2.4 非臨床試験の概括評価

目次

2.4	非臨床試験の概括評価	1
2.4.1	非臨床試験計画概略	3
2.4.2	薬理試験	6
2.4.2.1	主薬効薬理試験	6
2.4.2.2	副次的薬理試験	8
2.4.2.3	安全性薬理試験	9
2.4.3	薬物動態試験	10
2.4.3.1	吸収	10
2.4.3.2	分布	11
2.4.3.3	代謝	11
2.4.3.4	排泄	14
2.4.3.5	薬物動態学的薬物相互作用	14
2.4.3.6	評価に用いた分析法の妥当性	15
2.4.3.7	評価に用いた動物モデルの妥当性	16
2.4.4	毒性試験	17
2.4.4.1	単回投与毒性	17
2.4.4.2	反復投与毒性	18
2.4.4.3	遺伝毒性	19
2.4.4.4	がん原性	20
2.4.4.5	生殖発生毒性	20
2.4.4.6	幼若動物の毒性	20
2.4.4.7	局所刺激性	21
2.4.4.8	その他の毒性試験	21
2.4.4.9	毒性試験プログラム	23
2.4.4.10	動物からヒトへのデータの外挿	24
2.4.5	総括及び結論	26
2.4.5.1	ベネトクラクスの特徴	26
2.4.5.2	ベネトクラクスの安全性	27
2.4.5.3	総括	28
2.4.6	参考文献一覧	29

表一覧

表 2.4-1.　ベネトクラクスの主薬効薬理試験 8
表 2.4-2.　ベネトクラクスの副次的薬理試験 9
表 2.4-3.　ベネトクラクスの安全性薬理試験 10
表 2.4-4.　ベネトクラクスの薬物動態試験プログラム 15
表 2.4-5.　薬物濃度測定法* 16
表 2.4-6.　血漿中（定常状態）におけるベネトクラクスの代謝物プロファイル 17
表 2.4-7.　毒性試験プログラム 23
表 2.4-8.　ベネトクラクスの安全性プロファイル 28
表 2.4-9.　ベネトクラクス：マウス，ラット及びイヌの主要な毒性試験一覧 31

2.4.1 非臨床試験計画概略

ベネトクラクスは，これまで実施された試験においては，A-1195425，A-1195425.0 又はABT-199 と表記した。ベネトクラクスは，17p 欠失のある，少なくとも 1 種類以上の治療経験歴のある再発又は難治性 慢性リンパ球白血病（以下「CLL」） 患者に対する治療薬として 2016 年に FDA に迅速承認された。また，ベネトクラクスは EMA を含む複数の国において，CLL の治療薬として承認又は 条件承認を得ている。更に ，多発性骨髄腫（以下「MM」），急性骨髄性白血病（以下「AML」）及び非ホジキンリンパ腫（以下「NHL」），びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫（以下「DLBCL」）を含む複数のがん腫の治療薬として開発を進めている。

ベネトクラクスは，抗アポトーシス性タンパク質の BCL-2 ファミリーの一つである BCL-2 を強力かつ選択的に阻害する経口投与可能な BCL-2 阻害剤である。ベネトクラクスは単剤として 1200 mg/日まで投与され，最も多く投与された用量範囲は，400 mg/日から 800 mg/日であった。CLL，小リンパ球性リンパ腫及び NHL 患者に対してベネトクラクスの 400 mg/日を食後投与した際の定常状態における C_{max} 及び AUC_{0-24h} の平均値はそれぞれ 2.10 μg/mL 及び 32.8 μg•h/mL で，800 mg/日を食後投与した際の定常状態における C_{max} 及び AUC_{0-24h} の平均値はそれぞれ 3.43 μg/mL 及び 48.8 μg•h/mL であった。ベネトクラクスの曝露は食事の影響がみられることから，非臨床安全性試験における安全域の算出には 400 から 800 mg/日投与時の臨床曝露量を用いた。

ベネトクラクスの BCL-2 との結合親和性は高く（阻害定数［Ki］< 0.010 nmol/L），その他の抗アポトーシス性 BCL-2 ファミリータンパク質（$BCL-X_L$ 及び BCL-w）との結合親和性はそれより低い（BCL-2 に対する親和性のそれぞれ 4800 分の 1 未満及び 24500 分の 1 未満である）。*In vitro* において，ベネトクラクスは，患者由来の CLL 細胞，並びに B 細胞濾胞性リンパ腫（以下「FL」），マントル細胞リンパ腫（以下「MCL」），DLBCL，AML 及び MM といった様々なリンパ腫及び白血病の細胞株に対して細胞傷害作用を示した。ベネトクラクスは，特に BCL-2 を高発現している NHL 細胞株に対して強力な作用を示した。ベネトクラクスは，異種移植した急性リンパ性白血病（以下「ALL」），NHL 及び AML 由来のヒト腫瘍細胞株の増殖を抑制し，様々な用量で他剤との併用療法において高い有効性を示した。また，播種性の ALL 及び AML のモデルにおいても有効であった。

ベネトクラクスの薬物動態はマウス（CD-1，野生型 Tg.rasH2），ラット（Sprague-Dawley, Long Evans），ウサギ（New Zealand White），イヌ（ビーグル），サル（カニクイ）及びヒトで評価した。ベネトクラクスは難溶性の親油性化合物であるため，毒性試験で用いる動物種において，投与媒体及び用量の影響により，実現可能な最大曝露量が規定された。代謝経路の検討並びに単回投与及び定常状態における血漿中代謝物の検討の結果から，薬理活性を有しないヒト主要代謝物 M27 を特定した。放射能標識ベネトクラクスを用いた検討により，毒性試験で使用した主な動物種及びヒトにおける排泄並びに雌雄ラットの組織分布を評価した。タンパク結合率は各動物種及びその濃度依存性を検討した。また，CYP，UGT 及び各種トランスポーターに対するベネトクラクス及び M27 の基質及び阻害剤としての薬物相互作用を非臨床試験及びいくつかの臨床試験で検討した。

ベネトクラクスの安全性は，反復投与毒性試験（マウスでは 2 週間から 6 ヵ月間，ラットでは2週間から13週間，イヌでは1週間から9ヵ月間），*in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験，生殖発生毒性試験（マウス及びウサギの胚・胎児発生に関する試験並びにマウスの受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験），マウスの幼若動物毒性試験，ヘアレスマウスの光毒性試験，*in vitro* 及び *in vivo* 安全性薬理試験（中枢神経系，心血管系及び呼吸系の機能）を実施して，評価した。一部は ICH S9 の規定外の毒性試験も実施した [1]。ベネトクラクスの毒性試験でみられた主要な所見は，マウス，ラット及びイヌにおける血球系に対する変化（リンパ球及び赤血球系パラメータの減少），雄のイヌにおける生殖器系に対する変化（精巣生殖細胞の減少），マウスにおける胎児毒性であった。催奇形性のエビデンスはみられなかった。

ヒトの主要代謝物である M27 が定常状態における CLL 患者及び NHL 患者で検出された。M27 は，マウス及びイヌにおいてもみられているが，これらの動物種における曝露量は，ヒトの定常状態の曝露量と比較して低値（約 0.04－0.06 倍）であった。M27 は *in vitro* の薬理活性も低く（ベネトクラクスの 58 分の 1 未満），*in vitro* の復帰突然変異試験及び染色体異常試験において遺伝毒性を示さなかった。また，M27 に起因するオフターゲットな薬理作用は *in vitro* 副次的薬理試験においても弱いことが示された。M27 を最大 300 mg/kg/日の投与量でマウスに 4 週間反復経口投与した結果，著変はみられなかった。

2.4.1.1 試験計画

予定適応症でベネトクラクスを使用するための臨床開発及び承認申請に必要なデータを収集することを目的として，薬理試験，薬物動態試験及び毒性試験を計画した。薬理試験では，薬効薬理試験，副次的薬理試験，及び安全性薬理試験を実施した。薬物動態試験では，単回及び反復投与薬物動態試験，最も高い曝露を得るための検討，血漿及び排泄物中の代謝物の同定及びプロファイリング，組織内及び血漿への分布，並びに非臨床試験における薬物相互作用の検討を実施した。

定常状態での患者血漿中においては，ベネトクラクスのヒト主要代謝物として M27 が認められ，ベネトクラクスの曝露に対して M27 の平均曝露が占める割合は，400 mg/日投与において最大 29.4%であった。ICH S9 によると，進行がん患者を対象とした治療薬の開発では代謝物の評価は，一般的に必須とはなっていない [1]。しかし，将来的に ICH S9 の対象とならない適用症に対する治療薬として開発することを考慮し，M27 の *in vitro* 安全性評価を実施した。すなわち，分布，代謝，遺伝毒性及び副次的薬理に続いてマウスの 4 週間反復投与毒性試験に関する評価を実施した。

ベネトクラクスの毒性試験は ICH M3 (R2)及び ICH S9 に照らし合わせて実施した [1,2]。すなわち，反復投与毒性試験，*in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験，生殖発生毒性試験，光毒性試験を実施した。

がん原性試験は進行がん患者を対象とした治療薬の開発では一般的に必須ではないが，将来，進行がん患者以外に，ベネトクラクスの適用を拡大することを考慮し，Tg rasH2 マウスを用いたベネトクラクス及び M27 の 6 ヵ月間がん原性試験を実施している。ラットを用いた 2 年間がん原性試験の実施については，Tg rasH2 マウスの結果次第では実施の可能性がある。

その他，用量設定試験（単回投与及び 2 週間反復投与），幼若動物毒性試験，原薬の不純物及び製剤の分解物の安全性確認のための *in vitro* 及び *in vivo* 毒性試験を実施した[3-5]。

ベネトクラクスの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及び局所刺激性試験は，FDA 及び EMA との合意の基，実施していない。

免疫毒性試験は実施していない。ベネトクラクスは反復投与毒性試験においてリンパ球を減少させたが，日和見感染はみられず，免疫機能は十分に維持されていることが示唆される。

動物種

ベネトクラクスの毒性試験は高い曝露量が確保できる CD-1 マウス及びビーグル犬を用いて実施した。がん原性の予備試験では野生型 Tg.rasH2 マウス及び Sprague-Dawley ラットを用いた。これらの動物種は，がん原性試験で一般的に用いられる動物種である。*in vivo* 光毒性試験では，雌性ヘアレスマウス（Crl:SKH1-*hr*）を用いた。また，代謝物 M27 の毒性評価では，野生型 Tg.rasH2 マウスを用いた。

