ツシジノスタット
ハイヤスタ錠 10mg

第 2 部 CTD の概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.6 毒性試験の概要文

Huya Japan 合同会社

略号一覧表

略語・用語	内容
$AUC_{(0-24)}$	0 時間から 24 時間までの血中濃度－時間曲線下面積
$AUC_{(0-48)}$	0 時間から 48 時間までの血中濃度－時間曲線下面積
$AUC_{(0-tau)}$	一投与間隔の血中濃度－時間曲線下面積
BIW	週 2 回
C_{max}	最大血中濃度
ECG	心電図
FOB	機能観察総合評価法
GALT	腸管関連リンパ組織
GGT	γ-グルタミルトランスフェラーゼ
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験実施の基準
HDAC	ヒストン脱アセチル化酵素
HUYABIO	HUYA Bioscience International, LLC
IC_{50}	50%阻害濃度
ICH	医薬品規制調和国際会議
IE	幼若赤血球
LOAEL	最小毒性量
MIE	小核を有する幼若赤血球
MPE	Mean photo effect
MTD	最大耐量
NOAEL	無毒性量
PMDA	独立行政法人　医薬品医療機器総合機構
QD	1 日 1 回
QOD	2 日に 1 回
QTc	補正 QT 間隔
UVA	紫外線 A 波
UVB	紫外線 B 波

目次

頁
略号一覧表 2
2.6.6 毒性試験概要文 5
2.6.6.1 毒性試験の概要 5
2.6.6.1.1 要約 5
2.6.6.1.1.1 単回投与毒性試験 5
2.6.6.1.1.2 反復投与毒性試験 6
2.6.6.1.1.3 遺伝毒性 9
2.6.6.1.1.4 がん原性評価 9
2.6.6.1.1.5 生殖発生毒性試験 9
2.6.6.1.1.6 局所刺激性 9
2.6.6.1.1.7 その他の毒性試験 9
2.6.6.2 単回投与毒性試験 10
2.6.6.2.1 ラットにおける 21 日間反復経口投与毒性試験（2.6.6.3.1 項、試験番号 11470-07） 10
2.6.6.2.2 イヌにおける 19 日間反復経口投与毒性試験（2.6.6.3.4 項、試験番号 11296-07） 10
2.6.6.2.3 イヌを用いた経口投与の HBI-8000 のクロスオーバー試験（試験番号 [redacted]20176313） 10
2.6.6.3 反復投与毒性試験 11
2.6.6.3.1 ラットにおける HBI-8000 の 21 日間反復経口投与毒性試験(試験番号 11470-07) 11
2.6.6.3.2 ラットにおける HBI-8000 の 4 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復試験（試験番号 1515-002） 11
2.6.6.3.3 ラットにおける HBI-8000 の 13 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復試験（試験番号 20092736） 13
2.6.6.3.4 イヌにおける HBI-8000 の 19 日間反復経口投与用量設定試験（試験番号 11296-7） 16
2.6.6.3.5 イヌにおける HBI-8000 の 4 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復試験(試験番号 1515-001） 16
2.6.6.3.6 イヌにおける HBI-8000 の 13 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復試験（試験番号 20092737） 18
2.6.6.4 遺伝毒性試験 20
2.6.6.4.1 ネズミチフス菌及び大腸菌を用いる復帰突然変異試験（試験番号 9601677） 20
2.6.6.4.2 ヒト末梢血リンパ細胞における *In Vitro* 哺乳類染色体異常試験（試験番号 9601678） 20
2.6.6.4.3 ラットにおける *In Vivo* 小核試験（試験番号 9800415） 21
2.6.6.5 がん原性評価 21
2.6.6.6 生殖発生毒性試験 21
2.6.6.7 局所刺激性試験 22

2.6.6.8 その他の毒性試験 23
2.6.6.8.1 原薬の潜在的不純物 不純物F＊ のネズミチフス菌を用いる復帰突然変異試験（試験番号[redacted]08-368） 23
2.6.6.8.2 BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞を用いた *In Vitro* 光毒性試験（試験番号 20245854） 23
2.6.6.9 総括及び結論 23
2.6.6.10 参考文献 24

表

頁
表 2.6.6-1 毒性試験プログラム 5
表 2.6.6-2 ラット及びイヌにおける 13 週間反復経口投与毒性試験の最大耐量（MTD）でのトキシコキネティクスパラメータ 24

＊新薬承認情報提供時に不純物名を置き換え

2.6.6 毒性試験概要文

2.6.6.1 毒性試験の概要

2.6.6.1.1 要約

HBI-8000 開発のため、ラット及びイヌを用いた単回及び反復投与毒性試験、遺伝毒性試験、並びに光毒性試験を実施した（表 2.6.6-1）。非臨床毒性試験に用いるげっ歯類及び非げっ歯類動物種としては、規制当局より受け入れられていること、及び過去において膨大な背景データが存在していることを踏まえ、ラット及びイヌを選択した。さらに、 不純物F* は HBI-8000 合成に使用する出発物質であり、製剤の潜在的な不純物であることから、細菌を用いる復帰突然変異試験を行った。重要な試験は GLP 適合下で実施した。

表 2.6.6-1 毒性試験プログラム

Study	Species/ Test System	Dose Levels	GLP/ Non-GLP	Study Number	CTD Location
Oral single dose crossover toxicity study	Dog	1 mg/kg via gavage, 10 mg/day via tablet	Non-GLP	[redacted]20176313	4.2.3.1-1
21-Day oral repeated dose toxicity study	Rat	10, 20, 40 mg/kg QOD	Non-GLP	11470-07	4.2.3.2-1
4-Week oral repeated dose toxicity study	Rat	9, 18, 36 mg/kg QOD	GLP	1515-002	4.2.3.2-2
13-Week oral repeated dose toxicity study	Rat	3, 9, 27 mg/kg QOD	GLP	20092736	4.2.3.2-3
19-Day oral range finding repeated dose toxicity study	Dog	1 mg/kg (Day 1-8); 1, 1.5 and 2 mg/kg (Day 9-13); 1, 2, and 2.5 mg/kg (Day 14-20)	Non-GLP	11296-07	4.2.3.2-4
4-Week oral repeated dose toxicity study	Dog	0.25, 0.75, 1.25 mg/kg; 12 days QD + QOD for remainder of the study	GLP	1515-001	4.2.3.2-5
13-Week oral repeated dose toxicity study	Dog	0.25, 0.75, 1.25 mg/kg QOD	GLP	20092737	4.2.3.2-6
In vitro bacterial reverse mutation test	*Salmonella typhimurium, Escherichia coli*	Up to 5000 µg/plate	GLP	9601677	4.2.3.3.1-1
In vitro mammalian chromosome aberration test	Human peripheral blood lymphocytes	0.8 – 390 µg/mL	GLP	9601678	4.2.3.3.1-2
In vivo oral gavage micronucleus test	Rat	10, 20, 40 mg/kg	GLP	9800415	4.2.3.3.2-1
Bacterial reverse mutation test of potential product impurity	*Salmonella typhimurium, Escherichia coli*	15, 50, 150, 500, 1500, 5000 µg/plate	GLP	[redacted]08-368	4.2.3.7.6-1
In vitro photosafety	BALB/c 3T3 mouse fibroblasts	0.178 – 10.0 µg/mL	GLP	20245854	4.2.3.7.7-1

CTD = コモン・テクニカル・ドキュメント; GLP = 医薬品の安全性に関する非臨床試験実施の基準; QD = 1 日 1 回; QOD = 2 日に 1 回.

