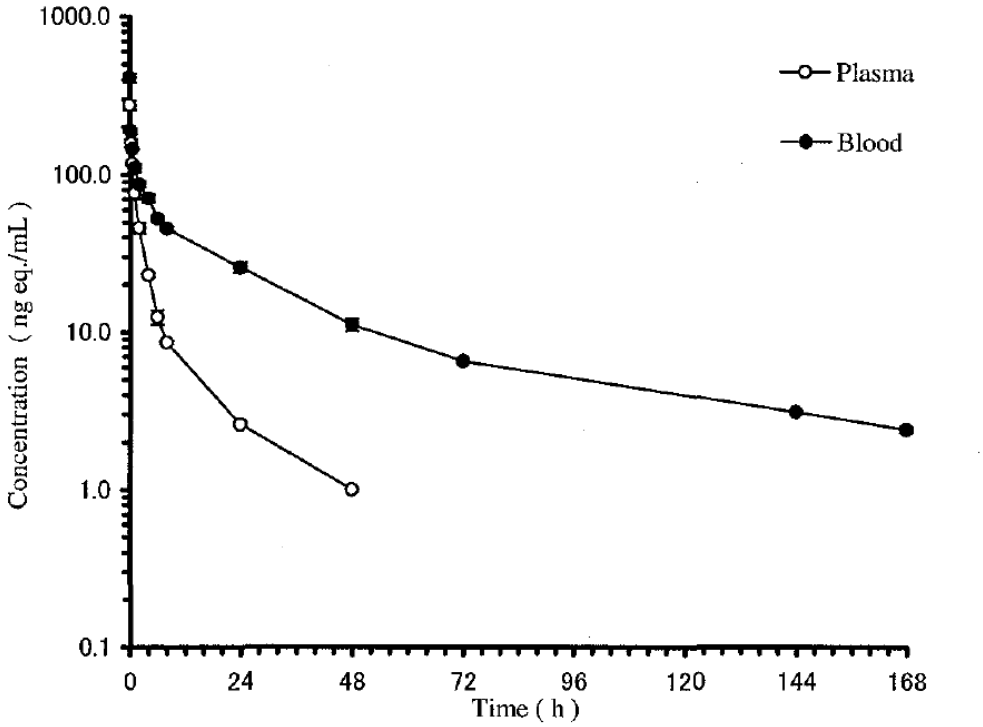
Figure 2: ロミデプシンをイヌに単回 4 時間持続静脈内投与したときの平均血漿中濃度推移（ng/mL、平均値±SD）



ラット及びイヌの結果から、ロミデプシンの PK は検討した用量範囲で線形性を示すことが明らかになり、曝露量及び血漿中濃度推移に性差は認められなかった。

[^{14}C]-ロミデプシンを用いて、ラットでのロミデプシンの PK 及び組織内分布を検討した（CRD040009）。血漿及び血液中放射能濃度推移を Figure 3 に示す。非放射性標識体を用いた試験と同様に、[^{14}C]-ロミデプシン由来放射能の血漿中濃度推移の特徴として、初期の速やかな α 分布相に続き、緩徐な終末消失相が認められた。0.3 mg/kg（28.6 μCi/kg）を単回静脈内投与したとき、最初の採血時点である投与 5 分後に 277 ng 当量/mL（ng eq./mL）の C_{max} が認められた。この値は非放射性標識体を用いた試験で認められた C_{max} に比べてはるかに高く、薬物動態プロファイルの非常に早い時点で代謝物が存在している可能性が示された。同じ時点の血液中 C_{max} 平均値は 412 ng eq./mL であった。血漿及び血液中いずれにおいても、総放射能濃度は多次元指数関数的に低下したが、血漿中消失はより速やかで、$t_{1/2}$ は血漿中で 13.2 時間、血液中で 66.9 時間であった。この結果は、代謝物の消失速度は未変化体に比べて遅いことを示していると考えられる。血液中放射能濃度はすべての採血時点において血漿中濃度より高かった。

Figure 3: [^{14}C]-ロミデプシンをラットに単回静脈内ボーラス投与したときの血漿及び血液中放射能濃度推移（ng eq./mL）



4.2.　分布

ラットに[^{14}C]-ロミデプシンを静脈内投与したときのロミデプシンの組織内分布を評価した（CRD040009）。放射能活性は速やかに組織に分布し、標的器官への選択的分布はほとんど認められなかった。回腸を除いて、投与後 5 分に採取したすべての組織及び器官中の総放射能濃度は、その後の試料採取時点に比べて高かった。投与後 5 分の放射能濃度は腎臓で最も高く、膀胱、空腸及び肝臓でも高い濃度が認められた。対照的に、投与後 5 分の脳、精巣、白色脂肪、眼球及び大腿骨の放射能濃度は非常に低かった。投与後 4 時間に採取した組織及び器官中の放射能濃度はすべて、血漿中濃度と概ね同程度又はそれ以上であったが、例外として、脳、眼球及び精巣中の放射能濃度は血漿中濃度に比べて低いか、又は定量下限未満であった。投与後 24 時間に採取したすべての組織／器官中の放射能濃度の血漿中濃度に対する比は、投与後 4 時間に比べて高く、組織／器官からの放射能の消失は血漿からの消失に比べて緩徐であることが示された。投与後 168 時間には、脳、白色脂肪及び前立腺に放射能は検出されず、血漿中放射能濃度は定量下限未満であった。

4.2.1.　In vitro タンパク結合（複数の動物種）

ラット、イヌ及びヒトでのロミデプシンのタンパク結合を検討した（CRD040011）。ロミデプシンのタンパク結合に種差が認められ、タンパク結合率はラット血清で 37.8～40.8%、イヌ血清で 73.1～87.7%、ヒト血清で 82.2～94.5%、ヒト血漿で 82.3～93.8%であった。ラット血清中のタンパク結合率は 50～5000 ng/mL の濃度範囲で一定していた。イヌ及びヒト血清では、飽和によると考えられるが、濃度 5000 ng/mL で結合率は低下した（イヌ：約 73%、ヒト：約 82%）。ヒト血清中での結合率は、濃度 1000 ng/mL まで一定（約 95%）であった。

