目次

2.6.6 毒性試験の概要文 4
2.6.6.1 まとめ 4
2.6.6.2 単回投与毒性試験 10
2.6.6.3 反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む） 11
2.6.6.4 遺伝毒性試験 29
2.6.6.5 がん原性試験（トキシコキネティクス評価を含む） 30
2.6.6.6 生殖発生毒性試験（用量設定試験及びトキシコキネティクス評価を含む） 30
2.6.6.7 局所刺激性試験 30
2.6.6.8 光安全性試験 31
2.6.6.9 その他の毒性試験（実施している場合） 31
2.6.6.10 考察及び結論 41
2.6.6.11 図表 47
2.6.6.12 参考文献 48

毒性試験の概要文の略号一覧表

略号	省略していない表現（英語）	省略していない表現（日本語）
A/G	albumin/globulin	アルブミン/グロブリン
ALP	alkaline phosphatase	アルカリホスファターゼ
ALT	alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
APTT	activated partial thromboplastin time	活性化部分トロンボプラスチン時間
AST	aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	area under the curve	濃度-時間曲線下面積
$AUC_{(0\text{-}5h)}$	AUC from zero time extrapolated to 5 hours	投与時から投与 5 時間後までの血漿中濃度–時間曲線下面積
$AUC_{(0\text{-}inf)}$	AUC from zero time extrapolated to infinite time	投与時から投与後無限大までの血漿中濃度–時間曲線下面積
$AUC_{(0\text{-}t)}$	AUC from time zero to time t	投与時から最終定量可能時点までの血漿中濃度–時間曲線下面積
BUN	blood uria nitrogen	血中尿素窒素
C_0	extrapolated concentration at zero time	0 時間に外挿した濃度
CYP	cytochrome P450	チトクローム P450
CHO	chinease hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
ConA	concanavalin A	コンカナバリン A
CRO	contract research organization	医薬品開発業務受託機関
$DA_{glu53}B_{389}IL\text{-}2$	—	ジフテリア毒素部分の変異により酵素活性を持たない DD の構造変異体
$DAB_{389}IL\text{-}2$	denileukin diftitox	denileukin diftitox の化学名（IUPAC）
$DAB_{389}IL\text{-}2_{\Delta 8\text{-}19}$	—	IL-2 結合部分の変異により IL-2R への結合能を有さない DD の構造変異体
DD	denileukin diftitox	本薬の活性体
E7272	E7272	現在米国で承認を取得している原薬又は製剤のエーザイ社内でのコード番号
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	エチレンジアミン四酢酸
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素免疫測定法
FDA	United States Food and Drug Administration	米国食品医薬局
γ-GT	γ-glutamyl transpeptidase	γ-グルタミントランスペプチダーゼ
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
[redacted]	[redacted]	[redacted]

毒性試験の概要文の略号一覧表

略号	省略していない表現（英語）	省略していない表現（日本語）
IC_{50}	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICH	International Council for Harmonisation	医薬品規制調和国際会議
ICR	Institute of Cancer Research	－（マウス系統名）
IFNγ	interferonγ	インターフェロンγ
IL-1α	interleukin-1α	インターロイキン-1α
IL-1β	interleukin-1β	インターロイキン-1β
IL-2	interleukin-2	インターロイキン-2
IL-2R	interleukin-2 receptor	インターロイキン-2 受容体
IL-6	interleukin-6	インターロイキン-6
LDH	lactate dehydrogenase	乳酸脱水素酵素
[redacted]	[redacted]	[redacted]
MTD	maximum tolerated dose	最大耐量
NK	natural killer	ナチュラルキラー
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
NZW	New Zealand white	－（ウサギ系統名）
PHA	phytohemagglutinin	フィトヘマグルチニン
PK	pharmacokinetics	薬物動態
PT	prothrombin time	プロトロンビン時間
RPTE	renal proxymal tubule epithelial	腎近位尿細管上皮
S9	9000×g supernatant of homogenate	ホモジネート 9000×g 上清
SD	Sprague Dawley	－（ラット系統名）
SDH	sorbitol dehydrogenase	ソルビトール脱水素酵素
SRBC	sheep red blood cell	ヒツジ赤血球
$t_{½}$	terminal phase half-life	最終消失半減期
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
TNF-α	tumor necrosis factor-α	腫瘍壊死因子-α
Treg	regulatory T-cell	制御性 T 細胞

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6.1 まとめ

E7777（以下，本薬）の安全性評価は，米国で既に承認されている旧製剤 E7272 を用いた in vitro 並びに複数の動物種を用いた in vivo 毒性試験，純度を向上させた新製剤である本薬のラットを用いた 3 サイクル並びに 7 サイクル投与毒性試験により評価した。なお，旧製剤 E7272 を用いて実施したほとんどの試験については，最終報告書を除く原書類が所在不明であるが，米国承認時点では十分な信頼性が確保されていたと考えられたことから，一部は評価資料とした。

E7272 並びに本薬の活性体デニロイキン ジフチトクス（遺伝子組換え，DD，一部の報告書では DAB_{389}IL-2 と記載）を構成する IL-2（インターロイキン-2）はヒト型であるが，ヒト，サル，マウス及びラットのリンパ球は DD の細胞障害作用に対して同様の感受性を示し，これらの動物種を安全性の評価に用いることができると考えられた。一部のげっ歯類の試験では雌のみを使用しているが，サルを用いた試験，並びに主要なラットの試験は雌雄を用いて実施された。本薬の安全性評価に用いた毒性試験を表 2.6.6-1 に示した。なお，本薬を投与した試験はラットを用いた 2 試験（試験番号 1010-0351 及び B[redacted]0280）のみであり，その他の試験は E7272 を用いた。

なお，表 2.6.6-1 に記載した試験以外に ONTAK®（E7272）の FDA の迅速承認（1999 年）時，完全承認の条件となった製剤の純度の問題を解決するため，2002 年にライガンド社で開発された改良凍結乾燥製剤を用いて GLP 試験 2 試験（ラットを用いた間歇投与毒性試験［試験番号 57650］及びサルを用いた TK 試験［試験番号 57651］）が実施されたが，報告書は最終化されていなかった。20[redacted] 年，試験実施 CRO（[redacted]）から弊社への連絡で，試験の存在が明らかとなった。ドラフト報告書の内容を確認したところ，その製剤の投与検体分析で実投与量が著しく低く投与量の保証ができない試験であること，既報と比較して新たな所見は見られないことから，評価の対象外とした。

表 2.6.6-1　毒性試験プログラム

試験の種類と投与期間	投与経路	動物種	GLP の適否
単回投与毒性試験			
単回投与[a]	腹腔内	マウス・モルモット	否
単回投与	皮下	ラット	否[b]
反復投与毒性試験			
14 日間	静脈内	マウス	適[c]
14 日間	静脈内	マウス	否
2 週あるいは 4 週間（5 日間/週）	静脈内	マウス	否
4 週間	静脈内	マウス	否
2 週あるいは 4 週間（5 日間/週）	静脈内	ラット	否
10 日間	静脈内	ラット	否
3 サイクル（5 日間/2 週間）	静脈内	ラット	適
3 サイクル（5 日間/2 週間） （E7777 及び E7272 投与）	静脈内	ラット	適
7 サイクル（5 日間/2 週間） （E7777 投与）	静脈内	ラット	適
14 日間	静脈内	サル	適
29-30 日間，15 日間あるいは 15 日間/30 日間の 2 サイクル	静脈内	サル	適[d]
遺伝毒性試験			
復帰突然変異試験	(in vitro)	細菌[e]	適
染色体異常試験	(in vitro)	CHO 細胞	適
がん原性試験			
ICH S9 ガイドラインに基づいて実施していない。			
生殖発生毒性試験			
実施していないが文献情報等に基づいてリスク評価を実施した。			
局所刺激性試験			
一般毒性試験で局所刺激性を評価した。			
光毒性試験			
ICH S9 ガイドラインに基づいて実施していない。			
その他の毒性試験			
免疫毒性試験			
免疫毒性，10 日間	静脈内	マウス	否
免疫化の影響，10 日間	静脈内	マウス	否
同上，3 又は 14 日間	静脈内	ラット	適[b]

表 2.6.6 -1　毒性試験プログラム（続き）

試験の種類と投与期間	投与経路	動物種	GLP の適否
毒性発現機序に関する試験			
肝及び腎に対する影響	(in vitro)	ラット初代培養細胞	適 [b,]
		ヒトの肝及び腎の切片	適 [f]
各種ヒト初代培養細胞における細胞毒性	(in vitro)	ヒト初代培養細胞	否
血管内皮細胞に対する影響	(in vitro)	ヒト初代培養細胞	否
毛細血管透過性，単回・10 日間投与	静脈内	ラット	適 [b]
サイトカイン分泌への影響，単回・10 日間投与	静脈内	ラット	適 [b]
不純物の毒性試験			
不純物（変化体A*），10 日間	静脈内	ラット	否
不純物（変化体A*），5 日間/3 週間の 2 サイクル	静脈内	ラット	否
その他の試験			
In vitro における細胞毒性の種差	(in vitro)	マウス，ラット，サル及びヒト由来 T リンパ球	否
免疫組織化学による IL-2R の分布	(in vitro)	ラット及びヒト，種々の臓器	否
[redacted]毒性の違い，10 日間	静脈内	ラット	否
DD 構造変異体による特異性確認，10 日間	静脈内	マウス	否
DD 構造変異体による特異性確認，10 日間	静脈内	ラット	否
DD 構造変異体による特異性確認，5 日間/週の 4 週間	静脈内	ラット	適 [b]
高コレステロール食の毒性に及ぼす影響 [g]，7 日間	静脈内	ウサギ	適 [b]

CHO 細胞 = チャイニーズハムスター卵巣由来細胞, DD = Denileukin diftitox, GLP =医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施に関する基準, ICH =医薬品規制調和国際会議, IL-2R = インターロイキン-2 受容体。

a: 異常毒性否定試験のための用量設定試験。
b: FDA の GLP 認証を受けていない試験施設（[redacted] 社）で GLP 試験として行われた。
c: ライガンド社からの委託で実施されたが，実施施設は既に閉鎖されており，試験資料は非 GLP 施設で保管されている。また，入手した最終報告書に署名等の欠落がある。
d: TK 測定部分は GLP 非適で実施した。
e: 試験菌種；サルモネラ菌 TA1535, TA1537, TA98, TA100 及び大腸菌 WP2 *uvrA*。
f: FDA の GLP 認証を受けていない試験施設（[redacted] 社）で GLP 試験として行われた。
g: 外部共同研究者の口頭報告を確認するために行われたが，その影響は確認されなかった。

単回投与毒性試験

本薬の急性毒性評価を，ラットにおける静脈内投与による 6 週間若しくは 14 週間間歇反復投与毒性試験の 1 サイクル目の結果に基づき行った。2 μg/kg 以上でポルフィリンによる被毛の汚れ，10 μg/kg 以上の用量で，自発運動の低下，不安定な呼吸数，軟便，ポルフィリンによる被毛

＊新薬承認情報提供時に置き換え

の汚れ，体重・摂餌に対する影響が認められたが，死亡はみられなかった。したがって，ラットにおける静脈内投与による本薬の概略の致死量は 40 μg/kg 以上であった。

