TABLE OF CONTENTS

LIST OF FIGURES 2
略語・用語の定義一覧 3
1. 非臨床試験計画概略 4
1.1. 薬理 4
1.2. 薬物動態 5
1.3. 毒性 5
2. 薬理試験 6
2.1. 効力を裏付ける試験 6
2.2. 安全性薬理試験 7
3. 薬物動態試験 7
3.1. 分析法 7
3.2. 吸収 7
3.3. 分布 8
3.4. 代謝 8
3.5. 排泄 9
3.6. 薬物動態学的薬物相互作用 9
4. 毒性試験 10
4.1. 単回投与毒性 10
4.2. 反復投与毒性 10
4.3. 遺伝毒性試験 10
4.4. がん原性 10
4.5. 生殖発生毒性 10
4.6. 局所刺激性試験 10
4.7. その他の毒性試験 10
5. 総括及び結論 11
5.1. 薬理試験 11
5.2. 薬物動態試験 12
5.3. 毒性試験 14
5.3.1. 肝臓 16
5.3.2. リンパ系器官，骨髄および血液学的所見 18
5.3.3. 雄性生殖器 20

5.3.4. 雌性生殖器 21
5.3.5. 胚・胎児毒性 21
5.3.6. 神経系 22
5.3.7. 腎臓 22
5.3.8. 変異原性，染色体異常誘発性およびがん原性 23
5.3.9. その他の所見 24
5.3.10. 毒性試験に関する結論 25
5.4. 結論 26

LIST OF FIGURES

Figure 1. イノツズマブ　オゾガマイシンの構造式 4
Figure 2. イノツズマブ　オゾガマイシンおよび非結合カリケアマイシンの主代謝経路 8

略語・用語の定義一覧

略語・用語	省略していない表現または用語の定義
AcBut	4-(4-Acetylphenoxy)butanoic acid，4-(4-アセチルフェノキシ)ブタン酸
ADA	Anti-drug antibody，抗薬物抗体
ADC	Antibody-drug conjugate，抗体薬物複合体
ADCC	Antibody dependent cellular cytotoxicity，抗体依存性細胞毒性
A/G 比	Alubumin/Globulin ratio：アルブミン/グロブリン比
ALL	Acute lymphatic leukemia，急性リンパ性白血病
ALT	Alanine transaminase，アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST	Aspartate transaminase，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
BCRP	Breast cancer resistant protein：乳癌耐性タンパク質
CDC	Complement dependent cytotoxicity，補体依存性細胞傷害
CHOP	シクロホスファミド，ドキソルビシン，ビンクリスチンおよび prednisone の 4 剤併用
CL	Clearance：クリアランス
C_{max}	Maximum concentration：最高血清中濃度
CVP	シクロホスファミド，ビンクリスチンおよび prednisone の 3 剤併用
CYP	Cytochrome P450：シトクロム P450
DMH	Dimethylhydrazide：ジメチルヒドラジド
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay：酵素免疫測定法
f_u	Fraction unbound：非結合型分率
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
hERG	Human ether-a-go-go related gene，ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子
IC_{50}	50% inhibitory concentration，50%阻害濃度
LC-MS/MS	高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法
LOAEL	Lowest-observed-adverse-effect level，最小毒性量
mRNA	Messenger ribonucleic acid：メッセンジャーRNA
NHL	Non-Hodgkin lymphoma，非ホジキンリンパ腫
NOAEL	No-observed-adverse-effect-level，無毒性量
NRH	Nodular regenerative hyperplasia，結節性再生性過形成
OATP	Organic anion transporting polypeptide：有機アニオン輸送ポリペプチド
OCT	Organic cation transporter：有機カチオントランスポーター
P-gp	P-glycoprotein，P-糖タンパク質
SCID	Severe combined immunodeficiency，重度複合免疫不全
SD	Sprague-Dawley
SEC	Sinusoidal endothelial cells，類洞内皮細胞
SOS	Sinusoidal obstruction syndrome，類洞閉塞症候群
t½	Apparent terminal half-life：見かけの消失半減期
UGT	Uridine diphosphate glucuronosyl transferase：ウリジン二リン酸グルクロン酸転移酵素
VOD	Veno-occlusive disease，静脈閉塞性肝疾患
V_{ss}	Steady-state volume of distribution：定常状態における分布容積

1. 非臨床試験計画概略

イノツズマブ　オゾガマイシン（Figure 1）は CD22 を標的とするヒト IgG4 に属する抗体である G544 に強力な細胞毒性薬である N-アセチル-γ-カリケアマイシン ジメチルヒドラジド（N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH），4-(4-アセチルフェノキシ)ブタン酸（AcBut）リンカーを介して共有結合させた抗体薬物複合体（ADC）で，急性リンパ性白血病（ALL）の治療薬として開発された。

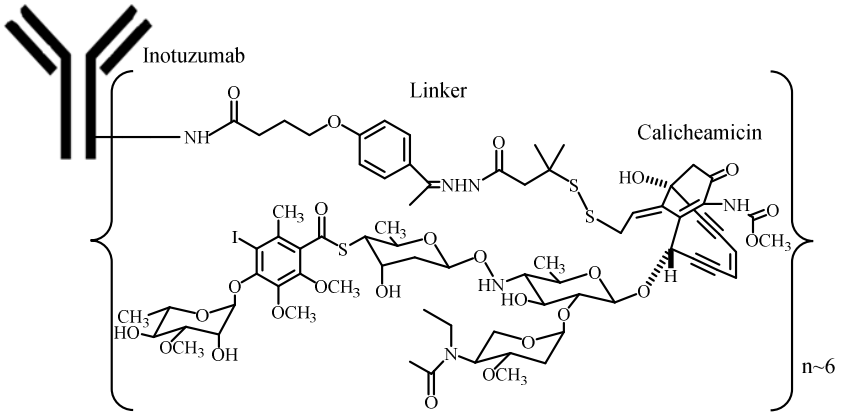


Figure 1.　イノツズマブ　オゾガマイシンの構造式

1.1. 薬理

効力を裏付ける試験では，in vitro においてイノツズマブ　オゾガマイシンまたは G544 の CD22 抗原ならびに CD22 を発現する ALL および非ホジキンリンパ腫（NHL）細胞株に対する結合親和性を評価するとともに，G544 の標的細胞における細胞内動態について検討した。また，イノツズマブ　オゾガマイシンの作用機序，補体依存性細胞傷害（CDC）および抗体依存性細胞毒性（ADCC）活性，ならびに細胞毒性作用を評価した。In vivo 試験では，1) B 細胞性 ALL モデルにおける単独での抗腫瘍効果，2) B 細胞性 NHL モデルにおける単独での抗腫瘍効果，および 3) イノツズマブ　オゾガマイシンの抗腫瘍効果に関する化学療法との比較，化学療法再発モデルでの検討および化学療法剤との併用効果について検討した。

安全性薬理試験では，心血管系，呼吸系および中枢神経系に対する影響を in vivo で検討したのに加え，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH のヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子（hERG）電流に対する阻害作用を in vitro で検討した。hERG 試験およびサル心血管系試験を除き，すべての試験は医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）適用下で実施した。サル心血管系試験は医薬審発第 902 号医薬局審査管理課長通知「安全性薬理試験ガイドラインについて」で規定された適用期日（平成 15 年 7 月 1 日）以前に実施されており，試験実施時期において FDA の GLP 査察を受けていないことから GLP 適合未確認とし，参考資料と位置づけた。

1.2. 薬物動態

非臨床薬物動態では，主として薬理試験および毒性試験で使用した動物種であるマウス，ラットおよびサルにおけるイノツズマブ　オゾガマイシンの吸収，分布，代謝および排泄に関する広範な検討を実施した。イノツズマブ　オゾガマイシンまたは N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の代謝および薬物トランスポーターに関する検討には，ヒト試料またはヒト遺伝子発現系細胞など目的に応じた in vitro 試験系を用いた。分布，代謝および排泄の検討には[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンまたは[^{3}H]N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH を使用した。イノツズマブ　オゾガマイシンの PK/TK プロファイルを総合的に評価するため複数の分析法を開発し，血清中のイノツズマブ　オゾガマイシン，総 G544，非結合カリケアマイシンおよび抗薬物抗体（ADA）濃度は酵素免疫測定（ELISA）法により，総カリケアマイシン濃度は高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析（LC-MS/MS）法により定量した。

1.3. 毒性

単回および 26 週間までの反復投与毒性試験，in vitro および in vivo 遺伝毒性試験，受胎能および初期胚発生試験（雌のみ）ならびに胚・胎児発生試験において，イノツズマブ　オゾガマイシンの毒性を評価した。また，ラット，サルおよびヒトにおける血液適合性を評価した。毒性試験の投与経路は臨床で用いられている静脈内とした。一般毒性試験では，ラットおよびサルをそれぞれげっ歯類および非げっ歯類の動物種として選択した。イノツズマブ　オゾガマイシンの構成成分である G544（抗 CD22 抗体）はいずれの非臨床動物種の CD22 抗原にも結合しない（2.6.2.2.1.3 項）ことから，これらの動物種は標的以外に対する結合型または非結合カリケアマイシンの毒性を検討するためにのみ適切であると考えられる。なお，マウス，ラット，ウサギ，イヌまたはサルの組織には，G544 に特異的な抗体染色像は認められていない（2.6.6.8.2 項）。ラットおよびサルを用いた重要な反復投与毒性試験における投与スケジュールは，臨床の投与レジメン（週 1 回の 3 回投与からなる 3～4 週間を 1 サイクルとして，最大 6 サイクル）に対応し，週 1 回投与とした。イノツズマブ　オゾガマイシンに加え，構成成分である G544 の毒性についても，ラットおよびサルを用いた反復投与毒性試験の 1 投与群ならびにマウス，ラット，イヌ，カニクイザルおよびアカゲザルを用いた組織交差反応性試験において評価した。非結合カリケアマイシンである N-アセチル（N-Ac）-γ-カリケアマイシン DMH について，マウス，ラットおよびイヌを用いた単回または反復投与毒性試験，in vitro 遺伝毒性試験ならびに in vitro 光毒性試験を実施した。N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH 4-(4′-アセチルフェノキシ)ブタン酸（AcBut）（非結合カリケアマイシンとリンカー部分の複合体）および N-Ac-ε-カリケアマイシン（イノツズマブ　オゾガマイシンのラットにおける主な胆汁中排泄代謝物で，ヒト尿中にも検出されている）についても，ラットまたはイヌを用いた単回投与毒性試験を実施した。

サルを用いたその他の毒性試験として，イノツズマブ　オゾガマイシン投与による血小板減少に対するオプレルベキン（組換え型ヒトインターロイキン-11）の作用を検討した併用投与試験を実施し，また結合型および非結合カリケアマイシンに関連した肝毒性および血小板減少の機序を検討するために，非結合性のヒト化 IgG1 モノクローナル抗体に酸に不安定な AcBut リンカーを介して N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH を結合させた ADC（PF-06647259）を投与する探索的試験を実施した。