ヒト血清アルブミン及び α_1-酸性糖タンパク質（α_1-AGP）に対する特異的結合率はそれぞれ、19.9%及び 93.5%であり、ヒト血清中での主要結合タンパク質は α_1-AGP であることが示唆された。

4.2.2.　血球移行（複数の動物種）

ラット、イヌ及びヒト試料中での[^{14}C]-ロミデプシンの血液／血漿中濃度比（B/P 比）を濃度範囲 50～5000 ng/mL で in vitro 評価した（CRD040012）。ロミデプシンの B/P 比は、ラット及びヒトにおいて 50～5000 ng/mL の濃度範囲でほぼ一定であった（ラット及びヒトそれぞれで、0.68～0.75 及び 0.56～0.61）。イヌの B/P 比は、ロミデプシン濃度 50～500 ng/mL の範囲で 0.58～0.59 であり、5000 ng/mL で 0.65 とわずかに上昇した。

4.3.　代謝

ラットを用いた in vivo 試験で得られた試料、並びにラット及びヒトの肝ミクロソームを用いた in vitro 試験で得られた試料中に約 30 種類の代謝物が特定された（CRD040013）。ラットに 0.3 mg/kg の[^{14}C]-ロミデプシンを静脈内ボーラス投与し、48 時間後まで採取した糞を HPLC で分離し、液体シンチレーションカウンターで放射能レベルを測定したとき、30 本の放射能ピークが特定された（CRD040010）。血漿、尿及び胆汁での HPLC クロマトグラム上に認められた放射能ピークは糞中より少なかったが、各試料中に 12 種類以上の代謝物が含まれていた。尿中放射能の約 25%が未変化体であり、投与後 48 時間までの尿中未変化体排泄率は 5%未満であった。血漿中の放射能の多くは血漿タンパクに結合していると考えられ、in vivo での血漿タンパク結合率が高いことがさらに裏付けられた。血漿中に存在する各代謝物が投与した放射能に占める割合は 4.9%未満であった。

代謝に関する種差を評価するため、ラット、イヌ及びヒト由来の肝 S9 画分及びミクロソームを用いた in vitro 代謝プロファイルの評価も行った（CRD030200）。[^{14}C]-ロミデプシンを各動物種由来の肝ミクロソームとともにインキュベーションしたとき、少なくとも 20 種類の代謝物が生成した。この試験において、親化合物の消失速度はラット及びヒトで類似していると考えられたが、イヌのミクロソームでの消失速度はこれより緩徐であった。反応液にジチオスレイトールを添加したとき、放射能の回収率が上昇したことから、可逆的ジスルフィド結合を介する[^{14}C]-ロミデプシン及び関連代謝物のタンパク結合が示唆された。[^{14}C]-ロミデプシンは中性条件下で迅速かつ非酵素的にグルタチオンと反応し、還元型ロミデプシンを産生した。雄ラット、雄イヌ及びヒト由来の肝ミクロソームによるロミデプシンの代謝において、質的及び量的に明らかな差は認められなかった。

ラット又はヒトのミクロソームによる in vitro 代謝及びラット胆汁中に認められた 28 種類の代謝物の構造を解析した（CRD040013）。広範な代謝パターンは、ラットとヒトで類似していた。また、これらの代謝物に大きな偏りはなく、各代謝物が占める割合は 5%未満であったことより、ヒトでの毒性評価ためにラットを使用することは妥当と考えられた。

患者の血漿中には投与薬物関連成分としてはロミデプシンのみが検出され、代謝物は検出されなかった（ROMI-DMPK-1510）

4.4.　排泄（ラット）

ラットに[^{14}C]-ロミデプシンを 0.3 mg/kg の単回静脈内ボーラス投与したときの放射能の排泄物及び呼気中排泄を検討した（CRD040009）。投与した放射能の 90%以上（対投与量%）が投与後 48 時間に排泄され、ロミデプシンの半減期が短く、広範な代謝及び分布を示すことと一致した。投与後 168 時間以内に、投与した放射能の約 98%が動物から回収された。総放射能の 20%未満が尿中に回収された（CRD040009）。尿中に排泄された放射能関連物質の化学構造の評価から、未変化体が占める割合は 5%未満であることが明らかになった（CRD040010）。ラットでのロミデプシン及び関連する代謝物の主な排泄経路は糞中排泄であり、投与した放射能の 79.4%が投与後 168 時間までに糞中から回収された。また、胆管カニュレーション処置ラットを用いて、総放射能の胆汁中排泄を

評価した結果、無処置ラットと同様の排泄パターンが認められることが明らかになった（Table 5）。胆管カニュレーション処置ラットで投与後 48 時間までに投与量の 66.1%が胆汁中から回収され、これに加えて 5.2%が糞中から回収された。総放射能の約 20%が尿中から回収されたことから、ロミデプシン及び関連代謝物の最も重要な消失経路は肝臓を介した経路であることが示唆された（CRD040009）。

Table 5:　胆管カニュレーション処置雄ラットに[^{14}C] ロミデプシン（投与量：0.3 mg/kg）を静脈内ボーラス投与したときの胆汁、尿及び糞中への累積放射能排泄率；CRD040009

試料	時間（h）	累積放射能排泄率（平均値及び SE）[a]（対投与量%）
胆汁	0-4	55.4 (1.1)
	0-8	59.7 (1.3)
	0-24	63.6 (2.1)
	0-48	66.1 (2.4)
尿	0-4	14.7 (1.8)
	0-8	16.1 (1.9)
	0-24	18.9 (2.2)
	0-48	20.0 (2.5)
糞	0-24	3.8 (0.6)
	0-48	5.2 (0.2)
消化管内容物	48	0.8 (0.1)
屍体	48	7.5 (0.4)
総回収率	0-48	99.6 (0.2)