2.6.6.1.1.1 単回投与毒性試験

ラット及びイヌでの複数の反復投与毒性試験及び 1.25 mg/kg/day（強制経口投与）及び 10 mg/day（コートあるいは非コートの錠剤）の HBI-8000 をイヌに単回経口投与した試験において致死用量における急性毒性を評価した。

＊新薬承認情報提供時に不純物名を置き換え

ラット 21 日間反復経口投与毒性試験（2.6.6.3.1 項、試験番号 11470-07）では、雌雄の Sprague-Dawley 系ラットに 10、20、又は 40 mg/kg の HBI-8000 を 2 日に 1 回（QOD）、20 日間強制経口投与した。40 mg/kg 群の雄 2 匹が 20 日目及び 1 匹が 21 日目に死亡した。これらの動物は試験初期の段階から体重減少及び軟便が認められ、投与 20 日目には立毛を示した。生存例においては 20 mg/kg 以上の投与群に体重減少及び軟便、立毛が一貫して認められた。これらのことより MTD は 40 mg/kg 未満と判断された。

イヌ 19 日間反復経口投与毒性試験（2.6.6.3.4 項、試験番号 11296-07）では雄ビーグル犬に HBI-8000 を 1 日 1 回（QD）で経口投与した。当初、1.0 mg/kg を投与した。忍容性が示されたため 9 日目から 1.0、1.5 及び 2.0 mg/kg に増量した。引き続き忍容性が示されたため 14 日目に用量を 2.0 及び 2.5 mg/kg に変更し 19 日目まで投与した。1.0、2.0 及び 2.5 mg/kg を投与した 1 例（2.5 mg/kg に変更 3 日目に死亡）、および 1.0、1.5 及び 2.0 mg/kg を投与した 1 例（2.0 mg/kg に変更 5 日目に切迫屠殺）がいずれも下血及びそれに伴う脱水に関連して死亡した。これらのことから、MTD は 2.0 mg/kg 未満と判断した。

1.25 mg/kg/day（強制経口投与）及び 10 mg/day（コートあるいは非コートの錠剤）の HBI-8000 をイヌに単回経口投与した試験（試験番号[redacted]20176313）では、良好な忍容性が認められた。

2.6.6.1.1.2 反復投与毒性試験

非 GLP 試験として実施したラット 21 日間反復経口投与毒性試験（試験番号 11470-07）では、雌雄の Sprague-Dawley 系ラットに 10、20、又は 40 mg/kg の HBI-8000 を QOD で強制経口投与した。試験期間中に 40 mg/kg 群の雄 3 匹が死亡した。全ての投与群に投与に関連した体重増加の減少がみられ、生存した高用量群の雄に特に顕著な減少が認められた。40 mg/kg 投与によって体重減少及び雄 3 匹の死亡が認められたことから、最大耐量（MTD）は 40 mg/kg 未満と判断された。

イヌ 19 日間反復経口投与毒性試験（試験番号 11296-07）を非 GLP 試験として実施した。最初 1 mg/kg/日を 14 日間連日投与し、忍容性が認められたため、9 日目から用量を 1、1.5 及び 2 mg/kg へ変更した。引き続き忍容性が示されたため、試験期間を延長して 20 日間とし、14 日目に用量を 2 及び 2.5 mg/kg に変更して 19 日目まで継続した。1.0、2.0 及び 2.5 mg/kg、又は 1.0、1.5 及び 2.5 mg/kg を投与した動物が、恐らく出血性の下痢及びそれに関連する脱水のために死亡した。死亡が認められたことから、MTD は 2.0 mg/kg 未満と判断された。

GLP 適合下で実施したラット 4 週間試験（試験番号 1515-002）では、9、18、又は 36 mg/kg の HBI-8000 を QOD で強制経口投与し、回復期間を 4 週間とした。

本試験では、全例に用量依存性の摂餌量及びそれに伴う体重増加量の減少が認められた。骨髄低形成が血液学的及び臨床化学的検査値に影響を及ぼしたと考えられる。18 mg/kg 及び 36 mg/kg 群でのこれらの変化の重症度は、リンパ組織の病理組織学的検査で確認された。9 mg/kg 群では顕著な病理組織学的影響が認められなかった。しかし、9 mg/kg を投与したラットで白血球数、好中球数及びリンパ球数が減少したことから、無毒性量（NOAEL）を判断することはできなかった。

GLP 適合下で実施したラット 13 週間試験（試験番号 20092736）では、3、9、又は 27 mg/kg の HBI-8000 を QOD で強制経口投与し、回復期間を 4 週間とした。27 mg/kg を投与した雌 1 匹が 12 日目（動物番号 2454）に死亡した。剖検結果から死因を明らかにすることはできず、病理組織学的検査によって細菌感染後に脳及び髄膜に炎症反応が生じた可能性が示唆された。9 mg/kg 以上の用量群では投与に関連する摂餌量及び体重増加の減少がみられた。9 mg/kg 以上の用量群では白血球数、好中球数、リンパ球数及び網状赤血球数に、投与に関連する有害な影響が認められた。

投与に関連する臨床化学的検査値の変化には、9 mg/kg 以上の用量群における γ-グルタミルトランスフェラーゼ（GGT）、尿素窒素及びアルブミン／グロブリン比の上昇、並びに総タンパク質、アルブミン、グロブリン、カルシウム及びカリウムの減少があった。9 mg/kg 以上の用量群における剖検所見が、リンパ節、脾臓、胸腺、消化管、下垂体及び甲状腺に認められた。臓器重量変化及び病理組織学的所見は、3 mg/kg 以上の用量群で前立腺に、9 mg/kg 以上の用量群で下垂体、甲状腺及び胸腺に認められた。骨髄低形成、下垂体前葉の萎縮、甲状腺の濾胞拡張、肺胞における組織球集積､並びに脾臓の単核球炎症及び線維症などの病理組織学的変化が認められた。さらに、盲腸、回腸、空腸及び胃に出血が低頻度で認められた。上記所見の多くは部分的又は完全に回復した。以上の結果から、NOAEL は 3 mg/kg と考えられた。最小毒性量（LOAEL）と考えられる 9 mg/kg 投与では、体重増加量及び摂餌量の減少、血液学的検査では白血球数、好中球数、リンパ球数及び網状赤血球数の変化、臨床化学的検査では GGT、尿素窒素及びアルブミン／グロブリン比の上昇、並びに総タンパク質、アルブミン、グロブリン、カルシウム及びカリウムの減少が認められた。剖検ではリンパ節、脾臓、胸腺、消化管、下垂体及び甲状腺に所見が、3 mg/kg 投与で臓器重量変化及び病理組織学的変化に加えて認められた。