すべての重要な試験（一般毒性試験，生殖発生毒性試験および遺伝毒性試験），組織交差反応性試験および光毒性試験は，特記ない限り米国食品医薬品局（FDA）の GLP を適用して実施した。

2. 薬理試験

2.1. 効力を裏付ける試験

イノツズマブ　オゾガマイシンおよびG544はいずれも，ヒトCD22-Fc融合タンパクに高い親和性［解離定数（K_D値）120～150 pmol/L］で結合した。また，G544はCD22を発現する腫瘍細胞に特異的な結合を示した。さらに，G544はヒト全血中の正常B細胞には結合するが，マウス，ラット，ウサギまたはカニクイザルのB細胞，顆粒球，単球またはT細胞には結合しなかった。G544はALLおよびNHL細胞株に速やかに取り込まれてリソゾームへ移行することが，LAMP-1（lysosomal-associated membrane protein 1）との共存により示された。作用機序の検討では，ALL細胞をイノツズマブ　オゾガマイシンとインキュベートした結果，二本鎖DNAの切断が認められ，カリケアマイシンの主要な作用機序と一致した。また，IgG4抗体からなるイノツズマブ　オゾガマイシンはCDCまたはADCC活性を有しないことが確認された。イノツズマブ　オゾガマイシンは種々のB細胞由来の腫瘍細胞株に対して，抗原特異的に強力な細胞毒性を示した。NHL細胞株はALL細胞株に比べてCD22の発現レベルが高かったにも関わらず,イノツズマブ　オゾガマイシンおよび非結合N-Ac-γ-カリケアマイシンDMHに対する感受性はALL細胞株の方が高く，イノツズマブ　オゾガマイシンに対する感受性に関して，両細胞間で差異のある可能性が示唆された。

ALLに対するイノツズマブ　オゾガマイシンの抗腫瘍効果は，Reh ALL細胞を用いて，ヌードマウスに皮下移植した異種移植腫瘍および重度複合免疫不全（SCID）マウスにおける播種モデルで評価した。Reh ALLが皮下に定着したヌードマウスに対して，イノツズマブ　オゾガマイシンは0.42～6.57 mg/m^{2}の用量で用量依存的な抗腫瘍効果を示し，6.57 mg/m^{2}では完全な腫瘍退縮が認められた。播種モデルでもイノツズマブ　オゾガマイシンは腫瘍の増殖を抑制し，3.30 mg/m^{2}の用量での生存率は100%であった。さらに，イノツズマブ　オゾガマイシンは播種モデルにおいてヒトCD45陽性白血病細胞の生着を強く阻害した。

イノツズマブ　オゾガマイシンの抗腫瘍効果をNHLの異種移植腫瘍および播種モデルついても評価した。イノツズマブ　オゾガマイシンはヌードマウスに移植したRamosおよびRL NHL異種移植腫瘍に対して用量依存的な腫瘍退縮効果を示した。イノツズマブ　オゾガマイシンの抗腫瘍効果は投与開始時の腫瘍サイズに関わらず認められ，体重の約10%に相当する2 gの腫瘍に対しても有効性を示した。RamosおよびRLモデルに対するイノツズマブ　オゾガマイシンの最小有効量は,4日ごとに3回の投与スケジュールでそれぞれ0.42および0.81 mg/m^{2}で,それぞれ6.57および4.92 mg/m^{2}の用量で腫瘍の完全退縮が認められた。異種移植モデルにおけるイノツズマブ　オゾガマイシンの抗腫瘍効果は，静脈内投与と腹腔内投与の間で同程度であった。全身播種モデルにおいて，腫瘍移植の3日後または9日後にイノツズマブ　オゾガマイシンを1.65 mg/m^{2}の用量で4日ごとに3回腹腔内投与したときの生存率は100%であった。

イノツズマブ　オゾガマイシンの抗腫瘍効果を化学療法剤と比較した。イノツズマブ　オゾガマイシンは化学療法剤であるCHOP（シクロホスファミド，ドキソルビシン，ビンクリスチンおよびprednisoneの4剤併用）およびCVP（シクロホスファミド，ビンクリスチンおよびprednisoneの3剤併用）よりも長期間にわたって腫瘍抑制効果を示した。また，化学療法剤による治療後に再発した腫瘍に対しても，イノツズマブ　オゾガマイシンは腫瘍の増殖を阻害した。さらに，イノツズマブ　オゾガマイシンはCHOPまたはCVPとの併用で，いずれかの単独投与に比べてより強い抗腫瘍効果を示した。

2.2. 安全性薬理試験

イノツズマブ　オゾガマイシンはカニクイザルを用いた心血管系試験で単回静脈内投与により血圧上昇を引き起こしたが，ラットを用いた中枢神経系および呼吸系の評価ではイノツズマブ　オゾガマイシンは作用を示さなかった。hERG 電流に対する阻害を検討した in vitro 試験では，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は 6.77 µmol/L までの濃度で作用を示さなかった。

3. 薬物動態試験

3.1. 分析法

イノツズマブ　オゾガマイシンの PK/TK プロファイルを総合的に評価するため，複数の分析法を開発した。マウス，ラット，ウサギまたはサルにおける血清中イノツズマブ　オゾガマイシン，総 G544，非結合カリケアマイシンおよび ADA 濃度は ELISA 法により定量した。また，ラットおよびイヌの血漿中カリケアマイシン誘導体濃度も ELISA 法により定量した。ラット，ウサギまたはサルにおける血清中総カリケアマイシン濃度は，LC-MS/MS 法により定量した。GLP 適用下で実施した反復投与毒性試験における血清中濃度推移および ADA の評価には，バリデートされた定量法を用い，単回投与による薬物動態試験およびサルを用いた試験を除く毒性試験では，それらに準じた ELISA 法を使用した。

3.2. 吸収

薬理試験で使用したマウスまたは毒性試験で使用したラットおよびサルにイノツズマブ　オゾガマイシンを単回腹腔内または静脈内投与したとき，イノツズマブ　オゾガマイシンの濃度－時間曲線下面積（AUC）は概して G544 の AUC と同程度かそれより低かった。非担癌マウスおよび担癌マウスにイノツズマブ　オゾガマイシンを腹腔内投与したときのイノツズマブ　オゾガマイシンおよび G544 の曝露量は，いずれも担癌マウスの方が低値を示した。イノツズマブ　オゾガマイシンをラットおよびサルに静脈内投与したときのイノツズマブ　オゾガマイシンおよび G544 の全身クリアランス（CL）は低値を示し，定常状態の見かけの分布容積（V_{ss}）は血漿容量と同等～やや高値を示し，モノクローナル抗体医薬品で予想される結果を示した。見かけの消失半減期（$t_{½}$）は概ね 40 時間～60 時間程度と長かった。[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンをラットに単回静脈内投与したときの血漿中放射能の大部分はタンパク質に結合したカリケアマイシン由来であり，非結合カリケアマイシン由来放射能は約 2%と微量であることが示された。

雌雄のラットおよびサルを用いた反復投与毒性試験において，いずれの測定対象物（イノツズマブ　オゾガマイシン，G544 または総カリケアマイシン）の AUC に一貫した性差は認められず，ラットおよびサルのいずれにおいても非結合カリケアマイシン誘導体の血清中濃度はほとんどの検体で定量限界未満であった。イノツズマブ　オゾガマイシン，G544 または総カリケアマイシンの AUC は，ラットでは用量にほぼ比例して増加したが，サルでは用量比を超えて増加した。ラットではイノツズマブ　オゾガマイシン，G544 および総カリケアマイシンの曝露量に顕著な経日的な変化はみられなかったが，サルでは最終投与後の曝露量は初回投与後より高値を示した。抗イノツズマブ　オゾガマイシン抗体の産生率は，ラットでは 10%～13%，サルでは 0%であった。

3.3. 分布

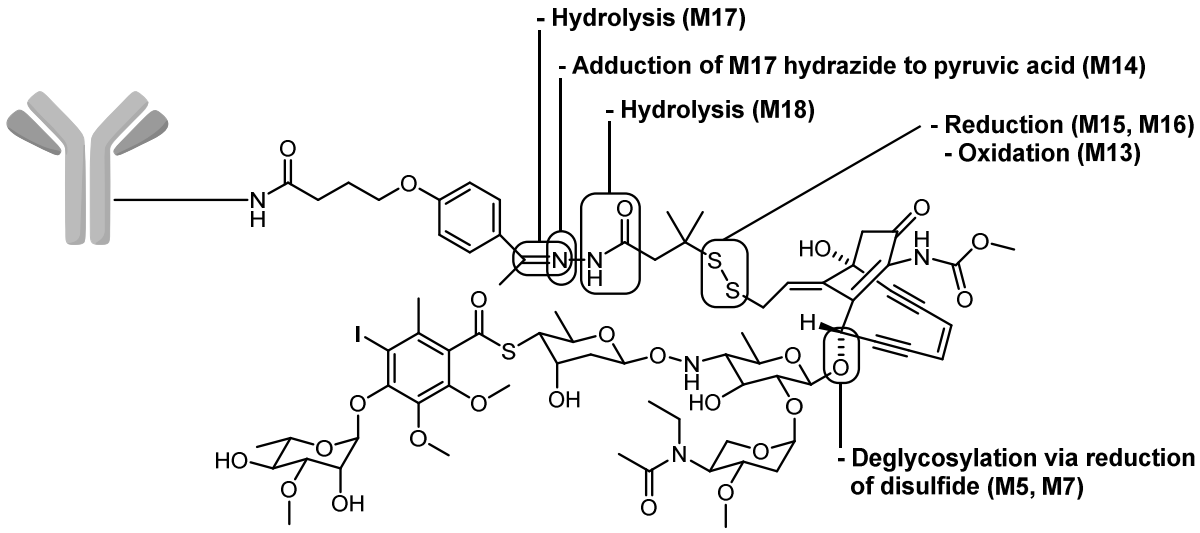
[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンをラットに静脈内投与したときの放射能の組織への分布は限定的であり，肝臓，脾臓，肺および腎臓でやや高い放射能濃度が認められたが，評価したすべての組織において放射能濃度の AUC は血漿中の 0.6 倍以下であった。脳における放射能濃度の AUC は血漿中の 2%未満であり，血液脳関門を通過して脳に分布する[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシン由来放射能はわずかであることが示された。血中の[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシン由来放射能は血漿にほぼ特異的に分布した。

N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の血漿タンパク結合率は評価したいずれの動物種においても高く，マウス，ラット，ウサギ，サルおよびヒトにおける非結合型分率（f_u）は 0.00094～0.031 であった。遺伝子導入したイヌ腎臓由来 Madin-Darby（MDCK）細胞を用いた in vitro 試験では，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は排出トランスポーターである P-糖タンパク質（P-gp）の基質となったが，乳癌耐性タンパク質（BCRP）の基質とはならないことが示された。サンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いた試験で N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は受動拡散によって肝細胞内に取り込まれたことから，有機アニオン輸送ポリペプチド（OATP）1B1 および OATP1B3 といった肝取り込みトランスポーターの基質となる可能性は低いことが示唆された。