[a] ラット 3 例の平均値（SE）

4.5. 薬物相互作用

ヒト肝ミクロソーム及び cDNA 発現のヒト CYP を用いて、ロミデプシンの代謝に関与する CYP アイソザイムを評価した。これらの in vitro 試験において、ロミデプシンの代謝に関与する酵素は主に CYP3A4 であり、CYP3A5、1A1、2B6 及び 2C19 の関与は副次的なものであった。その他の CYP アイソザイムはロミデプシンの代謝活性に関与しなかった（CRD030201）。

2 つの別試験（CRD030209 及び ROMI-DMPK-1479）において、100µmol/L（臨床で用量 14 mg/m^2 を 4 時間持続投与したときの C_{max} 平均値 1 µmol/L の約 100 倍）のロミデプシンは CYP3A4（62～70%）、2C19（64%）、2D6（24%）、2B6（26%）及び 2C8（37%）の活性を阻害したが、10µmol/L（臨床で認められた C_{max} 平均値の約 10 倍）のロミデプシンは、いずれの CYP アイソザイムの活性も阻害せず、臨床濃度のロミデプシンがこれらの CYP アイソザイムを阻害しないことが示唆された。ロミデプシン（0.5～10 µmol/L）をヒト培養肝細胞とともに 2 日間連続処理しても、CYP2B6 及び CYP3A4/5 の触媒活性及び mRNA 発現は誘導されなかった。ロミデプシンは CYP1A2 に対して弱い誘導作用を示したが（陽性対照の 10%未満）、臨床上の問題はないと考えられた（ROMI-DMPK-001）。

ロミデプシンの細胞毒性作用に対する抵抗性を獲得したがん細胞株での P-糖タンパク（P-gp）や多剤耐性関連タンパク質 1（MRP1）のようなトランスポータータンパク質の過剰発現が、ロミデプシンの細胞毒性作用に対する耐性を生み出すことを示唆する報告がある（Peart、 2003；Robey、 2008）。これらの報告は、ロミデプシンが流出ポンプの基質であることを意味するが、細胞毒性が評価されただけで、ロミデプシンの双方向の透過性に関する明らかな検討は行われていない。その他、単層の Caco-2 細胞を用いたロミデプシンの双方向の透過性を検討することによりロミデプシンと P-gp との相互作用の程度を明らかにした報告がある（Xiao、 2005）。当該報告では、ロミデプシンは Caco-2 細胞単層膜ではほぼ単一方向へのみ透過することが示され、膜での基底外側から頂端部（B → A）への透過性は頂端部から基底外側（A → B）への透過性より約 30 倍大きかった。検討したロミデプシンの濃度では明らかな P-gp の飽和は認められず、ロミデプシンは P-gp の強力な基質ではないことが示唆された。また、シクロスポリン A 及びベラパミルによる P-gp の阻害によって、B → A 透過係数は低下し、A → B 透過係数は増大した。ヒトの赤血球では、ロミデプシンの濃度依存的取込み及び飽和的流出が認められた（Xiao、 2005）。その他に、P-gp とロミデプシンとの相互作用を他の多くの基質や阻害薬で評価している報告がある（Scala、 1997）。当該報告で、10 µM の

ロミデプシンでは P-gp の基質であるベラパミルの蓄積は認められなかった。以上、これらの文献報告によりロミデプシンは P-gp の基質ではあるが、阻害薬ではないことが示されている。したがって、ロミデプシンが P-gp を阻害して臨床的に重要な薬物相互作用を引き起こす可能性は低いと考えられる。また、ロミデプシンが薬物トランスポーター（BCRP、MRP2、MDR1、BSEP、OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT2）の基質又は阻害薬であるかを in vitro 試験で評価した（ROMI-DMPK-1442）。当該試験で、該当するトランスポーターを発現させた小胞又は細胞で、1 及び 10 μmol/L のロミデプシンの取込み又は阻害を評価した結果、ロミデプシンは BCRP、BSEP、MRP2、OAT1、OAT3、OATP1B1、OATP1B3、OCT2 の各トランスポーターの基質ではないことが示された。また、臨床的に用いられる濃度で、ロミデプシンは BCRP、MDR1、BSEP、MRP2、OAT1、OAT3、OATP1B1、OATP1B3、OCT2 に対して顕著な阻害を示さなかった。したがって、ロミデプシンがこれらのトランスポーターを阻害することにより臨床的に重要な相互作用を引き起こす可能性はないと考えられる。

4.6. 結論

ラット及びイヌにロミデプシンを静脈内ボーラス投与又は静脈内持続投与したときの血漿 PK の評価を行った。いずれの場合についても、片対数グラフを用いて、血漿中濃度を時間に対してプロットすることにより得られる血漿中濃度推移は、多次元指数関数曲線によくあてはまった。初期の分布相では、ロミデプシンが血漿から多くの組織及び器官系へと速やかに分布し、この初期分布に続く期間の $t_{1/2}$ は、ラットでの 1 時間未満からイヌでの 4 時間以上まで多様であると推定された。ロミデプシンの曝露量は、検討した用量範囲で線形性を示すと考えられた。ロミデプシンの主な消失経路は肝臓での代謝及び代謝物の胆汁中排泄であり、ラット及びヒトで 30 種類の代謝物が特定されており、投与したロミデプシンの>5%を占める単一の代謝物は存在しなかった。ロミデプシンの代謝プロファイルはラットとヒトで類似していることから、ロミデプシンの毒性評価動物種としてラットは妥当と考えられた。

5. 毒性試験

5.1. 単回及び反復投与毒性試験

ロミデプシンの包括的毒性評価には動物種としてラット及びイヌを選択した。

単回投与毒性試験はロミデプシンをラット及びイヌに単回ボーラス静脈内投与で実施した。（2.6.6.2 項）

ラットではロミデプシンに起因する死亡例が認められ、概略の致死量は雄で 2.6～3.6 mg/kg、雌で 3.6 mg/kg と推定された（GLR910291）。イヌでは死亡例は認められなかったが、一般状態変化の発現頻度及び重症度が 0.1～1.0 mg/kg で用量依存的に増加した（GLR910294）。