GLP 適合下で実施したイヌ 4 週間試験（試験番号 1515-001）では、0.25、0.75、又は 1.25 mg/kg の HBI-8000 を 1 日 1 回（QD）12 日間強制経口投与し、その後 QOD の投与に変更した。試験期間中に 1.25 mg/kg 群の雄 3 匹及び雌 1 匹が瀕死状態を示したため安楽殺した。病理組織学的検査の結果、これらのイヌは、骨髄低形成、並びにリンパ節、脾臓及び胸腺におけるリンパ球枯渇の結果、肺炎が生じて瀕死に至ったことが示された。HBI-8000 投与に関連する一般症状所見として 0.75 mg/kg 以上の用量群で、活動低下、食欲不振､削痩及び水様／粘液性／変色便が認められた。0.75 mg/kg 及び 1.25 mg/kg 群では、体重及び摂餌量に対する影響が認められた。1.25 mg/kg 群では、11 日目の雌の RR 間隔が溶媒対照群に比較して統計学的に延長した。雌雄のデータを合算して溶媒対照群と比較した結果、10%超の補正 QT 間隔（QTc）延長が、0.75 mg/kg 群で 1 回、1.25 mg/kg 群で 2 回認められた。HBI-8000 投与に関連する赤血球系パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット値）の減少が 0.75 mg/kg 以上の用量群で、雌でより顕著に認められた。網状赤血球は 0.75 mg/kg 及び 1.25 mg/kg 群の雌雄で減少した。被験物質投与に関連するリンパ球数、単球及び白血球数の変化は 0.75 mg/kg 以上の用量群で認められた。2 週目と他の採血時とにおける血液学的検査値の差は、投与間隔の 1 日 1 回から 2 日に 1 回への変更に起因する可能性がある。2 週目に 1.25 mg/kg 群で、被験物質投与に関連する活性化部分トロンボプラスチン時間の延長が対照群に比較して認められた。0.75 mg/kg 以上の用量群で、被験物質投与に関連する電解質の変化が認められた。1.25 mg/kg 群雌 2 匹で 2 週目に測定可能なレベルのトロポニン I が認められた。0.75 mg/kg 及び 1.25 mg/kg 群の雌雄に、総タンパク質、アルブミン及びアルブミン／グロブリン比の散発的で軽度の低下が認められた。また、4 週目の 1.25 mg/kg 群でクレアチニンが減少した。全用量群で胸腺重量が、また 1.25 mg/kg 群で脾臓重量が減少し、剖検で認められた胸腺及び脾臓の小型化と関連していると考えられた。HBI-8000 投与に関連した病理組織学的所見が、骨髄、リンパ節、脾臓及び胸腺に認められた。1.25 mg/kg 群では、骨髄低形成、並びにリンパ節、脾臓及び胸腺のリンパ球枯渇がみられ、4 匹に肺炎を生じ瀕死安楽殺に至ったと考えられた。0.75 mg/kg 群では雄 1 匹に軽度の骨髄低形成及び中等度の胸腺萎縮が生じたことから、0.75 mg/kg 及び 1.25 mg/kg でみられた作用は有害な影響と考えられた。本試験では 0.25 mg/kg で毒性学的に意義がある変化が認められなかったこと、並びに 0.75 mg/kg 以上の用量で体重、摂餌量、病理組織学的所見、及び QTc 間隔における投与に関連する有害な変化が認められたことから、NOAEL

は 0.25 mg/kg と判断された。LOAEL の 0.75 mg/kg 投与では、活動低下、食欲不振、削痩及び水様／粘液性／変色便、体重及び摂餌量の変化、QTc 間隔延長、血液学的検査では赤血球系パラメータ、網状赤血球、リンパ球、単球及び総白血球数の変化、臨床化学的検査では電解質、総タンパク質、アルブミン及びアルブミン／グロブリン比の変化、並びに病理組織学的検査では骨髄低形成が認められた。

GLP 適合下で実施したイヌ 13 週間試験（試験番号 20092737）では、0.25、0.75、又は 1.25 mg/kg の HBI-8000 を強制経口投与し、回復期間を 4 週間とした。HBI-8000 の全用量群で歩行異常、四肢の使用制限及び円背位が認められたが、これらは断続的であり、無治療あるいは限定的な獣医学的治療（3～7 日間のメロキシカム投与）によって回復した。1.25 mg/kg 群の雄には、摂餌量の減少と、これに関連する体重増加量のわずかな減少が認められた。血液学的検査では、HBI-8000 投与に関連する有害な変化として、90 日目に 0.75 mg/kg 以上の用量群の雌雄に生じた平均赤血球系パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン及びヘマトクリット値）、並びに平均リンパ球数の減少がみられた。HBI-8000 投与に関連する剖検所見が、0.75 mg/kg 以上の用量群で肺（暗色化及び斑状の変色）に、1.25 mg/kg 群で生殖器官（精巣、精巣上体、前立腺、卵巣及び子宮の小型化）、リンパ組織（縦隔リンパ節の暗色化、胸腺への異物沈着及び脾臓の淡色巣）、並びに皮下組織（異物沈着）に認められた。HBI-8000 投与に関連する臓器重量の変化としては、0.75 mg/kg 以上の用量群で精巣上体、前立腺、卵巣、精巣及び子宮重量の減少、1.25 mg/kg 群で最終体重（雄）、甲状腺（雄）及び胸腺重量（雄）の減少が認められた。また、0.75 mg/kg 以上の用量群で肺重量（雄）の増加、1.25 mg/kg 群で肺重量（雌）の増加が認められた。HBI-8000 投与に関連する病理組織学的変化としては、0.75 mg/kg 以上の用量群で腸管関連リンパ組織（GALT）のリンパ球枯渇、肺胞に混合細胞性炎症、並びに精巣上体、前立腺、子宮及び卵巣の萎縮、1.25 mg/kg 群で甲状腺の濾胞萎縮、肺胞の出血、脾臓の結節性過形成、腸間膜リンパ節、縦隔リンパ節及び胸腺のリンパ球枯渇、並びに精巣精細管、膣及び子宮頚管の萎縮が認められた。以上の結果に基づき、NOAEL は 0.25 mg/kg と判断された。LOAEL の 0.75 mg/kg 群では、平均赤血球系パラメータ及び平均リンパ球数の減少、剖検所見として肺に斑状の変色、臓器重量変化として精巣、精巣上体、前立腺、卵巣、精巣及び子宮重量の減少、並びに肺重量（雄）の増加、病理組織学的変化として GALT のリンパ球枯渇、肺胞における混合細胞性炎症、並びに精巣上体、前立腺、子宮及び卵巣の萎縮が認められた。