3.4. 代謝

ラットおよびヒトにそれぞれ ^{3}H 標識および非標識のイノツズマブ　オゾガマイシン静脈内投与後の生体試料中の代謝物を検索した。ラットでは，[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンから遊離した[^{3}H]N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は広範に代謝された。[^{3}H]N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の主な代謝経路はジスルフィド基の還元であり，ヒドラジド基の加水分解，酸化およびピルビン酸との付加反応は副次的経路であった。

Figure 2.　イノツズマブ　オゾガマイシンおよび非結合カリケアマイシンの主代謝経路



ラットに[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンを投与後の血漿中総放射能に占めるイノツズマブ　オゾガマイシンの割合は 66%と見積もられ，その他に構造未同定のより高分子量を示す 2 種の成分が認められた。ヒトにイノツズマブ　オゾガマイシンを投与後の血清中および尿中の代謝物を

分析したところ，血清中にはイノツズマブ　オゾガマイシンの加水分解産物である N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH のみが認められ，尿中から検出された代謝物はいずれもラットにおいても認められた。

毒性試験に用いた動物種（ラットおよびサル）とヒトの代謝プロファイルを比較し，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の代謝に関与する酵素を検討するための in vitro 代謝試験を実施した。ラット，サルおよびヒト血漿中で[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンを 37°C で 96 時間インキュベートした ex vivo 試験では，90%を超える薬物由来放射能はタンパク質と結合していることが示された。[^{3}H]N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH をラット，サルおよびヒトの肝 S9 画分（グルタチオンなどの各種補因子の存在下）または血漿とインキュベートしたときの代謝物プロファイルはいずれの種においても類似しており，緩衝液中でインキュベートしたときとも同様であったことから，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の生体内における変換の大部分は薬物代謝酵素を介さないことが示唆された。[^{3}H]N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の in vitro 代謝で認められた代謝物は，[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンを投与したラットから採取した in vivo 試料でみられたものと質的に類似していた。以上のことから，イノツズマブ　オゾガマイシンの加水分解による N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の遊離はわずかであり，遊離した N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は主に薬物代謝酵素を介さない還元によって代謝されることが示唆された。したがって，イノツズマブ　オゾガマイシンをシトクロム P450（CYP）またはウリジン二リン酸グルクロン酸転移酵素（UGT）といった薬物代謝酵素の阻害薬または誘導薬と併用投与しても，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の曝露量が変化する可能性は低いと考えられた。

3.5. 排泄

ラットに[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンを静脈内投与したときの放射能の排泄は緩徐であり，投与放射能の約 80%は糞中に排泄され，尿中に排泄された放射能は投与量の 8%～9%程度であった。胆管カニューレ挿入ラットの胆汁中に投与放射能の 53%～64%が排泄されたことから，[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンを静脈内投与したときの放射能の主排泄経路は，胆汁を介した糞中排泄であると考えられた。

3.6. 薬物動態学的薬物相互作用

イノツズマブ　オゾガマイシンおよび N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の主な CYP 分子種に対する可逆的または時間依存的阻害能について in vitro で検討し，得られた阻害パラメータとヒトにイノツズマブ　オゾガマイシンを臨床用量で投与したときの定常状態でのイノツズマブ　オゾガマイシンおよび N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の最高血清中濃度（C_{max}，それぞれ 308 ng/mL＝0.00192 µmol/L および 0.050 ng/mL 以下＝0.000034 µmol/L 以下）に基づき臨床で薬物相互作用が生じる可能性について検討した。その結果，イノツズマブ　オゾガマイシンおよび N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は臨床用量で想定される濃度で CYP1A2，CYP2B6，CYP2C8，CYP2C9，CYP2C19，CYP2D6 および CYP3A4/5 の活性を阻害する可能性は低いことが示された。また，イノツズマブ　オゾガマイシンおよび N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は臨床用量で想定される濃度の 50 倍の濃度（それぞれ 0.32 µmol/L および 0.3 µmol/L）においても CYP1A2，CYP2B6 または CYP3A4 の mRNA もしくは酵素活性を誘導しなかった。

4. 毒性試験

4.1. 単回投与毒性

イノツズマブ　オゾガマイシンの単回静脈内投与による概略の致死量は，ラットで 8.22～16.4 mg/m^2，サルで 16.4 mg/m^2 超であった。

4.2. 反復投与毒性

ラットおよびサルにイノツズマブ　オゾガマイシンを反復投与したときに観察された投与期間中の変化として，体重および摂餌量の減少，骨髄およびリンパ組織への毒性を示唆する血液パラメータの変化ならびに肝毒性を示唆する血液生化学パラメータの変化などが認められた。これらの両動物種における毒性の主要な標的臓器は，肝臓，リンパ造血系組織および雌雄生殖器であった。反復投与時に観察されたイノツズマブ　オゾガマイシン投与に関連したその他の毒性所見として，神経系（ラット）および腎臓（ラットおよびサル）の変化が認められた。

4.3. 遺伝毒性試験

In vitro 遺伝毒性試験では，イノツズマブ　オゾガマイシン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，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は細菌において変異原性を示したほか，ヒト TK6 リンパ芽球細胞において染色体異常を誘発した。In vivo では，イノツズマブ　オゾガマイシンはマウス骨髄において染色体異常を誘発し，無影響量（NOEL）は求められなかった。

4.4. がん原性

イノツズマブ　オゾガマイシンのがん原性試験は実施していないが，ラットでは単回投与および 4 週間以上の反復投与で，サルでは 26 週間反復投与したときの 1 例で肝臓に前腫瘍性病変が観察された。また，ラットでは 26 週間反復投与時に肝細胞腺腫が観察された。

4.5. 生殖発生毒性

ラットを用いた受胎能および初期胚発生試験では，イノツズマブ　オゾガマイシンは雌の受胎能に影響を及ぼさなかった。ラットを用いた胚・胎児発生試験では，胚・胎児の吸収が増加するとともに生存胚数が減少し，胎児の体重減少およびそれと関連した胎児の骨化遅延が観察されたことから，イノツズマブ　オゾガマイシンは胎児毒性を有すると考えられた。イノツズマブ　オゾガマイシンは，ラットおよびウサギにおいて催奇形性を示さなかった。

4.6. 局所刺激性試験

イノツズマブ　オゾガマイシンの局所刺激性試験は実施していないが，ラット単回静脈内投与毒性試験ならびにラットおよびサルを用いた 4 および 26 週間静脈内投与毒性試験における投与部位の剖検および病理組織学的検査から局所刺激性を評価した。その結果，投与部位にイノツズマブ　オゾガマイシン投与に関連した変化は認められなかった。

4.7. その他の毒性試験

イノツズマブ　オゾガマイシンの in vitro 血液適合性試験では，ラット，サルおよびヒトの赤血球において溶血は認められなかった。

サルを用いたオプレルベキン（組換え型ヒトインターロイキン-11）とイノツズマブ　オゾガマイシンの併用試験では，イノツズマブ　オゾガマイシン投与による血小板数減少がオプレルベキンとの併用によって，イノツズマブ　オゾガマイシン単独投与よりも速やかに回復することが示された。

組織交差反応性試験では，抗 CD22 抗体である G544 は非臨床試験に用いた動物種（マウス，ラット，イヌ，カニクイザルおよびアカゲザル）では特異的な染色を示さなかった。ヒト組織では，G544 は評価した組織中の CD22 発現細胞と反応した。この試験でみられた組織染色像は，文献で報告されている CD22 の免疫組織化学的分布と一致していた。

カリケアマイシン誘導体（N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH, N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH AcBut および N-Ac-ε-カリケアマイシン）のマウス，ラットおよびイヌを用いた単回または反復投与毒性試験において，新たな標的臓器毒性は認められなかった。

マウス BALB/c 3T3 細胞を用いた in vitro 光毒性試験において, N-Ac-γ-カリケアマイシ DMH は光毒性を示さなかった。

肝毒性および血小板減少の機序を検討するために実施した PF-06647259 を用いる探索的試験では，サルにおいて血小板数減少および静脈閉塞性肝疾患（VOD）［類洞閉塞症候群（SOS）とも呼ばれる］の初期段階に相当すると考えられる肝臓微小血管傷害が認められた。血小板数の急性の減少は肝臓特異的な内皮損傷の二次的変化として発生した血小板の捕捉によって生じたと考えられた。血小板に対する影響が持続した機序は不明であるが，トロンボポエチン減少により骨髄への刺激が不十分となり，慢性的な血小板産生減少に至った可能性が考えられる。

5. 総括及び結論

5.1. 薬理試験

イノツズマブ　オゾガマイシンの効力を裏付ける試験として，腫瘍細胞への結合能ならびに in vitro および in vivo での B 細胞性 ALL および NHL に対する作用を評価した。In vitro では，イノツズマブ　オゾガマイシンはこれらの腫瘍細胞に対して濃度依存的に強力な増殖阻害作用を示した。In vivo では，皮下移植した異種移植モデルにおいて腫瘍退縮効果を示し，全身播種モデルにおいても延命効果を示した。一方，イノツズマブ　オゾガマイシンのイムノグロブリン部分である非結合 G544 は補体結合，CDC および ADCC 活性を示さず，抗腫瘍効果も示さなかった。

カニクイザルを用いた心血管系安全性薬理試験において，イノツズマブ　オゾガマイシンは 1.68 mg/m^2 以上の用量で軽度の血圧上昇を引き起こしたが, その毒性学的意義は低いと考えられ，心拍数や心電図パラメータ（PR，QRS，QT および QTc 間隔）には影響を与えなかった。なお，ALL 患者を対象とした B1931022 および B1931010 臨床試験において，イノツズマブ　オゾガマイシン投与群では血圧および心拍数を含むバイタルサインの測定値およびベースラインからの変化量に臨床的に意義のある所見は認められておらず，また心電図検査でも QTcF 間隔が 500 msec を超えた被験者は認められなかった（2.7.4.4 項）。N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は hERG カリウムイオンチャネルに対して 6.77 µmol/L までの濃度で作用を示さなかった。ラットを用いた中枢神経系および呼吸系試験において，イノツズマブ　オゾガマイシンを 8.46 mg/m^2 までの用量で投与しても，毒性学的に意義のある変化は認められなかった。

5.2. 薬物動態試験

イノツズマブ　オゾガマイシンおよびその細胞傷害性ペイロードである N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の非臨床薬物動態について in vitro および in vivo で広範に検討した。イノツズマブ　オゾガマイシンの構成成分である G544（抗 CD22 抗体）は非臨床薬理および毒性試験で使用したいずれの動物種（マウス，ラット，ウサギ，イヌおよびサル）の CD22 抗原にも結合しない（2.4.2.1 項）ことから，これらの動物種を用いた薬物動態試験は，主としてイノツズマブ　オゾガマイシンまたはそれから遊離した N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の標的を介さない薬物動態について評価したものと考えられる。