反復投与毒性試験はラット及びイヌを用いたボーラス静脈内投与による連続反復投与試験及び間欠反復投与試験並びに静脈内持続注入による間欠反復投与試験を実施した。（2.6.6.3 項）

ラットでは静脈内ボーラス反復投与試験（GLR910292、GLR910293）で最高用量 1.0 mg/kg 投与群で死亡例が認められ、一方、26 週間反復間欠静脈内ボーラス投与試験（510650）では 1.0 mg/kg においてもロミデプシンの投与に関連した死亡例は認められなかった。週 1 回 4 時間静脈内持続注入による 3 回反復投与毒性試験（GLR030561）では 1.0 mg/kg で死亡例が認められた。これらのいずれの試験においても特徴的な血液学的変化及び血液生化学的変化が認められ、病理組織学的異常が認められた。

イヌでは静脈内ボーラス連続投与試験（GLR910295、GLR910296）で 1.0 mg/kg 投与時に死亡が認められたが、間欠投与試験（GLR910297、GLR910298）では 2.0 mg/kg まで死亡例は認められなかった。1、4 及び 24 時間静脈内持続注入投与試験では 4 時間持続注入の方が 24 時間持続注入に比較し観察された毒性所見は弱かった（[redacted]318-8000-XXXVIII）。4 日に 1 回 4 時間持続注入で 3 回投与試験（[redacted]660-8000-LXXVIII）及び週 1 回 4 時間持続注入で 3 回投与した試験（GLR03590）ではいずれにおいても 1.0 mg/kg で死亡例は認められなかった。

これらの試験を通してみられたロミデプシンの主要な毒性学的変化は、投与部位の炎症、リンパ組織萎縮、リンパ節及び骨髄の変化、脾臓及び胸腺の変化並びに生殖器官／生殖系変化であった。消化管毒性も発現したが、みられたのはイヌのみであった。これらの毒性は概ね可逆的であり、ロミデプシンの投与終了時又は休薬期間中に回復が認められた。ロミデプシン投与に伴ってラット及びイヌで観察された毒性は、投与部位の変化を除いて、臨床試験でみられた副作用を示唆するものであった。

各試験での無毒性量は 4 週間静脈内ボーラス連続投与試験ではラット、イヌともに 0.0032 mg/kg 未満、26 週間間欠ボーラス投与試験ではラットで 0.1 mg/kg 未満、また、週 1 回 4 時間静脈内持続注入で 3 回投与試験ではラットで 0.1 mg/kg 未満、イヌでは 0.3 m/kg 未満と推定された。動物試験でみられたロミデプシンに関連する主な変化を以下に要約する。

5.1.1. 消化管

ロミデプシンを投与したイヌで消化管毒性がみられたが、ラットでは認められなかった。認められた変化は、血性下痢、嘔吐及び胃腸の病理組織学的変化（粘膜の鉱質沈着、粘膜の変性／壊死、出血、拡張及び粘膜の形質細胞浸潤等）が、1.0 及び 2.0 mg/kg（それぞれ 20 及び 40 mg/m^2）の用量での 24 時間及び 4 時間静脈内投与後に観察され、24 時間静脈内持続注入の方が強く認められた。 週 1 回 4 時間静脈内持続注入で 3 回投与試験においても消化管の炎症性変化が認められた。

5.1.2. 血液生化学的検査

ラット及びイヌのいずれの試験においても、血液生化学的変化は、ALT、AST、ALP 及びフィブリノゲンがしばしば増加した。イヌではコレステロール、CK 及び LDH の増加並びに BUN 及び電解質の減少もみられたが、BUN に関してラットの試験では、4 日に 1 回静脈内持続注入で 3 回投与試験のみで認められた。血液生化学的パラメータの変化に伴う特定の器官毒性は認められなかった。すべての血液生化学的変化は、いずれの動物種においても回復性のある変化であった。

5.1.3. 造血系

WBC 減少、リンパ球数及び PLT 減少並びに貧血などの血液学的変化が、ロミデプシンの用量及びスケジュールを問わず観察された。WBC 減少はラット及びイヌの両方でみられ、白血球分画の変動が認められた。赤血球系の減少も、ラット及びイヌの両方でみられたが、PLT はラットでは概ね減少したのに対し、イヌでは増加する場合もあり、Hb 及び MCHC も同様であった。これらは間欠投与の各投与間で回復がみられ、投与終了によりほぼ回復した。ロミデプシン投与による血液学的変化には、用量との関連性は認められなかった。

ラットの骨髄毒性は、1.0 mg/kg（6.0 mg/m^2）以上の用量で用量制限毒性と考えられた。ラットでみられたロミデプシンに関連する毒性は、リンパ節、脾臓及び胸腺でのリンパ球枯渇（すべての用量）、胸腺浮腫、骨髄病変及び骨髄の造血細胞枯渇は 1.0 mg/kg（6 mg/m^2）以上の用量で認められ、同様の所見はイヌにおいても 1.0 mg/kg（20 mg/m^2）以上の用量で認められた。ロミデプシンをラットに 0.10～1.0 mg/kg（0.60～6.0 mg/m^2）の用量で長期投与したときも、脾臓、胸腺及び下垂体とともに造血系が標的器官であった。胸腺及び脾臓の重量変化は、血液学的パラメータ（WBC 及び RBC）の変化に関連している可能性があると考えられた。

5.1.4. 生殖器毒性

ラットの一般毒性試験でみられた生殖器官の病理組織学的所見は、卵巣における軽微から重度の萎縮及び黄体減少を伴う卵胞活性低下から完全な卵巣不活性に及ぶものであった。萎縮は子宮にもみられ、粘膜上皮の厚さの減少並びに内膜腺の活性の低下を示していた。雄マウスで精巣萎縮がみられ，ロミデプシンの最終投与後 2 週間以上持続して認められた。一部のイヌでは、ロミデプシンの 1.0 mg/kg（20 mg/m^2）を上回る用量の投与に伴って精巣及び精巣上体の精子減少並びに精細管変性が観察された。受胎能評価のための正規の試験は実施しなかったが、雌雄の生殖器官における病理組織学的変化に基づくと、ロミデプシンは受胎能に影響を及ぼすと予想された。