ベネトクラクスの投与

毒性試験では，ベネトクラクスの投与経路は，臨床適用経路である経口投与とした。マウス及びイヌの 4 週間反復経口投与毒性試験では，到達可能な最大全身曝露量が得られる用量を高用量に用いた。その際の高用量は，予定適応症での治療時のヒト曝露量と比較してマウスで約 3 倍，イヌで約 18 倍であった。これらの投与量を使用した結果，重篤ではないがマウス及びイヌで毒性変化が確認された。ベネトクラクスに関連する変化としてマウス及びイヌでリンパ球及び赤血球系パラメータの減少がみられた。また，イヌでは上皮細胞（胆嚢，膵外分泌腺，前立腺，精巣上体及び胃）の単細胞壊死及び精巣生殖細胞の減少がみられた。4 週間反復投与毒性試験の高用量でみられた赤血球系パラメータの減少は，毒性と判断するほど強く発現したため，その後の長期反復投与毒性試験では、高用量を減量したが，同様の毒性変化がみられた。

2.4.1.2 GLP 適合性

毒性試験及び安全性薬理試験については，ICH M3(R2)ガイドライン「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」及び安全性評価に関する ICH ガイドラインに従って実施した。また，主要な毒性試験及び安全性薬理試験は GLP に準拠して実施した。

2.4.1.3 ベネトクラクスの品質特性

ベネトクラクスの 1 日投与量である 400 mg/日において 0.15%を超えて含有されるか，1 mg/日を超える投与量になる可能性のある原薬の不純物及び製剤の分解物を GLP 反復投与毒性試験及び GLP の *in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験で毒性を評価した。ICH M7 ガイドラインに基づき，

遺伝毒性不純物は毒性学的観念の閾値（以下「TTC」）未満で管理される。また，発がん性不純物は許容 1 日曝露量（以下「PDE」）未満で管理される[6]。

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 主薬効薬理試験

時間分解-蛍光共鳴エネルギー転移法（Time-resolved fluorescence resonance energy transfer, TR-FRET）を用いてベネトクラクスの抗アポトーシスタンパク質である，BCL-2，BCL-X_L，BCL-w 及び MCL-1 に対する結合親和性を評価した。ベネトクラクスは，BCL-2 に対してナノモル未満の親和性を示し（Ki 値: < 0.01 nmol/L），他の BCL-2 ファミリータンパク質である，BCL-X_L 及び BCL-w に対する親和性は，BCL-2 より弱く，Ki 値は，それぞれ 48 nmol/L 及び 245 nmol/L で，BCL-2 の 4800 分の 1，24500 分の 1 であった。一方，MCL-1 は，Ki 値を算出するのに十分な結合親和性は得られなかった（Ki 値: > 444 nmol/L）。

ベネトクラクスの機能解析を行うため，インターロイキン-3（以下「IL-3」）非存在下で BCL-2 又は BCL-X_L に依存した生存活性を示すマウス胎仔肝由来 IL-3 依存性マウス FL5.12 細胞にヒト BCL-2 又は BCL-X_L を導入した細胞を用いて試験を行った。ベネトクラクスは，強力に FL5.12-BCL-2 細胞を傷害し（EC_{50} = 4 nmol/L），FL5.12 BCL-X_L 細胞に対する作用は BCL-2 よりも弱かった（EC_{50} = 261 nmol/L）ことから，ベネトクラクスはより BCL-2 に選択的であることが明らかとなった。また，細胞内哺乳類細胞ツーハイブリッド（M2H）法において，ベネトクラクスは，BCL-2-BIM 複合体を強力に阻害したが（EC_{50} = 3 nmol/L），BCL-X_L-BCL-X_S 及び MCL-1-NOXA 複合体に対しては弱い阻害作用を示した（それぞれ，EC_{50}: 2167 nmol/L，> 3000 nmol/L）。

TR-FRET 法において，M27 は，BCL-2 に対して数ナノモルの親和性を示し（Ki 値: 2.2 nmol/L），BCL-X_L 及び MCL-1 に対する親和性は弱かった（Ki 値: > 560 nmol/L 及び > 330 nmol/L）。また，M27 は，BCL-2 又は BCL-X_L 依存性の腫瘍細胞株のいずれにも細胞傷害作用を示さなかった（EC_{50} > 10000 nmol/L）。

ベネトクラクスが，作用機序としてアポトーシス作用を誘導するかを検討するために複数の試験を実施した。ベネトクラクスは，内因性アポトーシス経路に必須のメディエータである BAX 及び BAX を欠損させたトランスジェニックマウス由来のマウス胚線維芽細胞（MEF）に対して有効性を示さなかった。一方，BCL-2 依存性 ALL 細胞株（RS4;11）において，ベネトクラクスは，チトクロム C 遊離，カスパーゼ活性化及びホスファチジルセリンの露出といったアポトーシス様の特性を示した。

ベネトクラクスは，患者由来の腫瘍細胞に対して *ex vivo* で強力な活性を示し，CLL 細胞に対する EC_{50} の平均値は 6 nmol/L（n = 35）であった。ベネトクラクスは高リスク 17p del を有する CLL 標本サブセットに対しても同様に強力な活性を示し，EC_{50} の平均値は 8 nmol/L（n = 5）であったことから，ベネトクラクスはこの高リスク病変を有する患者の治療における有効性が期待された。また，ベネトクラクスは，B 細胞 FL，MCL，DLBCL，AML，ALL 及び MM に対し

て細胞傷害作用を示した。ベネトクラクスは，BCL-2 高発現の細胞株に対して特に強力な細胞阻害作用を示した。感受性を示す FL 及び DLBCL 細胞株は，免疫グロブリン重鎖エンハンサーにより BCL-2 を高発現させる t（14;18）染色体転座が認められる。したがって，BCL-2 量と t（14;18）染色体転座は，ベネトクラクスに対する感受性を予測するバイオマーカーとなる可能性が考えられる。ベネトクラクスは，MM 細胞株及び t（11;14）転座を有するに関連する初代腫瘍細胞に対して強力な細胞傷害作用を示した。これらの細胞は，MCL-1 に比べ BCL-2 発現量が高い傾向を示した。

in vivo 移植モデルにおいて，ベネトクラクスを単回又は反復投与したときの単剤の有効性を評価した。皮下及び全身性の異種移植モデルにおいては，単独投与で評価した。また，臨床的に意義の認められている化学療法との併用での有効性についても評価した。さらに免疫不全マウスの皮下又は静脈内にヒト血液腫瘍細胞株を移植したモデルを用いて探索的に有効性を検討した。

ベネトクラクスは単独投与により，ヒト腫瘍細胞株の AML（MOLM-13），ALL（RS4;11）及び NHL（Toledo）皮下移植モデルに対して評価した多くの用量及び投与レジメンで腫瘍増殖を抑制した。また，ALL 及び AML 播種モデルにおいても有効であった。他のモデルの DLBCL，MCL 又は MM モデルに対して，ベネトクラクスは単独投与による有効性は低かったが，広範な化学療法剤の有効性を併用により増強させた。ベネトクラクスは，MM モデルに対してプロテアソーム阻害剤であるボルテゾミブとの併用でも有効であった。ベンダムスチン及びリツキシマブ療法に対して，ベネトクラクスは 3 回投与により十分な相加効果を示したことから，アポトーシス誘導性の薬剤としてベネトクラクスを持続的に曝露させることは併用効果を得るために必須ではないと考えられた。ベネトクラクスの主薬効薬理試験の一覧を表 2.4-1 に示し，詳細は 2.6.2 項に記載する。

表 2.4-1.　　ベネトクラクスの主薬効薬理試験

	試験系	投与経路	試験番号
ベネトクラクスの BCL-2 ファミリーに対する結合親和性及び細胞活性	TR-FRET 法，培養細胞，M2H 法	*in vitro*	R&D/10/905 R&D/10/1025 R&D/12/538 R&D/13/316
M27 の BCL-2 ファミリーに対する結合親和性及び細胞活性	TR-FRET 法，培養細胞	*in vitro*	A-1195425 Drug metabolism Memo #24
in vivo 抗腫瘍作用	異種移植モデル	経口	R&D/10/889 R&D/10/974 R&D/10/975 R&D/10/976
in vivo 免疫系疾患に対する作用	マウス，イヌ	経口	R&D/12/395 R&D/12/507

2.4.2.2　副次的薬理試験

一連の典型的な G タンパク質共役受容体，リガンド及び電位開口型イオンチャネルに対するベネトクラクスの受容体結合に及ぼす影響を検討した。80 種の受容体，リガンド及び電位開口型イオンチャネルに 10 µmol/L（ヒト C_{max} の 4.0 倍）のベネトクラクスを添加したとき，対照リガンドの結合を 50%超置換したのは，アデノシン-3 受容体（77%），ノルエピネフリントランスポーター（52%），ドパミン-5 受容体（66%），PPARγ 受容体（57%），プロスタサイクリン受容体（58%），末梢性ベンゾジアゼピン受容体（93%）及びセロトニン-5a 受容体（85%）であった。これらの受容体について，追加解析を行った結果，プロスタサイクリン受容体，末梢性ベンゾジアゼピン受容体，$5\text{-}HT_{5A}$ 受容体に対して濃度依存的な反応性がみられ，Ki 値はそれぞれ，0.81 µmol/L（ヒト C_{max} の 0.32 倍），0.38 µmol/L（ヒト C_{max} の 0.15 倍）及び 0.37 µmol/L（ヒト C_{max} の 0.15 倍）であった。

ヒトの主要代謝物である M27（A-1621332）について，一連の典型的な G タンパク質共役受容体，リガンド及び電位開口型イオンチャネルに対するリガンド結合性に及ぼす影響を検討した。10 µmol/L（ヒト C_{max} の 12.9 倍）の M27 を添加したとき，対照リガンドの結合を 50%超置換したのは，メラトニン-2 受容体（53.7%），エストロゲン受容体（ERα，67.1%），δ-オピオイド受容体（88.4%）であった。追加解析を行った結果，δ-オピオイド受容体で用量反応性がみられ，Ki 値は，0.65 µmol/L（ヒト C_{max} の 0.84 倍）であった。さらに，δ-オピオイド受容体に対するアゴニスト又はアンタゴニスト活性を検討した結果，10 µmol/L（ヒト C_{max} の 12.9 倍）まで EC_{50} 又は IC_{50} は求められなかった。副次的薬理試験の概要を表 2.4-2 に示す。副次的薬理試験に関する詳細は，2.6.2 項に記載する。