薬理試験で使用したマウスまたは毒性試験で使用したラットおよびサルにイノツズマブ　オゾガマイシンを単回腹腔内または静脈内投与したとき，イノツズマブ　オゾガマイシンの AUC は概して G544 の AUC と同程度かそれより低かった。非担癌マウスおよび CD22 陽性非ホジキンリンパ腫（NHL）B 細胞株 RL 細胞の担癌マウスにイノツズマブ　オゾガマイシンを腹腔内投与したときのイノツズマブ　オゾガマイシンおよび G544 の曝露量は，いずれも担癌マウスの方が低値を示した。このことは，担癌マウスではイノツズマブ　オゾガマイシンの G544 部分が B 細胞腫瘍の表面の CD22 タンパク質を認識し，特異的に腫瘍細胞へ移行したことによると推察される。イノツズマブ　オゾガマイシンをラットおよびサルに静脈内投与したときのイノツズマブ　オゾガマイシンおよび G544 の全身 CL は低値を示し，定常状態の V_{ss} は血漿容量と同等～やや高値を示し，モノクローナル抗体医薬品で予想される結果を示した。$t_{½}$は概ね 40 時間～60 時間程度と長かった。[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンをラットに単回静脈内投与したときの血漿中放射能の大部分はタンパク質に結合したカリケアマイシン由来であり，非結合カリケアマイシン由来放射能は約 2%と微量であることが示された。

雌雄のラットおよびサルを用いた反復投与毒性試験において，いずれの測定対象物（イノツズマブ　オゾガマイシン，G544 または総カリケアマイシン）の AUC にも一貫した性差は認められず，ラットおよびサルのいずれにおいても非結合カリケアマイシン誘導体の血清中濃度は概して定量限界未満であった。イノツズマブ　オゾガマイシン，G544 または総カリケアマイシンの AUC は，ラットでは用量にほぼ比例して増加したが，サルでは用量比を超えて増加した。ラットではイノツズマブ　オゾガマイシン，G544 および総カリケアマイシンの曝露量に顕著な経日的な変化はみられなかったが，サルでは最終投与後の曝露量は初回投与後より高値を示した。抗イノツズマブ　オゾガマイシン抗体の産生率は，ラットでは 10%～13%，サルでは 0%であったが，高用量群では血中のイノツズマブ　オゾガマイシン濃度が抗イノツズマブ　オゾガマイシン抗体の検出を妨げた可能性がある。

[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンをラットに静脈内投与したときの放射能の組織への分布は限定的であり，肝臓，脾臓，肺および腎臓でやや高い放射能濃度が認められたが，評価したすべての組織において放射能濃度の AUC は血漿中の 0.6 倍以下であった。脳における放射能濃度の AUC は血漿中の 2%未満であり，血液脳関門を通過して脳に分布する[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシン由来放射能はわずかであることが示された。血中の[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシン由来放射能は血漿にほぼ特異的に分布した。

N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の血漿タンパク結合率は評価したいずれの動物種においても高く，マウス，ラット，ウサギ，サルおよびヒトにおける f_u は 0.00094～0.031 であった。N-Ac-γ-カ

リケアマイシン DMH は排出トランスポーターである P-gp の基質となったが，BCRP の基質とはならず, OATP1B1 および OATP1B3 といった肝取り込みトランスポーターの基質とはならず主として受動拡散により肝細胞内に取り込まれると考えられた。

イノツズマブ　オゾガマイシンの主代謝経路はヒドラゾン部分の加水分解による N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の遊離であるが，標的介在性および非介在性の両経路も循環血中からの消失に寄与していると考えられている[a,b]。標的介在性の経路にはイノツズマブ　オゾガマイシンの CD22 発現細胞の表面抗原への結合とそれに続く受容体を介した内在化，エンドソームからリソソームへの移行およびリソソーム内での N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の細胞内放出（水解）が含まれる。標的非介在性の経路は IgG の異化経路であり，肝臓など複数の器官において内皮細胞による飲作用を介した非特異的取り込みなどにより ADC であるイノツズマブ　オゾガマイシンも消失すると考えられる。細胞内に取り込まれたイノツズマブ　オゾガマイシンは胎児性 Fc 受容体（FcRn）を介して循環血中へ再放出されるか，リソソームへ移行し N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の遊離および IgG4 部分の異化作用を受けると考えられる。

ラットおよびヒトにそれぞれ ^{3}H 標識および非標識のイノツズマブ　オゾガマイシン静脈内投与後の生体試料中の代謝物を検索した。ラットでは，[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンから遊離した[^{3}H]N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は広範に代謝された。[^{3}H]N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の主な代謝経路はジスルフィド基の還元であり，ヒドラジド基の加水分解，酸化およびピルビン酸との付加反応は副次的経路であった。ラットに[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンを投与後の血漿中総放射能に占めるイノツズマブ　オゾガマイシンの割合は 66%と見積もられ，その他に構造未同定のより高分子量を示す 2 種の成分が認められた。ヒトにイノツズマブ　オゾガマイシンを投与後の血清中および尿中の代謝物を分析したところ，血清中にはイノツズマブ　オゾガマイシンの加水分解産物である N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH のみが認められ，尿中から検出された代謝物はいずれもラットにおいても認められた。

毒性試験に用いた動物種（ラットおよびサル）とヒトの代謝プロファイルを比較し，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の代謝に関与する酵素を検討するための in vitro 代謝試験を実施した。ラット，サルおよびヒト血漿中で[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンを 37°C で 96 時間インキュベートした ex vivo 試験では，90%を超える薬物由来放射能はタンパク質と結合していることが示された。[^{3}H]N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH をラット，サルおよびヒトの肝 S9 画分（グルタチオンなどの各種捕因子の存在下）または血漿とインキュベートしたときの代謝物プロファイルはいずれの種においても類似しており，緩衝液中でインキュベートしたときとも同様であったことから，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の生体内における変換の大部分は薬物代謝酵素を介さないことが示唆された。[^{3}H]N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の in vitro 代謝で認められた代謝物は，[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンを投与したラットから採取した in vivo 試料でみられたものと質的に類似していた。以上のことから，イノツズマブ　オゾガマイシンの加水分解による N-Ac-γ-カ

[a] Gerber HP, Koehn FE, Abraham RT. The Antibody-Drug Conjugate: An Enabling Modality for Natural Product-Based Cancer Therapeutics. Nat Prod Rep 2013; 30(5):625-39.

[b] Kraynov E, Kamath AV, Walles M, et al. Current Approaches for Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion Characterization of Antibody-Drug Conjugates: An Industry White Paper. Drug Metab Dispos 2016; 44(5):617–23.

リケアマイシン DMH の遊離はわずかであり，遊離した N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は主に薬物代謝酵素を介さない還元によって代謝されることが示唆された。したがって，イノツズマブ　オゾガマイシンを CYP または UGT といった薬物代謝酵素の阻害薬または誘導薬と併用投与しても，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の曝露量が変化する可能性は低いと考えられた。

ラットに[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンを静脈内投与したときの放射能の排泄は緩徐であり，投与放射能の約 80%は糞中に排泄され，尿中に排泄された放射能は投与量の 8%～9%程度であった。胆管カニューレ挿入ラットの胆汁中に投与放射能の 53%～64%が排泄されたことから，[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンを静脈内投与したときの放射能の主排泄経路は，胆汁を介した糞中排泄であると考えられた。

イノツズマブ　オゾガマイシンおよび N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の主な CYP 分子種に対する可逆的または時間依存的阻害能について in vitro で検討し，得られた阻害パラメータとヒトにイノツズマブ　オゾガマイシンを臨床用量で投与したときの定常状態でのイノツズマブ　オゾガマイシンおよび N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の C_{max}（それぞれ 308 ng/mL＝0.00192 μmol/L および 0.050　ng/mL 以下＝0.000034 μmol/L 以下）に基づき臨床で薬物相互作用が生じる可能性について検討した。その結果，イノツズマブ　オゾガマイシンおよび N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は臨床用量で想定される濃度で CYP1A2，CYP2B6，CYP2C8，CYP2C9，CYP2C19，CYP2D6 および CYP3A4/5 の活性を阻害する可能性は低いことが示された。また，イノツズマブ　オゾガマイシンおよび N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は臨床用量で想定される濃度の 50 倍の濃度（それぞれ 0.32 μmol/L および 0.3 μmol/L）においても CYP1A2，CYP2B6 または CYP3A4 の mRNA もしくは酵素活性を誘導しなかった。

N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は UGT1A4，UGT1A6，UGT1A9 および UGT2B7 の活性に対して可逆的な阻害作用をほとんど示さず，50%阻害濃度（IC_{50} 値）はいずれも 10 μmol/L 超であったが，UGT1A1 に対しては阻害作用を示し，2% BSA の非存在下および存在下での IC_{50} 値はそれぞれ 0.61 μmol/L および 1.4 μmol/L であった。この結果とヒトにイノツズマブ　オゾガマイシンを臨床用量で投与したときの定常状態での N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の C_{max} 値に基づき臨床で薬物相互作用が生じる可能性について検討したところ，臨床用量で想定される濃度で N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH が UGT 分子種を阻害する可能性は低いことが示された。

N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の主な薬物トランスポーター分子種に対する阻害能について in vitro で検討し，得られた阻害パラメータとヒトにイノツズマブ　オゾガマイシンを臨床用量で投与したときの定常状態での N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の C_{max} に基づき臨床で薬物相互作用が生じる可能性について検討した。その結果，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は臨床用量で想定される濃度で排出トランスポーターである P-gp および BCRP，肝取り込みトランスポーターである OATP1B1 および OATP1B3 ならびに腎取り込みトランスポーターである OAT1，OAT3 および OCT2 を阻害する可能性は低いことが示された。

5.3. 毒性試験

イノツズマブ　オゾガマイシンの毒性プロファイルを一般毒性，遺伝毒性および生殖発生毒性試験によって広範に評価した結果，イノツズマブ　オゾガマイシン投与に関連した主要な影響として，肝臓，リンパ造血系組織および雌雄生殖器に対する影響ならびに胚・胎児毒性および変異原性/がん原性の可能性が特定された。その他，イノツズマブ　オゾガマイシンの反復投与によって，

ラットおよびサルにおける腎臓への影響ならびにラットにおける神経系への影響が認められた。イノツズマブ　オゾガマイシンはラットおよびサルの CD22 に対して特異的な結合を示さないことから，これらの種々の臓器に認められた本薬投与による影響は，結合型または非結合カリケアマイシンによる非特異的な細胞毒性に由来するものと考えられる。非結合カリケアマイシン誘導体（N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH AcBut および N-Ac-ε-カリケアマイシン）のマウス，ラットおよびイヌを用いた単回または反復投与毒性試験において，新たな標的臓器毒性は認められなかった。G544 を単独でラットおよびサルに投与しても毒性は認められず，これは G544 がラットやイヌなどの非臨床動物種の CD22 には結合しないことから，予測された結果であった。イノツズマブ　オゾガマイシンの単回および反復投与によって用量依存的な体重増加量または摂餌量の減少が認められた。不耐容の徴候を示す一般状態変化に続く瀕死状態/死亡は，ラット単回投与の 16.4 mg/m^2 およびサル 26 週間反復投与の 0.732 mg/m^2 で生じた。サルで瀕死状態/死亡が発生したときの曝露量（90700 ng•h/mL）は日本人における治療時の曝露量（32500 ng•h/mL[a]）を上回っていた。N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は変異原性および染色体異常誘発物質であることが確認され，イノツズマブ　オゾガマイシンも染色体異常誘発物質であることが示された。