5.2. 遺伝毒性試験

ロミデプシンについて、標準的な遺伝毒性試験を実施した（2.6.6.4 項）。

ロミデプシンの復帰変異原性を、ネズミチフス菌の 4 菌株及び大腸菌の 1 菌株を用いて検討した。ロミデプシンを DMSO に溶液として、本評価系での被験物質の溶解限度及びそれを上回る濃度で検討したところ、いずれの菌株においても変異原性は認められなかった（[redacted]25107）。マウスリンフォーマ細胞を用いた染色体異常試験では、ロミデプシンはマウスリンフォーマ L5178Y 細胞において 0.3 µg/mL までの濃度で極めて弱い変異原性を示した。しかし、この変化は統計学的に有意差を示すも、遺伝毒性の程度は低かったことから、生物学的意義がある可能性は低いと考えられた。また、より高い濃度では概して細胞毒性がみられた（[redacted]25590）。ロミデプシンのラット小核試験では、ラットに最大耐量[雄は 1 mg/kg（6.0 mg/m^2）、雌は 3 mg/kg（8 mg/m^2）]を静脈内投与した結果、骨髄細胞に小核は誘導されなかった（[redacted]25561）。

5.3. がん原性試験

がん原性試験は実施しなかった。

5.4. 生殖発生毒性

ロミデプシンの治療対象が進行がん治療であるため、受胎能及び初期発生に関する試験及び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は実施せず、胚・胎児発生に関する試験のみ実施した（2.6.6.6 項）。

胚・胎児発生に関する試験では、雌ラットを用いて、ロミデプシンを 0.006、0.02、及び 0.06 mg/kg の用量で妊娠 6 日から 16 日まで連日静脈内投与した。生存期間中の所見として、母動物の体重及び摂餌量が 0.06 mg/kg の用量で減少した。平均胎児体重減少が 0.06 及び 0.02 mg/kg で認められた。しかしながら、その他の胎児毒性は認められなかった（[redacted]25501）。

より高用量を用いたラット胚・胎児発生試験を実施した（ROMI-TOX-005）。0.1、0.2 及び 0.5 mg/kg の用量を妊娠 6 日から 17 日まで静脈内投与した。0.5 mg/kg 群の 1 例で、妊娠 18 日に死亡が発見された。0.5 mg/kg 群の母動物では、一般状態の変化として、膣周囲物質（褐色又は赤色）、円背位、軽度、中等度又は重度の脱水、尾の腫脹、耳褪色、四肢褪色及び自発運動低下が観察された。ロミデプシンの 0.1、0.2 及び 0.5 mg/kg 群で、用量に依存した母動物の体重増加抑制及び摂餌量の減少又は体重減少が、対照群と比較して認められた。妊娠子宮重量及び補正した母動物体重の減少が、妊娠 21 日に 0.2 及び 0.5 mg/kg でみられた。片側又は両側の腎臓の白色隆起部位が、0.5 mg/kg 群で観察された。発生に関する所見として、全胚吸収が 0.5 mg/kg において 1 腹を除くすべての腹でみられ、初期吸収胚増加が 0.2 mg/kg で認められた。胎児体重減少が 0.2 及び 0.5 mg/kg で観察された。後肢捻転及び網膜褶曲の発現頻度増加が 0.2 mg/kg でみられた。胎児骨化遅延（尾椎、中足骨及び／又は後肢趾骨）が 0.2 及び 0.5 mg/kg でみられ、過剰胸部肋骨の発現頻度が 0.5 mg/kg で有意に増加した。これらの結果より、ロミデプシンの母動物における無毒性量は 0.1 mg/kg 未満であり、胎児発生に関する無毒性量は 0.1 mg/kg（0.6 mg/m^2； AUC_t：2.44 ng･hr/mL）であった。特筆すべきこととして、低用量で毒性変化がみられたことから、ロミデプシンは器官形成期の胎児に有害作用を及ぼす可能性が示唆された。

5.5. 局所刺激性試験

局所刺激性試験では、ロミデプシンの遅延型接触過敏症誘発能、急性皮膚刺激性及び感作能を評価した（2.6.6.7 項）。

ロミデプシンをマウスの耳に局所適用したところ、0.1%の濃度で感作性を有すると考えられ、0.025～0.1%の用量範囲で用量反応関係が認められた（[redacted]25565）。しかし、ロミデプシンをウサギの皮膚に局所適用したところ、刺激性は認められなかった（[redacted]25564）。イヌを皮内注射によりロミデプシン及び溶媒に曝露した一般毒性試験（[redacted]2-6464-XCV）において、全例で浮腫及び紅斑がみられたことから、溶媒がこれらの皮膚感作性所見の原因であることが示唆された。

5.6. 不純物に関する毒性試験

雌雄のラットにロミデプシンの不純物である *t*-ブチルアルコールを 0（溶媒）、5、50 及び 500 mg/kg の用量で週 1 回、合計 3 回静脈内投与した（ROMI-TOX-002）（2.6.6.8 項）。

高用量の 500 mg/kg/週では、一般状態に一過性の行動変化（異常歩行、運動失調、活動性低下／亢進、全身衰弱、横臥位）、生理的変化（浅呼吸／努力性呼吸、呼吸数の増加又は減少、筋緊張度低

下、部分閉眼及び脱水の疑い）、尿の変化又は尿関連の可能性がある変化（泌尿器／腹部の赤色被毛汚染、赤色尿、動物ケージ／受け皿の液状又は乾燥赤色物質）及び尾にみられたより持続的な変化（皮膚黒色化／青色化／白色化／赤色化、皮膚乾燥／痂皮／腫脹、分泌物を伴う又は伴わない病変）が認められた。赤血球系パラメータ（RBC、HCT 及び Hb）の減少及び、それに伴う網状赤血球数増加が雌雄で認められた。WBC（主として好中球及び単球）の増加も雌雄にみられた。500 mg/kg/週でみられた病理組織学的所見により、投与部位の局所刺激性が示唆された。雄ラットでは、腎臓において、$\alpha_{2\mu}$ グロブリンに一致する近位尿細管硝子滴の発現頻度及び重症度の増加が認められた。なお、無毒性量は 50 mg/kg/週であった。