E7272 の急性毒性評価を，本薬と毒性を比較したラットにおける静脈内投与による 6 週間間歇反復投与毒性試験の 1 サイクル目の結果に基づき行った結果，40 μg/kg において本薬と同様に被毛の汚れ，体重・摂餌に対する影響がみられたが，本薬に比べてその影響は軽度であり，死亡はみられなかった。E7272 のラットにおける静脈内投与による 10 日間反復投与毒性試験において最高用量 90 μg/kg においても死亡が認められなかったことから，E7272 の静脈内投与における概略の致死量は 90 μg/kg 以上と考えられた。また，E7272 を用いたラットの 2430 μg/kg 単回皮下投与においては，14 日間の観察期間に軽度の体重減少（5%以下）が認められたが，死亡は認められなかったことから，概略の致死量は 2430 μg/kg 以上と考えられた。さらに，E7272 を用いたマウス及びモルモットを用いた異常毒性否定試験の用量設定として実施した単回腹腔内投与毒性試験では，マウスでは 7.5 μg/例，モルモットでは 75 μg/例以上で 8 日間の観察期間中に軽度の体重減少がみられたが，臨床症状に変化はみられなかった。マウスでは 15 μg/例以上，モルモットは 450 μg/例以上で死亡例がみられたことから，概略の致死量は単位体重当たりの投与量としては，それぞれ 691 μg/kg 及び 1230 μg/kg であった。これら E7272 における概略の致死量を基に，本薬のそれを類推すると，生物活性は E7272 の約 2 倍であることから，ラットの静脈内投与においては 45 μg/kg 以上，皮下投与においては 1215 μg/kg 以上，マウス及びモルモットの腹腔内投与においてはそれぞれ 345 μg/kg 及び 615 μg/kg であると考えられた。

反復投与毒性試験

げっ歯類（マウス及びラット）及びカニクイザルを用いて E7272 の静脈内投与による反復投与毒性試験（投与期間：10～30 日間）を実施した。これらの試験の投与量は 2～653 μg/kg/日であった。E7272 の最大耐量（MTD）は投与期間，投与スケジュールによって異なり，短期反復投与（10～15 日間）試験ではサル＜ラット≦マウスの順であった。主要な毒性所見はいずれの動物種でも共通し，食欲減退，下痢，脱水，活動性低下，体重減少，白血球及びリンパ球の減少，好中球の増加，ALT 及び AST の増加，あるいはアルブミンの低下等がみられた。高用量ではクレアチニン及び BUN の増加もみられた。

いずれの動物種でも標的臓器は肝及び腎であり，肝細胞と腎尿細管上皮細胞の壊死がみられた。さらに，長期反復投与毒性試験では，種々の臓器に著しい単核細胞浸潤がみられた。連続反復投与試験と間欠反復投与試験の結果から，投与期間が長くなると E7272 に対する忍容性が向上することが示唆された。忍容性向上は，間歇投与における休薬期間中の毒性回復，あるいは抗体の発現による E7272 の血中濃度低下のいずれか，あるいはその両方が関与したと考えられた。

本薬の毒性を評価するため，雌雄の SD ラットを用いて本薬（投与量：2，10 又は 40 μg/kg/日）を 3 サイクル（各サイクルは 5 日間の投与期間と 9 日間の休薬期間）静脈内投与するとともに，E7272 の 40 μg/kg/日群も設定し，本薬との直接比較を行った。なお，本薬の生物活性は E7272 の生物活性の約 2 倍であり，E7272 の最大耐量 40 μg/kg/日と同じ本薬の投与量は過剰で，死亡が認められた。さらに，本薬の 40 μg/kg/日では体重及び摂餌量の減少，リンパ球の減少，好中球の増加，肝及び腎機能パラメータの変動，各種臓器へのリンパ球及び好酸球の細胞浸潤

並びに副腎皮質の空胞化等も認められた。これらの変化の頻度及び程度は投与量に相関していた。一方，直接比較のために設定したE7272投与群では死亡例はみられなかったものの，本薬投与群と同様に各種臓器へのリンパ球及び好酸球浸潤がみられ，体重増加量及び摂食量の減少，並びに臨床検査で薬物の影響がみられた。みられた毒性はいずれも可逆的であった。また，2サイクル投与後に本薬群及びE7272群のいずれにおいても抗DD抗体が検出された。

以上，本薬及びE7272の毒性は質的に同じであり，過去に米国承認申請時にE7272を用いて行われた毒性試験結果ともよく一致していた。量的な違いは両製剤の生物活性の違いに基づくものと思われた。

ラットを用いた本薬の7サイクル（14週間）間歇静脈内投与試験（投与量：2，10又は20 μg/kg/日）では，3サイクル投与と同様の所見が見られ，長期投与による毒性の重篤化や違いは無かった。抗E7777抗体生成により，本薬の全身暴露は減少傾向を示し，薬物性の変化はむしろ7サイクル投与で弱くなる傾向が見られた。

遺伝毒性試験

本薬及びE7272の活性体DDはタンパク質であり，ICH S6に記載されているように遺伝毒性試験は必要とされない。しかしながら，E7272を用いて細菌を用いた復帰突然変異試験並びに培養細胞を用いた染色体異常試験（いずれもGLP）が行われている。細菌を用いた復帰突然変異試験ではE7272の15 μg/plateの濃度まで，いずれの菌株においても変異原性はみられなかった。チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を用いた染色体異常試験では，E7272の3 μg/mLの濃度まで染色体異常はみられなかった。

がん原性試験

がん原性試験については，本剤の適応症が進行がん患者の治療を目的としたものであり，ICH S9ガイドラインにも記載されているように，必要とされないことから，実施しなかった。

生殖発生毒性試験

本薬の薬理作用としてTreg細胞の傷害作用が報告されており，その機能低下あるいはTreg数減少は動物でもヒトでも妊娠障害あるいは流産を引き起こすことが多くの文献で報告されている（Robertson, et al., 2018; Heitmann, et al., 2017; Ruocco, et al., 2014; Zenclussen, et al., 2006）。したがって，妊婦に対するリスクが明らかなため，生殖発生毒性試験は実施しなかった。

局所刺激性

独立した局所刺激性試験は実施していないが，静脈内投与で実施した反復投与毒性試験において投与部位における局所刺激性を評価した。その結果， 毒性試験において重篤な刺激性は認められず，今までに行われた臨床試験においても重度の局所性皮膚反応を含む刺激性は認められていない。

光毒性

本薬及びE7272の活性体であるDDはタンパク質である。光吸収は280 nmで光反応性はないと考えられる。ICH S10ガイドラインにおいても光毒性試験は適用されないため，実施しなかった。

免疫機能の抑制作用

マウスを用いてE7272の無毒性量で免疫機能に関する種々のex vivo評価（マイトジェン刺激に対する反応，混合リンパ球反応，ナチュラルキラー［NK］細胞の細胞傷害性及びマクロファージの細胞傷害性）及びin vivo評価（抗ヒツジ赤血球［SRBC］抗体産生，遅延型過敏症，B16メラノーマ移植に対する抵抗性，リステリア菌感染に対する抵抗性）を行った結果，影響は認められなかった。

DD免疫化の影響

本薬及びE7272の活性体であるDDはヒトIL-2とジフテリア毒素を結合させた外来性の高分子タンパク質であり，ヒトを含むいずれの種においても強い免疫原性を示す。抗DD抗体の毒性に及ぼす影響をマウス及びラットを用いて調べた。マウスにおいては免疫化により毒性の明らかな軽減が確認された。ラットを用いた実験（報告書番号 ■150，■151）においては，抗薬物抗体を持つ動物へのE7272投与の結果，投与直後に重篤な活動性の低下とチアノーゼが一過性に観察されたが，日を追うごとに症状は軽減した。これらの症状は，皮下投与により前処理した動物でのみ認められており，E7272及び本薬の静脈内投与試験では認められていない。その他の毒性については，マウスと同様，明らかな軽減が確認された。

肝及び腎毒性

本薬及びE7272のラット反復投与毒性試験に共通した毒性の標的臓器は肝及び腎であり，肝細胞と腎尿細管上皮細胞の壊死がみられた。これらの毒性はE7272を用いて行われた他の動物種（マウス及びサル）における毒性試験でも同様で，主要な標的臓器は肝及び腎であった。肝毒性並びに腎毒性検討のため，E7272を用いていくつかの検討試験が行われた。ラット肝腎初代培養細胞を用いた実験では非常に高い暴露量でのみ，非特異的エンドサイトーシスによると考えられるタンパク質合成阻害が認められたが，ヒトの肝，腎スライスを用いた実験ではタンパク質合成に対する影響は認められなかった。また，ヒト各種初代培養細胞（上皮，腎，内皮，平滑筋，ケラチノサイト[角化細胞]及び線維芽細胞）においても細胞毒性は認められなかった。

毛細血管透過性並びに血管内皮細胞に及ぼす影響

E7272の臨床における特定の有害事象として，毛細血管漏出症候群並びにinfusion reactionの発現頻度が高いため，ヒト血管内皮細胞を用いたin vitro実験を行った。ヒトの血管内皮細胞においてはE7272の直接作用は認められなかった。また，ラットを用いた毛細血管透過性並びにサイトカインの変化も検討した。ラットにおいては軽度の透過性指数の変化は認められたものの，動物の状態は良好であり，臨床で認められるような変化は認められなかった。また，ラットにおける血漿中サイトカインに関してはE7272投与による明らかな影響はみられなかった。

不純物（変化体A*）の毒性

E7777 製剤は E7272 の活性体の純度を上げた製剤であるが，変化体N*以上の変化体A*が[redacted]%以下含まれる。これらの変化体A*について，ラットで特性を調べた。変化体A*は有効成分*よりクリアランスが早く，毒性及び免疫原性が弱かった。

IL-2 受容体の組織分布

ラット及びヒト組織を用いて IL-2 受容体（IL-2R）の組織分布について免疫組織化学的に検討した。ラットにおいてはリンパ球の膜部分の反応が強く，組織としてはリンパ組織（気管支関連リンパ組織，リンパ節，脾）及び炎症部位（腎，肝の門脈周囲）で反応がみられた。ヒト組織においてもリンパ組織（脾/リンパ節）及びリンパ球集簇がみられる内部臓器（肝門脈周囲，肺の細気管支周囲）で反応がみられた。

[redacted]の毒性

本薬の活性体である DD は，[redacted]として変化体H*（[redacted]，本薬の規格で全体の[redacted]%以上）及び変化体C*（[redacted]，全体の約[redacted]%～[redacted]%）から構成される。これらの[redacted]について，ラットで毒性及び PK を比較した。毒性は変化体C* が総じて強かったが，PK に差は無く，[redacted]のばらつき（ロットにより全体の約[redacted]%～[redacted]%の範囲）が臨床上有意な差になるとは考えられなかった。

DD 構造変異体による特異性の確認

本薬及び E7272 の活性体である DD は，ジフテリア毒素の一部とヒト IL-2 の融合タンパク質だが，その構造を改変した $DA_{glu53}B_{389}$IL-2（ジフテリア毒素部分の変異により酵素活性を持たない DD の構造変異体），並びに DAB_{389}IL-$2_{\Delta 8\text{-}19}$（IL-2 結合部分の変異により IL-2R への結合能を有さない DD 構造変異体）を作製し，その毒性に関する特異性をマウス及びラットを用いて調べた。いずれの実験においても $DA_{glu53}B_{389}$IL-2 では毒性は認められず，DAB_{389}IL-$2_{\Delta 8\text{-}19}$ では軽度の毒性が認められたが，その毒性は DD と比較してはるかに弱かった。いずれの DD 構造変異体もクリアランスが 3 倍早いが，それを踏まえても薬効並びに毒性発現には両部分が必要と考えられた。

高コレステロール食の影響

E7272 を投与したウサギを用いて高コレステロール食の影響を調べた。その結果，毒性はほとんど影響を受けなかった。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

2.6.6.2.1 マウス及びモルモットにおける単回腹腔内投与用量設定毒性試験（添付資料 4.2.3.1.1，報告書番号[redacted]012［参考］）

異常毒性否定試験の用量設定として，E7272 を ICR 雌マウス（10 例/群）及び Hartley 雌モルモット（10 例/群）に腹腔内投与した。E7272 の投与量としてマウスは 7.5，15，30 μg/例，モルモットは 75，150，450 μg/例とし，投与後 8 日間観察した。陰性対照群（10 例/群）には媒体（0.9%

＊新薬承認情報提供時に置き換え

生理食塩液）を投与した。

その結果，マウスでは15 μg/例以上，モルモットは450 μg/例で死亡例がみられた。また，マウスでは7.5 μg/例，モルモットでは75 μg/例以上で観察期間中に軽度の体重減少がみられたが，臨床症状に顕著な変化はみられなかった。