表 2.4-2. ベネトクラクスの副次的薬理試験

試験の種類	試験系	試験方法	報告書番号
ベネトクラクスの受容体結合性	各種受容体，イオンチャネル，トランスポーター	10 µmol/L 適用時の各受容体，イオンチャネル，トランスポーターへのリガンド特異的結合に対する阻害作用を評価	R&D/10/833 R&D/10/834 R&D/10/835 R&D/15/0024 R&D/15/0123
M27 の受容体結合性	各種受容体，イオンチャネル，トランスポーター	10 µmol/L 適用時の各受容体，イオンチャネル，トランスポーターへのリガンド特異的結合に対する阻害作用を評価	R&D/14/1267 R&D/15/0007 R&D/15/0025

2.4.2.3 安全性薬理試験

ベネトクラクスをマウスに経口投与したとき，600 mg/kg まで，中枢神経系及び呼吸系に影響を及ぼさなかった。ベネトクラクスを麻酔イヌに静脈内持続投与したとき，血漿中濃度 46 µg/mL（ヒト C_{max} の 21.1 倍）まで QTc 間隔，血圧及び心拍数に影響を及ぼさなかった。血漿中濃度 16 µg/mL（ヒト C_{max} の 7.4 倍）及び 32 µg/mL（ヒト C_{max} の 14.9 倍）で心収縮力の低下（それぞれ，6%及び 13%），心拍出量の低下（それぞれ，11%及び 19%）がみられた。ベネトクラクスを覚醒イヌに投与したとき，150 mg/kg（血漿中濃度 16 µg/mL，ヒト C_{max} の 7.2 倍）まで，心血管系に影響を及ぼさなかった。安全性薬理試験の概要を表 2.4-3 に示す。安全性薬理試験に関する詳細は，2.6.2 項に記載する。

表 2.4-3.　　　　ベネトクラクスの安全性薬理試験

評価対象となる組織	動物種/系統	投与方法	投与量 (mg/kg)	報告書番号
中枢神経系				
一般症状（Irwin)	ラット/ Rj:Wistar (Han)	経口	3，10，30，100 mg/kg	R&D/09/1365
抗痙攣/痙攣誘発， 自発運動量， エタノール（催眠/鎮静作用）	ラット/ Rj:Wistar (Han)	経口	3，10，30，100 mg/kg	R&D/09/1365
機能観察総合評価（FOB)	マウス/ CD-1	経口	50，200，600 mg/kg	R&D/10/315
心血管系				
hERG テール電流	hERG 発現 HEK293 細胞	*in vitro*	1.5 μg/mL	R&D/10/795
hERG テール電流	hERG 発現 HEK293 細胞	*in vitro*	2.6 μg/mL	R&D/16/0360
麻酔イヌ	イヌ/ ビーグル	静脈内	0.033，0.110，0.333 mg/kg/分	R&D/10/766
覚醒イヌ	イヌ/ ビーグル	経口	5，50，150 mg/kg	R&D/10/318
呼吸系				
プレスチモグラフ	マウス/ CD-1	経口	50，200，600 mg/kg	R&D/10/317

2.4.3　　　薬物動態試験

薬物動態試験においては，各種動物における単回及び反復投与薬物動態試験，最も高い曝露を得るための検討，血漿及び排泄物中の代謝物の同定及びプロファイリング，組織内及び血漿への分布及び非臨床試験における薬物相互作用の検討を実施した（表 2.4-4）。

2.4.3.1　　　吸収

ベネトクラクスは，分子量が大きな脂溶性の化合物（mw 868.44，logD 5.4）であり，水に溶けにくい（中性では 4 ng/mL 未満）。ラットにおける探索的な初期の薬物動態試験において，水溶性懸濁液を用いたときの経口バイオアベイラビリティは低く，非晶質固体分散体と油性媒体又は界面活性剤を添加した媒体を用いたときにはわずかに曝露が向上することが示された。PEG-400 溶液でのベネトクラクスの経口バイオアベイラビリティは低く，8.6%（サル）から 27.8%（イヌ）の範囲であり，ベネトクラクスが有する特性（難水溶性及び低から中程度の見かけの膜透過性）と整合性を持った結果を示した。胆管ろう形成ラットを用いた検討においては，投与された放射能（[^{3}H] ベネトクラクス）の約 15%が吸収された。マウス，ラット，ウサギ及びイヌにおいて最も高い曝露を得ることが可能となったのは，最適化された非結晶固体分散の懸濁液を用いたときであった。雌性ラットにおける AUC は雄性ラットより 2–4 倍高かったが，マウス及びイヌで性差は認められなかった。野生型 Tg.rasH2 マウスと CD-1 マウスの曝露も類似

していた。マウス，ラット及びウサギでは反復投与時の蓄積は認められず，イヌにおいては，半減期と投与間隔からの予想と一致して，約2倍の蓄積が認められた（2.6.4.3項）。

2.4.3.2 分布

反復投与毒性試験で用いた動物種及びヒトにおける血漿タンパク結合を，臨床試験における平均血漿中濃度を包括する濃度範囲で検討した。ベネトクラクスはマウス，ラット，イヌ及びヒトにおいて濃度によらず高い血漿タンパク結合率を示し，非結合分画（f_u）の値は< 0.01 であった。M27 もマウス，ラット，イヌ，サル及びヒトにおいて高い血漿タンパク結合率を示し，f_u の値は< 0.01 であった。全血 / 血漿中濃度比の検討において，ベネトクラクス及び M27 は検討したいずれの動物種においても細胞分画への優先的な分布は示さなかった。有色ラットに [^{14}C] ベネトクラクスを経口投与したとき，投与された放射能は投与後 8 時間を通じて組織に広く分布し，多くの組織においては投与後 4 時間に最高濃度に達した。試験全体を通して，最も高い放射能分布を示した組織は肝臓であった。組織内放射能濃度は，最高濃度に達した後経時的に減衰し，投与後 168 時間までに完全に消失した。また，メラニン含有組織に選択的な結合性を有しないことが示された。更に水晶体及び中枢神経系組織においても，試験全体を通して，測定可能な放射能濃度は認められなかった。ラットにおいて胎盤移行した放射活性はわずかであったことから，胎児における曝露は限定的であった。（2.6.4.4項）。

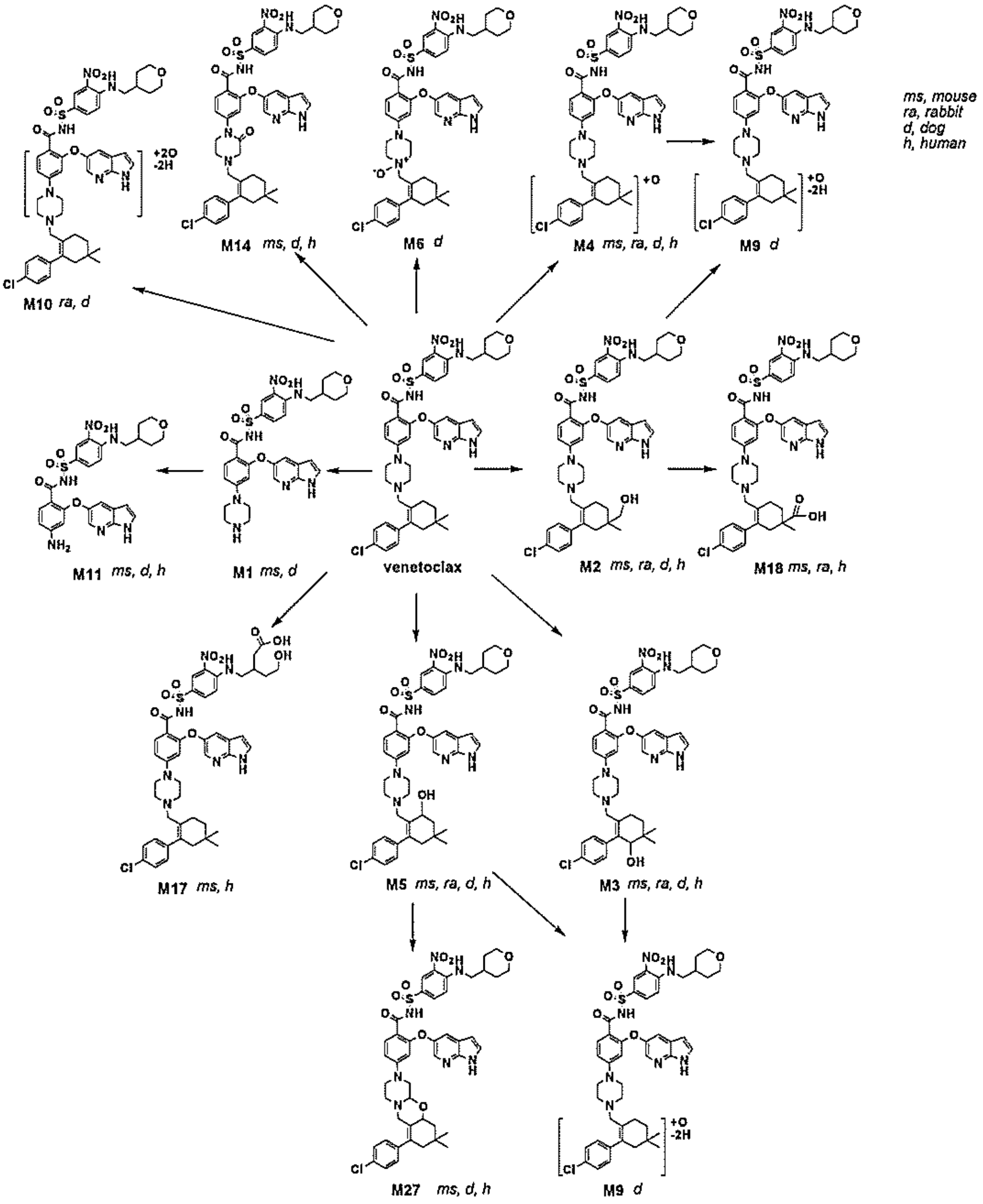
2.4.3.3 代謝

非臨床動物種（マウス，ラット，ウサギ，イヌ）及びヒトにおけるベネトクラクスの生体内変換の大部分はジメチルシクロヘキセニル部分の酸化的代謝が占めており，M2（メチル基の水酸化），M3（A-1612542，シクロヘキセニル環の 3 位の水酸化），M4（シクロヘキセニル部分の水酸化）及び M5（A-1617595，シクロヘキセニル環の 6 位の水酸化）が生成された（図2.4-1）。M2 については更に酸化され，カルボン酸代謝物である M18 が生成された。M5 についてはピペラジンの α 炭素部分で CYP による環化反応を受け，M27（A-1621332）が生成された。ベネトクラクスのピペラジン環も酸化的に代謝され M6 及び M14 が生成された。ピペラジン環の *N*-メチレン部分の酸化的代謝はクロロフェニルジメチルシクロヘキセニル部分の脱離を導き M1 が生成された。M1 は更に酸化され M11（ピロロピリジニルアニリン）が生成された。ヒトにおいては M27 が主要代謝物として同定され，単回経口投与したときの血漿中放射能の 12.0%を占めていた。M27 は，ベネトクラクスのシクロヘキセニル環の 6 位の 1 酸素付加によって M5 が生成された後，ピペラジンの α 炭素部分での酵素反応による環化反応により生成されると推定された。また，M30（ニトロフェニル基の還元体）及び M34（ニトロフェニル基の酸化，硫酸化及び還元体）が主要代謝物として，ヒト糞中でのみ認められた（2.6.4.5項）。