5.7. その他の試験

その他の試験では、in vitro 骨髄毒性、、in vitro 心毒性、子宮への影響、ラットを用いた経口投与毒性及びマウスを用いた反復投与毒性を評価した（2.6.6.8 項）。また、ロミデプシンの光毒性及び新規添加剤（PVP K17、以下 K17）の毒性を評価した。

マウス、イヌ及びヒトの培養骨髄細胞に対するロミデプシンの毒性を検討したところ、IC_{50} はマウスで 1.0 nM、イヌで 0.35 nM 及びヒトで 0.03 nM であり培養細胞増殖抑制作用が認められた（Hipple CRC）。

新生児ラット及びイヌの心筋細胞並びに不死化ヒト胎児心筋細胞株に 0.1～100 μM の濃度の ロミデプシンを曝露したところ、細胞毒性及び LDH の遊離が認められた（[redacted]362-8000-XLI）。また、マウス in vivo 試験（[redacted]1145-6464-LXXX）において 0.2～8.0 mg/kg（0.6～24 mg/m^2）の用量範囲で 4 つの異なる投与スケジュールにより、一部の動物で LDH アイソザイムパターンに変動がみられたが、用量との関連はみられず、動物間のばらつきがあったため、これらの所見の意義は明らかでなかった。得られた限定的な血液生化学的検査及び病理組織学的検査の結果により、心臓への影響の可能性が示唆された。

ロミデプシンの子宮への影響試験を、未成熟雌ラットを用いて実施した（ROMI-TOX-003）。ロミデプシンは子宮への影響試験において 0.4 mg/kg（実際の平均 1 日用量は 0.462 mg/kg）までの用量で影響を示さなかった。

ロミデプシン製造環境での安全性を担保する目的で、ラットを用いた急性経口毒性についても評価した。その結果 17.5 mg/kg（105 mg/m^2）の用量で単回強制経口投与したときの忍容性は良好であったが、55～550 mg/kg の用量では死亡及び一般状態の変化（姿勢への影響、よろめき歩行、振戦、不整呼吸及び立毛）が用量増加に伴って観察されたが、投与後 2 日以内に消失した。ロミデプシン投与に関連する剖検所見として、胸腺の混濁及び暗色巣並びに肺の暗赤色化が認められた。ロミデプシンのラットでの経口投与の概略の致死量は、55 mg/kg（330 mg/m^2）と推定された（[redacted]25566）。

雄マウスを用いた反復投与毒性試験（[redacted]653-6464-LXXXIX）では、3.6、5.3 及び 8.0 mg/kg（10.8、15.9 及び 24 mg/m^2）の週 1 回又は 2 回の静脈内ボーラス（尾静脈）投与を 4 週間行った。いずれのスケジュール（週 1 回投与群で 10 例中 4 例及び週 2 回投与群で 10 例中 2 例）においても、高用量群で薬物誘発性の死亡がみられた。多くは投与部位の局所的変化に関連する一般状態の毒性変化の発現頻度が、ロミデプシンを週 2 回投与したマウスで増加した。投与部位の局所的変化に関連する多くの肉眼的及び病理組織学的変化もみられ、週 2 回投与群のマウスでは発現頻度及び重症度の増加が認められた。マウスでみられた毒性は、投与部位の炎症、骨髄での枯渇／過形成、脾臓の造血細胞増殖、脾臓／胸腺萎縮、肝臓の造血巣及び脂肪変性並びに精巣萎縮であった。精巣萎縮を除いて、いずれの毒性も投与終了後 2 週間以内に回復した。

ロミデプシンは 190～700 nm までのスペクトルデータから、太陽光の波長内（290～700 nm）に光の吸収帯が存在しないことが確認された（2.3.S.3.1 項）。よって、ロミデプシンには光毒性の懸念がないことが確認された。

ロミデプシン製剤中の K17 は、これまで本邦において静脈内投与で使用された実績のない新添加物に該当する。毒性試験の結果から、K17 に起因する安全性上の懸念として過敏症反応が考えられる。

5.8. 結論

ロミデプシンの非臨床試験でみられた主な毒性は、消化管及び造血系への毒性であり、臨床試験でこれまでに観察された有害作用と類似していた。なお、動物では反復投与による蓄積毒性の徴候はみられず、毒性の多くは休薬により回復した。

ラットにおける投与部位の変化、体重減少、WBC 減少、血小板減少、骨髄細胞枯渇、リンパ節のリンパ球枯渇及び肝酵素上昇といったロミデプシン誘発性の毒性について回復性が示された。ラットでみられた体重減少、摂餌量減少、血液学的及び血液生化学的変化並びに肉眼的及び病理組織学的所見は、投与間隔内又は 2 週間の休薬期間中に軽減する傾向が認められた。例外として脾臓の萎縮及びリンパ球数減少は、中用量群（1.0 mg/kg 又は 6.0 mg/m^2）及び高用量群（1.67 mg/kg 又は 10.0 mg/m^2）のいずれにおいても持続して認められた。

イヌにおける血清生化学的変化並びに骨髄、リンパ系組織、肝臓、肺及び注射部位の病理組織学的変化といったロミデプシンの反復投与により誘発された毒性は、休薬期間中に回復が認められた。検討したほぼすべての用量においても、リンパ球、分節核好中球、単球及び好酸球を含む WBC 数の一過性の減少がみられた。ヘマトクリット、ヘモグロビン及び網状赤血球数の減少もみられたが、これらのパラメータは休薬期間中に概ね正常に戻った。しかし、一部のイヌでは、リンパ球枯渇、注射部位の慢性炎症、精巣の精子減少及び貧血が、休薬期間中も引き続き認められた。