2.6.6.2.2 ラットにおける単回皮下投与毒性試験（添付資料 4.2.3.1.2，報告書番号 ■093［参考］）

ラットにおける単回皮下投与毒性試験として，E7272 を注射用水で復水し，2430 μg/kg の投与量で雌雄の SD ラット（10 例/性/群）に単回皮下投与した。対照群（10 例/性/群）にはプラセボ（100 μmol/L グルタチオン，3%マンニトール，0.35%ポリソルベート-20 を含む 12 mmol/L クエン酸塩，50 μmol/L EDTA，pH 7.2）を投与した。動物は，3 日目及び 15 日目に雌雄各 5 例ずつ剖検した。

その結果，死亡は認められなかった。投与後 7 日までの期間，E7272 投与群で軽度の体重減少（5%以下）が認められた。3 日目の剖検群で肝毒性を示唆する軽度の肝逸脱酵素の変化（AST，ALT，ALP 及びソルビトール脱水素酵素［SDH］，媒体対照群に比べて約 2 倍）が認められた。いずれの変化も 2 週間後に回復あるいは回復傾向が確認された。

2.6.6.3 反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

2.6.6.3.1 マウスにおける 14 日間反復投与毒性試験（添付資料 4.2.3.2.1，報告書番号 ■066［参考］）

マウスにおける 14 日間静脈内投与試験を実施した。E7272 は 0（対照群），19，38，77，164，327 又は 653 μg/kg/日を投与した。対照群には同じ容量のリン酸緩衝生理食塩水を投与した。各群 10 例の雌 ICR マウスを使用し，投与期間終了後（15 日目）に剖検した。検査項目として，死亡の有無，一般状態観察，体重，摂餌量，眼科学的検査，臨床検査（血液学的検査・血液生化学的検査），肉眼検査，病理組織学的検査を行った。なお，本試験では比較のため関連化合物の投与群も設定しているが，その結果は記載していない。

投与期間中，E7272 の 327 及び 653 μg/kg/日群では全例が死亡発見又は瀕死のため安楽殺を行った。これら途中死亡の個体では，粗毛，活動性の低下，異常呼吸，削痩がみられた。77 μg/kg/日以上で明らかな体重減少，19 及び 38 μg/kg/日で体重増加抑制が認められた。腎，肝，副腎，肺，リンパ・造血系への毒性が認められ，腎への毒性は用量相関性が認められ，体重減少・死亡の原因と考えられた。肝については，細胞毒性による肝障害が示唆され，AST，ALT 及び ALP の上昇を伴っていた。副腎にみられた皮髄境界部の壊死は重度のストレスの際にみられる変化として知られるが，用量相関性があり，肝や腎に対する影響がみられた個体で認められたことから，肝腎障害による間接的影響も関連すると考えられた。肺の出血と急性の炎症は全ての投与群にみられ，死亡の認められなかった高用量群（77 又は 164 μg/kg/日）では壊死や慢性的な炎症性の変化がみられた。リンパ組織・造血組織の変化は用量相関性が認められ，化合物の直接，あるいは反応性の影響と考えられた。リンパ節や脾ではリンパ過形成，肝では髄外造血，骨髄では造血の亢進が認められた。

2.6.6.3.2 マウスにおける 14 日間反復毒性試験（添付資料 4.2.3.2.2，報告書番号：■015［参

考]）

E7272 を投与したマウスに見られる肝・腎毒性の回復性を確認するため，40 例の雌 ICR マウスを陰性対照群及び E7272（85 μg/kg/日）の 2 群（20 例/群）に分け，1 日 1 回，14 日間静脈内投与を行った。陰性対照群にはリン酸緩衝生理食塩水を投与した。投与開始から 15 日目，半数の動物の体重を測定し，麻酔後放血し，血液生化学的検査並びに病理組織学的検査（肝，腎）を実施した。30 日目に残りの回復群の動物も同様に検査した。

E7272 を 14 日間投与した群は，体重の減少，肝トランスアミナーゼの上昇が認められ，肝細胞壊死が認められた。しかしながら，回復群では ALT の高かった 1 例を除いて，血液生化学的検査並びに病理組織学的検査に毒性所見は認められなかった。したがって，E7272 投与により認められた肝毒性は回復性があると考えられた。

2.6.6.3.3 マウスにおける 2 週あるいは 4 週間間歇反復投与毒性試験（添付資料 4.2.3.2.3，報告書番号 [redacted]164［参考]）

雌 ICR マウスに E7272 の 10 又は 25 μg/kg/日を 5 日間/週（1 週間で 5 日間投与，2 日間休薬）を 1 サイクルとして 2 又は 4 週間静脈内投与した。2 週間投与群（60 例/群）には投与期間終了後，2 及び 4 週間休薬後に剖検に供する小群を，4 週間投与群（45 例/群）には投与期間終了後，4 及び 8 週間休薬後に剖検に供する小群を設定した。対照群（5 例）には，0.9%生理食塩液を 5 日間/週で 4 週間静脈内投与し，29 日目に剖検した。投与期間中及び投与終了後における死亡の有無，一般状態観察，体重，血液生化学的検査，トキシコキネティクス（酵素免疫測定法［ELISA］及び IL-2R を発現するヒト C91/PL 細胞による生物活性），免疫原性（投与期間終了後及び休薬後の抗 DD 抗体量及びその中和活性），肉眼及び病理組織学的検査（肝，腎，脾，肺，脳［皮質］）を実施した。

マウスの忍容性は良好であったが，25 μg/kg/日の 1 例が 17 日目に死亡発見された。25 μg/kg/日群では 22 日目まで体重減少がみられた。回復期間終了後も対照群に比べ低い体重を示したが，22 日目以降の伸びは対照群と同様であった。また，血液生化学的検査では AST，ALT，総ビリルビンの上昇がみられ，病理組織学的変化として肝細胞の空胞化がみられた。肝の変化は回復期間終了後にもみられた。脾ではリンパ過形成がみられたが，休薬によって軽減した。さらに数例で肺における肉芽腫性炎症がみられた。

10 μg/kg/日群では同様な変化が肝，脾，肺にみられたが，体重に対する影響はみられなかった。

ICR マウスにおける E7272 の毒性は比較的弱く，抗 DD 抗体や中和抗体が 2 週間程度で産生されることに起因すると考えられた。

表 2.6.6-2 雌マウス間歇反復投与における TK パラメータ

投与量 (μg/kg/日)	投与日	C_{5min} (ELISA) (ng/mL)	C_{5min} (Bioassay [c]) (U/mL)
10	1 [a]	70.075	8336
	12 [a]	56.479	6082
	26 [b]	27.468	5931
25	1 [a]	269.054	42936
	12 [a]	212.808	37997
	26 [b]	119.343	18848

C_{5min} は各 5 例の平均値，ELISA =酵素免疫測定法，IL-2R = インターロイキン-2 受容体。
a: 2 週間投与群。
b: 4 週間投与群。
c: IL-2R を発現するヒト C91/PL 細胞による生物活性。
出典：添付資料 4.2.3.2.3 ([redacted]164)。

表 2.6.6-3 雌マウス間歇反復投与における免疫原性

投与量 (μg/kg/日)	投与日	2 週間投与群 (% [頻度])		4 週間投与群 (% [頻度])	
		抗 DD 抗体 [a]	中和抗体 [b]	抗 DD 抗体 [a]	中和抗体 [b]
10	15	20 [1/5]	0 [0/5]	–	–
	30	40 [2/5]	20 [1/5]	60 [3/5]	40 [2/5]
	44	60 [3/5]	60 [3/5]	–	–
	59	–	–	40 [2/5]	40 [2/5]
	85	–	–	60 [3/5]	60 [3/5]
25	15	100 [5/5]	20 [1/5]	–	–
	30	80 [4/5]	80 [4/5]	100 [5/5]	80 [4/5]
	44	100 [4/4]	80 [4/5]	–	–
	59	–	–	100 [5/5]	100 [5/5]
	85	–	–	100 [4/4]	100 [4/4]

DD = Denileukin diftitox, – = データ無し。
a: 中等度（125 倍希釈）以上の抗体価を持つ動物の頻度。
b: 抗体による中和作用が中等度（≥0.1 NU/mL）以上を示す動物の頻度。
出典：添付資料 4.2.3.2.3 ([redacted]164)。

2.6.6.3.4 マウスにおける 4 週間反復投与毒性試験（添付資料 4.2.3.2.4，報告書番号：[redacted]014［参考］）

雌 ICR マウス（各群 10 例）に E7272 を 0（媒体：リン酸緩衝生理食塩水），8 又は 34 μg/kg/日の用量で 4 週間静脈内投与し，投与期間終了後に剖検した。全例について死亡の有無，一般状態観察，体重，臨床検査（血液生化学的検査），肉眼所見及び病理組織学的検査を行った。

血液生化学的検査で 34 μg/kg/日群の 1 例において ALT，AST の上昇がみられた以外に特筆すべき毒性変化はみられず，E7272 を 34 μg/kg/日で 4 週間静脈内投与しても，マウスには毒性は認められなかった。

2.6.6.3.5 ラットにおける 2 週あるいは 4 週間間歇反復投与毒性試験（添付資料 4.2.3.2.5，報告書番号：[redacted]163［参考］）

雌 SD ラット（35～40 例/群）に E7272 の 10 又は 25 μg/kg/日を 5 日間/週（1 週間で 5 日間投与，2 日間休薬）を 1 サイクルとして 2 又は 4 週間静脈内投与した。2 週間投与群には投与期間終了後，2 及び 4 週間休薬後に剖検する群を，4 週間投与群には投与期間終了後，4 及び 8 週間休薬後に剖検する群を設定した。対照群（5 例）には，生理食塩液を 5 日間/週で 4 週間静脈内投与し，29 日目に剖検した。投与期間中及び投与終了後における死亡の有無，一般状態観察，体重，血液生化学的検査，肝チトクローム P450（CYP）活性（CYP 量及びエリスロマイシン N-脱メチル化活性），トキシコキネティクス（ELISA 及び IL-2R を発現するヒト C91/PL 細胞による生物活性），免疫原性（投与期間終了後及び休薬後の抗 DD 抗体量及びその中和活性），肉眼及び病理組織学的検査（肝，腎，脾，肺，脳［皮質］）を実施した。

25 μg/kg/日群では 22～37 日目の間に 4 例死亡，13 例が瀕死となったため安楽殺し，10 μg/kg/日群では 23～24 日目の間に 1 例死亡，2 例が瀕死となったため安楽殺した。10 μg/kg/日群では 2 週間以降の投与期間中，25 μg/kg/日群では投与期間を通して用量依存的な体重の増加抑制がみられ，被毛の汚れ，衰弱，削痩及び活動性低下が認められたが，これらの変化は休薬期間中に回復傾向がみられた。血液生化学的検査の結果，投与終了時は 10 及び 25 μg/kg/日群ともに電解質の異常，A/G 比の低下，ALT 及び LDH の増加が認められ，25 μg/kg/日群ではさらに AST 及び BUN の増加が認められた。休薬期間後にも 10 及び 25 μg/kg/日群では，電解質の異常，γ-GT，及び LDH の増加等が認められた。E7272 投与群の投与終了後及び休薬期間後の肉眼検査では，肺，肝及び脾に変化がみられ，その頻度は投与量及び投与期間依存的に増加した。病理組織検査の結果，投与終了時までに剖検した動物では，10 及び 25 μg/kg/日群で肺の慢性炎症，投与期間終了後，10 及び 25 μg/kg/日群では脾のリンパ球過形成が，さらに 25 μg/kg/日群では腎の好塩基性尿細管及び肝の多巣性単核細胞浸潤が認められた。また，休薬後，脾及び肝の変化は軽減傾向がみられたが，肺及び腎の変化は回復期期間後も観察された。なお，4 週間投与後，10 μg/kg/日群の 1 例及び 25 μg/kg/日群で肝 CYP 量の減少，10 及び 25 μg/kg/日群でエリスロマイシン N-脱メチル化活性の誘導がみられた。