M27 は，ヒト定常状態血漿中において，主要な代謝物であることが確認された。CLL 若しくは NHL 患者にベネトクラクスを最終投与量として 400 及び 600 mg/日投与したとき，ベネトクラクス + M27 の曝露に対して M27 の曝露が占める割合は，定常状態においてそれぞれ最大

29.4%及び30.6%であった。M27は*in vivo*非臨床毒性試験において最高用量を投与したときの血漿中においても認められたが，ヒト血漿における曝露を下回っていた。したがって，M27は「ヒト固有代謝物（human unique metabolite）」ではなかったが，「曝露量が毒性試験での最大曝露量よりも明らかに高い代謝物（disproportionate metabolite）」であると考えられた。M27をCD-1マウスに100 mg/kg/dayの用量で5日間反復経口投与したとき，血漿中において認められた投与薬物関連物質はM27のみであり，M27の代謝物は検出されなかった。

図 2.4-1.　　マウス，ウサギ，イヌ及びヒト血漿中（定常状態）において認められた代謝物を基に推定したベネトクラクスの代謝経路



2.4.3.4 排泄

非臨床動物種及びヒトにベネトクラクスを経口投与したとき，ベネトクラクス未変化体及びその代謝物は主として胆汁又は糞中に排泄され，腎排泄はほとんど寄与していなかった。マウスに経口投与したとき，投与量の 93.6%が糞中に排泄され，尿中からの回収率は 0.6%であった。胆管ろう形成ラットに静脈内投与したとき，投与量の 92.8%が胆汁中に排泄され，尿中からの回収率は 0.4%であった。授乳中のラットに [^{14}C] ベネトクラクスを投与したとき，その放射能は乳汁中に排泄されたが，乳汁 / 血漿中濃度比は投与後 48 時間にわたって 1 未満であった。イヌに経口投与したとき，投与量の 87.4%が糞中に排泄され，尿中からの回収率はわずか（投与量の 0.1%）であった。ヒトマスバランス試験においては，糞中への回収率は平均 100%であり，216 時間の検体採取期間中，尿中回収率は 0.1%未満であった（2.6.4.6 項）。

2.4.3.5 薬物動態学的薬物相互作用

CYP，その他の代謝酵素及びトランスポーターに対して，ベネトクラクスが被相互作用薬（victim）及び相互作用薬（perpetrator）である可能性を非臨床試験で検討した。ベネトクラクス及びその主要代謝物である M27 は *in vitro* において主に CYP3A4 で代謝され，ベネトクラクスの代謝に関して UGT の寄与は認められなかった。ベネトクラクス及び M27 共に排出トランスポーターである P-gp 及び BCRP の基質であった。これらの *in vitro* 試験での成績は臨床における相互作用試験の成績とも一致しており，ケトコナゾール（CYP3A4 及び P-gp の阻害薬）併用投与試験及びリファンピン（CYP3A4 及び P-gp の誘導薬）反復併用投与試験の成績から，ベネトクラクスの吸収に対する P-gp の寄与，ベネトクラクスの消失に対する CYP3A4 の寄与及び M27 生成に対する影響が示唆されている。400 mg 1 日 1 回投与（QD）において，ベネトクラクスは UGT1A1 に対して弱い阻害作用を有する可能性が示された。また，ベネトクラクス及び M27 は排出トランスポーターを阻害し，それらの基質である薬物（P-gp：ジゴキシン，ダビガトラン等，BCRP：ロスバスタチン等）と相互作用を示す可能性が示唆された。更に，ベネトクラクスは OATP1B1 を阻害する可能性があり，本トランスポーターの基質である薬物（スタチン等）と弱い相互作用を示す可能性が示唆された（2.6.4.7 項）。

表 2.4-4.　ベネトクラクスの薬物動態試験プログラム

試験系	報告書番号
マウス，ラット，ウサギ，イヌ単回投与薬物動態	R&D/10/857
マウス，ラット，ウサギ，イヌ限界曝露量（投与可能な最大用量を投与したときの曝露量）及び反復投与薬物動態	R&D/14/0500
[^{3}H] 標識化合物を用いたマウス吸収・分布・代謝・排泄	R&D/14/0704
[^{14}C] 標識化合物を用いたラット吸収・分布・代謝・排泄	R&D/10/855
[^{14}C] 標識化合物を用いたイヌ吸収・分布・代謝・排泄	R&D/14/0705
[^{14}C] 標識化合物を用いたヒト吸収・分布・代謝・排泄	R&D/14/0875; R&D/14/0876
血漿タンパク結合	R&D/14/0801; R&D/14/0877
血球移行	1195425-memo-10; 1195425-memo-30
[^{14}C] 標識化合物を用いた Long Evans ラット組織内分布（QWBA）	R&D/13/052
[^{14}C] lacteal/placental transfer in Sprague-Dawley rats (w/metID)	R&D/16/0672; R&D/16/067
代謝物同定（*in vivo*）	1195425-memo-16
ベネトクラクス及び M27 の薬物代謝及びトランスポーターを介した薬物相互作用	
(a) ヒト肝ミクロソームを用いた CYP/UGT 阻害	
(b) ヒトヘパトサイトを用いた CYP 阻害	R&D/15/0166
(c) トランスポータープロファイリング（阻害剤及び基質）：OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, OCT1, OCT2, MATE1, MATE2K, P-gp, BCRP	

2.4.3.6　評価に用いた分析法の妥当性

ベネトクラクスのマウス，ラット，ウサギ及びイヌ血漿中濃度並びにマウス血液中濃度を定量するために，選択的で高感度な薬物濃度測定法を開発し，そのバリデーション試験を実施した。更に，マウス及びヒト血漿中代謝物 M27 の定量法を開発した（表 2.4-5）。バリデーション試験は FDA ガイダンス [7] に従って実施した。定量法の再現性に関しては，定量時に，少なくとも各定量法で 1 動物種あたり 1 回 incurred samples reanalysis（ISR）を実施した。

ベネトクラクスの測定法では，一定量の血漿に所定の安定同位体標識内部標準物質，有機溶媒及び緩衝液を添加し，一般的な塩析液・液抽出法で前処理を行った。血漿中 M27 の測定法では，酢酸エチル・ヘキサン混液を用いて液・液抽出し，遠心分離後，有機層をインジェクションプレートに移して蒸発乾固，その後，抽出物を所定の媒体で再溶解し，HPLC-MS/MS に供した。

全ての測定法において，分析対象物質の夾雑物からの分離は逆相分析カラムを用いて行い，検出は多重反応モニタリング（MRM）モードで行った。いずれの動物種においても，バリデートされた定量範囲で，測定法は直線性を示した（表 2.4-5）。

表 2.4-5.　　薬物濃度測定法*

化合物	動物種	定量範囲	安定性（日）	報告書番号
Venetoclax	マウス（血漿）	49.2–41,600 ng/mL	56 (–20°C)	R&D/10/553
Venetoclax	マウス（血漿）	21.6–41,000 ng/mL	66	R&D/12/877
Venetoclax	マウス（血漿）	4.86–4,110 ng/mL	(–20°C 又は–70°C)	R&D/14/0981
Venetoclax	ラット（血漿）	29.1–15,500 ng/mL	112 (–20°C)	R&D/14/1079
Venetoclax	ウサギ（血漿）	4.01–4,010 ng/mL	153 (–20°C)	R&D/14/0809
Venetoclax	イヌ（血漿）	49.2–41,400 ng/mL	374 (–20°C)	R&D/10/554
M27	マウス（血漿）	4.56–37,300 ng/mL	実施中	1195425-memo-23
M27	マウス（血漿）	9.99 -9990 ng/mL	21 (-20°C)	R&D/16/0216
M27	イヌ（血漿）	4.57–37,300 ng/mL	実施中	1195425-memo-23
M27	ヒト（血漿）	2.01–2010 ng/mL	実施中	1195425-memo-22

* ベネトクラクス定量法は FDA ガイダンス [7] に従ってバリデートした。M27 定量法は簡略法でバリデートした。

2.4.3.7　　評価に用いた動物モデルの妥当性

ベネトクラクス毒性試験において用いる主要な動物種は，ラット及びサルより高い全身曝露が得られることから，CD-1 マウス及びビーグル犬を選択した。マウス，ラット，ウサギ，イヌ及びヒト血漿中代謝物のプロファイルを表 2.4-6 に示す。定常状態における代謝物曝露の評価を基に，医薬品代謝物の安全性評価に関する FDA ガイダンス [9] 及び ICH M3 (R2) ガイドライン [2] に従い（すなわち，定常状態において投与薬物に関連するすべての物質の曝露量［AUC］の 10%超），M27 をヒトにおける主要代謝物と位置付けた。M27 はマウス及びイヌに最高用量を投与したときの定常状態での血漿中においても認められたが，400 mg 1 日 1 回投与時のヒト血漿における曝露を下回っており，マウス及びイヌにおける曝露の見積もりはそれぞれヒトの 0.05 倍及び 0.09 倍であった。なお，M27 は，*in vitro* 活性が少なくともベネトクラクスの 58 分の 1 未満であることから，*in vivo* において薬理活性を示すことはないと考えられた。