ラット及びイヌには類似する毒性徴候がみられた。摂餌量減少は体重減少を引き起こした。下痢は頻回に生じた。軽度～中等度の骨髄低形成が生じ、白血球数、好中球数、リンパ球数、網状赤血球数及び血小板数の減少に至った。さらに、リンパ節にはリンパ球枯渇が生じた。グロブリン、アルブミン及びカルシウム値は減少した。胃、小腸、大腸及び心筋における出血は低頻度ではあるが、特に高用量群に認められた。肺に出血及び線維症を伴う炎症が、特に高用量群に認められた。試験結果からは、HBI-8000 の曝露量が小さい場合に毒性が低下するため、QD 投与より QOD 投与の忍容性が良好であることが示された。

イヌ 4 週間試験（試験番号 1515-001）で認められた QTc 延長は、被験物質投与に関連した血清カリウム及びカルシウム値の減少に続発する変化と考えられ、イヌ 13 週間試験（試験番号 20092737）では QTc の延長は認められていない。

ラットでは 3～40 mg/kg の用量範囲における QOD 投与で検討した。MTD は 40 mg/kg QOD 未満、NOAEL は 3 mg/kg QOD であった。イヌでは 0.25～2.5 mg/kg の用量範囲で検討した。1～2.5 mg/kg QD の 21 日間投与では、MTD が 2 mg/kg 未満であることが示された。4 週間試験では、0.25～1.25 mg/kg QD の 12 日間投与では顕著な毒性が生じたため、残りの試験期間では用法を

QOD に変更した。13 週間の QOD 投与の結果、NOAEL は 0.25 mg/kg と判断された。

2.6.6.1.1.3 遺伝毒性

HBI-8000 の遺伝毒性を *in vitro* 試験（細菌を用いる復帰突然変異試験［試験番号 9601677］及びヒト末梢血リンパ球における哺乳類染色体異常試験［試験番号 9601678］）、並びに *in vivo* 試験（ラットにおける小核試験［試験番号 9800415］）で評価した結果、HBI-8000 に遺伝毒性は認められなかった。

2.6.6.1.1.4 がん原性評価

がん原性試験は実施しなかった。ICH S9 ガイドラインに従い、がん原性試験は不要と判断された。

2.6.6.1.1.5 生殖発生毒性試験

生殖発生毒性試験は実施しなかった。

ICH S9 抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン（2010）に従い、雌雄の受胎能については、ラット（試験番号 1515-002 及び 20092736）並びにイヌ（試験番号 1515-001 及び 20092737）の反復投与試験における生殖器の詳細な検査により評価した。ラットの 13 週間反復経口投与試験（試験番号 20092736）では、前立腺重量の減少が観察された。イヌの 13 週間反復経口投与毒性試験（試験番号 20092737）では、被験物質投与に関連する精巣所見（精巣の小型化、精巣重量減少及び精細管の萎縮）、及び前立腺の萎縮が雄で認められた。また、卵巣と子宮の萎縮が雌で認められた。これらの変化はすべて、部分的に回復した。精巣や卵巣の重量減少や病理組織学的所見は、HBI-8000 に類似する HDAC 阻害活性に関連しロミデプシンでも認められている[イストダックス点滴静注用 10 mg 審議結果報告書 （平成 29 年 6 月 7 日）]。反復投与毒性試験で認められた雌雄の生殖器におけるこれらの所見に基づいて、HBI-8000 は男女の受胎能に影響を与える可能性があることが示唆された。

HBI-8000 は進行がん患者の治療を目的とした医薬品であることから、ICH S9 ガイドラインに従い、これらの情報に基づき、さらなる受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験は不要と判断した。

HBI-8000 は分裂が速い細胞を標的としており、発生毒性を誘発することがよく知られている系統の医薬品（Eikel 2006; Menegola 2006; Wise 2007; Giavini 2014）であることから、ICH S9 ガイドラインに従い、胚及び胎児発生に関する毒性試験は不要と判断している。

HBI-8000 は進行がん患者の治療を目的とした医薬品であることから、ICH S9 ガイドラインに従い、出生前及び出生後の毒性試験は不要と判断された。

2.6.6.1.1.6 局所刺激性

HBI-8000 の予定臨床投与経路は経口であることから、局所刺激性試験は実施しなかった。

2.6.6.1.1.7 その他の毒性試験

HBI-8000 原薬の合成に使用する出発物質であり、製剤の潜在的な不純物である

不純物 F＊ について、細菌を用いる復帰突然変異試験（試験番号[redacted]08-368）を実施した。試験の結果、遺伝毒性が認められたため、HUYA Bioscience International, LLC（HUYABIO）は最終

＊新薬承認情報提供時に不純物名を置き換え

出荷判定基準として本物質の規格を 5 ppm に設定し、遺伝毒性を有する出発物質の出荷前の最終製剤からの除去についての管理を継続する。

HBI-8000 の光毒性を評価する目的で、BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞を用いた *in vitro* 光毒性試験を GLP 適合下で実施した（試験番号 20245854）。陽性対照物質にはプロメタジンを用いた。

用量設定試験を実施したが、細胞毒性の 50%阻害濃度（IC_{50}）を求めることはできなかった。本試験では、5 J/cm^2 の紫外線 A 波（UVA）、23 mJ/cm^2、24 mJ/cm^2、又は 25 mJ/cm^2 の紫外線 B 波（UVB）を照射した。細胞毒性の IC_{50} 値が求められない場合には、光毒性の評価には Mean photo effect（MPE）が用いられる。プロメタジンの MPE 値が陽性基準値を超えていたのに対し、HBI-8000 の MPE 値は陽性基準値を下回っていた。

本試験の結果、HBI-8000 は光毒性反応を引き起こさないことが示された。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

2.6.6.2.1 ラットにおける 21 日間反復経口投与毒性試験（2.6.6.3.1 項、試験番号 11470-07）

参考資料[4.2.3.2-1] 11470-07

ラット 21 日間反復経口投与毒性試験（2.6.6.3.1 項、試験番号 11470-07）では、Sprague-Dawley 系ラット（雌雄各 5 匹／投与群）に 10、20、又は 40 mg/kg の HBI-8000 を QOD で 20 日間強制経口投与した。投与期間中に 40 mg/kg 群の雄 2 匹が 20 日目及び 1 匹が 21 日目に死亡した。これらの動物は試験初期の段階から体重減少及び軟便が認められ、投与 20 日目には立毛を示した。生存例においては 20 mg/kg 以上の投与群に体重減少及び軟便、立毛が一貫して認められた。これらのことより MTD は 40 mg/kg 未満と判断した。