表 2.6.6-4 雌ラット間歇反復投与における TK パラメータ

投与量 (μg/kg/日)	投与日	C_{5min} (ELISA) (ng/mL)	C_{5min} (Bioassay [c]) (U/mL)
10	1	232.926	28122
	12 [a]	155.383	13640
	26 [b]	185.229	14113
25	1	579.129	70646
	12 [a]	542.201	76499
	26 [b]	436.456	79855

C_{5min} は各 5 例の平均値，ELISA =酵素免疫測定法，IL-2R = インターロイキン-2 受容体。
a: 2 週間投与群。
b: 4 週間投与群。
c: IL-2R を発現するヒト C91/PL 細胞による生物活性。
出典：添付資料 4.2.3.2.5 （[redacted]163）。

表 2.6.6-5 雌ラット間歇反復投与における免疫原性

投与量 (μg/kg/日)	投与日	2 週間投与群 (% [頻度])		4 週間投与群 (% [頻度])	
		抗 DD 抗体 [a]	中和抗体 [b]	抗 DD 抗体 [a]	中和抗体 [b]
10	15	0 [0/5]	0 [0/5]	–	–
	30	0 [0/5]	0 [0/5]	20 [1/5]	0 [0/5]
	44	0 [0/5]	0 [0/5]	–	–
	59	–	–	0 [0/5]	20 [0/5]
	85	–	–	0 [0/5]	0 [0/5]
25	15	0 [0/5]	0 [0/5]	–	–
	30	0 [0/5]	0 [0/5]	40 [2/5]	20 [1/5]
	44	75 [3/4]	75 [3/4]	–	–
	59	–	–	40 [2/5]	60 [3/5]
	85	–	–	60 [3/5]	60 [3/5]

DD = Denileukin diftitox,，– = データ無し。
a: 中等度（125 倍希釈）以上の抗体価を持つ動物の頻度。
b: 抗体による中和作用が中等度（≥0.1 NU/mL）以上を示す動物の頻度。
出典：添付資料 4.2.3.2.5 （[redacted]163）。

2.6.6.3.6 ラットにおける 10 日間反復投与毒性試験（添付資料 4.2.3.2.6，報告書番号：[redacted]002 [参考]）

SD ラット（各群雌雄各 10～15 例）に E7272 の 30，75 又は 90 μg/kg/日を 1 日 1 回 10 日間静脈内投与した。対照群には媒体（生理食塩液）を投与した。投与開始後 11 日目に剖検し，血液生

化学的検査並びに肝，腎の病理組織学的検査を行った。トキシコキネティクスは 25 又は 75 μg/kg/日の単回投与で評価した。

75 又は 90 μg/kg/日を投与した動物は 7～9 日目に状態が悪化し，体重減少，ALT/AST の上昇，肝及び腎の病理組織学的変化が認められた。30 μg/kg/日では一般症状及び血液生化学的検査で変化は無かったが，病理組織学的検査において，軽度の腎尿細管の壊死及び再生が見られ，体重の増加抑制も見られた。体重への影響は雌の方が強かったが，毒性の性差があるとは考えられなかった。トキシコキネティクスのパラメータ及びクリアランスにおいても雌雄差は認められなかった。

表 2.6.6-6 ラット投与初日における TK パラメータ

投与量 [a] (μg/kg/日)	投与日	雄		雌	
		C_{max}	AUC	C_{max}	AUC
ELISA		(ng/mL)	(ng·min/mL)	(ng/mL)	(ng·min/mL)
25	1	591 [b]	32936 [b]	526 [c]	19405 [c]
25（覚醒下）		–	–	564 [b]	12814 [b]
75		2450	119124	2221	84322
Bioassay [d]		(U/mL)	(U·min/mL)	(U/mL)	(U·min/mL)
25	1	64410 [b]	2940675 [b]	78052 [e]	2313144 [e]
25（覚醒下）		–	–	71239 [f]	1587672 [f]
75		276525	11530458	220038	8473450

ELISA =酵素免疫測定法，IL-2R = インターロイキン-2 受容体，– = データ無し。
C_{max} 並びに AUC の測定は各 5 例，6 例（雌 25 μg/kg/日，覚醒下採血）又は 10 例（雌 25 μg/kg/日，麻酔下採血）の動物を用いた。
a: カテーテルを埋設した雌雄ラット（雌雄各 5 例/群）にウレタン麻酔下で 25 又は 75 μg/kg/日を単回投与し，トキシコキネティクス測定を行った。さらにカテーテルを埋設した雌ラット 5 例は覚醒下で採血し，トキシコキネティクス測定を行った。
b: N=4（1 例は測定値が低い，又は測定できたポイント数が少なかったため，評価できなかった）
c: N=6（4 例はは測定値が低い，又は測定できたポイント数が少なかったため，評価できなかった）
d: IL-2R を発現するヒト C91/PL 細胞による生物活性。
e: N=7（3 例は測定値が低く，評価できなかった）
f: N=5（1 例は測定値が低く，評価できなかった）
出典：添付資料 4.2.3.2.6 ([redacted}002)。

2.6.6.3.7 ラットにおける 6 週間間歇反復投与毒性試験（添付資料 4.2.3.2.7，報告書番号：[redacted]059［参考］）

SD ラット（メイン群雌雄各 15 例，トキシコキネティクス・免疫原性測定群雌雄各 37 例）に E7272 を 0（対照群），2，10 又は 40 μg/kg/日で 3 サイクル（各サイクルは 5 日間の投与期間と 9 日間の休薬期間）静脈内投与した。

対照群には 1 mL/kg の媒体（生理食塩液）を投与した。10 例/性/群は第 3 サイクルの投与期間終了後，5 例/性/群は第 3 サイクルの休薬期間後に剖検した。

投与期間中及び投与終了後，死亡の有無，一般状態観察，体重，摂餌量，臨床検査（各サイクルの投与期間後及び第 3 サイクルの休薬期間後の血液及び血液生化学的検査と第 3 サイクルの投与期間終了後及び休薬期間後の血液凝固能検査），尿検査，トキシコキネティクス・免疫原性測定（第 1 及び第 3 サイクルの初回投与時），酵素誘導（第 3 サイクル投与期間終了後），臓器重量，剖検所見，病理組織学的検査，及び雄の精子検査を実施した。

全ての用量で投与物質に関連した死亡はみられなかった。臨床症状として，10 及び 40 μg/kg/日群では耳介の肥厚及び発赤，2 及び 40 μg/kg/日群では色素性鼻汁，40 μg/kg/日群では紅涙及び活動性の低下がみられた。40 μg/kg/日群の雌雄及び 10 μg/kg/日群の雌では，体重及び体重増加の減少がみられ，40 μg/kg/日群では摂餌量の減少も伴っていた。40 μg/kg/日群では，第 1 及び 2 サイクルの投与期間終了後に白血球及びリンパ球減少並びに好中球の減少が雌雄でみられ，第 3 サイクルの投与及び休薬期間終了後に白血球及びリンパ球の増加が雄でみられた。全サイクルの投与期間終了後，40 μg/kg/日群の雌雄及び 10 μg/kg/日群の雄では，軽度の ALT 及び AST の増加が認められた。第 3 サイクルの投与期間終了後，40 μg/kg/日群の雌雄で肝，腎及び脾の相対重量の増加，10 μg/kg/日群の雄で肝の相対重量の増加が，10 及び 40 μg/kg/日群の雄で副腎重量の減少が認められた。第 3 サイクルの休薬期間終了後，40 μg/kg/日群で副腎重量の減少が引き続き認められた。第 3 サイクルの投与期間終了後の病理組織検査では，全ての投与群で，腎，肝，肺，脾，精巣上体及び前立腺を含む多数の臓器における血管周囲のリンパ球浸潤が用量依存的に認められた。また，全ての投与群で副腎皮質の空胞増加も用量依存的にみられた。投与部位の軽度な変化が全投与群で認められたが，投与群では病変の程度及び頻度が軽度に増加していた。第 3 サイクルの休薬期間終了後，これらのリンパ球浸潤と副腎皮質の空胞化は軽減しており，投与部位の変化は対照群を含む全ての群で同等であった。

尿検査，精子濃度，精子運動能，精子断片化，肝 CYP 量に影響はみられなかった。第 1 サイクルの初回投与後，血清中 DD の濃度には性差はみられず，用量相関的に増加した。第 3 サイクルの初回投与後の DD の血清中濃度は第 1 サイクル初回投与後と比較して減少しており，この減少は雌より雄で顕著で，DD 抗体量と良く相関していた。

本試験から NOAEL は定まらなかった。

本試験における TK パラメータ及び抗体価を，それぞれ表 2.6.6-7 及び表 2.6.6-8 に示した。

表 2.6.6-7 ラット 6 週間間歇反復投与における TK パラメータ

投与量 (μg/kg/日)	投与日 [a]	雄		雌	
		C_{max} (ng/mL)	$AUC_{(0-t)}$ [b] (ng·h/mL)	C_{max} (ng/mL)	$AUC_{(0-t)}$ [b] (ng·h/mL)
2	1	29.89	25.71	29.87	16.41
10		103.2	107.5 [b]	104.3	92.38
40		676.8	416.9	519.8	477.7
2	29	37.28	18.43	20.47	11.14 [c]
10		20.99	15.10 [b]	129.2	42.98
40		233.3	49.08 [b]	645.6	207.5

測定は ELISA （酵素免疫測定法）で行った。
C_{max} は各 3 例の平均値，AUC は各時点 3 例の平均値から計算した。
a: 最終報告書では投与初日を雄は 0 日目，雌は 2 日目としているため，見かけ上の日付が異なる。
b: AUC の計算のため，0.08～0.25 時間までの値から 0 時間の値を計算し外挿した。
c: $AUC_{(0.08-t)}$，0 時間の値が計算できなかったため，0.08 時間を初期値とした。
出典：添付資料 4.2.3.2.7 ([redacted]059)。

表 2.6.6-8 ラット 6 週間間歇反復投与における抗 DD 抗体産生頻度

投与量 (μg/kg/日)	投与日 [a]	雄 (% [頻度 [b]])	雌 (% [頻度 [b]])
2	–1	0 [0/37]	0 [0/37]
	14	0 [0/37]	0 [0/37]
	28	67 [24/36]	59 [22/37]
10	–1	0 [0/37]	0 [0/37]
	14	19 [7/37]	0 [0/37]
	28	95 [35/37]	84 [31/37]
40	–1	0 [0/37]	3 [1/37]
	14	30 [11/37]	8 [3/37]
	28	100 [37/37]	97 [36/37]

DD = Denileukin diftitox。
a: 最終報告書では投与初日を 0 日目としているため，見かけ上の日付が 1 日異なる（–1 日目のみ最終報告書の表記と一致）。
b: 中等度（125 倍希釈）以上の抗体価を持つ動物の数/抗体価を測定した動物の数。
出典：添付資料 4.2.3.2.7 ([redacted]059)。

2.6.6.3.8 ラットにおける 6 週間間歇反復投与毒性試験（添付資料 4.2.3.2.8，E7777 投与，試験番号: 1010-0351［評価］）

SD ラット（各群雌雄各 15 例）に本薬を 0（対照群），2，10 又は 40 μg/kg/日で 3 サイクル（各

サイクルは 5 日間の投与期間と 9 日間の休薬期間）静脈内投与した。比較のため，E7272 の 40 μg/kg/日投与群も設定した。対照群には 1 mL/kg の媒体（生理食塩液）を投与した。ラットは，投与終了後（34 日目）あるいは第 3 サイクル完了の 43 日目に剖検した。投与期間中及び投与終了後，死亡の有無，一般状態観察，体重，摂餌量，臨床検査（6，20，34 及び 43 日目の血液及び血液生化学的検査，34 及び 43 日目の血液凝固検査），免疫原性（投与前，14 及び 28 日目の被験物質に対する抗体産生），臓器重量，剖検所見，病理組織学的検査を実施した。なお，本試験と並行して実施した 3 連続サイクル静脈内投与による薬物動態試験（試験番号：DMPKAP20[redacted]-063）の結果，E7777 の生物活性は E7272 の生物活性の約 2 倍であることが明らかになっていることから，同じ投与量で比較すると E7777 の投与量はやや過剰であったと考えられた。この薬物動態試験の結果は表 2.6.6-9 に示した。