表 2.4-6.　　血漿中（定常状態）におけるベネトクラクスの代謝物プロファイル

化合物	マウス	ウサギ	イヌ	ヒト
Venetoclax (A-1195425)	**major**	**major**	**major**	**major**
M1（クロロフェニルジメチルシクロヘキシル部分の脱離，A-1610478）	minor		minor	
M2（ジメチルシクロヘキシルのメチル基の水酸化）	minor	minor	minor	minor
M3（ジメチルシクロヘキシルの水酸化，A-1612542）	minor	minor	minor	minor
M4（ジメチルシクロヘキシルの水酸化）	minor	minor	minor	minor
M5（ジメチルシクロヘキシルの水酸化，A-1617595）	minor	minor	minor	minor
M6（ピペラジン環の N-酸化，A-1548065）			minor	
M9（酸化，シクロヘキシル部分の脱水素）			minor	
M10（酸化，脱水素）		minor	minor	
M11（M1 のピロロピリジニルアニリン）	minor		minor	minor
M14（ピペラジン環の酸化，A-1572074）	minor		minor	minor
M17（テトラヒドロピラニル環のαメチレンの酸化）	minor			minor
M18（M2 からのカルボン酸体）	minor	minor		minor
M27（M5 からのピペラジンα炭素部分での環化，A-1621332）	minor		minor	**major**

major 及び minor の区分は FDA MIST 及び ICH M3 ガイドラインに従い，major は血漿中における薬物関連物質の総量の 10%を超える場合，minor は血漿中における薬物関連物質の総量の 10%を下回る場合と定義した。

2.4.4　　毒性試験

ベネトクラクスの 400 mg/日を食後投与した際の定常状態における C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ の推定値はそれぞれ 2.10 μg/mL 及び 32.8 μg•h/mL であった。また，800 mg/日を食後投与した際の定常状態における C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ の推定値はそれぞれ 3.43 μg/mL 及び 48.8 μg•h/mL であった。主要な毒性試験における安全性プロファイル及び安全域を表 2.4-8 に示す。

2.4.4.1　　単回投与毒性

雌雄のイヌ（1 又は 2 例 / 性 / 群）にベネトクラクスを 0，2，5，30 及び 100 mg/kg の用量で，単回経口投与し，末梢血リンパ球（総リンパ球及びリンパ球サブセット）の回復性及びトキシコキネティクス（以下「TK」）を評価した。本試験は GLP 試験として実施しなかった。その結果，用量依存性のあるリンパ球の減少がみられた。5 mg/kg 以上で投与前値の比較において個体別で最大 62%の総リンパ球数の減少がみられた。5 及び 30 mg/kg 投与では回復まで 1 から 7 週間，100 mg/kg では 14 週間を要した。2 mg/kg では著変はみられなかった。リンパ球サブセット解析を実施した結果（B 細胞並びに CD4+及び CD8+ T 細胞染色等），回復に要する期間（5 mg/kg 以上では 14 から 18 週間）及び変化の程度（30 mg/kg 以上では 90%以上の減少，2 及び 5 mg/kg では，B 細胞が最も感受性の高いリンパ球と考えられた。CD4+及び CD8+ T 細胞では，1 ヵ月未満で回復したが，100 mg/kg の CD8+ T 細胞の回復には最大 15 週間を要した。単回投与後にみられるリンパ球の減少の回復には，2 週間反復投与時にみられたリンパ球の減少と同様の期間を要した。

反復投与毒性試験における初回投与後にみられたベネトクラクスに関連した変化（末梢血リンパ球の減少及び投与後の嘔吐等）は2.6.6.9項に記載する。

2.4.4.2 反復投与毒性

ベネトクラクスの反復投与毒性試験でみられた主要な毒性所見は，マウス，ラット及びイヌにおける血球系に対する変化（リンパ球及び赤血球系パラメータの減少），雄のイヌにおける生殖器系に対する変化（精巣生殖細胞数の減少），マウスにおける胎児毒性であった。その他，特記する変化として，イヌでみられた複数の上皮組織（胆嚢，膵外分泌腺，精巣上体，前立腺及び胃）における軽微から軽度の単細胞壊死，及び被毛の色調変化がみられた（2.6.6 項及び2.6.7 項参照）。

ベネトクラクスを投与したマウス（最長 6 ヵ月間），ラット（最長 13 週間）及びイヌ（最長9 ヵ月間）のすべての投与群において軽度から高度で，用量依存性のある末梢血中及びリンパ系器官中のリンパ球の減少がみられた。末梢血リンパ球の減少は，投与期間が異なっても同様にみられた。すなわち，末梢血リンパ球の減少はマウスでは–69%から–75%，ラットでは–64%，イヌでは–81%で変化した。イヌにおいて末梢血リンパ球の減少は，初回投与後 24 時間から発現し，投与後 2 週間に最大の減少に到達した。末梢血リンパ球の減少に関連して，脾臓，胸腺，リンパ節及びパイエル板等のリンパ系器官で軽微から中等度のリンパ球の減少がみられた。末梢血リンパ球の減少はマウス及びイヌでみられたが，回復に要する期間はマウス（4 週間）よりもイヌ（18 週間）の方が長期であった。イヌでは末梢血リンパ球のイムノフェノタイピング（成熟 T 細胞，ヘルパーT［CD4+］細胞，細胞傷害性［CD8+］T 細胞，及び［CD21+］成熟 B 細胞）を実施した。その結果，すべてのリンパ球サブセットは減少し，減少幅が最も大きかった（90%以上）のは B 細胞であった。総リンパ球の減少と同様，B 細胞及び T 細胞の回復には最大 18 週間を要した。4 週間反復投与でみられたリンパ球の減少は，4 週間の休薬期間後に回復しなかった。イヌの 9 ヵ月間試験でみられた最大 81%の持続的なリンパ球数の減少（B 細胞数の 90%以上の減少）は，日和見感染のような免疫機能の低下を引き起こさなかった。したがって，リンパ球数の減少は毒性でないと考えられた。また，リンパ球数の減少は BCL-2 を抑制したとき予期される薬理作用であり，毒性とは考えなかった。

マウス及びイヌの 4 週間反復投与毒性試験で，ヘモグロビン減少を特徴とする，赤血球系パラメータの用量依存的な減少がみられた。ヘモグロビンは，マウスの 600 mg/kg/日（平均 $AUC_{0\text{-}24h}$ = 91.5 μg•h/mL）では約 21%，イヌの 150 mg/kg/日（平均 $AUC_{0\text{-}24h}$ = 572 μg•h/mL）では約 23%，それぞれ減少した。マウスでは対照群の平均値と比較，イヌでは個体別のベースラインと比較して，減少の程度，ヘモグロビンの高度な生合成障害が示唆される程度に他の赤血球系パラメータ（平均赤血球容積（以下「MCV」），ヘモグロビン量（以下「MCH」），赤血球分布幅（以下「RDW」，網状赤血球数，核化赤血球及び赤血球の形態変化等）の変化がみられるかに基づいて，毒性と判断した。無毒性量は，マウスでは 200 mg/kg/日（平均 $AUC_{0\text{-}24h}$ = 59.5 μg•h/mL），イヌでは 50 mg/kg/日（平均 $AUC_{0\text{-}24h}$ = 472 μg•h/mL）であった。投与期間の延長に伴い，低用量で，赤血球系パラメータの減少が，マウスの 6 ヵ月間反復投与毒性試験で

は 50 mg/kg/日以上（平均 $AUC_{0\text{-}24h} \geq 9.65$ µg•h/mL）（最大減少率 14%）でみられた。イヌの 9 ヵ月間反復投与毒性試験ではヘモグロビンの減少はみられなかったが，6 mg/kg/日以上（平均 $AUC_{0\text{-}24h} \geq 52.1$ µg•h/mL）で用量依存的な MCV の減少幅が最大 17%，MCH の減少幅は最大 18%であった。ラットでも同様に赤血球系パラメータの減少がみられたが，更に顕著であり（瀕死状態を呈し，赤血球生合成の抑制がみられた），その時の曝露量は $AUC_{0\text{-}24h} = 75.4\text{–}83.1$ µg•h/mL であった。

イヌの 4 週間（5 mg/kg/日以上，平均 $AUC_{0\text{-}24h} = 59.3$ µg•h/mL）及び 9 ヵ月間反復投与毒性試験（2 mg/kg/日以上，平均 $AUC_{0\text{-}24h} = 15.1$ µg•h/mL）において，用量依存的でない精巣への影響がみられた。精巣においてみられた変化は，精巣生殖細胞数の著しい減少であり，この変化は 4 週間の休薬期間終了後には重度の精巣生殖細胞数の減少として観察された。イヌの 9 ヵ月間反復投与毒性試験では，精細管の両側性の変性 / 萎縮がみられた。両試験において精巣重量の減少，及び 9 ヵ月間反復投与毒性試験では前立腺重量の減少もみられた。イヌの曝露量と同様の曝露量を示した雄性マウス及び雄性ラットにおいてはベネトクラクスに関連した精巣への変化はみられなかった（平均 $AUC_{0\text{-}24h}$ の最高値はマウスの 4 週間反復投与毒性試験の 600 mg/kg/日で 91.5 µg•h/mL）。

イヌの 1 週間から 9 ヵ月間反復投与毒性試験で複数の上皮細胞（胆嚢，膵外分泌腺，精巣上体，前立腺及び胃）で単細胞壊死がみられた。これらの変化がみられた曝露量は，60.8 µg•h/mL（4 週間試験の 5 mg/kg/日）及び 17.3 µg•h/mL（9 ヵ月間試験の 2 mg/kg/日）であった。これらの変化は，9 ヵ月間試験の 2 mg/kg/日以上でみられ，用量依存性がなく，軽微から軽度の胃幽門部でみられた変化を除き，軽微であった。イヌの 4 週間反復投与毒性試験の回復性試験において，胆嚢及び膵臓の変化の回復性は示されたが，精巣上体，前立腺（精巣の変化と関連）及び胃の変化については，4 週間の休薬期間終了時にもみられた。これらの上皮組織における単細胞壊死はその程度が軽微から軽度であること，粘膜構造の恒常性が保たれていることから毒性とは判断しなかった。上皮組織における単細胞壊死は，マウスではみられなかった。