2.6.6.2.2 イヌにおける 19 日間反復経口投与毒性試験（2.6.6.3.4 項、試験番号 11296-07）

参考資料[4.2.3.2-4] 11296-07

イヌ 19 日間反復経口投与毒性試験（2.6.6.3.4 項、試験番号 11296-07）では、雄ビーグル犬に摂餌下又は絶食下で溶液（強制経口投与）、カプセル、又は錠剤の HBI-8000 を QD で経口投与した。当初、1.0 mg/kg を投与した。忍容性が示されたため 9 日目から 1.0、1.5 及び 2.0 mg/kg に増量した。引き続き忍容性が示されたため 14 日目に容量を 2.0 及び 2.5 mg/kg に変更し 19 日目まで投与した。1.0、2.0 及び 2.5 mg/kg を投与した 1 例（2.5 mg/kg に変更 3 日目に死亡）、および 1.0、1.5 及び 2.0 mg/kg を投与した 1 例（2.0 mg/kg に変更 5 日目に切迫屠殺）がいずれも下血及びそれに伴う脱水に関連して死亡した。体重減少及び一般状態観察所見はいずれの投与群においても試験初期の段階から各投与群に散発的に認められた。これらのことから、MTD は 2.0 mg/kg 未満と判断した。

2.6.6.2.3 イヌを用いた経口投与の HBI-8000 のクロスオーバー試験（試験番号 ■20176313）

参考資料[4.2.3.1-1]■20176313

1.25 mg/kg/day（強制経口投与）及び 10 mg/day（コートあるいは非コートの錠剤）の HBI-8000 をイヌに単回経口投与した結果、良好な忍容性が認められた。

2.6.6.3 反復投与毒性試験

2.6.6.3.1 ラットにおける HBI-8000 の 21 日間反復経口投与毒性試験（試験番号 11470-07）

参考資料[4.2.3.2-1] 11470-07

MTD を判定するため、非 GLP の経口投与用量設定試験を実施した。

雌雄の Sprague-Dawley 系ラット（雌雄各 5 匹／投与群）に 10、20、又は 40 mg/kg の HBI-8000 を QOD で 20 日間強制経口投与した（投与日は計 11 日間）。

試験期間中に 40 mg/kg 群の雄 3 匹が死亡した。3 匹の剖検所見では、肺の蒼白化、肝臓の変色、腹部脂肪の減少、消化管内の液体貯留、胃内のガス貯留及び胸水貯留が認められた。

中用量及び高用量群の動物で肺の蒼白化及び脾臓における白色巣が認められた。全用量群で投与に関連する体重増加量の減少が認められた。最大の減少は、高用量群で生存した雄に認められた。

高用量群の動物で投与に関連する白血球数（リンパ球）の減少、並びに好中球数及び単核球数の増加が認められた。わずかではあるがプロトロンビン時間延長が認められ、HBI-8000 投与に関連すると考えられた。血清化学的検査では、アルブミン、グロブリン及び総タンパク質レベルに緩徐ではあるが投与に関連する変化が認められた。

10 mg/kg 群雌雄のラット 0 日目の 0 時間から投与後 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積（$AUC_{(0-24)}$）はそれぞれ 2980 及び 3660 ng· h/mL、並びに最大血漿中濃度（C_{max}）はそれぞれ 420 及び 961 ng/mL であった（中用量及び高用量群の動物ではトキシコキネティクス分析[TK]は実施しなかった）。

40 mg/kg 群に体重減少及び雄 3 匹の死亡が認められたことから、MTD は 40 mg/kg 未満と判断された。

2.6.6.3.2 ラットにおける HBI-8000 の 4 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復試験（試験番号 1515-002）

評価資料[4.2.3.2-2] 1515-002

GLP 適合の 4 週間経口投与毒性試験及び 4 週間回復試験を実施し、毒性及び毒性変化の回復性、進行性、又は遅発性について評価した。

雌雄の Sprague-Dawley 系ラット（15 匹／性／投与群）に 9、18、又は 36 mg/kg の HBI-8000 を QOD で 27 日間強制経口投与し、回復期間を 4 週間とした。28 日目にラット 10 匹／性／群を安楽殺した。残りの 5 匹／性／群には 4 週間の回復期間を設定した。TK 試験には追加の 7 匹／性／群を用いた。

対照群と比較して 9、18 及び 36 mg/kg 群には、投与に関連する平均体重の減少が認められた。体重増加量への影響は雌雄で早ければ 4 日目に認められた。平均体重への影響は平均摂餌量減少と関連していた。9 mg/kg 群における平均体重への影響はわずかであり、HBI-8000 投与に関連する一般状態に変化がみられなかったことから有害な影響ではないと考えられた。回復期間終了時の平均体重は、対照群と比較して 36 mg/kg 群においてのみ統計学的に有意に低い値であった。しかし、回復期間中の 36 mg/kg 群の体重増加量は対照群と比較して高く、部分的な回復性が認められた。回復期間中の平均摂餌量は対照群と同等であったことから、完全に回復したと考えられた。

投与に関連する有害な影響が血液学的検査値（全用量群）及び臨床生化学的検査値（18 mg/kg 及び 36 mg/kg 群）に認められた。血液学的変化では、総白血球数、好中球数、リンパ球数、網状

赤血球数及び血小板数に投与に関連する減少があり、骨髄低形成と一致していた。桿状好中球が36 mg/kg 群の雄に認められたことから、未熟な細胞の早期出現が示唆された。赤血球系パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン及びヘマトクリット値）の変化は一貫性が乏しく、かつ白血球数の変化より小さく、雄におけるヘマトクリット値の変化を除き、36 mg/kg 未満の用量群で一貫して認められることはなかった。回復期間内に全ての血液学的変化は少なくとも部分的に回復した。その他、18 mg/kg 及び 36 mg/kg 群において、HBI-8000 投与に関連する影響が凝固検査値に認められたが、有害な影響ではないと考えられた。

臨床生化学的検査値の変化には、用量依存的なグロブリン及びアルブミンの減少、並びに二次的なカルシウム減少があり、これはリンパ球数減少から示唆される免疫抑制の可能性と一致した。36 mg/kg 群の複数の雄では、明らかな GGT 及び総ビリルビンの増加が生じた。18 mg/kg 及び36 mg/kg 群で尿素窒素が増加したが、クレアチニン及び尿検査値に変化がなかったことから、脱水や栄養状態など、腎以外に対する影響が示唆された。回復期間内に全ての臨床化学的変化は少なくとも部分的に回復した。

投与期間終了時の絶対及び相対臓器重量（体重及び脳重量比）に HBI-8000 投与に関連する影響が認められた。腎重量は雄（9、18、及び 36 mg/kg 群）及び雌（18 mg/kg 及び 36 mg/kg 群）で減少した。36 mg/kg 群の複数の雄で胸腺の小型化が剖検で認められ、9、18 及び 36 mg/kg 群の雌雄で胸腺重量が減少していた。雌では、9、18 及び 36 mg/kg 群で下垂体及び顎下腺重量が減少していた。雄では、全用量群で下垂体の重量減少が生じた可能性があるが、9 mg/kg 群の脳重量比及び 36 mg/kg 群の体重比には影響がなかった。形態学的変化との関連性は雌雄の胸腺に認められ、リンパ球の減少が重量減少を引き起こしたと考えられた。回復期間終了時に、臓器重量の変化は概して対照群のレベルにまで回復したが、一部は体重が回復しなかったために依然として低かった。