本薬の 40 μg/kg/日群では，25～39 日目の間に，2 例（雄）が死亡し，6 例（雄 3 例，雌 3 例）が瀕死となったため安楽殺した。

本薬による急性毒性として，1 サイクル期間中に死亡や瀕死等はみられず，この期間に認められた所見は，2 μg/kg/日以上でポルフィリンによる被毛の汚れ，10 μg/kg/日で不安定な呼吸，10 μg/kg/日以上で自発運動の低下及び体重増加抑制，40 μg/kg/日で摂餌量の減少であった。

本薬の 40 μg/kg/日群では，摂餌量及び体重の減少（第 3 サイクル終了時に対照群と比べて，体重が雄で–43%，雌で–28%）がみられた。症状として，被毛の汚れ，便性状及び排便量の変化，活動性の低下，円背位，触知時冷感などがみられた。これらの症状の一部は 9 日間の休薬期間中にもみられた。血液及び血液生化学的検査では，好中球の増加，リンパ球の減少，ALT，AST，ALP，γ-GT，BUN 及びクレアチニンなどの肝及び腎機能パラメータの変動並びにアルブミン及びコレステロールの減少がみられた。血液検査では，赤血球数，ヘモグロビン濃度，ヘマトクリット値及び平均赤血球容積の減少，血小板数の増加並びに PT 及び APTT の延長がみられた。これら臨床検査値の変動は 9 日間の休薬期間中に回復する可逆的な変化であった。臓器重量では，副腎，下垂体，肺及び脾の相対重量の変動がみられた。剖検所見としては，リンパ節及び脾の肥大，腎，肝，ハーダー腺，甲状腺，消化管，肺及び副腎を含む多臓器の色調の変化，及び雄生殖器の小型化がみられた。これらの変化は，組織におけるリンパ球・好酸球の浸潤及び副腎皮質の空胞化に関連するものと思われた。病理組織所見のうち，皮膚のびらん及び肺の慢性炎症は休薬期間後もみられた。

本薬の 2 及び 10 μg/kg/日群では，被毛の汚れ，摂餌量及び体重増加の減少，並びにリンパ球の減少，種々の臓器・組織におけるリンパ球及び好酸球浸潤が用量に相関して観察された。10 μg/kg/日群では，網状赤血球，AST，ALT 及び γ-GT の軽度増加などの変化がみられた。これらの変化は 9 日間の休薬期間中に回復した。

E7272 の 40 μg/kg/日投与群では，本薬投与群と同様の毒性所見がみられたが，それらの程度は軽く，死亡及び瀕死例もなかった。これらは本薬と E7272 の生物活性の違いを反映した，予期された結果であった。

2 サイクル終了後に免疫原性を確認したところ，本薬の 2，10，40 μg/kg，E7272 の 40 μg/kg/日でそれぞれ 83%，23%，7%及び 53%で免疫原性がみられた。

以上，本薬を 2，10 又は 40 μg/kg/日で SD ラットに 3 連続サイクル静脈内投与し，比較のため E7272 の 40 μg/kg/日群も設定した。その結果，本薬の高用量群では死亡が発現した。みられた毒

性所見は，体重増加量及び摂餌量の減少，リンパ球の減少，好中球の増加，肝及び腎機能パラメータの変動，各種臓器へのリンパ球及び好酸球の細胞浸潤，並びに副腎皮質の空胞化であった。これらの変化の頻度及び程度は投与量に相関していた。また，これらの毒性は可逆的であった。

E7272 は本薬より生物活性が低く（約 1/2），死亡並びに瀕死例はみられなかったものの，体重増加量，摂餌量並びに臨床検査で本薬と類似の影響がみられ，各種臓器へのリンパ球及び好酸球浸潤もみられた。これらはいずれも E7272 で既に報告された変化と同じであった。また，2 サイクル投与後に本薬群及び E7272 群のいずれにおいても免疫原性がみられた。

本薬及び E7272 の毒性は質的に同じであり，量的な違いは両化合物の生物活性の違いに基づくものと思われた。

なお，TK の測定は同じ条件で高用量（40.53 μg/kg/日）のみを用いた別試験として実施した。TK パラメータを表 2.6.6-9 に示した。

表 2.6.6-9　ラット 3 連続サイクル静脈内投与における TK パラメータ（試験番号：DMPKAP20[redacted]-063）

投与量 (μg/kg/日)	投与日	雄		雌	
		C_0 (ng/mL)	$AUC_{(0\text{-inf})}$ (ng·h/mL)	C_0 (ng/mL)	$AUC_{(0\text{-inf})}$ (ng·h/mL)
ELISA					
E7777 40.53	1[a]	1165	852	1248	716
	5[a]	1189	806	946	645[c]
	29[b]	2079	731	1421[c]	648[c]
E7272 40.53	1[a]	771	760	1156	761
	5[a]	568	662[c]	981	850[c]
	29[d]	1130	640	1151	501
Bioassay					
E7777 40.53	1[a]	1463	687	1357	516
	5[a]	1568	632	1079	622
	29	1527[e]	665[e]	810[d]	315[d]
E7272 40.53	1[a]	587	253	875	297
	5	477[d]	375[d]	774[c]	359[c]
	29	678[d]	233[d]	354[b]	200[b]

ELISA =酵素免疫測定法。
a:　n=7。
b:　n=2。
c:　n=6。
d:　n=5。
e:　n=3。
出典：添付資料 4.2.2.2.3（DMPKAP20[redacted]-063）。

表 2.6.6-10 ラット 6 週間間歇反復投与における抗 DD 抗体産生頻度

投与量 (μg/kg/日)	投与日	雄 (% [頻度])	雌 (% [頻度])
0 (媒体)	–1	0 [0/15]	0 [0/15]
	14	0 [0/15]	0 [0/15]
	28	0 [0/15]	0 [0/15]
E7777 2	–1	0 [0/15]	0 [0/15]
	14	0 [0/15]	0 [0/15]
	28	87 [13/15]	80 [12/15]
E7777 10	–1	0 [0/15]	0 [0/15]
	14	0 [0/15]	0 [0/15]
	28	27 [4/15]	20 [3/15]
E7777 40	–1	0 [0/14]	0 [0/15]
	14	0 [0/15]	0 [0/15]
	28	7 [1/14]	7 [1/15]
	32-39[a]/31-38[b]	67 [2/3]	33 [1/3]
E7272 40	–1	0 [0/15]	0 [0/15]
	14	0 [0/15]	0 [0/15]
	28	60 [9/15]	47 [7/15]

DD = Denileukin diftitox。
a: 雄は 32，37，39 日目に採血して測定した。
b: 雌は 31，37，38 日目に採血して測定した。
出典：添付資料 4.2.3.2.8（1010-0351）。

2.6.6.3.9 ラットにおける 14 週間間歇反復投与毒性試験（添付資料 4.2.3.2.9，E7777 投与，試験番号: B[redacted]0280［評価］）

SD ラット（各群雌雄各 10 例）に本薬を 0（対照群），2，10 又は 20 μg/kg/日で 7 サイクル（各サイクルは 5 日間の投与期間と 9 日間の休薬期間）静脈内投与した。対照群には 1 mL/kg の媒体（生理食塩液）を投与した。ラットは，第 7 サイクル完了後（投与開始から 98 日目）に剖検した。投与期間中及び投与終了後，死亡の有無，一般状態観察，体重，摂餌量，眼科学的検査，臨床検査（35，91 及び 98 日目の血液及び血液生化学的検査，98 日目の血液凝固能検査），尿検査，トキシコキネティクス，免疫原性（被験物質に対する抗体産生，主試験群：投与前，42 及び 98 日目，トキシコキネティクス群：投与前，28 及び 84/85 日目），臓器重量，剖検所見，病理組織学的検査を実施した。

尿検査，血液生化学的検査及び眼科学的検査において毒性学的に有意な変化はみられなかった。

本薬による急性毒性として，1 サイクル期間中に死亡や瀕死等はみられず，この期間に認めら

れた所見は，10 μg/kg/日以上で体重増加抑制及び摂餌量の減少であった。

本薬の 20 μg/kg/日群では，62～63 日目の間に 2 例（雄，主群及び TK 群 1 例ずつ）が瀕死となったため安楽殺した。これらの動物は，投与期間中に活動性の低下，軟便，安楽殺前には，体重あるいは摂餌の減少を伴って削痩が見られた。この主群の雄は，35 及び 63 日目（瀕死による安楽殺直前）に白血球パラメータの増加が見られた。病理組織学的検査では，最終剖検群と同様，全身多臓器における炎症細胞浸潤，さらにその実質への影響が示唆され，これらが死因と考えられた。

生存動物では，摂餌減少を伴う体重減少（対照群と比し，雄で最大–18%，雌で–8%）がみられた。最も影響の大きかった動物では，91 及び 98 日目に白血球パラメータの増加並びに血小板数の増加（対照群と比し，2～21 倍）が見られた。

薬物性の変化として様々な組織におけるリンパ球又は好酸球の浸潤がみられた。その二次的変化として，一般症状観察で歯の白色化として見られた切歯の乳頭層の萎縮，腎尿細管の再生，精巣重量低下（対照群と比し，–61%）を伴う精細管萎縮，精巣上体の上皮細胞の単細胞壊死及び精巣上体管萎縮，前立腺腺房萎縮，精嚢及び凝固腺における分泌物の減少，骨髄（大腿骨及び胸骨）における造血細胞（顆粒球細胞）の増加などが見られた。18 日目から見られた耳介の浮腫は，動物識別のための耳パンチにより細胞浸潤が悪化し，その結果耳介軟骨症となったと考えられた。副腎においては，皮質の束状帯細胞の空胞化が観察された。

10 μg/kg/日においては，雌雄で 18 日目から耳介浮腫，雌で 33～61 日に歯の白色化が認められた。実験期間中には摂餌の低下（5～28 日目）並びに体重の低値（対照群と比して，–11%）も認められた。病理組織学的変化は，臼歯，甲状腺及び耳介にのみ認められた。

2 μg/kg/日では，臼歯の歯肉でわずかな細胞浸潤が 1 例の雄でのみ見られた。

投与初日は，C_0（0 時間に外挿した濃度）と $AUC_{(0\text{-}5h)}$（投与時から投与 5 時間後までの血漿中濃度–時間曲線下面積）は，用量依存的に増加した。10 及び 20 μg/kg/日においては，血清中濃度は 29 及び 85 日目に減少し，その原因は抗 DD 抗体によると考えられた。一部の動物では，29 及び 85 日目には本薬が全ての採血時点で血清中に検出されなかった。2 μg/kg/日では，85 日目には本薬が検出されない動物も見られたが，C_0 と $AUC_{(0\text{-}5h)}$の平均値では顕著な変化はみられなかった。性差はみられなかった。

表 2.6.6-11 ラット 14 週間間歇反復投与における TK パラメータ

投与量 (μg/kg/日)	投与日	雄		雌	
		C_0 (ng/mL)	$AUC_{(0\text{-}5h)}$ (ng·h/mL)	C_0 (ng/mL)	$AUC_{(0\text{-}5h)}$ (ng·h/mL)
2	1	34.3	14.1	34.5	13.3
	29	41.1	21.7	37.7	14.4
	85	47.4	27.9	52.8	22.9
10	1	224	161	286	164
	29	158	84.9	159	66.3
	85	NC	NC	NC	NC

20	1	551	392	579	310
	29	202	57.4	218	94.7
	85	NC	NC	NC	NC

測定は ELISA（酵素免疫測定法）で行った。NC = not calculated。
C_0 及び $AUC_{(0\text{-}5h)}$は 7 例の平均値から求めた。
出典：添付資料 4.2.3.2.9（B[redacted]0280）。