胚・胎児発生に関する試験では、母動物毒性及び発生毒性がみられた。母動物の所見として、一般状態の毒性変化並びに体重増加量、摂餌量及び体重の用量依存的な低値が認められた。妊娠子宮重量及び補正した母動物体重の減少がみられた。胎児発生に関する所見として、早期吸収胚増加、胎児体重減少、後肢捻転及び網膜褶曲を有する胎児及び腹の増加、骨化遅延並びに過剰胸部肋骨の有意な発現頻度増加が認められた。

生殖器官では、雄マウスに精巣萎縮がみられ，最終投与後 2 週間以上にわたり持続的に観察された。イヌにロミデプシンを 1.0 mg/kg（20 mg/m^2）以上の用量で投与したところ、精巣及び精巣上体の精子減少並びに精細管変性がみられ、回復は示されなかった。ラットでの生殖器官の病理組織学的所見として、軽微から重度の卵巣萎縮及び黄体数減少を伴う卵胞活性低下から完全な卵巣不活性までの変化が観察された。ラットでは子宮の萎縮が観察され、それに伴って粘膜上皮の高さの減少並びに内膜腺の活性低下が認められた。

要約すると、ロミデプシンをマウス、ラット及びイヌに投与したところ、消化管、造血系及び生殖系の毒性変化並びに血液生化学的変化が認められた。動物でみられた毒性は、いずれもロミデプシン投与終了により、又は休薬期間終了時において概ね回復が認められた。ロミデプシン投与に伴う毒性変化への忍容性には注入速度及び薬物投与スケジュールに依存し、4 時間の持続注入で間欠投与による忍容性は、より短時間の持続注入や連続投与と比較して良好であった。ロミデプシンの長期投与による蓄積毒性はみられず、6 ヵ月間投与後にみられた毒性は、2 又は 4 週間投与後にみられたものと比較してほとんど違いは認められなかった。ロミデプシンの予定臨床用量は、14 mg/m^2（28 日スケジュールの 1、8 及び 15 日目に投与）である。また、ロミデプシンは 190～700 nm までのスペクトルデータに太陽光の波長（290～700 nm）に光の吸収帯が存在しないことから、光毒性の懸念がないことが確認された。なお、ロミデプシン製剤中の新添加物 K17 の毒性試験の結果から、K17 に起因する安全性上の懸念として過敏症反応が考えられたが、ロミデプシンの有効性を考慮すると、PTCL 患者に対してロミデプシンを投与するベネフィットは潜在的なリスクを上回ると考えられる。

6. 統括及び結論

ロミデプシンは、HDAC 阻害作用を特徴とする新規二環性ペプチド製剤である。In vitro 及び in vivo において、ロミデプシン処置により、多数の重要な制御遺伝子が誘導及び抑制された。ロミデプシンは、HDAC の阻害、遺伝子発現の誘導又は抑制、細胞周期の停止、細胞分化、細胞増殖の阻害、アポトーシスの誘導、形質転換細胞の形態復帰、及び血管新生の抑制といった多様な活性を介して抗腫瘍効果を示した。また、転写因子、腫瘍抑制タンパク質、分子シャペロンタンパク質を含む複数のヒストンとは異なるタンパク質のアセチル化も亢進することが認められている。ロミデプシンは、in vitro 及び in vivo での複数のヒト腫瘍細胞異種移植モデルにおいて抗腫瘍作用が認められた。これらの抗腫瘍作用の多くは、PTCL 患者においてロミデプシン投与による臨床的有効性に重要な役割を果たしていると考えられるが、臨床的効果に関連する正確な機序は、完全には明らかにされていない。

イヌを用いたロミデプシンの心血管系に対する評価において、検討したすべての用量で軽度の心拍数の増加が認められ、また、試験最高用量の 1.0 mg/kg（20 mg/m^2）では QTc に対する散発的な作用が認められた。ロミデプシンの非臨床試験の実施中に、これらの作用の機序は特定されなかった。ロミデプシンは、生理的濃度で hERG チャネル及びモルモット活動電位に影響を与えなかった。また、主要な受容体及びイオンチャネルに対するロミデプシンの作用の検討では、ロミデプシンは薬理学的な作用を示す濃度で有意な結合を示さなかった。臨床試験では、ロミデプシン投与により QTc、T 波（陰性 T 波、2 相性 T 波等）及び ST-T 部分（ST 下降）に対する一過性作用などの心血管系作用が報告されている。

ロミデプシンはラット、イヌ及びヒト血漿中から速やかに消失した。動物試験において、ロミデプシンの PK は検討した用量範囲で線形性を示した。投与したロミデプシンはほぼすべての組織に速やかに分布した。In vitro 試験において、ロミデプシンは CYP3A4 の基質であることが明らかになった。治療濃度で、ロミデプシンは CYP450 を阻害することも、誘導することもなかった。ロミデプシンは in vivo で広範に代謝され、投与量の 5%以上を占める単一の代謝物は認められなかった。ラットにロミデプシンを投与したとき、90%以上が投与後 48 時間以内に排泄され、尿中に排泄された放射能は少量で、尿中未変化体排泄率は 5%未満であった。ロミデプシン及びその代謝物の主な排泄経路は、胆汁を介した糞中排泄であった。

動物におけるロミデプシンの毒性試験を、ラット及びイヌを用いて実施し、種々の用量での静脈内投与を、様々な注入速度及び種々の投与スケジュールの下で評価した。ロミデプシン誘発性毒性の発現頻度及び重症度においては、薬物投与速度及び投与スケジュールが重要であることが示された。ラットにおける注入部位変化、体重減少、白血球減少、血小板減少、骨髄細胞枯渇、リンパ節のリンパ球枯渇及び肝酵素上昇といったロミデプシン誘発性毒性は回復性が示された。体重減少、摂餌量減少、血液学的及び血清生化学的パラメータの変化並びに肉眼的及び病理組織学的所見は、投与間隔内又は 2 週間の休薬期間中に軽減する傾向が認められた。例外として脾臓の萎縮及びリンパ球数のごく軽度の減少は、中用量群及び高用量群のいずれにおいても持続して認められた。