HBI-8000 投与に関連する病理組織学的所見としては、18 mg/kg 及び 36 mg/kg 群に骨髄低形成、並びにリンパ節、パイエル板及び胸腺におけるリンパ球枯渇に加え、膵臓表面に炎症が認められた。18 mg/kg 及び 36 mg/kg 群の雌雄に、投与に関連する軽度～中等度の骨髄低形成が認められ、造血細胞／脂肪細胞比に一致した。骨髄低形成は 36 mg/kg 群の雌雄各 10 匹全てで認められ、雄で重症度が高かった。18 mg/kg 及び 36 mg/kg 群の雌雄で、下顎及び腸間膜リンパ節、並びにパイエル板に投与に関連する濾胞性リンパ球枯渇が認められ、発現頻度は 36 mg/kg 群で顕著に高かった。18 mg/kg 及び 36 mg/kg 群の雌雄の胸腺に投与に関連するリンパ球枯渇が認められた（萎縮と記録）。対照群及び全用量群の複数の雌雄に投与に関連する脾臓表面の慢性／線維性炎症が認められ、36 mg/kg 群では癒着に進行しており、発現頻度は雌より雄でわずかに多かった。9 mg/kg 群には HBI-8000 投与に関連する病理組織学的所見は認められなかった。回復期間終了時に全ての病変は回復あるいは改善傾向を示していた。

生死、一般状態所見、眼科学的検査、機能観察総合評価法（FOB）、尿検査及びトロポニン I 測定において、HBI-8000 投与に関連する影響は認められなかった。

36 mg/kg 群の雌雄における 27 日目の 0 時間から投与後 48 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積（$AUC_{(0\text{-}48)}$）は、それぞれ 15000 及び 21600 ng· h/mL、C_{max} は 3670 及び 6640 ng/mL であった。生存率及び一般状態所見に基づき、MTD は 36 mg/kg 以上と判断された。9 mg/kg 群では顕著な病理組織学的影響が認められなかった。しかし、9 mg/kg 群に白血球数、好中球数及びリンパ球数減少が認められたため、NOAEL を判断することはできなかった。

2.6.6.3.3 ラットにおけるHBI-8000の13週間反復経口投与毒性試験及び4週間回復試験（試験番号20092736）

評価資料[4.2.3.2-3] 20092736

GLP適合の13週間経口投与毒性試験及び4週間回復試験を実施し、毒性及び毒性変化の回復性、進行性、又は遅発性について評価した。

雌雄のSprague-Dawley系ラット（15匹／性／群）に3、9、又は27 mg/kgのHBI-8000をQODで1日目から89日目まで経口投与し、回復期間を4週間とした。90日目に各群の10匹／性／群を安楽死させて剖検した。残りの5匹／性／群には4週間の回復期間を設定した。TK試験には追加の7匹／性／投与群（投与0.5、1.5、3、6、12及び24時間後に3匹／性／群）を用いた。

27 mg/kgを投与した雌1匹（動物番号2454）で12日目に計画外の死亡が生じた。安楽殺したこの動物では、瀕死症状（活動低下、脱水の疑い、円背位、浅呼吸、立毛、半眼及び呼吸数増加）が認められた。剖検結果から死因を明らかにすることはできず、病理組織学的検査より、細菌感染に伴う脳及び髄膜の炎症反応が生じた可能性が示唆された。この死亡がHBI-8000投与に関連する可能性は否定できなかった。また、3 mg/kg群の雌1匹（動物番号2390）を試験50日目に安楽殺したが、剖検結果より、死因は被験物質投与に関連するものではなく、おそらくは投与過誤による食道穿孔に起因することが確認された。計画外に死亡したラットを除き、HBI-8000投与に関連する臨床徴候は認められなかった。

9 mg/kg以上の用量群雌雄ではHBI-8000投与に関連する体重増加量減少がみられ、1週目の終わりから試験期間を通して平均体重が低い結果となった。9 mg/kg群の雌雄では、1～89日目における平均体重増加量が対照群と比較して18%低く、89日目の平均体重は対照群より8%（雄）及び7%（雌）低かった。27 mg/kg群では1～89日目における平均体重増加量が対照群と比較して雄で56%、雌で40%低く、89日目の平均体重は対照群より27%（雄）及び12%（雌）低い結果となった。3 mg/kg群では体重及び体重増加量に対して毒性学的に意義がある影響は認められなかった。

9 mg/kg以上の用量群雌雄における投与に関連する体重増加量減少は、概して回復期間内に回復した。89～114日目における9 mg/kg以上の用量群雌雄における平均体重増加量は、対照群と比較して差がない、又はより大きかった。このため、雄の平均体重は、9 mg/kg群では対照群の範囲内に戻り、27 mg/kg群では89日目における対照群より27%低い値から、114日目には対照群より14%低い値にまで改善した。雌では、9 mg/kg群で平均体重増加量は改善されたものの、114日目の平均体重は依然として対照群より7%低く、27 mg/kg群では114日目の平均体重が対照群の範囲内に回復した。

9 mg/kg以上の用量群雌雄における平均摂餌量の変化は、被験物質投与に関連し、体重増加量減少と一致した。9 mg/kg群では、試験期間中における摂餌量の変化は雄で4%～18%の減少、雌で39%の減少～16%の増加の範囲であり、1～89日目を通した全般的な差はそれぞれ18%及び17%の減少であった。27 mg/kg群では、試験期間中における摂餌量の変化は雄で1%～29%の減少、雌で45%の減少～7%の増加の範囲であり、1～89日目を通してはそれぞれ26%及び23%の減少であった。3 mg/kg群の雌雄では摂餌量が減少したものの、対応する毒性学意義がある体重増加量減少がみられなかった。

回復期間中の平均摂餌量は概して対照群より低いままであったが、対応する毒性学的意義がある体重増加量減少がみられなかった。3 mg/kg群の回復期間中における摂餌量変化は、雄で17%の減少～35%の増加、雌で36%の減少～13%の増加の範囲であり、89～116日目を通してそれぞれ

2%の増加及び18%の減少がみられた。9 mg/kg 群では、回復期間中における摂餌量の変化は、雄で 17%の減少～29%の増加、雌で 38%の減少～5%の増加の範囲であり、89～116 日目を通してそれぞれ 1%及び 22%の減少がみられた。27 mg/kg 群では、回復期間中における摂餌量変化は、雄で 22%の減少～23%の増加、雌で 30%の減少～19%の増加の範囲であり、89～116 日目を通してそれぞれ 7%及び 12%の減少がみられた。

3 mg/kg 以上の用量群雄及び 9 mg/kg 以上の用量群雌における総白血球数及び大部分の種類の白血球集団数、27 mg/kg 群の雌雄における血小板数、並びに 9 mg/kg 以上の用量群雌雄における網状赤血球数が、全般的に投与に関連して減少した。さらに、27 mg/kg 群の雌雄では平均赤血球容積及び平均赤血球ヘモグロビン量が減少し、3 mg/kg 以上の用量群雄及び 9 mg/kg 以上の用量群雌では、平均赤血球ヘモグロビン濃度がわずかに増加した。9 mg/kg 以上の用量群雌雄における総白血球数、好中球数、リンパ球数及び網状赤血球数の変化は有害な影響と判断された。その他の変化は、変化の程度が小さく、概して平均値が背景データの範囲内であったことから、有害な影響ではないと判断された。