抗 DD 抗体は 28 日目から全投与群で認められた。2 μg/kg/日では，TK 群の雄 71%，雌 57%で抗 DD 抗体が認められた。10 及び 20 μg/kg/日では，28 日目以降大多数の動物で抗 DD 抗体が認められた。

表 2.6.6-12 ラット 14 週間間歇反復投与における抗 DD 抗体産生頻度

投与量 (μg/kg/日)	投与日	雄 (% [頻度])	雌 (% [頻度])
2	1	0 [0/17]	0 [0/17]
	28	29 [2/7]	14 [1/7]
	42	50 [5/10]	20 [2/10]
	84/85	71 [5/7]	57 [4/7]
	98	50 [5/10]	40 [4/10]
10	1	0 [0/17]	0 [0/17]
	28	100 [7/7]	71 [5/7]
	42	100 [10/10]	100 [10/10]
	84/85	100 [7/7]	100 [7/7]
	98	100 [10/10]	100 [10/10]
20	1	0 [0/17]	0 [0/17]
	28	100 [7/7]	86 [6/7]
	42	90 [9/10]	100 [10/10]
	84/85	83 [5/6] [a]	100 [10/10] [a]
	98	89 [8/9]	100 [10/10]

DD = Denileukin diftitox。
主群は投与 1, 42, 98 日目に採血し，TK 群は 1，28，84/85 日目に採血して測定した。
a: 雌雄各 1 例（動物番号 20406 及び 60407）は，85 日目に採血した。
出典：添付資料 4.2.3.2.9（B[redacted]0280）。

本試験における変化は，先に実施した 6 週間間歇投与（同じ 3 サイクル投与試験）で見られた変化，すなわち摂餌及び体重の減少，白血球及び血小板数の増加，様々な臓器へのリンパ球・好中球の浸潤などと同様であった。歯並びに耳介の変化は先の試験ではみられなかったが，いずれも薬理作用が関連する細胞浸潤から想定される変化であった。薬剤性の毒性は長期

投与で悪化せず，むしろ多くの動物では先の試験より，7 サイクル投与終了時点で軽減していた。これは抗 DD 抗体形成が関係すると考えられた。

2.6.6.3.10 カニクイザルにおける 14 日間反復投与毒性試験（添付資料 4.2.3.2.10，報告書番号：[redacted]067［参考］）

カニクイザルに E7272 の 31 μg/kg/日を 14 日間静脈内反復投与（雌雄各 3 例）し，その後 14 日間観察し，毒性を評価した。また，初回投与後の血中クリアランスも評価した。なお，本試験では比較のため関連化合物の投与群も設定しているが，その結果は記載していない。

検査項目として，死亡の有無，一般状態，体重，詳細検査（呼吸数測定を含む詳細観察，直腸温，心拍数），眼科学的検査，血液学的検査，血液生化学的検査，トキシコキネティクス測定（抗体量の測定を含む）を実施した。早期剖検した E7272 投与群の雌 1 例については，肉眼的観察と病理組織学的検査も実施した。

E7272 投与群では，29 日目に雌 1 例が昏睡状態を示し，早期剖検された。当該動物では，結腸及び直腸粘膜においては細菌巣を伴う炎症性変化が認められ，感染の可能性が示唆された。リンパ節におけるリンパ球減少，肝及び胆嚢における急性炎症がみられ，肝では炎症に付随して髄外造血，胆管上皮の肥大及び微小膿瘍が認められた。重篤な貧血も認められ，骨髄では赤血球系骨髄細胞及び幼若巨核球の増加が認められた。一般状態観察では，早期剖検動物を含むほぼ全例で，投与部位に中等度の紫斑があったが，17 日目までに回復した。また，試験期間中，ほぼ全例で試験期間を通して粘膜が蒼白であったほか，軽度の脱水が認められた。体重は，投与期間中に減少（–8.7%～–24.7%）したが，その後，一部の動物では 29 日目までに回復した。血液学的検査では，15 日目に白血球とリンパ球の減少，単球の増加が認められたが，29 日目までに回復した。血液生化学的検査では，15 日目に肝への影響を示唆する AST と ALT の増加とアルブミンの軽度の減少があった。また，腎毒性を示唆するクレアチニンの中等度の増加も全例でみられた。これらの変化は 29 日目の検査までに回復傾向を示した。詳細検査（詳細観察，直腸温，心拍数）及び眼科学的検査では，被験物質に関連した変化は認められなかった。E7272 の血中クリアランスに明らかな雌雄差は認められず，個体差も少なかった。

表 2.6.6-13 サル単回投与における TK パラメータ

投与量 (μg/kg/日)	投与日	雄		雌	
		C_0 (U/mL)	$t_{½}$ (min)	C_0 (U/mL)	$t_{½}$ (min)
Bioassay					
31	1	119033	43.0	70367	32.4

C_0 及び $t_{½}$ は各時点 3 例の平均値。
出典：添付資料 4.2.3.2.10（[redacted]067）。

表 2.6.6-14　サル 14 日間反復投与における抗薬物抗体産生頻度

投与量 (μg/kg/日)	投与日	雄 (% [頻度])	雌 (% [頻度])
抗 DD 抗体 [b]			
31	–21	0 [0/3]	0 [0/3]
	29 [a]	100 [3/3]	33 [1/3]
抗ジフテリア毒素抗体 [b]			
31	–21	0 [0/3]	0 [0/3]
	29 [a]	100 [3/3]	33 [1/3]
抗 IL-2 抗体 [b]			
31	–21	0 [0/3]	0 [0/3]
	29 [a]	0 [0/3]	0 [0/3]
抗 DD 中和抗体 [b]			
31	–21	0 [0/3]	0 [0/3]
	29 [a]	0 [0/3]	0 [0/3]

DD = Denileukin diftitox, IL-2 = インターロイキン-2。
a:　14 日間投与後 15 日目。
b:　抗 DD 抗体，抗ジフテリア毒素抗体，抗 IL-2 抗体は，抗体価 2（25 倍希釈）以下の動物は投与前に散見されるため，抗体価 3（125 倍希釈）以上を陽性とした。抗 DD 中和抗体は，0.25 NU/mL 以上の動物を陽性とした。
出典：添付資料 4.2.3.2.10（[redacted]067）。

2.6.6.3.11 カニクイザルにおける 2 週あるいは 4 週間反復投与及び 6 週間間歇反復投与毒性試験（添付資料 4.2.3.2.11，報告書番号：[redacted]107［参考］）

カニクイザルに E7272 を 2.5，10 又は 25 μg/kg/日（3 例/性/群，ただし 25 μg/kg 群のみ雄 7 例，雌 9 例）を 0.167 mL/kg の投与容量で急速静脈内投与した。2.5 及び 10 μg/kg/日群は全例 30 日間投与を行い，31 日目に剖検した。25 μg/kg/日群は，29 日間投与を行い 29 日目に剖検する 29 日間連投群（雌雄各 3 例），15 日間投与し 16 日目に剖検する 15 日間連投群（雌雄各 2 例），15 日間投与後に 14 日間休薬し，再び 15 日間投与し 45 日目に剖検する分割投与群（雄 2 例，雌 4 例）に分けて設定した。対照群は E7272 投与群と同容量の生理食塩液を 30 日間静脈内投与し 31 日目に剖検する 30 日間連投群（雌雄各 1 例）若しくは 44 日間投与し投与 45 日目に剖検する 44 日間連投群（雌雄各 2 例）を設定した。検査項目として，死亡の有無，一般状態（摂餌変化含む），麻酔下での身体検査（週一回の体表観察，心肺聴診及び腹部触診），体重，血液学的検査，血液生化学的検査，心電図及び眼科学的検査，抗薬物抗体量の測定，臓器重量測定，肉眼及び病理組織学的検査を実施した。なお，2.5 μg/kg/日群及び 25 μg/kg/日の 29 日間連投群の各一例は投与とは関連のない原因（それぞれ脾膿瘍からの敗血症，サイトメガロウイルス感染）で死亡したため，評価から除外した。また 10 μg/kg/日の雄 1 例は採血時に首輪がケージに引っかかる事故により死亡した。

心電図及び眼科学的検査では，投与による影響はみられなかった。

2.5 及び 10 μg/kg/日群では投与に起因した死亡若しくは瀕死例は認められなかった。

25 μg/kg/日群では 2 例（分割投与群で 11 及び 42 日目に各 1 例）が死亡した。さらに，状態悪化により 25 μg/kg/日の 15 日間連投群及び分割投与群で 15 日目及び 19 日目に各 1 例ずつ瀕死解剖した。

一般状態あるいは身体検査では，10 あるいは 25 μg/kg/日群で異常便（下痢／軟便），食欲不振，脱水，活動性の低下が用量依存的に，また削痩や脾・リンパ節の腫大が観察された。E7272 の全ての投与群で，用量依存的な体重減少及び摂餌量減少が観察された。25 μg/kg/日の分割投与群では，体重は 28 日目には増加に転じた。

血液学的検査では，全ての投与群において E7272 の薬理作用によると考えられるリンパ球減少がみられたが，25 μg/kg/日でも分割投与群で 21 日目あるいは 28 日目までに正常値に回復した。全ての 25 μg/kg/日群で網状赤血球の軽度増加を伴う赤血球数，ヘモグロビン及びヘマトクリット値の軽度の減少がみられた。

血液生化学的検査では，10 及び全ての 25 μg/kg/日群で，投与量に依存しない血清トランスアミナーゼ（ALT 及び AST），血清グロブリン，及び LDH の増加と，血清アルブミン及び総タンパクの減少がみられた。肝酵素の上昇は，病理組織学的変化でみられた肝細胞の空胞化，及び変性・壊死と相関していた。また全ての投与群で γ-GT とカルシウムの軽度の減少がみられた。

全ての 25 μg/kg/日群で脾重量の増加が認められ，赤脾髄における細胞浸潤及び血管内皮細胞の過形成と関連していると考えられた。また用量依存性に胸腺重量の減少がみられ，関連した変化として肉眼所見における胸腺小型，組織所見におけるリンパ球枯渇，並びに血液学的検査におけるリンパ球減少が認められた。

病理組織学的検査では，10 及び 25 μg/kg/日投与群において，脾，リンパ節，肝，腎，脳，副腎，胆嚢，甲状腺，心，肺，骨格筋を含む種々の臓器における単核細胞浸潤，好酸球の浸潤，及びまれに多核巨細胞もみられた。さらに，脾，胸腺及びリンパ節においてリンパ球の枯渇がみられた。肝では，肝細胞質の空胞化，変性・壊死，クッパー細胞の色素沈着及び肥大，及び血管炎がみられた。腎においては糸球体の細胞数増加（hypercellularity）もみられた。脾では，赤脾髄における血管内皮細胞の過形成が特徴的であった。また，動物の状態悪化などに伴う二次的な変化として精巣の精細管変性と骨髄の過形成も認められた。

以上，本試験では 25 μg/kg/日の 29 日間連投群において最も重篤な変化が認められ，それより投与期間の短い 15 日間投与群の変化は 29 日間連投群よりやや軽度であった。25 μg/kg/日分割投与群では，体重減少やリンパ球数の回復が投与開始 21 日目あるいは 28 日目までにみられた。全薬物投与群で，用量非依存性に血清中の抗 E7272 抗体及び抗 E7272 中和抗体が検出され，25 μg/kg/日分割投与群の投与期間後半における化合物の毒性軽減の原因と考えられた（2.6.6.9.1 参照）。

2.6.6.3.12 カニクイザルにおける 4 週間反復投与 TK 試験（添付資料 4.2.3.2.12，報告書番号：[redacted]117［参考］）

E7272 をカニクイザルに 30 日間急速静脈内投与した試験（試験番号[redacted]107）から得られた試料について，抗 DD 抗体，抗ヒト IL-2 抗体，抗 DD 中和抗体，及び DD 濃度について測定した。

抗 DD 抗体及び抗ヒト IL-2 抗体については，週 1 回（投与期間前，投与 7，14，19/21/22，28 日目， 44 日間連投対照群・E7272 分割投与群については加えて 35，44±1 日目）採血し，血清中の抗 DD 抗体及び抗ヒト IL-2 抗体価の測定を ELISA で，また抗 DD 中和抗体価を in vitro cell-based assay により測定した。