ラットを用いて，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の 6 週間（週 1 回投与）試験およびイノツズマブ　オゾガマイシンの 4 および 26 週間（週 1 回投与）試験を実施して反復投与時の毒性を評価した。ラットにおけるイノツズマブ　オゾガマイシンおよび N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の毒性の標的臓器はおおむね同様であり，骨髄，精巣，腎臓，肝臓，卵巣，雄の乳腺および脾臓であった。肝臓および腎臓は天然に存在するカリケアマイシンであるγ-カリケアマイシンをラットに投与した場合でも標的臓器であったことから（MIRACL-24560, MIRACL-24625），これらはイノツズマブ　オゾガマイシンおよび非結合カリケアマイシン誘導体の反復投与時の共通した標的臓器と考えられる。末梢神経系および中枢神経系は，イノツズマブ　オゾガマイシンによる毒性の標的臓器であったが，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH，γ-カリケアマイシンまたは G544 のみを投与したときの標的臓器ではなかった。イノツズマブ　オゾガマイシンのラット単回投与試験において剖検または病理組織学的所見が認められた臓器は N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH またはγ-カリケアマイシンを投与したラットで観察されたものとおおむね同様であり（MIRACL-24559, MIRACL-24564），肝臓，腎臓，脾臓，精巣，胸腺，リンパ節，骨髄および胃であった。サルを用いた非結合カリケアマイシン誘導体の単回または反復投与毒性試験は実施しなかったが，γ-カリケアマイシンのサルを用いた単回投与試験（MIRACL-24563）では肝臓が標的臓器として特定され，病理組織学的所見として肝細胞の細胞多型および再生像が観察された。したがって，イノツズマブ　オゾガマイシンの単回および反復投与による毒性プロファイルは N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH またはγ-カリケアマイシンのものと同様であり，このことからもイノツズマブ　オゾガマイシンによる毒性は結合型または非結合カリケアマイシンによる標的に依存しない毒性に起因すると考えられる。

[a]再発または難治性 ALL 患者を対象にイノツズマブ　オゾガマイシンを 1.8 mg/m^2/サイクルで反復投与したときのサイクル 4 の第 1 日（投与量 0.8 mg/m^2）における日本人の AUC_{168} の平均値（母集団薬物動態モデルに基づくシミュレーションによる推定値）（2.7.2.3.1.2 項）

以下の項目に示す曝露比は，各々の毒性所見に関するイノツズマブ　オゾガマイシンの NOAEL または最小毒性量（LOAEL）における AUC とヒトに最大用量（0.8 mg/m^2）を投与したときの臨床曝露量（AUC_{168} 値 32500 ng•h/mL）との比較で算出した。

5.3.1. 肝臓

ラットおよびサルを用いたイノツズマブ　オゾガマイシンの単回投与試験および最長 26 週間の反復投与試験において肝臓の変化が認められた。サルにおける主要な肝臓の所見として，AST または ALT の増加に加え，類洞内皮細胞（SEC）の損傷/減少および血小板捕捉を伴う類洞拡張ならびに多巣性の肝細胞肥大などの病理組織学的変化が認められた。これらの所見は肝臓の微小血管障害を示すものであり，臨床試験で報告されている VOD/SOS や結節性再生性過形成（NRH）の初期段階と形態学的に類似した所見であると考えられる。他の重要な所見として，ラットにおける前腫瘍性病変および腫瘍性病変，ならびに 1 例のサルで変異肝細胞巣が認められた。

ラットおよびサルで観察された血液生化学的パラメータの変化として，反復投与試験において用量依存的な AST または ALT の増加が 0.41 mg/m^2/週以上のラットおよび 0.216 mg/m^2/週以上のサルで認められた。単回投与試験でも，AST および ALT の増加はラットおよびサルのそれぞれ 8.22 mg/m^2 以上および 4.11 mg/m^2 以上で観察された。サル単回投与試験では 8.22 mg/m^2 以上で総ビリルビンの増加も観察されたが，ラットおよびサルの 26 週間反復投与試験でそれぞれ最大 0.727 mg/m^2/週および 0.732 mg/m^2/週を投与しても総ビリルビンの増加はみられなかった。

ラットを用いたイノツズマブ　オゾガマイシンの 4 または 26 週間反復投与試験で認められた肝臓の病理組織学的変化として，0.218 mg/m^2/週以上における肝細胞の核の大型化（軽微～中等度）および肝細胞肥大（軽微～中等度）ならびに 4.07 mg/m^2/週群における肝細胞変性（軽微）が認められた。肝細胞肥大と関連して，0.073 mg/m^2/週以上では剖検時に肝肥大および肝臓の相対重量（体重比）の増加が認められた。ラット 26 週間反復投与試験で認められたその他の病理組織学的所見として，0.073 mg/m^2/週以上における肝細胞の空胞化（軽微～軽度），血管拡張（軽微～重度）および髄外造血，0.218 mg/m^2/週の雄 1 例における胆管線維症（軽度），0.218 mg/m^2/週以上における線維化（軽微，多巣性）ならびに 0.727 mg/m^2/週における類洞拡張（軽微）が認められた。血管拡張はほとんどが被膜下にみられ，剖検で認められた暗変色化または陥凹化と関連する所見であった。サルを用いたイノツズマブ　オゾガマイシンの 4 週間反復投与試験では，4.20 mg/m^2/週までの用量で肝臓の病理組織学的変化はみられなかった。サル 26 週間反復投与試験では，0.072 mg/m^2/週以上で肝細胞萎縮を伴う類洞拡張（軽微～中等度）および 0.216 mg/m^2/週以上で肝細胞肥大（軽微）が観察された。イノツズマブ　オゾガマイシンをラットに単回投与したときには，8.22 mg/m^2 以上で絶対肝重量は減少したが相対肝重量は増加し，16.4 mg/m^2 群では肝細胞肥大および肝細胞の褐色色素沈着の増加が観察された。16.4 mg/m^2 の単回投与後に死亡または瀕死状態のため安楽殺したラットでは，重度の小葉中心性の肝細胞壊死が認められた。これらの観察された肝毒性は，カリケアマイシンの作用機序および肝臓での細胞傷害作用と一致している。また，反復投与試験ではラットの肝臓に前腫瘍性病変および腫瘍性病変が，サルでは 1 例で変異肝細胞巣が認められた。これらの所見については 2.4.5.3.8 項で考察する。

ラット 4 週間反復投与試験では，4 週間の休薬期間終了時にイノツズマブ　オゾガマイシン投与に関連した病理組織学的所見は回復または回復傾向を示した。肝細胞変性は回復したが，肝細胞肥大（軽微～軽度），単細胞壊死の増加（軽微）および核の大型化（軽微）は雌雄で回復傾向を

示したのみであった。サル 4 週間反復投与試験では，イノツズマブ　オゾガマイシン投与による肝臓に関連した所見は，4 週間の休薬期間終了時には認められなかった。

イノツズマブ　オゾガマイシンはラットまたはサルの CD22 抗原とは結合しないことから，上記の肝臓の所見は非結合または結合型カリケアマイシンによる標的非依存的な作用によるものと考えられる。サルにおける肝毒性について詳細に検討し，臨床試験で報告された肝毒性との関係を評価するため，イノツズマブ　オゾガマイシンならびに同一のリンカーおよびカリケアマイシン部分を含む社内で評価した他の ADC［すなわち，ゲムツズマブ　オゾガマイシン，PF-06647259 および PF-06647263（抗エフリン A4 IgG1 抗体に AcBut リンカーを介して N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH を結合させた ADC）］を投与したサルの肝臓での病理組織学的所見について横断的に評価した[a]。サルで認められた肝臓の病理組織学的変化はカリケアマイシンを含む ADC の各試験にわたって同様であり，主として肝細胞の肥大/再生を示唆する病巣を伴う多巣性の類洞拡張または肝細胞萎縮であった。その他の試験間での一貫性が比較的低い病理組織学的所見として，中心静脈の内膜肥厚および概して類洞拡張の領域でみられたクッパー細胞の色素沈着が観察された。PF-06647263 を用いた試験では，血管内皮細胞増殖因子受容体（VEGFR）-2 に対する免疫組織化学染色で SEC の減少が認められ，これは類洞拡張および肝細胞萎縮の領域で最も顕著にみられ，類洞の微細な線維化を伴った。また，レチクリン染色により肝細胞の肥大/再生像を明らかにし，その特性についてさらに評価した結果，肥大した肝細胞の小結節が認められ，これらはほとんどの場合二層性に配列しており，萎縮した肝細胞がその辺縁を囲んでいた。サルにおけるこれらの肝臓の所見は，オキサリプラチンを投与したヒトで報告されたものと形態学的に類似しており[b]，VOD/SOS および NRH の発症段階を示すものと考えられた。

肝障害の発症機序をさらに検討し，肝毒性のバイオマーカー候補を特定することを目的として，ヒト化非結合性 IgG1 モノクローナル抗体にイノツズマブ　オゾガマイシンと同様に AcBut リンカーを介して N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH を結合させた ADC である PF-06647259 のサルを用いた探索的試験を実施した（2.6.6.8.4 項）。試験 3 日の剖検で採取した肝臓試料を用いて行った病理組織学的検査（SEC および血小板の光学顕微鏡，透過電子顕微鏡および免疫組織化学染色による評価を含む）の結果，顕著な肝細胞の損傷はみられなかったが，主に中間帯で中等度から重度の SEC の減少が認められた。さらに，SEC の減少に伴って肝臓での血小板の捕捉，活性化および脱顆粒が認められ，これが急性の血小板数減少の原因になったと考えられた。その後，試験 63 日には SEC は回復したものの類洞の毛細血管化を示す CD34 の過剰発現が認められた，また軽微から軽度の類洞拡張または肝細胞の萎縮を主な特徴とする実質組織の再構築が認められた。これらの病理組織学的検査の結果から，肝臓の SEC の損傷は当該毒性所見の起因となる現象と考えられた。PF-06647259 投与に関連したバイオマーカーの変化は血清中 HA の増加のみであり，この増加は試験 2 日（最大で投与前値の 4.71 倍）から認められ，試験 4 日（同 6.76 倍）に最大になった後初回投与サイクル中に回復傾向を示したが，第 2 以降の投与サイクルでは HA の増加が持続した（最大 8.49 倍）。HA は細胞外基質に含まれる多糖類の一つであり，全身の間葉系細

[a] Nonclinical Toxicity of Antidoby-Calicheamicin Conjugates (White Paper)（参考文献）

[b] Rubbia-Brandt L, Lauwers GY, Wang H, et al. Sinusoidal obstruction syndrome and nodular regenerative hyperplasia are frequent oxaliplatin-associated liver lesions and partially prevented by bevacizumab in patients with hepatic colorectal metastasis. Histopathology. 2010;56:430-9.