117 日目の 27 mg/kg 群では、総白血球数及びリンパ球数を除き、血液学的検査値の大部分は背景データの範囲内であった。総白血球数及びリンパ球数は雌雄ともに対照群と比較して依然として低く、背景データの範囲外であった。これらの値は 90 日目の値と比較すると増加したことから、部分的な回復が示唆された。

HBI-8000 投与に関連する臨床化学的検査値の変化には、27 mg/kg 群の雄及び 9 mg/kg 以上の用量群の雌における GGT 増加、9 mg/kg 以上の用量群雌雄における尿素窒素の増加、9 mg/kg 以上の用量群雌雄における総タンパク質、アルブミン及びグロブリンの減少、27 mg/kg 群雌雄におけるアルブミン／グロブリン比の上昇、並びに 27 mg/kg 群雌雄におけるカルシウム及びカリウムの減少があった。

27 mg/kg 群雌雄では、GGT、尿素窒素及びアルブミン／グロブリン比が増加／上昇し、総タンパク質、アルブミン、グロブリン、カルシウム及びカリウムがそれぞれ減少した。27 mg/kg 群では、尿素窒素、総タンパク質、アルブミン、グロブリン及びカリウム（雄のみ）の平均値は背景データの範囲外であった。これらに関連する病理組織学的評価は実施されておらず、これらの所見の意義は明らかではない。

投与期間中の 3 mg/kg 群では、毒性学的に意義がある HBI-8000 投与に関連する臨床化学的検査値の変化はなかった。9 mg/kg 以上の用量群に生じた HBI-8000 投与に関連する臨床化学的検査値の変化は全て回復期間内に回復した。

剖検所見としては、9 mg/kg 以上の用量群で腸間膜リンパ節の変色（雄）、脾臓の淡色巣及び癒着（雄）、胃の暗色化（雌）、並びに胸腺の小型化（雄）が、さらに 27 mg/kg 群で下垂体の蒼白化及び変色（雄）、甲状腺の蒼白化（雄）、盲腸の暗色化（雌）、腸間膜リンパ節の暗色化（雌）、胃の暗色化（雄）、空腸及び回腸の暗色化（雄）、並びに胸腺の小型化（雌）が認められた。

被験物質投与に関連する臓器重量として、3 mg/kg 以上の用量群で前立腺重量の減少、9 mg/kg 以上の用量群で最終体重（雄）、下垂体、甲状腺（雄）及び胸腺（雄）重量の減少、27 mg/kg 群では最終体重（雌）及び胸腺（雌）重量の減少が認められた。回復期間の終了時点で、前述した臓器重量の変化は、部分的あるいは完全に回復した。

骨髄低形成は、造血組織（骨髄細胞、赤血球系細胞及び巨核球）の減少を特徴とし、脂肪組織の明らかな増加を引き起こした。血液学的検査では骨髄系細胞が赤血球系細胞よりわずかに強い影響を受けていたが、骨髄の病理組織学的検査でその相違は明らかではなかった。

脾臓の単核球炎症及び線維症は、被膜における線維性結合組織巣の出現、並びに結合組織内のマクロファージ及びリンパ球の集積を特徴としていた。他の腹部組織の漿膜表面には同様の所見は認められなかった。

27 mg/kg 群の雄 4 匹に心筋出血、心外膜における混合細胞性炎症、及び／又は心臓の心膜脂肪組織における混合細胞性炎症が認められた。肺に出血、浮腫及び線維増殖が生じた動物番号 2428 は例外である可能性があるものの、残りの 3 匹に心臓所見を説明するその他の所見は認められなかった。

肺胞の組織球集積（肺胞の組織球症）は、肺胞内のマクロファージ集積及び輪郭不明瞭な空間（空胞）を有する細胞質を特徴としていた。

盲腸、回腸、空腸及び胃に出血が認められた。これらの所見の発現頻度は極めて低く、同様の所見は一般的に認められるものではないが、対照群の 1 匹の雄の結腸にも出血が認められた。27 mg/kg 群の動物で発現頻度及び重症度（空腸）がより高かったことから、被験物質投与に関連する可能性が示される。

下垂体前葉の萎縮は、下垂体全体の大きさ及び前葉細胞の大きさの減少を特徴としていた。好酸性細胞が最も影響を受けていたが、変化が明らかで特定が容易であるという事実に起因する可能性がある。

胸腺リンパ球枯渇はリンパ球系細胞の喪失を特徴としており、重症度の高い例では正常な胸腺構造が喪失していた。この変化は被験物質投与に関連すると考えられた。しかし、リンパ球枯渇が認められた用量群では最終体重が減少していたことから、ストレスが原因である可能性が示唆された（Everds 2013）。

GALT、下顎及び腸間膜リンパ節のリンパ球枯渇は、濾胞及び濾胞内皮質におけるリンパ球系細胞の喪失を特徴としており、被験物質投与に関連すると考えられた。しかし、リンパ球枯渇が認められた用量群では最終体重が減少していたことから、ストレスが原因である可能性が示唆された（Everds 2013）。

甲状腺の濾胞拡張は濾胞細胞の扁平化を特徴としており、このため濾胞は通常より大きく（拡張して）みえたが、甲状腺全体は小型化した。甲状腺周辺部で顕著にみられる濾胞拡張は加齢とともに増加する（Frith 2000）。

乳腺の萎縮は対照群及び投与群の動物で認められた。投与群で発現率及び／又は重症度が高いことから、被験物質投与に関連することが示唆された。しかし、乳腺の萎縮が認められた用量群では最終体重が減少していたことから、一般状態不良の動物に見られる変化である可能性が示唆された（Rudmann 2012）。以上の変化の多くは、部分的又は完全に回復した。脾臓を除き、117 日目に下垂体、甲状腺及び肺に認められた変化は、90 日目に比べて頻度も重症度も低かった。脾臓では、90 日目に比べ 117 日目の単球浸潤の程度は低くなったが、嚢線維症の頻度と程度は強く、回復性は認められなかった。

眼科学的検査所見、FOB 及び尿検査値には、被験物質投与に関連する毒性学的意義がある変化がなかった。

89 日目の TK 解析において、3、9 及び 27 mg/kg 群の $AUC_{(0\text{-}24)}$値は雄でそれぞれ 7.00、1900 及び 5270 ng· h/mL、雌でそれぞれ 34.2、2150 及び 8130 ng· h/mL であった。C_{max} は雄でそれぞれ 1.76、245 及び 880 ng/mL、雌でそれぞれ 6.61、497 及び 3920 ng/mL であった。概して、雄の TK 曝露量は雌より低かった。