DD 血中濃度測定については，全群について 1，15，29（又は 30）日目の投与後 5，10，15，30，60，90，120 分後に採血し，44 日間連投対照群及び E7272 分割投与群については 44 日目にも同様の採血を行った。薬物投与群については血中 DD 濃度を in vitro cell-based assay 及び sandwich product ELISA により測定した。対照群については測定を実施しなかった。

投与開始時，抗 DD 抗体及び抗ヒト IL-2 抗体価は低値であった。E7272 連続投与 28 日目後，大多数の動物が中等度から高い抗 DD 抗体価，及び低い～高い（0.05～1.6 NU/mL 以上）抗 DD 中和抗体価を示した。一方で，ヒト IL-2 に対する抗体価は試験終了時においても低かった。ELISA による測定では投与用量による力価の違いはみられなかった。しかし，25 μg/kg/日分割投与群（1～15 日目及び 30～44 日目に投与）では抗体価が上昇し，他の連続投与群に比べ明らかに高い抗 E7272 抗体及び抗ヒト IL-2 抗体価を示しており，これらの抗体が投与後半における毒性の軽減に寄与している可能性が示唆された。

DD の血中濃度は in vitro cell-based assay 及び sandwich product ELISA でよく合致し，用量相関性が認められた。性差はみられず，連投による蓄積性もなかった。DD 血中濃度は，29 日目にはほとんどの動物で低値若しくは検出限界以下であった。

表 2.6.6-15 サル 2 週あるいは 4 週間反復投与及び 6 週間間歇反復投与における抗薬物抗体産生頻度

投与量 (μg/kg/日)	投与日	雄 (% [頻度])			雌 (% [頻度])		
		抗 DD 抗体 [a]	抗 IL-2 抗体 [a]	中和抗体 [a]	抗 DD 抗体 [a]	抗 IL-2 抗体 [a]	中和抗体 [a]
0	Pre	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]
	7	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]
	14	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]
	21/22	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/2]	0 [0/3]
	28/29	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]
	35	0 [0/2]	0 [0/2]	0 [0/2]	0 [0/2]	0 [0/2]	0 [0/2]
	43	0 [0/2]	0 [0/1]	0 [0/2]	0 [0/2]	0 [0/2]	0 [0/2]
2.5	Pre	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]
	7	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]
	14	33 [1/3]	0 [0/3]	0 [0/3]	33 [1/3]	0 [0/3]	0 [0/3]
	21/22	100 [2/2]	50 [1/2]	100 [2/2]	100 [3/3]	33 [1/3]	67 [2/3]
	28/29	100 [2/2]	50 [1/2]	100 [2/2]	100 [3/3]	67 [2/3]	100 [3/3]

表 2.6.6-16 サル 2 週あるいは 4 週間反復投与及び 6 週間間歇反復投与における抗薬物抗体産生頻度（続き）

投与量 (μg/kg/日)	投与日	雄 (% [頻度])			雌 (% [頻度])		
		抗 DD 抗体 [a]	抗 IL-2 抗体 [a]	中和抗体 [a]	抗 DD 抗体 [a]	抗 IL-2 抗体 [a]	中和抗体 [a]
10	Pre	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]
	7	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]
	14	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]	33 [1/3]	0 [0/3]	0 [0/3]
	21/22	100 [2/2]	0 [0/2]	0 [0/2]	100 [3/3]	0 [0/3]	0 [0/3]
	28/29	100 [2/2]	0 [0/2]	100 [2/2]	100 [3/3]	33 [1/3]	67 [2/3]
25	Pre	0 [0/7]	0 [0/7]	0 [0/7]	0 [0/9]	0 [0/9]	0 [0/9]
	7	0 [0/7]	0 [0/7]	0 [0/6]	0 [0/9]	0 [0/9]	0 [0/9]
	14	29 [2/7]	0 [0/7]	0 [0/7]	25 [2/8]	0 [0/8]	0 [0/8]
	19/21/22	100 [5/5]	20 [1/5]	20 [1/5]	67 [4/6]	0 [0/6]	0 [0/5]
	28/29	100 [5/5]	20 [1/5]	75 [3/4]	75 [3/4]	67 [2/3]	50 [2/4]
	35	100 [2/2]	50 [1/2]	50 [1/2]	100 [2/2]	0 [0/2]	0 [0/1]
	43	100 [2/2]	100 [2/2]	100 [1/1]	100 [1/1]	0 [0/1]	100 [1/1]

DD = Denileukin diftitox, IL-2 = インターロイキン-2。
a: 抗 DD 抗体と抗 IL-2 抗体は，抗体価 2 (25 倍希釈)以下の動物は，陰性対照群並びに投与前に散見されるため，抗体価 3（125 倍希釈）以上を陽性とした。抗 DD 中和抗体は，測定下限である 0.02NU/mL 以上の動物を陽性とした。
出典：添付資料 4.2.3.2.11 ([redacted]117)。

表 2.6.6-17 サル 4 週間反復投与における TK パラメータ

投与量 [a] (μg/kg/日)	投与日	雄		雌	
		C_{max} (ng/mL)	AUC (ng·min/mL)	C_{max} (ng/mL)	AUC (ng·min/mL)
ELISA					
2.5	1	51 [a]	2151 [a]	44 [b]	2434 [b]
	15	49 [a]	2004 [a]	41 [a]	1960 [a]
	29	57 [b]	691 [b]	27 [a]	679 [a]
10	1	259 [a]	13098 [a]	257 [a]	8257 [a]
	15	280 [b]	17991 [b]	196 [a]	14211 [a]
	29	270 [b]	3502 [b]	270 [b]	7501 [b]

表 2.6.6-18　サル 4 週間反復投与における TK パラメータ（続き）

投与量[a] (μg/kg/日)	投与日	雄		雌	
		C_{max} (ng/mL)	AUC (ng·min/mL)	C_{max} (ng/mL)	AUC (ng·min/mL)
ELISA					
25	1	381[c]	20812[c]	464[d]	23130[d]
	15	397[a]	32093[a]	415[c]	20021[c]
	29/30	206[b]	4906[b]	217[b]	8511[b]
	44	382[c]	5507[c]	443[c]	9153[c]
Bioassay					
		C_{max} (U/mL)	AUC (U·min/mL)	C_{max} (U/mL)	AUC (U·min/mL)
2.5	1	6918[a]	243286[a]	6165[b]	291719[b]
	15	3407[a]	173378[a]	2610[a]	184294[a]
10	1	24449[a]	1294700[a]	23106[b]	978078[b]
	15	16888[b]	1149960[b]	13020[a]	803796[a]
	29	–	–	22639[e]	403503[e]
25	1	39978[c]	2507075[c]	52957[f]	2707924[f]
	15	28705[g]	2210642[g]	57853[d]	2711695[d]
	29	2359[e]	122682[e]	–	–
	44	–	–	14642[e]	914024[e]

ELISA =酵素免疫測定法，– = no data。
a:　n=3。
b:　n=2。
c:　n=6。
d:　n=7。
e:　n=1。
f:　n=8。
g:　n=4。
出典：添付資料 4.2.3.2.12 （[redacted]117）。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

本化合物はタンパク質であり，ICH S6 に記載されているように遺伝毒性試験は必要とされない。しかしながら，E7272 を用いて細菌を用いた復帰突然変異試験並びに培養細胞を用いた染色体異常試験（いずれも GLP）を実施し，結果はいずれも陰性であった。

2.6.6.4.1 細菌を用いる復帰突然変異試験（添付資料 4.2.3.3.1.1，報告書番号[redacted]110［参考］）

E7272 の復帰突然変異試験では，ネズミチフス菌（TA100，TA1535，TA98，TA1537）及び大腸菌 WP2 *uvrA* を用いてプレート法により Ames 試験を実施した。復帰突然変異試験に先立ち，

TA100 を用いた用量設定試験を実施した。最大溶解濃度が 150 µg/mL であったため，15 µg/plate を最高用量とし，陰性対象及び E7272 の 5 用量（0.9375，1.875，3.75，7.5 及び 15 µg/plate）で代謝活性化（ラット肝ホモジネートの 9000×g 上清［S9］mix）の存在下及び非存在下で評価したが，細胞毒性並びに被験物質の沈殿はみられなかったため，用量設定試験と同じ用量で復帰突然変異試験を実施した。復帰突然変異試験は，それぞれの菌株で陰性及び陽性対照を設定し，代謝活性化の存在下及び非存在下で実施した。復帰変異コロニー数を数えて突然変異の評価を行うとともに，細胞毒性は，陰性対照と比較して，復帰変異コロニー数あるいは細菌のバックグラウンドローンの減少により評価した。

いずれの菌株についても復帰変異コロニー数の増加は S9 mix 非存在下及び存在下で認められなかった。

以上から，E7272 は，ネズミチフス菌の TA100，TA1535，TA98，TA1537 及び大腸菌 WP2 *uvrA* において，15 µg/plate の濃度まで S9 mix の有無にかかわらず，突然変異誘発作用を示さなかった。

2.6.6.4.2 チャイニーズハムスター卵巣由来細胞を用いた染色体異常試験（添付資料 4.2.3.3.1.2，報告書番号 [redacted]109［参考］）

E7272 の CHO 細胞を用いた染色体異常試験を実施した。E7272 は代謝活性化系（S9 mix）の存在下あるいは非存在下で 4 時間処理した。S9 mix 存在下の陽性対照にはシクロホスファミド，S9 mix 非存在下の陽性対照にはマイトマイシン C を用いた。陰性対照には培地（McCoy's 完全培地）を用いた。

用量設定試験において，150 µg/mL 以上では化合物が凝集を起こし活性が低下するため，150 µg/mL を 2 v/v %で培地に処理する 3 µg/mL を最高濃度として 0.001 µg/mL まで細胞毒性を評価したが，いずれの用量でも明確な細胞毒性は認められなかった。したがって，S9 mix 存在下，非存在下いずれも 1，2，及び 3 µg/mL の 3 用量で染色体異常の評価を行った。

その結果，S9 mix 存在下あるいは非存在下のいずれの処理条件下においても，染色体異常の有意な増加はみられなかった。

以上から，E7272 は，CHO 細胞を用いた染色体異常試験において，S9 mix 存在下及び非存在下で染色体異常誘発作用を示さなかった。

2.6.6.5 がん原性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

がん原性試験については，本剤の適応症が進行がん患者の治療を目的としたものであり，ICH S9 ガイドラインにも記載されているように，必要とされないことから，実施していない。

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

本剤の薬理作用として妊婦に対するリスクが明らかなため（2.6.6.9.1 参照），生殖発生毒性試験は実施していない。

2.6.6.7 局所刺激性試験

独立した局所刺激性試験は実施していないが，局所刺激性について，静脈内投与で実施した

反復投与毒性試験において評価した。投与部位において薬理作用を伴う炎症性変化が病理組織学的検査において認められる可能性があるが，いずれの毒性試験においても薬物性の重篤な局所刺激性は認められなかった。

2.6.6.8 光安全性試験

本薬及び E7272 の活性体である DD は組替え融合タンパク質であり，タンパク質の光吸収（280 nm）は光反応性を考慮すべき領域（290～700 nm）に入らないため，光毒性試験は実施していない。

2.6.6.9 その他の毒性試験（実施している場合）

2.6.6.9.1 免疫毒性試験（免疫機能の抑制作用，DD 免疫化の影響）

2.6.6.9.1.1 マウスにおける免疫毒性試験（添付資料 4.2.3.7.2.1，報告書番号：[redacted]020［参考］）

B6C3F$_1$ マウスに 4 週間反復投与毒性試験（CTD4.2.3.2.4［報告書番号[redacted]014］）の無毒性量と同等量（36 μg/kg/日）の E7272 を 10 日間静脈内投与した際の静止期の免疫細胞に与える影響について，一連の ex vivo 試験（マイトジェン刺激，混合リンパ球反応，NK 細胞毒性，マクロファージ細胞毒性）及び in vivo 試験（抗 SRBC 抗体産生能，遅延型過敏反応，B16 メラノーマ移植に対する抵抗性，リステリア感染への抵抗性）で評価した。これらの試験では，既知の免疫抑制剤であるシクロホスファミドを陽性対照物質として使用した。媒体対照群にはリン酸緩衝生理食塩水を用いた。