胞によって合成され，ほとんど肝臓の SEC のみによって分解される[a]。AST は最大で投与前値の 3.09 倍に増加した。血清中 HA の増加は，試験 3 および 63 日の AST および肝臓の病理組織学的変化と相関していた。このように，サルでみられた肝臓の所見は SEC の一次的な損傷に関連した微小血管障害を示すものであり，VOD/SOS の初期段階に相当する所見と考えられる。サルで認められたこうした肝臓の変化は，標的結合性および非結合性のいずれの抗体からなる ADC でも認められていることから，標的に依存しない毒性であると考えられる。

イノツズマブ　オゾガマイシンを 26 週間投与したとき，ラットおよびサルで最低用量のそれぞれ 0.073 mg/m^2/週（投与 1 週の AUC_{168} は 7630 ng•h/mL）および 0.072 mg/m^2/週（AUC_{168} は 3830 ng•h/mL）から肝毒性が観察された。ラットおよびサルでの LOAEL における曝露量は，最大用量を投与したヒトにおける曝露量（AUC_{168}；32500 ng•h/mL）のそれぞれ 0.1 倍および 0.2 倍であった。

VOD/SOS を含む肝障害については，臨床でも死亡例が報告されていることから，添付文書（案）において「本剤投与中は患者の状態を十分に観察し、VOD/SOS の徴候や症状の発現に注意すること」と注意喚起する。

5.3.2. リンパ系器官，骨髄および血液学的所見

ラットおよびサルを用いたイノツズマブ　オゾガマイシンの単回投与試験および 26 週間までの反復投与試験において，血液学的所見ならびに骨髄およびリンパ系器官の病理組織学的変化が認められた。主要な血液学的所見としては，ラットおよびサルにおける赤血球パラメータおよびリンパ球数の減少ならびにサルにおける血小板数の減少が認められた。急性の血小板数減少はイノツズマブ　オゾガマイシンによる肝臓に特異的な内皮細胞障害の二次的変化としての血小板捕捉によるものと考えられるが，持続性の血小板数減少の機序は明らかではない。

ラットで最もよくみられた血液学的変化は赤血球パラメータ（赤血球数，ヘモグロビンおよびヘマトクリット）の減少であった。この変化は概して網赤血球数の減少を伴い，単回投与試験では 8.22 mg/m^2 以上で，反復投与試験では 0.218 mg/m^2/週以上で認められた。最も顕著な変化は網赤血球数の減少で，反復投与試験では 0.727 mg/m^2/週以上の用量で進行性の赤血球パラメータ減少を伴った。試験中の死亡がなかった群では白血球数の減少が認められたが，これは主にリンパ球数の減少によるもので，リンパ球数の減少は単回投与試験では 4.62 mg/m^2 以上で，4 週間反復投与試験では 4.07 mg/m^2/週で認められた。一過性の血小板数の減少が単回投与試験の 8.22 mg/m^2 以上および 4 週間反復投与試験の 4.07 mg/m^2/週（雌のみ）で，試験 6 または 7 日に認められた。最も顕著な血小板数の減少は単回投与試験の 16.4 mg/m^2 でみられ，これに関連して死亡および肝小葉中心性壊死が認められたが，後者の所見は血小板への影響の一因となった可能性が考えられた。これらの血液学的変化に関連して，単回投与試験の 8.22 mg/m^2 以上および 4 週間反復投与試験の 1.24 mg/m^2/週以上では，病理組織学的所見として骨髄の造血細胞の減少ならびに胸腺，脾臓，リンパ節または GALT のリンパ球数減少が観察された。4 週間反復投与試験での 4 週間の休薬期

[a] Eriksson S, Fraser JR, Laurent TC, et al. Endothelial cells are a site of uptake and degradation of hyaluronic acid in the liver. Exp Cell Res. 1983;144:223-8.

間終了時に，血液学的所見ならびに骨髄およびリンパ系器官の病理組織学的変化は回復または回復傾向を示した。

サルでみられた血液学的変化は主に赤血球パラメータ，リンパ球数および血小板数の減少であった。単回投与試験の 16.4 mg/m^2 および反復投与試験の 0.732 mg/m^2/週以上で観察された赤血球パラメータの減少は，試験期間全体にわたって徐々に進行した。網赤血球数も減少したが，必ずしも赤血球パラメータの減少とは一致しなかった。リンパ球数の減少は，単回投与試験の 8.22 mg/m^2 以上および反復投与試験の 0.732 mg/m^2/週以上で観察された。血小板数の減少は初回投与後まもなく認められ，最も顕著な影響は単回投与試験の 4.11 mg/m^2 以上で試験 3 日に，4 週間反復投与試験の 0.36 mg/m^2/週以上で試験 4 日に観察され，単回投与試験の 4.11 mg/m^2 以上では試験 14 日までに，4 週間反復投与試験の 1.32 mg/m^2/週以下および 4.20 mg/m^2/週ではそれぞれ試験 10 日および 28 日までに回復した。骨髄の病理組織学的所見は 4 週間反復投与試験の 1.32 mg/m^2/週以上でみられた軽微な細胞数減少のみであり，この所見は血液学的変化の一因となった可能性も考えられるが，サルの血小板の寿命は通常 6～8 日であることを考慮すると，血小板数の急速な減少は骨髄での血小板産生低下よりむしろ末梢での血小板の破壊を示唆しており，これについては後述のサルを用いた探索的試験を実施してさらに検討した。リンパ球数の減少と関連する変化として，反復投与試験の 0.36 mg/m^2/週以上では胸腺，脾臓またはリンパ節の軽微から極めて重度のリンパ球数減少が観察された。4 週間反復投与試験での 4 週間の休薬期間終了時に，血液学的所見ならびに骨髄およびリンパ系器官の病理組織学的変化は回復または回復傾向を示した。

2.4.5.3.1 項で述べた PF-06647259 の探索的試験（2.6.6.8.4 項）において，血小板減少の発症機序についても検討した。PF-06647259 投与に関連した主要な血液学的変化は血小板数の減少であり，初回投与サイクルでは血小板数は急性かつ可逆的に減少し，それ以降のサイクルでは初回ほど顕著ではないものの持続的な減少を示した。骨髄に血小板産生低下の徴候はなく（巨核球の密度および形態は正常範囲内），血中に直接的な血小板活性化またはサイトカイン放出（IL-6）の徴候は認められなかった。試験 3 日の剖検で採取された肝臓試料を用いて行った病理組織学的評価（SEC および血小板の光学顕微鏡，透過電子顕微鏡および免疫組織化学染色による評価を含む）の結果，主に中間帯で中等度から重度の SEC の消失とそれに付随する血小板の捕捉，活性化および脱顆粒が認められた。試験 3 日の肺および腎臓には同様の病理組織学的所見はみられず，急性の血小板数減少は PF-06647259 による肝臓特異的な内皮損傷の二次的変化として発生した血小板の捕捉によって生じたと考えられた。初回投与から 3 週間後に血小板数は投与前値に回復したが，それ以降の投与サイクルでは完全には回復せず，血小板に対する影響が持続した機序は不明であるが，トロンボポエチン減少により骨髄への刺激が不十分となり，慢性的な血小板産生減少に至った可能性が考えられる。同様の機序による肝臓における血小板の捕捉および凝集による血小板減少症はオキサリプラチンを投与した患者でも報告されており，これについても肝臓の SEC 損傷との関連が指摘されている[a]。

以上のように，イノツズマブ　オゾガマイシン投与による主な血液学的変化はラットおよびサルでみられた赤血球パラメータおよびリンパ球数の減少ならびにサルでみられた血小板数の減少

[a] Tajima H, Ohta T, Miyashita T, et al. Oxaliplatin-based chemotherapy induces extravasated platelet aggregation in the liver. Molecular and Clinical Oncology. 2015;3: 555-8.

であった。ラットおよびサルではイノツズマブ　オゾガマイシンは標的の CD22 抗原と結合しないため，両動物種におけるこれらの血液学的変化は，カリケアマイシンによる標的に依存しない影響に起因するものと考えられた。26 週間反復投与試験における血液学的変化に対する NOAEL は，ラットでは 0.218 mg/m^2/週（AUC_{168} は 20200 ng•h/mL），サルでは 0.216 mg/m^2/週（AUC_{168} は 21700 ng•h/mL）であった。ラットおよびサルでの NOAEL における曝露量は，最大用量を投与したヒトにおける曝露量（AUC_{168}；32500 ng•h/mL）のそれぞれ 0.6 倍および 0.7 倍であった。

骨髄抑制については臨床においても致命的な転帰をたどる場合があり，また骨髄抑制に起因した感染症による死亡例も報告されていることから，添付文書（案）において「骨髄抑制作用に起因する感染症，出血や他の副作用の徴候や症状を観察し，必要に応じ，減量，休薬，中止又は抗感染症薬の投与等の適切な処置を行うこと」と注意喚起する。

5.3.3. 雄性生殖器

主にラットを用いた単回投与試験および 4 週間以上の反復投与試験において，雄性生殖器（精巣，精巣上体，前立腺，精嚢および乳腺）への影響が認められた。単回投与試験では 8.22 mg/m^2 以上で軽微から極めて重度の精細管変性が認められ，関連する所見として精巣の小型化ならびに精巣の絶対および相対重量の減少が認められた。また，精巣での変性変化を反映する所見として，精巣上体の精子減少，精巣上体の小型化，前立腺萎縮ならびに精巣上体および前立腺の重量減少が認められた。4 週間以上の反復投与試験では，0.073 mg/m^2/週以上で用量依存的な精細管変性（軽度～極めて重度）が認められた。精細管変性の特徴として，高頻度にセルトリ細胞の層のみを有する萎縮した精細管が認められ，付随して管内に巨大精子細胞がみられた。精巣の病理組織学的所見と関連して，0.073 mg/m^2/週以上で精巣小型化ならびに絶対および相対精巣重量の減少が認められた。0.073 mg/m^2/週以上では，精細管変性の二次的所見として精巣上体の精子減少が認められた。同用量では，雄の乳腺の萎縮も観察された。4 週間反復投与試験のみで観察された他の所見として，精嚢（0.41 mg/m^2/週以上）ならびに精巣上体および前立腺（1.24 mg/m^2/週以上）の小型化または重量減少が認められた。26 週間反復投与試験では，0.727 mg/m^2/週で軽微な精嚢腺液減少が認められた。4 週間反復投与試験では，4 週間の休薬期間終了時に重度から極めて重度の精細管変性は依然として認められ，二次的変化として精巣上体の精子減少も認められた。精巣の変化と関連して，精巣の小型化ならびに精巣および精巣上体の重量減少も認められた。雄の乳腺の萎縮は，休薬期間終了時までに回復傾向を示した。正常な精子形成サイクルでは精原細胞の成熟に約 8 週間を要することから[a]，ラット 4 週間反復投与試験で精細管変性の回復または回復傾向がみられないことは予測可能であった。また，精巣上体の回復は精巣に対する一次的な影響が回復した後に起こると考えられることから，精巣上体の所見が持続することも予測可能であった。イノツズマブ　オゾガマイシン投与によって生じた精巣に対する影響は，カリケアマイシンを成分に含む他の ADC の細胞障害作用と同様であった[b]。

[a] Foster PMD. Testicular organization and biochemical function. In: Lamb JC, Foster PMD, editors. The Physiology and Toxicology of Male Reproduction. New York: Academic Press; 1988:7-34.