イヌの 9 ヵ月間反復投与毒性試験では，投与後 3 ヵ月に 6 mg/kg/日以上（平均 $AUC_{0\text{-}24h} = 46.3$ µg•h/mL）で顔毛の色調変化 （白色）がみられた。変化は，鼻口部からみられはじめた。投与後 3 ヵ月から 9 ヵ月まで，この変化は色素のある被毛の大部分に広がり，毛球を含む毛包内における色素の減少と関連していると考えらえる。イヌを用いた 9 ヵ月間反復投与毒性試験では，皮膚及び眼の詳細な検査を実施した結果，皮膚及び眼の色素（特に虹彩及び眼底）に変化はみられなかった。また，被毛の色調変化は，マウス及びラットではアルビノ動物であったため変化はみられなかった。

2.4.4.3 遺伝毒性

in vitro 遺伝毒性試験（Ames 試験及び染色体異常試験）及びマウスの *in vivo* 小核試験においてベネトクラクスは陰性であった。ヒトの主要代謝物である M27 の遺伝毒性については 2.4.4.8 項に記載する。

2.4.4.4 がん原性

がん原性試験は実施していない。これまでに実施した非臨床試験の結果から，遺伝毒性試験で陰性が示され，マウスの 6 ヵ月間反復投与毒性試験及びイヌの 9 ヵ月間反復投与毒性試験において，がん原性を示唆するような過形成又は腫瘍性病変がみられていないことから，ベネトクラクス及び M27 ががん原性を示す可能性は低いと考えられる。がん原性試験は進行がん患者を対象とした治療薬の開発では必須ではないが，将来，進行がん患者以外に，ベネトクラクスの適用を拡大することを考慮し，Tg rasH2 マウス及びラットのがん原性試験の予備試験を実施した。Tg rasH2 マウスによるがん原性試験の結果次第では，2 年間のラットのがん原性試験の実施の可能性はある。

2.4.4.5 生殖発生毒性

受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験では，雌雄のマウスを用いて，受胎能，妊娠率，卵巣及び子宮のパラメータ並びに生殖器官，性周期のいずれにもベネトクラクスに関連した変化はみられなかった。無毒性量は雌雄ともに 600 mg/kg/日であった。その際の雌雄の曝露量は，別途実施されたマウスの 4 週間反復投与毒性試験の TK データから，それぞれ 97.5 μg•h/mL 及び 85.5 μg•h/mL と考えられた。

胚・胎児発生に関する試験は，妊娠マウス及び妊娠ウサギを用いて実施した。催奇形性はみられなかった。マウスでは，ベネトクラクスに関連する変化は 150 mg/kg/日のみでみられ，（1）着床後胚損失率の増加（早期吸収の増加とそれに対応する同腹児数及び同腹児あたりの生存胎児数の減少）及び（2）胎児体重の減少などがみられた。ベネトクラクスに関連する胎児の外表，内臓及び骨格の奇形 / 変異は観察されなかった。着床後胚損失率増加及び胎児体重の減少がみられたことから母体に対する無毒性量は 150 mg/kg/日（$AUC_{0\text{-}24h}$: 37.8 μg•h/mL），胚･胎児に対する無毒性量は 50 mg/kg/日（$AUC_{0\text{-}24h}$: 26.1 μg•h/mL）であった。ウサギでは，母体毒性が 300 mg/kg/日でみられた。ベネトクラクスには，着床後胚損失率を含む生殖パラメータに変化はみられず，体重，性比，並びに外表，内臓及び骨格の発達を含む胎児パラメータに変化はみられなかった。母体に対する無毒性量は 100 mg/kg/日（$AUC_{0\text{-}24h}$: 2.37 μg•h/mL）であった。胚･胎児に対する無毒性量は 300 mg/kg/日（$AUC_{0\text{-}24h}$: 4.90 μg•h/mL）であった。

ベネトクラクスの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しなかったが，ベネトクラクスの CLL 以外への適用を考慮し，実施を計画している。

2.4.4.6 幼若動物の毒性

ベネトクラクスの CLL 以外への適用を考慮し，幼若マウスの用量設定試験（非 GLP）及び GLP 試験を実施した。GLP 試験において，0，10，30 及び 100 mg/kg/日のベネトクラクスを生後 7 日から 60 日まで幼若マウスに経口投与し，12 週間の休薬期間を設けてみられた変化を評価した。一般的な毒性試験の検査項目に加え，行動観察及びリンパ球のイムノフェノタイピングを実施し，トキシコキネティクスでは生後 7 日及び生後 60 日の血液濃度及び脳内濃度を測定した。

一般状態において自発運動の減少，腹部膨満等の一般状態の変化は 30 mg/kg/日以上でみられ，死亡例及び体重増加量の減少が 100 mg/kg/日でみられた。その他，10 mg/kg/日以上で回復性のあるリンパ球数の減少がみられ，これらの変化は 30 mg/kg/日以上でみられた脾臓及びリンパ節におけるリンパ球の減少並びに 10 mg/kg/日以上でみられた脾臓の髄外造血の発現の増加と関連していた。精巣毒性はみられなかった。12 週間の休薬期間では一般状態，体重，血液学的検査，脾臓及びリンパ節でみられた変化は回復した。無毒性量は 10 mg/kg/日と考えられ，その際の生後 60 日の AUC は 4.17 μg·h/mL であった。

幼若マウスでは生後 7 日からベネトクラクスを投与し，脳においても曝露がみられたが，中枢神経系に関連した一般状態及び病理組織学的所見はみられなかった。生後 7 日における全身曝露量に対する脳曝露量の比（雌雄の合算平均値）は，10，30 及び 100 mg/kg/日でそれぞれ 0.460，0.590 及び 1.01 であった。生後 60 日では脳曝露量は定量下限未満であり，脳血液関門の成熟と一致していた。

2.4.4.7 局所刺激性

ベネトクラクスの反復投与毒性試験の結果から，局所刺激性が懸念される毒性所見はみられておらず，ベネトクラクスの臨床投与経路は経口投与のため，局所刺激性試験を実施していない。

2.4.4.8 その他の毒性試験

ベネトクラクスのヒトの主要代謝物である M27 の遺伝毒性試験を実施した結果，陰性を示し，M27 の遺伝毒性のリスクは低いと考えられた。また，マウス及びイヌにおいても M27 は検出されているが，ベネトクラクスを投与されたヒトにおける曝露量と比較して，低い量であったため，M27 の Tg マウスを用いた 4 週間反復投与毒性試験を実施した。その結果，全投与群（最大 300 mg/kg/日）において忍容性は良好で有り，曝露量もヒトと同様であった。みられた主要な変化は，雄の 30 mg/kg/日以上でみられたリンパ球数の軽微から軽度な減少（最大-40%），雌の 300 mg/kg/日でみられた軽度なヘモグロビンの減少（-4%）であった。

実施した毒性試験では安全性が担保出来なかった 4 種類の原薬中不純物及び 2 種類の製剤中分解物について，*in vitro* 及び *in vivo* による毒性試験（GLP 試験）を実施した。*in silico* 解析で変異原性の警告構造がみられた不純物については *in vitro* の Ames 試験（GLP 試験）で評価した。Ames 試験で陽性が示された 1 つの不純物は TTC 未満で管理される。

ベネトクラクスは 200 nm から 390 nm の紫外光域及び可視光域（400 nm から 500 nm）で光を吸収する。紫外光域の最大モル吸光係数は，222 nm において 56100 L mol^{-1}•cm^{-1} であり，可視光域の最大モル吸光係数は，428 nm において 52000 L mol^{-1}•cm^{-1} であった。一方，[^{14}C]-ベネトクラクスの 5 mg/kg をアルビノラットに単回静脈内投与した際の皮膚への分布はわずかであった（2.6.4.4 項）。光毒性ポテンシャルが低いことは，雌の Crl:SKH1-*hr* ヘアレスマウスを用いた *in vivo* 光毒性試験において確認された。

2.4.4.9　毒性試験プログラム

表 2.4-7.　毒性試験プログラム

試験の種類／期間	投与経路	投与量（mg/kg/日）	動物種	報告書番号
単回投与毒性試験	経口	2, 5, 30, 100	イヌ	R&D/12/395
反復投与毒性試験				
1 週間	経口	0, 30, 200, 600, 800	野生型 Tg.rasH2 マウス [a]	R&D/14/0303
	経口	0, 50, 100, 200	イヌ	R&D/09/1105
2 週間	経口	0, 200, 500	CD-1 マウス	R&D/10/1053
	経口	0, 30, 150, 400	ラット	R&D/14/0193
	経口	0, 5, 30	イヌ	R&D/11/298
1 ヵ月	経口	0, 30, 200, 600	野生型 Tg.rasH2 マウス [a]	R&D/14/0737
	経口	0, 50, 200, 600	CD-1 マウス	R&D/10/342
	経口	0, 5, 50, 150	イヌ	R&D/10/224
3 ヵ月	経口	M: 0, 15, 150, 400 F: 0, 8, 30, 150, 400	ラット	R&D/14/0959
6 ヵ月	経口	0, 15, 50, 300	CD-1 マウス	R&D/12/522
9 ヵ月	経口	0, 2, 6, 20	イヌ	R&D/12/384
遺伝毒性試験				
復帰突然変異試験	*in vitro*	最大 5,000 µg/plate	ネズミチフス菌/大腸菌	R&D/10/420
染色体異常試験	*in vitro*	最大 50.0 µg/mL	ヒトリンパ球	R&D/10/421
in vivo 小核試験	経口	0, 208.8, 417.5, 835	CD-1 マウス	R&D/12/675
がん原性試験	-	-	-	-
生殖発生毒性試験				
受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験	経口	0, 50, 200, 600 (F)	CD-1 マウス	R&D/13/279
	経口	0, 50, 200, 600 (M)	CD-1 マウス	R&D/12/810
	経口	0, 50, 300, 600	CD-1 マウス	R&D/12/551
胚・胎児発生に関する試験	経口	0, 10, 50, 150	CD-1 マウス	R&D/12/746
	経口	Part A: 0, 50, 100, 300, 600 Part B: 0, 50, 100, 300	ウサギ	R&D/12/543
	経口	0, 50, 100, 300	ウサギ	R&D/12/824
幼若動物毒性試験				
単回投与忍容性試験	*in vivo*	0, 100	CD-1 マウス	R&D/14/0165
用量設定試験	*in vivo*	0, 3, 30, 100, 300	CD-1 マウス	R&D/14/0573
反復毒性試験（GLP）:生後 7-60 日齢	*in vivo*	0, 10, 30, 100	CD-1 マウス	R&D/16/0922
局所刺激性試験	-	-	-	-
その他の毒性試験				
代謝物(M27)				
復帰突然変異試験	*in vitro*	最大 1,000 µg/well	ネズミチフス菌/大腸菌	R&D/14/1122