その結果，E7272 の 10 日間の投与は，静止期の免疫細胞が特定の刺激に応答する能力に影響を及ぼさなかった。一連の試験によって評価された投与期間終了時の免疫機能は，媒体対照群と同等であった。一方，シクホスファミドはこれらの刺激の大部分に対する応答を抑制した。

2.6.6.9.1.2 マウス無処理及び免疫動物における比較毒性試験（添付資料 4.2.3.7.2.2，報告書番号：[redacted]013［参考］）

ジフテリア毒素を感作させた雌 ICR マウスにおいて抗体産生が E7272 の毒性に与える影響を検討した。感作は，ジフテリア毒素を週 1 回 50 μg/例を 3 回皮下投与することにより行った。抗体産生量はサテライト動物（10 例）を用いて最終投与の 2 週間後に確認した。各群 10 例の無処置及び免疫動物に E7272（0，36，106 μg/kg/日）を 10 日間静脈内投与し，11 日目に体重測定，臨床検査，剖検並びに病理組織学的検査を実施した。陰性対象としてリン酸緩衝生理食塩水を用いた。

無処置動物の高用量群（106 μg/kg/日）においてのみ体重減少，AST，ALT 及び LDH の上昇，肝細胞壊死，尿細管上皮壊死が認められた。免疫動物の高用量群では毒性が認められなかったことより，ジフテリア毒素に対する免疫により肝及び腎への毒性が軽減されたものと考えられた。

2.6.6.9.1.3 ラット無処理及び免疫動物における比較毒性試験（添付資料 4.2.3.7.2.3，報告書番号：[redacted]150［参考］）

E7272 をラットに静脈内投与したときの肝，腎，脾，肺における病理組織学的変化を経時的に検討し，また臨床検査値との相関についても検討を行った。無処置及び E7272 前処置により感作

させた雌 SD ラットに，E7272 の高用量（100 μg/kg/日）を 3 日間，あるいは低用量（25 μg/kg/日）を 14 日間投与した。また E7272 前処置による免疫の影響についても検討した。

ラットは以下の表に従い群分け，投与を行った。

表 2.6.6-19 本試験における群構成

群番号	被験物質	免疫状態	免疫原	動物数	投与量 (μg/kg/日)	投与容量 (mL/kg/日)	投与期間
1	媒体	無処置	なし	24	0	1	14 日間
2	E7272	無処置	なし	24	100	1	3 日間
3	E7272	感作	E7272	24	100	1	3 日間
4	E7272	無処置	なし	24	25	1	14 日間
5	E7272	感作	E7272	24	25	1	14 日間

群番号 3 及び 5 の動物は E7272 を 1 回/日，4 日間皮下投与することで感作させ，約 3 週間後に投与を開始した。

投与期間中には症状観察と体重測定，2，4，8，15，22，29，36 及び 43 日目には剖検（各群 3 例）を行い，血液学的検査，血液生化学的検査，抗体価測定及び肝，腎，脾，肺の病理組織学的検査を実施した。

無処置動物では投与開始前に抗 DD 抗体及び抗 IL-2 抗体は認められなかった。高用量群（100 μg/kg/日）では 15 日目以降に低レベルの抗 DD 抗体が認められたが，低用量群（25 μg/kg/日）においては有意な抗 DD 抗体は認められなかった。抗 IL-2 抗体については両投与量群で確認されなかった。免疫動物では投与開始前から試験期間中を通して抗 DD 抗体が高値を維持していた。抗 IL-2 抗体は投与前には測定されなかったが，投与開始後には程度に差はあるが抗体産生が認められた。

免疫動物では 1～5 日目の全例で投与直後に一過性の呼吸困難，チアノーゼ，よろめき歩行が認められたが，1 時間以内に完全に回復し，日を追うごとに症状は軽減した。高用量群では症状はより早く発現し，程度も重篤であった。

また，多くの無処置動物及び免疫動物において E7272 投与による被毛の汚れ，うずくまり，削痩がみられた。これらの症状は試験開始初期に顕著であり，高用量群でより重篤な傾向を示した。

体重減少は無処置動物の E7272 投与群において認められ，高用量群では 1～8 日目に約 9%の減少がみられたが，その後は対照群と同等に増加した。低用量群では 1～8 日目に 4%，8～15 日目に 3%の体重減少が認められた。免疫動物群と対照群に体重の違いは認められなかった。

無処置動物の低用量群では 15～43 日に剖検した動物の肝に多巣性の単核細胞浸潤が認められ，22 日目においてより広範囲に認められた。免疫動物の低用量群及び無処置動物の高用量群では細胞浸潤は認められなかったが，免疫動物の高用量群の 4 あるいは 22 日剖検の各 1 例に肝に多巣性単核細胞浸潤が認められた。腎においても変性/再生性の変化が 4 日目以降に認められ，無処置動物群においては投与量に関わらず，より重篤な傾向であった。

2.6.6.9.2 毒性発現の機序に関する試験

2.6.6.9.2.1 In vitro ラット初代培養肝，クッパー及び腎近位尿細管細胞における E7272 によるタンパク合成阻害（添付資料 4.2.3.7.3.1，報告書番号：[redacted]111［参考］）

ラット初代培養肝細胞及び腎近位尿細管上皮細胞において E7272 によるタンパク合成阻害作用に対する感受性を評価し，その細胞毒性が E7272 の IL-2R への結合の結果か，あるいは飲食作用（液相エンドサイトーシス）によって非特異的に取り込まれた二次的なものかを評価した。また，E7272 によるクッパー細胞のタンパク合成阻害に対する感受性及び特異性，さらに IL-1β（インターロイキン-1β）及び TNF-α（腫瘍壊死因子-α）放出刺激活性を評価した。

雌 SD ラットより肝細胞，クッパー細胞，及び腎近位尿細管上皮（RPTE）細胞の初代培養細胞を調製した。これらの細胞を E7272 1×10^{-12}～2×10^{-7} mol/L の濃度で，24 時間処理し，その後 [^{14}C]ロイシンの取り込みによってタンパク合成を評価した。10^{-6} mol/L の IL-2 による E7272 の阻害も検討した。

E7272 の肝細胞に対するタンパク質合成の 50%阻害濃度（IC_{50}）値は 3×10^{-8} mol/L，クッパー細胞に対しては 5×10^{-8} mol/L，そして RPTE 細胞に対しては 1×10^{-7} mol/L 以上であり，これらの作用は IL-2 存在下で影響を受けなかった。すなわち，これら細胞による E7272 の取り込み及びタンパク合成阻害は，IL-2R を介さず，非特異的な飲食作用によるものと考えられた。E7272 の 25 μg/kg/日の静脈内急速投与（肝及び腎毒性が引き起こされる用量）において，ラットの平均最大血清中濃度は 7×10^{-9} mol/L（402 ng/mL）に達するが，これは in vitro でタンパク合成阻害がみられる IC_{50} 値に匹敵する濃度であった。

肝細胞でタンパク合成を 50%減少させる最小処理時間は 10^{-7} mol/L で 4～6 時間であった。10^{-8} 及び 10^{-9} mol/L ではタンパク合成の 50%抑制はみられなかったが，IL-2R を高発現している細胞株においては，同濃度の E7272 がタンパク合成を 50%抑制するのに要する時間は 4 時間未満であった。IC_{50} 値は in vivo における血清中濃度に匹敵したが，タンパク合成の 50%阻害を引き起こすのに要する最小処理時間は，この血中濃度が in vivo で維持される時間を大きく上回っていた。

クッパー細胞の培養液中の IL-1β 及び TNF-α のレベルを，E7272 の 10^{-8} mol/L 存在下で培養開始後 2，24 及び 48 時間後に測定した。E7272 はクッパー細胞のサイトカイン放出を刺激しなかった。

2.6.6.9.2.2 ヒト肝，腎スライスに E7272 を 20 時間曝露した際の影響（添付資料 4.2.3.7.3.2，報告書番号：[redacted]068［参考］）

ヒト肝及び腎スライス in vitro モデルにおいて，タンパク合成を指標として E7272 の毒性ポテンシャルを評価した。結果，タンパク合成に対する用量依存的な作用はみられなかった。生データ及びコントロールに対する相対比データから，E7272 のいずれの濃度（10^{-12}～10^{-8} mol/L）においても，陰性対照と比較してタンパク合成の明らかな変化はなかった。

2.6.6.9.2.3 ヒト初代培養細胞における E7272 による細胞毒性と IL-2R 発現（添付資料

4.2.3.7.3.3，報告書番号：[redacted]066［参考］）

E7272 に対する種々の正常ヒト細胞の *in vitro* での感受性を確認し，IL-2R の p55 及び p75 鎖の mRNA 発現に対する感受性との相関を評価した。結果，ヒト上皮，腎，内皮，平滑筋，骨格筋，ケラチノサイト（角化細胞）及び線維芽細胞は，E7272 の 25 μg/kg/日をサル又はラットに静脈内投与した際の最高血清中濃度（576 ng/mL）に匹敵する濃度においても，E7272 に感受性を示さなかった。さらに，これらの細胞のいずれも IL-2R の p55 鎖の mRNA を発現しておらず，3 つの細胞でのみ低レベルの IL-2R の p75 鎖を発現していた。これらの正常細胞の結果は，IL-2R の p55 及び p75 鎖を中～高レベルで発現している種々のヒトがん細胞株で得られた E7272 に対する高感受性結果と対照的であった。

表 2.6.6-20　ヒト初代細胞の感受性

細胞	IL-2R 発現*		IC_{50} (ng/mL)
	p55	p75	
近位尿細管上皮細胞	–	–	>576
腎皮質上皮細胞	–	–	>576
腎メサンギウム細胞	–	low	>576
皮膚毛細血管内皮細胞	–	–	>576
肺動脈内皮細胞	–	–	>576
肺動脈平滑筋細胞	–	–	>576
骨格筋細胞	–	low	>576
表皮角化細胞	–	low	>576
皮膚線維芽細胞	–	–	>576
気管支／気管上皮細胞	–	–	>576

*:　–：negative：$< 10^5$ copies mRNA/50 ng total RNA，low: $< 5\times10^5$ copies mRNA/50 ng total RNA.
出典：添付資料 4.2.3.7.3.3（[redacted]066）。

2.6.6.9.2.4 In vitro ヒト血管内皮細胞に対する影響（添付資料 4.2.3.7.3.4，報告書番号：[redacted]114［参考］）

種々のヒト初代培養血管内皮細胞を用い，in vitro における E7272 のタンパク合成阻害活性，細胞の形態変化，サイトカイン（IL-1α，TNF-α 及び IL-6）産生に対する影響を調べた。比較対照として，$DA_{glu53}B_{389}$IL-2，DAB_{389}IL-$2_{\Delta8\text{-}19}$，IL-2，フィブロネクチン（脱グリコシルリシン A 鎖による臍帯静脈障害を阻害）及びヒトアルブミン（非特異的タンパク対照）を用いた。

その結果，正常なヒト肺動脈内皮細胞は E7272 に対して非特異的な作用を示したが（$IC_{50}=5\times10^{-8}$ mol/L; 2882 ng/mL），ヒトの皮膚，肺の毛細血管内皮細胞及び臍帯静脈内皮細胞は感受性を示さなかった。高濃度（10^{-7} mol/L; 5765 ng/mL）の E7272，$DA_{glu53}B_{389}$IL-2，DAB_{389}IL-$2_{\Delta8\text{-}19}$，IL-2，フィブロネクチン及びヒトアルブミンを細胞に曝露したところ，タンパク種に関わらず形態学的な変化が生じたことから，これらの変化はタンパク合成の阻害に関与しない非特