イヌでの血清生化学的変化並びに骨髄、リンパ系組織、肝臓、肺及び注射部位の病理組織学的変化といったロミデプシンの反復投与により誘発された毒性は、休薬期間中に回復が認められた。検討したほぼすべての用量においても、リンパ球、分節核好中球、単球及び好酸球を含む WBC 数の一過性の減少がみられた。ヘマトクリット、ヘモグロビン及び網状赤血球数の減少もみられたが、これらのパラメータは休薬期間中に概ね正常に戻った。しかし、一部のイヌでは、リンパ球枯渇、注射部位の慢性炎症、精巣の精子減少及び貧血が、休薬期間中も引き続き認められた。

観察されたこれらの毒性は概ね可逆的であり、ロミデプシン投与終了時又は休薬期間中に回復した。全体に、投与部位の局所毒性を除いて、ラット、及びイヌでロミデプシン投与に伴って観察された毒性（特に消化管及び造血系の変化）は、臨床試験でみられた副作用を予測するものであっ

た。ロミデプシン投与に伴う毒性変化への忍容性には注入速度及び薬物投与スケジュールに依存し、4 時間の点滴及び間欠投与による忍容性は、より短時間の点滴や 1 日 1 回投与と比較して良好であった。臨床試験で使用したスケジュールを用いたロミデプシンの長期投与による累積的毒性はみられず、6 ヵ月間投与後にみられた毒性は 2 又は 4 週間投与後にみられたものと比較してほとんど違いは認められなかった。

ロミデプシンには光毒性の懸念はないことが確認された。また、製剤中の K17 には、毒性試験の結果から、過敏症反応の懸念はあるものの、そのリスクはロミデプシン投与によるベネフィットを上回るものではないと考える。

7. 参考文献

Bradner JE、 West N、 Grachan ML、 et al. Chemical phylogenetics of histone deacetylases. Nat Chem Biol. 2010;6(3): 238-243.

Furumai R、 Matsuyama A、 Kobashi N、 et al. FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases. Cancer Res. 2002;62:4916-4921.

Hoshino I、 Matsubara H、 Akutsu Y、 et al. Gene expression profiling induced by histone deacetylase inhibitor、 FK228、 in human esophageal squamous cancer cells. Oncol Rep. 2007;18(3):585-592.

Imai T、 Adachi S、 Nishijo K、 et al. FR901228 induces tumor regression associated with induction of Fas ligand and activation of Fas signaling in human osteosarcoma cells. Oncogene. 2003;22:9231-9242.

Irwin S、 Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. Psychopharmacologia. 1968;13:222-257.

Kwon HJ、 Kim MS、 Kim MJ、 et al. Histone deacetylase inhibitor FK228 inhibits tumor angiogenesis. Int J Cancer. 2002;97:290-296.

Michaelis M、 Michaelis UR、 Fleming I、 et al. Valproic acid inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. Mol Pharmacol. 2004;65:520-527.

Miller TA、 Witter DJ、 Belvedere S. Histone deacetylase inhibitors. J Med Chem. 2003;46(24):5097-5116.

Nakajima H、 Kim YB、 Terano H、 et al. FR901228、 a potent antitumor antibiotic、 is a novel histone deacetylase inhibitor. Exp Cell Res. 1998;241(1):126–133.

Peart MJ、 Tainton KM、 Ruefli AA、 et al. Novel mechanisms of apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors. Cancer Res. 2003;63:4460-4471.

Qian DZ、 Kato Y、 Shabbeer S、 et al. Targeting tumor angiogenesis with histone deacetylase inhibitors: the hydroxamic acid derivative LBH589. Clin Cancer Res. 2006;12(2):634-642.

Rasheed W、 Bishton M、 Johnstone RW、 et al. Histone deacetylase inhibitors in lymphoma and solid malignancies. Exp Rev Anticancer Ther. 2008;8(3):413-432.

Richon VM、 Sandhoff TW、 Rifkind RA、et al. Histone deacetylase inhibitor selectively induces $p21^{WAF1}$ expression and gene-associated histone acetylation. Proc Natl Acad Sci USA. 2000;97(18):10014-10019.

Robey RW、 Shukla S、 Finley EM、 et al. Inhibition of P-glycoprotein (ABCB1) - and multidrug resistance associated protein 1 (ABCC1) - mediated transport by the orally administered inhibitor、 CBT-1. Biochem Pharmacol. 2008;75:1302-1312.

Rossig L、 Li H、 Fisslthaler B、 et al. Inhibitors of histone deacetylation downregulate the expression of endothelial nitric oxide synthase and compromise endothelial cell function in vasorelaxation and angiogenesis. Circ Res. 2002;91:837-844.

Sasakawa Y、 Naoe Y、 Sogo N、et al.. Marker genes to predict sensitivity to FK228、 a histone deacetylase inhibitor. Biochem Pharmacol. 2005;69(4):603-616.

Scala S、 Akhmed N、 Rao US、 Paull K、 Lan LB、 Dickstein B、 et al. P-glycoprotein substrates and antagonists cluster into two distinct groups. Mol Pharmacol. 1997 Jun; 51 (6): 1024-33.

Ueda H、 Manda T、 Matsumoto S、 et al. FR901228、 a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by Chromobacterium violaceum、 No. 968、 III. Antitumor activities on experimental tumors in mice. J Antibiot. 1994b;47(3):315-323.

Ueda H、 Nakajima H、 Hori Y、 et al. Action of FR901228、 A novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by Chromobacterium violaceum、 No. 968、 on ha-ras transformed NIH3T3 cells. Biosci Biotech Biochem. 1994a;58(9):1579-1583.

Xiao JJ、 Foraker AB、 Swaan PW、 et al. Efflux of depsipeptide FK228 (FR901228、 NSC-630176) is mediated by P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 1. J Pharmacol Exp Ther. 2005;313:268-276.

Yu X、 Guo ZS、 Marcu MG、 et al. Modulation of p53、 ErbB1、 ErbB2、 and Raf-1 expression in lung cancer cells by depsipeptide FR901228. J Natl Cancer Inst. 2002;94:504-513.