[b] Nonclinical Toxicity of Antidoby-Calicheamicin Conjugates (White Paper)（参考文献）

サルを用いた 4 週間反復投与試験では，1 例を除く全例で精巣が未成熟であったため，イノツズマブ　オゾガマイシンが精子形成に及ぼす影響を評価することはできなかった。ただし，4.20 mg/m^2/週の雄 2 例の精巣では，セルトリ細胞の空胞化が認められた。26 週間反復投与試験では，0.732 mg/m^2/週までの用量でイノツズマブ　オゾガマイシンを投与した雄サルの生殖器官に影響はみられなかった。しかし，試験に用いたサルの年齢および雄性生殖器の成熟状態から判断して，生殖器官への影響を十分に評価することはできていないと考えられた。

ラットの 26 週間反復投与試験では，0.073 mg/m^2/週（投与 1 週の AUC_{168} は 7630 ng•h/mL）から雄性生殖器に毒性所見が認められ，このときの曝露量は最大用量を投与したヒトにおける曝露量（AUC_{168}；32500 ng•h/mL）の 0.2 倍であった。サルに関しては，反復投与毒性試験で用いた雄の成熟度にはばらつきがあったため，雄性生殖器に対する影響を正確に評価することはできなかった。

5.3.4. 雌性生殖器

ラットおよびサルを用いたイノツズマブ　オゾガマイシンの単回投与試験および 4 週間反復投与試験において，雌の生殖器官（卵巣，子宮，腟および乳腺）への影響が認められた。

ラット単回投与試験では，16.4 mg/m^2 で卵巣，子宮および腟上皮の軽微から軽度の萎縮が認められ，これと関連して卵巣および子宮の相対重量の減少も認められた。ラット 4 週間反復投与試験では 4.07 mg/m^2/週で卵巣，子宮および腟の軽微な萎縮が認められ，これに関連して子宮の小型化ならびに子宮および卵巣の絶対重量の減少が認められた。サル 4 週間反復投与試験では 1.32 mg/m^2/週以上で軽微から重度の卵巣萎縮が認められ，これに関連して 0.36 mg/m^2/週以上で卵巣の絶対および相対重量の減少がみられた。4.20 mg/m^2/週では軽微から軽度の子宮萎縮が認められ，これに関連して 0.36 mg/m^2/週以上で子宮重量が減少した。ラットの卵巣では二次および三次卵胞が減少し，一次卵胞の変性がみられた。ラットおよびサルの子宮の所見として，ラットで子宮筋層，サルで子宮内膜の厚みが減少し，ラットで子宮内膜の高さが減少し，サルで子宮内膜腺が減少した。また，ラット 4 週間反復投与試験では 4.07 mg/m^2/週で腟上皮の層の数が減少し，腟の重量減少と関連していた。同用量の雌 1 例では乳腺の萎縮がみられた。ラットでは 4 週間の休薬期間終了時に，1 例の両側卵巣の黄体内で軽度な単細胞壊死の発生率が増加し，卵巣の絶対および相対重量が減少したが，明らかな卵巣萎縮や子宮重量の減少はみられなかった。サルでは 4 週間の休薬期間終了時に卵巣および子宮の重量減少ならびに卵巣萎縮は回復傾向を示し，子宮萎縮は回復した。サル 26 週間反復投与試験で観察された変化は 0.732 mg/m^2/週での軽微な卵巣萎縮のみであり，ラット 26 週間反復投与試験では雌性生殖器への影響は認められなかった。

26 週間反復投与試験において，ラットの 0.727 mg/m^2/週（AUC_{168} は 64000 ng•h/mL）およびサルの 0.732 mg/m^2/週（AUC_{168} は 90700 ng•h/mL）までの用量で雌性生殖器に毒性所見は認められず，このときの曝露量は最大用量を投与したヒトにおける曝露量（AUC_{168}；32500 ng•h/mL）のそれぞれ 2.0 倍および 2.8 倍であった。

5.3.5. 胚・胎児毒性

ラットの受胎能試験ならびにラットおよびウサギの胚・胎児発生試験では，ラットの胎児体重の減少を除き，母動物に毒性が生じる用量においてのみ，胎児に対する影響が認められた。ラット受胎能試験では，0.109 mg/m^2/日で母動物の体重，体重増加量および摂餌量の軽微な減少が認め

られ，また胚吸収の増加およびそれに伴う生存胚数の減少が観察された。胚・胎児発生試験では，ラットの 0.109 mg/m^2/日およびウサギの 0.145 mg/m^2/日で母動物の体重増加量および摂餌量の軽微な減少が認められた。ラットでは 0.036 mg/m^2/日以上で胎児体重の減少ならびにそれに関連して胎児の骨化遅延（肋骨，頭蓋骨，胸骨分節および椎骨）が認められ，0.109 mg/m^2/日では上腕骨短小/肥厚，肩甲骨奇形および尺骨奇形の発現例数が増加した。ラットにおけるこれらの胎児の形態への影響は可逆的であり，胎児の成長遅延の結果として生じたものと考えられた[a]。これら以外には胎児の形態にイノツズマブ　オゾガマイシン投与に関連する変化は認められなかった。ウサギ胚・胎児発生試験では，重要な試験において 0.145 mg/m^2/日までの用量で胚・発生毒性は認められなかったが，用量設定試験では 0.436 mg/m^2/日で母動物に死亡を含む顕著な毒性所見がみられると同時に胎児体重減少および胎児の死亡が認められた。

胚・胎児発生に関するラットおよびウサギにおける NOAEL はそれぞれ 0.011 mg/m^2/日（AUC_{24} は 364 ng•h/mL）および 0.145 mg/m^2/日（AUC_{24} は 13300 ng•h/mL）で，これらの値は最大用量を投与したヒトにおける曝露量（AUC_{168}；32500 ng•h/mL）の 0.08 倍および 2.9 倍であった。

毒性試験で上述したような雌雄生殖器系に対する影響および胚・胎児毒性が観察されていることから，添付文書（案）において「妊婦又は妊娠している可能性のある婦人には，治療上の有益性が危険を上回ると判断される場合にのみ投与すること。妊娠可能な女性に対しては，治療中及び本剤の最終投与後少なくとも 8 ヵ月，妊娠可能な女性をパートナーに持つ男性に対しては，治療中及び本剤の最終投与後少なくとも 5 ヵ月は有効な避妊を行うよう指導すること」と注意喚起する。

5.3.6. 神経系

ラット 4 週間反復投与試験で末梢および中枢性軸索の変性が観察されたが，26 週間試験では認められなかった。4 週間反復投与試験の 1.24 mg/m^2/週以上で坐骨神経の軽微な軸索変性がみられ，4.07 mg/m^2/週の雌で頸髄（後索および側索）に，雌雄で三叉神経に，軽微な軸索変性が観察された。4 週間の休薬期間終了時には，4.07 mg/m^2/週において坐骨神経の軸索変性は増悪し，頸髄および三叉神経の軸索変性も依然として認められた。さらに同用量では，休薬期間終了時に腰髄の軽微な軸索変性が新たに認められた。サルの単回および反復投与試験では，神経系への影響は認められなかった。

ラット 4 週間反復投与試験における軸索変性に関する NOAEL は 0.41 mg/m^2/週（AUC_{168} は 50700 ng•h/mL）であり，これは最大用量を投与したヒトにおける曝露量（AUC_{168}；32500 ng•h/mL）の 1.6 倍であった。

5.3.7. 腎臓

ラットおよびサルの単回または反復投与試験において，腎臓への影響が認められた。ラットでは，単回投与試験の 16.4 mg/m^2（瀕死例のみ）および 4 週間反復投与試験の 1.24 mg/m^2/週以上で尿細管のタンパク円柱形成（軽微～軽度）が観察されたが，これに随伴する病変が腎臓に認められな

[a] Kimmel CA, Garry MR, DeSesso JM. Relationship between bent long bones, bent scapulae, and wavy ribs: Malformations or variations? Birth Defects Research (Part B) 2014;101:379-92.

かったことから，毒性学的意義の低い変化と考えられた。26 週間反復投与試験では，0.218 mg/m^2/週以上の雌雄に慢性進行性腎症の発現例数および重症度の増加（軽微～重度）が認められ，これに関連して剖検で腎皮質の淡明化および顆粒状外観が認められた。当該所見がヒトへの外挿性のないラットに特異的な腎症の悪化であるか，イノツズマブ　オゾガマイシンによる直接的な影響であるかは明らかでない。サルでは，26 週間反復投与試験において 0.732 mg/m^2/週の雄 1 例を試験 37 日に安楽殺したが，この 1 例ではタンパク喪失を伴う糸球体腎炎が瀕死状態の原因と考えられた。この糸球体腎炎に付随する所見として，尿タンパク，腎尿細管の円柱形成および亜急性全身性血管炎が認められた。糸球体腎炎または全身性血管炎は単回および 4 週間反復投与試験では認められなかった。糸球体腎炎および血管炎の経時変化および病理組織学的特徴から，ADA による免疫複合体の沈着の可能性が考えられる。このサルでは ADA は検出されなかったが，血清中のイノツズマブ　オゾガマイシンにより ADA 検出が妨げられたか，あるいは採血時に ADA 量が少なかったか存在しなかった可能性がある。しかしながら，イノツズマブ　オゾガマイシン投与時に認められた変化であるため，糸球体腎炎が本薬投与に関連した所見である可能性は否定できない。

ラットおよびサルにおける 26 週間反復投与試験の腎臓に関する NOAEL はそれぞれ 0.073 mg/m^2/週（AUC_{168} は 7630 ng•h/mL）および 0.216 mg/m^2/週（AUC_{168} は 21700 ng•h/mL）であり，これは最大用量を投与したヒトにおける曝露量（AUC_{168}；32500 ng•h/mL）のそれぞれ 0.2 倍および 0.7 倍であった。

5.3.8. 変異原性，染色体異常誘発性およびがん原性

イノツズマブ　オゾガマイシンの遺伝毒性を評価した結果，染色体異常誘発性が確認されたが変異原性は認められなかった。イノツズマブ　オゾガマイシンは雄マウスにおいて，検討した最低用量である 1.14 mg/m^2 より用量依存的に小核の出現頻度を増加させた。また，イノツズマブ　オゾガマイシンから遊離する細胞毒性物質である N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は，細菌を用いた in vitro 復帰突然変異試験および培養ヒトリンパ芽球細胞 TK6 を用いた試験において，それぞれ変異原性および染色体異常誘発性を示した。また，天然に存在するカリケアマイシンであるカリケアマイシンγは DNA を強力に切断する物質であり，配列特異的な二本鎖切断を引き起こすこと[a]，またその作用機序に由来して，in vitro 小核試験および in vitro 染色体異常試験において強力に染色体損傷を誘発することが知られている物質である[b,c]。

イノツズマブ　オゾガマイシンを 26 週間投与したとき，病理組織学的検査でラット肝臓に前腫瘍性病変または腫瘍性病変を示す用量依存的な所見が認められ，サル 1 例で変異肝細胞巣が認められた。ラットでは，0.727 mg/m^2/週で肝細胞腺腫が，0.073 mg/m^2/週以上で好塩基性または好酸

[a] Zein N, Poncin M, Nilakantan R, et al. Calicheamicin γ_1^I and DNA: Molecular recognition process responsible for site-specificity. Science. 1989;244:697-9.