染色体異常試験	*in vitro*	最大 17.5 µg/mL	ヒトリンパ球	R&D/14/1123
反復毒性試験	*in vivo*	0, 30, 100, 300	野生型 Tg.rasH2 マウス [a]	R&D/16/0143

表 2.4-7.　　毒性試験プログラム（続き）

試験の種類／期間	投与経路	投与量（mg/kg/日）	動物種	報告書番号
不純物				
復帰突然変異試験				
A* B* E*	*in vitro*	最大 5,000 µg/plate	ネズミチフス菌/大腸菌	R&D/14/0400
F*	*in vitro*	最大 5,000 µg/plate	ネズミチフス菌/大腸菌	R&D/14/0518
C*	*in vitro*	最大 5,000 µg/plate	ネズミチフス菌/大腸菌	R&D/14/0515
D*	*in vitro*	最大 5,000 µg/plate	ネズミチフス菌/大腸菌	R&D/14/0517
H* I*	*in vitro*	A-1166995:　最大 300 µg/well A-1166996:　最大 1,000 µg/well	ネズミチフス菌/大腸菌	R&D/15/0164
J* K* L* M*	*in vitro*	最大 1,000 µg/well	ネズミチフス菌/大腸菌	R&D/15/0241
N* O* P*	*in vitro*	最大 1,000 µg/well	ネズミチフス菌/大腸菌	R&D/15/0326
Q*	*in vitro*	最大 1,000 µg/well	ネズミチフス菌/大腸菌	R&D/15/0471
染色体異常試験				
A* B* E*	*in vitro*	最大 500 µg/mL	ヒトリンパ球	R&D/14/0401
F*	*in vitro*	最大 128 µg/mL	ヒトリンパ球	R&D/14/0519
C*	*in vitro*	最大 500 µg/mL	ヒトリンパ球	R&D/14/0516
D*	*in vitro*	最大 500 µg/mL	ヒトリンパ球	R&D/14/1110
in vivo 試験				
上記 6 不純物	*in vivo*	0, 250	CD-1 マウス	R&D/13/545
C*	*in vivo*	0, 300, 600, 1200	ラット小核/コメット	R&D/15/0036
光毒性試験	*in vivo*	0, 200, 825	Crl:SKH1-*hr* ヘアレスマウス	R&D/14/1173

注:　- = 実施せず; M = males; F = females.

a.　野生型 CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic マウス.

b.　Part A は非妊娠ウサギ，Part B は妊娠ウサギを用いて実施した

2.4.4.10　　動物からヒトへのデータの外挿

ベネトクラクスの反復投与毒性試験でみられた主要な毒性所見は，マウス，ラット及びイヌにおける血球系に対する変化（リンパ球及び赤血球系パラメータの減少），雄のイヌにおける生殖器系に対する変化（精巣生殖細胞数の減少），マウスにおける胎児毒性であった。その他，

*新薬承認情報提供時に置き換え

特記する変化として，イヌでみられた複数の上皮組織（胆嚢，膵臓，精巣上体，前立腺及び胃）における軽微から軽度の単細胞壊死，及び被毛の色調変化（白色）がみられた。

動物及びヒト（2.7.4.3 項）でみられたベネトクラクスに関連したリンパ球の減少は，BCL-2阻害によるものであり，薬理機序に関連した変化であった[10]。したがって，リンパ球の減少は，リンパ球、特に B 細胞を治療ターゲットとしたベネトクラクスの予期される薬力学的効果である。

リンパ球の減少は，感染症のリスクを増加させる可能性があるが，最長 6 ヵ月間のマウス試験，最長 13 週間のラット試験，最長 9 ヵ月間のイヌ試験では感染が増加することはなかった。しかし，衛生的に管理された毒性試験で感染症がみられなかったことが，CLL 患者の感染症のリスクを増加させないということではない。臨床試験において，重篤なケースを含む，感染症がみられた。多くの場合は，高齢者でみられ，上気道感染症や肺炎であったが，日和見感染の増加はみられなかった。みられた感染症の原因は，投与開始前から被験者の骨髄細胞数が減少していることや，進行がんを罹患していることから，一義的には判断が難しい。更に CLL 患者は，原疾患に関連した又は化学療法による免疫機能の低下により感染合併症を引き起こしやすいと報告されている[11]。また，既に多くの治療を受けている患者ほど，重篤な感染症を患うリスクが大きいとされている[12]。感染症は，標準的なガイドラインに沿った支持療法により管理可能であり，感染症のリスクは，再発又は難治性 CLL 患者に対するベネトクラクスの使用のベネフィット-リスクを考える上の一部になっている。

赤血球系パラメータの減少については，理論的には BCL-2 及び BCL-X_L が関与している可能性がある。BCL-X_L は赤血球系細胞の成熟と維持に，特に成熟過程の後期に必須であり[13]，BCL-XL に対する阻害作用もわずかに働く可能性があり，赤血球にも影響を及ぼした可能性も完全に否定できない。しかし，増殖分化過程における BCL-2 のエリスロポエチン制御が，赤血球前駆細胞の生存に関与するという報告があり，[14]in vitro 試験からベネトクラクスは BCL-2 に高い選択性を示した。したがって，ベネトクラクスによる BCL-2 阻害は，赤血球系パラメータの減少に寄与している可能性が考えられる。BCL-X_L はヘムの合成に重要であり，実験的に BCL-X_L の発現を抑制するとヘモグロビンの合成が著しく抑制される[13]。ベネトクラクスの BCL-2 への選択性は高いものの，BCL-X_L に対する阻害作用もわずかに働く可能性があり，したがって，赤血球にも影響を及ぼした可能性も考えられる。

程度は低いが，ヘモグロビンの減少及び貧血が，ベネトクラクスの連日投与の治療でみられた。がん患者においてみられたヘモグロビンの減少及び貧血のうち，用量制限毒性を示したケースはみられておらず（2.7.4.3 項），重篤なケースはほとんどみられなかった。ヘモグロビンの減少及び貧血の原因は，投与開始前から被験者が貧血であったこと，複数の抗がん療法を受けていること，また，進行がんを罹患していることから，一義的に判断が難しい。ヘモグロビンの減少及び貧血は，支持療法により管理可能である。赤血球系パラメータ及びリンパ球への影響は，通常の血液検査でモニター可能であり，非臨床試験の結果から，回復性があるものと考えられる。

精巣生殖細胞の減少は BCL-2 阻害作用と一致する [15-17]。イヌでみられた精巣の変化から，ベネトクラクスの投与を受けた被験者にも同様のリスクがあることが示唆される。イヌの 4 週間反復投与でみられた精巣生殖細胞の減少は，4 週間の休薬期間では回復しなかった。ベネトクラクスの対象患者の多くは高齢者（65 歳以上）であり，更に前治療の化学療法による精巣毒性の影響を受けている可能性があることから，ベネトクラクスに関連した精巣の変化が再発又は難治性 CLL 患者でもみられるかを評価するのは容易ではない。イヌでみられた精巣の変化（精巣生殖細胞の減少）と同様の所見が男性被験者でみられる可能性を判断するデータはない。精巣の変化はイヌのみでみられた。マウス及びラットでは，イヌと同様の曝露量であったが，変化はみられなかった。ヒトにおいて BCL-2 が生殖細胞の維持に役割を果たしているかは不明である。したがって，イヌでみられた精巣の変化がヒトに外挿可能かについては不明である。再発又は難治性の CLL 患者は，精巣機能に障害を及ぼす治療薬を既に処方されている可能性があるが，仮に，ヒトで同様の変化が生じた場合は，精巣機能を障害する可能性が考えられる。

マウスでみられた着床後胚損失及び胎児体重の減少から，ヒトの胎児毒性のリスクが示唆された。妊娠の可能性がある女性は，ベネトクラクスの投与に際し，効果的な避妊法を助言を受け，妊娠した場合は医療機関に報告（連絡）する必要がある。

毒性試験でみられた単細胞壊死の臨床的な意義は明らかではない。ベネトクラクスの臨床試験においても単細胞壊死と関連する副作用はみられていない。一方，毒性試験でみられた上皮細胞の単細胞壊死は，一般的な血液生化学的検査では検出するのが困難と考えられるほど，軽微な変化であった。

イヌでみられた被毛の色調変化（白色）は，BCL-2 阻害作用に起因するものと考えられる [18]。臨床試験において，頭髪の色調変化（白色）がみられたケースが数例報告されたが，多くの被験者が高齢者であることから，ベネトクラクスによるものかは，判断が難しい。

ヒト主要代謝物である M27 の安全性プロファイルは，*in vitro* 遺伝毒性試験，反復投与毒性試験及び副次的薬理試験により評価した。その結果，M27 の BCL-2 に対する親和性は，ベネトクラクスの 220 分の 1 未満であり，遺伝毒性はみられず，オフターゲットの薬理活性も弱いという結果が得られ，M27 がベネトクラクスの再発又は難治性 CLL 患者に対するベネフィット-リスク評価に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

2.4.5 総括及び結論

2.4.5.1 ベネトクラクスの特徴

薬理試験，薬物動態試験及び毒性試験を実施し，ベネトクラクスの特徴を評価した。遺伝毒性不純物及び発がん性不純物は，ICH M7 ガイドラインに従って設定した原薬の規格値に管理されている [6]。規格値の設定の詳細については 3.2.S.2.6 項及び 3.2.S.3.2 項を参照されたい。

2.4.5.2 ベネトクラクスの安全性

毒性試験でみられた毒性変化は赤血球系パラメータ（主にヘモグロビン）の減少，回復性が確認されなかった精巣生殖細胞の減少及びマウスの胎児毒性であった。しかし，マウス及びウサギの胚・胎児発生に関する試験では催奇形性はみられなかった。毒性とは考えなかった変化として，末梢血及びリンパ系器官におけるリンパ球の減少，複数の上皮組織における単細胞壊死，被毛の色調変化（白色）がみられた。リンパ球の減少は回復性がみられたが，イヌにおけるリンパ球の減少は，回復に長期間（2 週間反復投与の場合は 18 週間の回復期間）を要した。ベネトクラクス及びそのヒト主要代謝物 M27 は *in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験で陰性であった。光毒性試験も陰性であった。毒性試験でみられた主な変化の無毒性量及びその曝露量並びに安全域を表 2.4-8 に示す。

表 2.4-8. ベネトクラクスの安全性プロファイル

毒性所見	無毒性量	$AUC_{0\text{-}24h}$	安全域
赤血球系パラメータの減少	マウス 200 mg/kg/日(4 週間) 300 mg/kg/日(6 カ月間) イヌ 50 mg/kg/日(4 週間) 20 mg/kg/日(9 カ月間)	マウス 59.5 μg•h/mL 34.2 μg•h/mL イヌ 472 μg•h/mL 85.7 μg•h/mL	マウス 1.8 倍 0.9 倍 イヌ 14.3 倍 2.6 倍
精巣細胞の減少	マウス 著変なし イヌ 無毒性量/無作用量未決定	マウス(最高曝露量) 91.5 μg•h/mL イヌ(最低曝露量) 15.1 μg•h/mL	マウス 2.8 倍 イヌ 0.5 倍
胚・胎児毒性 (体重減少及び着床後胚損失)	マウス 50 mg/kg/日 ウサギ 著変なし	マウス 26.1 μg•h/mL ウサギ(最高曝露量) 4.90 μg•h/mL	マウス 0.8 倍 ウサギ 0.1 倍
毒性でない所見	無毒性量	AUC_{ss}	安全域
リンパ球減少	マウス 600 mg/kg/日(4 週間) 300 mg/kg/日(6 カ月間) イヌ 150 mg/kg/日(4 週間) 20 mg/kg/日(9 カ月間)	マウス 91.5 μg•h/mL 34.2 μg•h/mL イヌ 572 μg•h/mL 85.7 μg•h/mL	マウス 2.8 倍 0.9 倍 イヌ 17.4 倍 2.6 倍
単細胞壊死	マウス 著変なし イヌ 150 mg/kg/日(4 週間) 20 mg/kg/日(9 カ月間)	マウス(最高曝露量) 91.5 μg•h/mL イヌ 572 μg•h/mL 85.7 μg•h/mL	マウス 2.8 倍 イヌ 17.4 倍 2.6 倍
被毛の色調変化	マウス 著変なし イヌ 20 mg/kg/日(9 カ月間)	マウス(最高曝露量) 91.5 μg•h/mL イヌ 85.7 μg•h/mL	マウス 2.8 倍 イヌ 2.6 倍

安全域はヒトにベネトクラクスの 400 mg/日を投与した際の定常状態の曝露量（AUC＝32.9 μg•h/mL）(M12-175, Clinical Safety Report) を用いた算出した。イヌの精巣細胞の枯渇については雄のみのデータ。その他は，両性を用いた試験においては雌雄の平均値に基づいて算出した。

2.4.5.3 総括

ベネトクラクスは，BCL-2 を強力かつ選択的に阻害する経口投与可能な BCL-2 阻害剤である。この BCL-X_L による副作用を回避する阻害剤は，単剤，又は化学療法及び生物製剤との併用において，多様な血液悪性腫瘍に対して抗腫瘍作用を示す。ベネトクラクス及びそのヒト主要代謝物である M27 は主に CYP3A4 で代謝される。薬理作用が期待される血漿中濃度において実施された安全性薬理試験（中枢神経系，心血管系及び呼吸系）では良好な安全性プロファイルを示

した。ベネトクラクスの毒性試験でみられた主要な毒性所見は，マウス，ラット及びイヌにおける血球系に対する変化（リンパ球及び赤血球系パラメータの減少），雄のイヌにおける生殖器系に対する変化（精巣生殖細胞数の減少），マウスにおける胎児毒性であった。ヒトの主要代謝物である M27 は遺伝毒性を示さず，マウスにおいては軽微から軽度のリンパ球及び赤血球系パラメータへの影響がみられたが，ベネトクラクスによる変化よりも弱いものであった。ベネトクラクスの非臨床試験から得られる安全性プロファイルは，再発又は難治性の CLL 患者に投与した場合，有効性及び安全性を支持するものであった。

2.4.6 参考文献一覧

1. 抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン（S9）．ICH 医薬品規制調和国際会議. ステップ 5. 平成 22 年 6 月 4 日.
2. 医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス（M3（R2））．ICH 医薬品規制調和国際会議. ステップ 5. 平成 22 年 2 月 19 日.
3. 新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドライン（Q3A（R2））．ICH 医薬品規制調和国際会議. ステップ 5. 平成 18 年 12 月 4 日.
4. 「新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドラインの改定について」の一部改定について（Q3B（R2））．ICH 医薬品規制調和国際会議. ステップ 5. 平成 18 年 7 月 3 日.
5. 医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンス（S2（R1））．ICH 医薬品規制調和国際会議. ステップ 5. 平成 24 年 9 月 20 日.
6. 潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中 DNA 反応性（変異原性）不純物の評価及び管理ガイドライン（M7）．ICH 医薬品規制調査国際会議. ステップ 5. 平成 27 年 11 月 10 日.
7. FDA. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. 2001.
8. Viswanathan CT, Bansal S, Booth B, et al. Quantitative Bioanalytical Methods Validation and Implementation: Best Practices for Chromatographic and Ligand Binding Assays. Pharm Res 2007;24:1962-73.
9. FDA. Safety Testing of Drug Metabolites. Guidance for Industry, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. February, 2016.

10. Marsden VS, Strasser A. Control of Apoptosis in the Immune System: Bcl-2, BH3-only Proteins and More. Annu Rev Immunol 2003;21:71-104.

11. Dearden C. Disease-specific complications of chronic lymphocytic leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2008;450-456.

12. Wadhwa PD, Morrison VA. Infectious complications of chronic lymphocytic leukemia. Semin Oncol. 2006;33(2):240-249.

13. Hafid-Medheb K, Augery-Bourget Y, Minatchy M-N, et al. Bcl-X_L is Required for Heme Synthesis During the Chemical Induction of Erythroid Differentiation of Murine Erythroleukemia Cells Independently of its Antipoptotic Function. Blood 2003;101:2575-2583.

14. Silva M, Grillot D, Benito A, Richard C, Nunez G, Fernandes-Luna JL. Erythropoietin Can Promote Erythroid Progenitor Survival by Repressing Apoptosis through Bcl-X_L and Bcl-2. Blood 1996;88(5):1576-1582.

15. Yan W, Huang JX, Lax AS, et al. Overexpression of Bcl-w in the Testis Disrupts Spermatogenesis: Revelation of a Role of BCL-W in Male Germ Cell Cycle Control. Mol Endocrinol 2003;17:1868-79.

16. Sugiyama N, Obinata M, Matsui Y. Bcl-2 Inhibits Apoptosis of Spermatogonia and Growth of Spermatogonial Stem Cells in a Cell-Intrinsic Manner. Mol Reprod Dev 2001;58(1):30-38.

17. Oldereid NB, De Angelis P, Wiger R, Clausen OP. Expression of Bcl-2 Family Pproteins and Spontaneous Apoptosis in Normal Human Testis. Mol Hum Reprod 2001;7(5):403-408.

18. Yamamura K, Kamada S, Ito S, et al. Accelerated Disappearance of Melanocytes in bcl-2-deficient Mice. Cancer Research 1996;56:3546-3550.

表 2.4-9. ベネトクラクス: マウス，ラット及びイヌの主要な毒性試験一覧

毒性試験	動物種	投与期間	報告書番号	無毒性量(mg/kg/日)	無毒性量の曝露量(μg•hr/mL)[a]	安全域[b]	毒性所見
反復投与毒性試験	マウス(Tg.rasH2)[c]	1ヵ月間	R&D/14/0737	M: 600 F: 200	M: 62.8 F: 43.2	M: 1.9 F: 1.3	M: なし F: ↓赤血球系パラメータ
	マウス (CD-1)	4週間	R&D/10/342	200	60	1.8	↓赤血球系パラメータ
		6ヵ月間	R&D/12/522	300	34	1.0	なし
	ラット (Sprague-Dawley)	3ヵ月間	R&D/14/0959	M: 150 F: 8	M: 26.4 F: 17.4	M: 0.8 F: 0.5	M: ↓体重増加量 (>10%) F: 400 mg/kg/日: 瀕死状態; 骨髄細胞増加及び赤芽球の過形成; 肝小葉中心性萎縮; 150 mg/kg/日以上: ↓赤血球系パラメータ; ↓MCV, MCH, MCHC; 赤血球形態変化 ↓体重増加量 (>10%)
	イヌ (Beagle)	2週間	R&D/11/298	NA[d]	NA[d]	NA[d]	なし
		1ヵ月間	R&D/10/224	M: 特定されず[e] F: 200	472	14.3	M, F: ↓赤血球系パラメータ M: 精巣生殖細胞の減少
		9ヵ月間	R&D/12/384	M: 特定されず[e] F: 20	86	2.6	M: 精巣生殖細胞の減少 F: なし
生殖発生毒性試験	マウスの受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験	M: 52日間– 交配期間前14日から剖検まで	R&D/12/810	600	85.5	2.6	なし
		F: 交配期間前15日から妊娠7日まで	R&D/13/279	600	97.5	3.0	なし
	マウスの胚・胎児発生に関する試験	妊娠 6日 – 妊娠15日	R&D/12/746	150 (母動物)	37.8	1.1	なし
				50 (胎児)	26.1	0.8	↑着床後胚損失; ↓胎児体重
	ウサギの胚・胎児発生に関する試験	妊娠7日 – 妊娠19日	R&D/12/824	100 (母動物)	2.4	0.1	死亡, ↓体重及び体重増加量, ↓摂餌量
				300 (胎児)	4.9	0.1	なし

; NA = 適用外; M = male; F = female; ↓ = 減少; ↑ = 増加

a. 定常状態の $AUC_{0\text{-}24h}$.

b. 400 mg/日におけるヒト臨床薬効曝露量を 32.9 μg•hr/mL と想定

c. 野生型 CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic マウス

d. 無毒性量を目的としない試験。高用量 30 mg/kg/日（平均 AUC = 311 μg•hr/mL）において毒性はみられなかった。

e. 雄の全群で精巣毒性（精巣生殖細胞の減少）がみられた。