[b] Van Duijn-Goedhart A, Zdzienicka MZ, Sankaranarayanan K, et al. Differential responses of Chinese hamster mutagen sensitive cell lines to low and high concentrations of calicheamicin and neocarzinostatin. Mutation Research. 2000;471:95-105.

[c] Zhou T, Akopiants K, Mohapatra S, et al. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase and the repair of 3'-phosphoglycolate-terminated DNA double-strand breaks. DNA Repair. 2009;8:901-11.

性変異細胞巣（軽微～中等度）およびオーバル細胞の過形成（軽微～中等度）が認められた。肝細胞腺腫ならびに好塩基性および好酸性細胞巣は，剖検で認められた多巣性淡色隆起性の肝臓変色と関連するものであった。オーバル細胞の軽微な過形成は単回投与試験（8.22 mg/m^2 以上）および 4 週間反復投与試験（4.07 mg/m^2/週）でも観察された。サルの 26 週間反復投与試験では，0.732 mg/m^2/週の雌 1 例で変異肝細胞巣が観察された。変異肝細胞巣はげっ歯類では前腫瘍性病変と考えられるが[a,b]，カニクイザルの自然発生病変としては一般的ではなく[c]，サルにおける発症原因や腫瘍形成との関連は不明である。26 週間反復投与試験では，ラットの 0.218 mg/m^2/週以上およびサルの 0.072 mg/m^2/週以上において，これらの所見と関連して肝細胞核の Ki-67 染色を指標とした肝細胞増殖活性の増加が示された。この増殖活性の増加ならびに前腫瘍性病変および腫瘍性病変は，肝細胞のターンオーバーの増加によるものと考えられ，両動物種の肝臓における遺伝毒性および細胞毒性と符合するものである。ラット 4 週間反復投与試験での 4 週間の休薬期間終了時には，オーバル細胞の過形成（軽微～中等度）が依然として観察され，雄 1 例で明細胞巣が観察された。サルの 4 週間反復投与試験では，4 週間の休薬期間終了時に前腫瘍性病変または腫瘍性病変は認められなかった。

ラット 26 週間反復投与試験では最低用量（0.073 mg/m^2/週；AUC_{168} は 7630 ng•h/mL）から前腫瘍性病変が認められ，これが LOAEL と考えられた。サル 26 週間反復投与試験における前腫瘍性病変または腫瘍性病変に関する NOAEL は 0.216 mg/m^2/週（AUC_{168} は 21700 ng•h/mL）と考えられた。これらの曝露量は最大用量を投与したヒトにおける曝露量（AUC_{168}；32500 ng•h/mL）のそれぞれ 0.2 倍および 0.7 倍であった。

上述したイノツズマブ　オゾガマイシンの遺伝毒性および前腫瘍性/腫瘍性病変については, 添付文書（案）の「その他の注意」の項に記載し，注意喚起する。

5.3.9. その他の所見

ラットまたはサルの単回または反復投与試験において，凝固パラメータ（APTT および PT）に加え，血液生化学的パラメータとしてフィブリノゲン，アルブミン，グロブリン，アルブミン/グロブリン比（A/G 比），グルコース，コレステロール，トリグリセリド，リン，カリウムおよびサイロキシンなどの変化が観察された。病理組織学的所見として，ラットの単回または反復投与試験において肺胞マクロファージの増加が認められた。盲腸，胃および心臓の変化はラット単回投与試験において瀕死状態のラットでのみ観察された。

サル単回投与試験において 4.11 mg/m^2 以上で APTT の軽度から中等度の延長および PT の軽微から軽度の延長が観察された。APTT の変化は用量依存的であったが，投与 7～14 日後に回復または回復傾向が認められた。APTT または PT の変化は，サルの反復投与試験あるいはラットの単

[a] Goodman DG, Maronpot RR, Newberne PM, et al. Proliferative and selected other lesions of the liver of rats. In: Guides for Toxicology Pathology. STP/ARP/AFIP. Washington, DC. 1994:1-15.

[b] Bannash P, Haertel T, Su Q. Significance of hepatic preneoplasia in risk identification and early detection of neoplasia. Toxicol Pathol. 2003;31:134-9.

[c] Reindel JF, Walsh KM, Toy KA, et al. Spontaneously occurring hepatocellular neoplasia in adolescent cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis). Vet Pathol. 2000;37:656-62.

回または反復投与試験では認められなかった。フィブリノゲンの増加（軽微～軽度）は，ラットの 4 または 26 週間反復投与試験の 0.727 mg/m^2/週以上ならびにサル単回投与試験の 4.11 mg/m^2 以上および 4 週間反復投与試験の 1.32 mg/m^2/週以上で認められた。アルブミン，グロブリン，A/G 比または総タンパクの軽微な増加または減少は，ラットおよびサルの単回投与試験（ラット 16.4 mg/m^2，サル 4.11 mg/m^2 以上）および 26 週間反復投与試験（ラット 0.727 mg/m^2/週，サル 0.216 mg/m^2/週以上）で認められた。アルブミンおよびグロブリンの変化はサル 4 週間反復投与試験（1.32 mg/m^2/週以上）でも観察された。ラットおよびサルでみられたフィブリノゲンおよび血清タンパクの軽微から軽度の増加は炎症の可能性を示唆するもので，一部の動物では血液学的所見（好中球数および単球数の軽微から軽度の増加）と関連していた。血清タンパクの減少は主に摂餌量の減少によるものと考えられた。フィブリノゲンおよび血清タンパクの変化は，全身性炎症を示唆する病理組織学的所見がみられない，変化の程度が小さい，用量反応性がみられない，あるいは摂餌量の減少に伴う二次的変化であることから，毒性学的意義の低い変化と考えられた。コレステロール，グルコースまたはトリグリセリドの軽微な減少は，ラットおよびサルの単回投与試験（ラット 8.22 mg/m^2 以上，サル 4.11 mg/m^2 以上）ならびにラットの 4 週間反復投与試験（0.41 mg/m^2/週以上）で観察された。雌ラットで認められたトリグリセリドの減少は，4 週間の休薬期間後も持続した。これらのパラメータの減少は摂餌量の減少によるものと考えられ，毒性学的意義の低い変化と考えられた。無機リンはラットの単回投与試験（8.22 mg/m^2 以上）およびサルの 4 週間反復投与試験（4.20 mg/m^2/週）で減少し，ラットの 4 週間反復投与試験（1.24 mg/m^2/週以上）で増加した。サイロキシンの減少は，ラット単回投与試験（3.06 mg/m^2 以上）ならびにラットおよびサルの 4 週間反復投与試験（ラット 4.07 mg/m^2/週，サル 4.20 mg/m^2/週）で認められた。カリウムの減少はラット単回投与試験（8.22 mg/m^2 以上）で観察された。無機リン，サイロキシンおよびカリウムの変化は軽微から軽度であり，毒性学的意義の低い変化と考えられた。肺胞マクロファージの増加は，ラットの単回投与試験（8.22 mg/m^2 以上）ならびに 4 および 26 週間反復投与試験（それぞれ 0.41 mg/m^2/週以上および 0.727 mg/m^2/週）で観察されたが，軽微な変化であり，毒性学的意義の低い変化と考えられた。心臓の出血，盲腸粘膜の変性および胃主細胞の好酸性変化は，ラットの単回投与試験において，16.4 mg/m^2 群の瀕死状態の個体でのみ認められた。

5.3.10. 毒性試験に関する結論

イノツズマブ　オゾガマイシンの毒性プロファイルを，単回投与毒性試験，最長 26 週間の反復投与毒性試験，遺伝毒性試験，雌の受胎能着床までの初期胚発生に関する試験，胚・胎児発生試験ならびに組織交差反応性試験を実施して評価した。非結合カリケアマイシン誘導体についても単回投与毒性試験，最長 6 週間の反復投与毒性試験，遺伝毒性試験または光毒性試験を実施した。ラットおよびサルの単回および反復投与試験において，本薬の活性部分である N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の薬理作用である DNA 鎖切断による細胞毒性に起因すると考えられる主要な標的臓器への影響が両動物種の肝臓，リンパ造血系組織および雌雄生殖器で認められた。サルの肝臓で認められた所見は微小血管障害を示唆しており，臨床試験で報告されている VOD/SOS および NRH と形態学的に類似した，これらの病態の初期段階を示すものと考えられる。急性の血小板数減少はイノツズマブ　オゾガマイシン投与による肝臓特異的な内皮の損傷の二次的変化として発生した血小板の捕捉によって生じたと考えられるが，血小板数減少が持続した機序は不明である。イノツズマブ　オゾガマイシン投与に関連した毒性学的に意義のあるその他の所見として，軸索変性がラットの 4 週間反復投与試験で観察される（ただし 26 週間反復投与試験では認められなかった）とともに糸球体腎炎がサルの 26 週間反復投与試験の 1 例で認められ，その結

果当該動物は試験37日に安楽殺された。糸球体腎炎はADA産生と関係していると考えられるが，イノツズマブ　オゾガマイシン投与と直接関連している可能性も否定できない。軸索変性および糸球体腎炎のヒトへの外挿性は不明である。カリケアマイシン誘導体のラットおよびイヌを用いた単回または反復投与毒性試験において，新たな標的臓器毒性は認められなかった。イノツズマブ　オゾガマイシンの単回および反復投与によって，用量依存的な体重または摂餌量の減少が認められた。不耐容の徴候を示す一般状態変化に続く瀕死状態/死亡は，ラット単回投与試験およびサル26週間反復投与試験で観察された。ラットで観察された精巣および精巣上体の変化ならびに軸索変性を除き，イノツズマブ　オゾガマイシン投与に関連したすべての標的臓器毒性は，休薬期間後に回復または回復傾向を示すことが確認された。雌の受胎能に対する影響は認められなかったが，ラットおよびウサギの胚・胎児発生試験において，イノツズマブ　オゾガマイシンは胎児毒性を示した。イノツズマブ　オゾガマイシンは染色体異常誘発性を示した。前腫瘍性病変がラットの単回投与試験ならびに4および26週間反復投与試験で，肝細胞腺腫がラット26週間反復投与試験で，また変異細胞巣がサル26週間反復投与試験の1例で観察された。ラット4週間反復投与試験で認められた前腫瘍性病変は4週間の休薬期間後にも持続していた。以上のイノツズマブ　オゾガマイシンの毒性プロファイルは対象とする患者集団（再発または難治性ALL患者）においてモニタリング可能であり，臨床的に管理可能または許容可能なリスクであると考えられる。

5.4. 結論

以上の非臨床試験結果から，イノツズマブ　オゾガマイシンは臨床においてALLの治療に有用であると期待された。