結論として、3、9 及び 27 mg/kg の HBI-8000 を 2 日に 1 回 13 週間ラットに強制経口投与した。

27 mg/kg 群の雌 1 匹が早期死亡した。9 mg/kg 以上の用量群雌雄では摂餌量減少を伴う体重増加量減少が生じて体重が減少した。9 mg/kg 以上の用量群雌雄では有害な影響と考えられる総白血球数、好中球数、リンパ球数及び網状赤血球数の減少が認められたほか、有害な影響とは考えられない血液学的検査値の変化もみられた。9 mg/kg 以上の用量群で剖検所見、3 mg/kg 以上の用量群で臓器重量の変化及び 3 mg/kg 以上の用量群で病理組織学的所見が認められた。全ての所見ではないものの、大半の変化が部分的ないし完全に回復した。以上の結果から、NOAEL は 3 mg/kg、MTD は 9 mg/kg と判断された。3 mg/kg の HBI-8000 投与時の $AUC_{(0\text{-}24)}$は雄で 7.00 ng· h/mL 及び雌で 34.2 ng· h/mL、C_{max} は雄で 1.76 ng/mL 及び雌で 6.61 ng/mL であった。

2.6.6.3.4 イヌにおける HBI-8000 の 19 日間反復経口投与用量設定試験（試験番号 11296-7）

参考資料[4.2.3.2-4] 11296-07

MTD を明らかにする目的で、非 GLP の経口投与用量設定試験を実施した。

摂餌下又は絶食下で溶液（強制経口投与）、カプセル、又は錠剤の HBI-8000 を QD で経口投与した。当初、1.0 mg/kg/日を 14 日間、複数の剤形及び摂餌条件下で投与した。忍容性が示されたため、9 日目から用量を変更して 1.0、1.5 及び 2.0 mg/kg とした。引き続き忍容性が示されたため、試験期間を延長して 20 日間とし、14 日目に用量を 2.0 及び 2.5 mg/kg に変更して 19 日目まで継続した。

2 匹（1 匹は錠剤及びカプセル製剤として 1.0、2.0 及び 2.5 mg/kg を投与、別の 1 匹は溶液として 1.0、1.5 及び 2.5 mg/kg を投与）が、おそらく下血及びそれに伴う脱水に関連して死亡した。

その他、腸管出血、紫色調への肺の変色、骨髄低形成、トリグリセリド値低下及び白血球数減少が認められた。さらに、強制経口投与した HBI-8000 溶液（10%ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン及び 10%プロピレングリコールを含有する約 pH 2.0 の脱イオン水）では、固形剤形と比較して曝露量が高くバラツキも少ない可能性があったものの、HBI-8000 の血漿中濃度に対する明らかな摂餌の影響はなかった。

体重、一般状態観察所見及び臨床病理学的検査値に対する影響は全用量群で一致していた。試験初期には、一部の動物で食欲不振、軟便、下痢、脱水及び摂餌量の減少が認められた。用量を変更した 14 日目以降試験終了まで、一般状態所見（黒色下痢、下血、嘔吐及び肛門出血）の頻度と程度が増加した。

死亡が生じたことから、MTD は 2.0 mg/kg 未満と判断された。

2.6.6.3.5 イヌにおける HBI-8000 の 4 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復試験（試験番号 1515-001）

評価資料[4.2.3.2-5] 1515-001

GLP 適合の 4 週間経口投与毒性試験及び 4 週間回復試験を実施し、毒性及び毒性変化の回復性、進行性、又は遅発性について評価した。

5 匹／性のビーグル犬 3 群に HBI-8000 を、当初それぞれ 0.25、0.75、又は 1.25 mg/kg の用量を QD で強制経口投与した。5 匹／性の対照群を設定し、溶媒の 10%ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン及び 10%プロピレングリコールを含有する pH 2.5（± 0.1）の脱イオン水を QD で強制経口投与した。12 日間 QD で強制経口投与した結果、中用量及び高用量群の動物に重篤な毒性が発現したため、残りの試験期間では投与頻度を QOD に変更した。雄 1 匹（動物番号 741）を

1.25 mg/kg 群に追加し、試験 11 日目及び 12 日目に HBI-8000 を初回及び 2 回目投与して、その後は計 28 日間 QOD で投与した。投与期間終了後、所定の動物（2 匹／性／群）を 28 日間の回復期間中生存させた。

投与期間中に瀕死状態を示した 1.25 mg/kg 群の雄 3 匹及び雌 1 匹を安楽殺した。病理組織学的検査の結果、骨髄低形成、並びにリンパ節、脾臓及び胸腺におけるリンパ球枯渇によって肺炎が生じて瀕死に至ったことが示された。他のイヌは全て剖検予定日まで生存した。

被験物質投与に関連する一般状態所見として活動低下、食欲不振、削痩及び水様／粘液／変色便が認められた。これらの所見は 0.75 mg/kg 以上の用量群雌雄で 7 日目頃に最初に認められ、投与期間中継続した。食欲不振及び削痩の一般状態所見が繰り返し認められたため、0.75 mg/kg 及び 1.25 mg/kg 群の動物には試験 2 週目から補助餌料を与えた。投与頻度の変更後、0.75 mg/kg 及び 1.25 mg/kg 群中、全動物ではないものの数匹の動物で一般状態所見が改善した。認められた影響を総合的に判断し、0.75 mg/kg 及び 1.25 mg/kg 群の一般状態所見は有害な影響と判断された。これらの影響の大部分は回復期間内に可逆性を示した。28 日間にわたり 1.25 mg/kg を主に QOD で投与された動物番号 741 には、顕著な異常が認められなかった。

0.75 mg/kg 及び 1.25 mg/kg 群における平均体重には HBI-8000 投与に関連する影響が認められた。試験期間中、0.75 mg/kg 群雌雄の平均体重は対照群と比較してそれぞれ 12%～16%低かった。試験期間中、1.25 mg/kg 群雌雄の平均体重は対照群と比較してそれぞれ 14%～25%低かった。全用量群（対照群を含む）の平均体重は、投与前の値から 1 週目まで減少し、0.75 mg/kg 及び 1.25 mg/kg 群の平均体重は継続して減少した。影響の程度に基づき、0.75 mg/kg 以上の用量群におけるこれらの作用は有害な影響と判断された。動物番号 741 では試験期間中に平均体重に対する明らかな影響はなかった。回復期間中に 0.75 mg/kg 及び 1.25 mg/kg 群の体重は対照群と同等に増加した。

0.75 mg/kg 及び 1.25 mg/kg 群の摂餌量には被験物質投与に関連する影響が認められた。12 日目までの 0.75 mg/kg 群雌雄の平均摂餌量は対照群と比較してそれぞれ 60%～69%低く、12 日目までの 1.25 mg/kg 群雌雄の平均摂餌量は対照群と比較してそれぞれ 64%～99%低かった。0.75 mg/kg 及び 1.25 mg/kg 群の大部分の動物には 12 日目から補助餌料を与えたため、12 日目以降の平均摂餌量を評価することはできず、回復期間を含めたこれ以降の実際の摂餌量は明らかではない。12 日目までに認められた摂餌量への影響は、上述した平均体重への影響と整合している。

心電図（ECG）波形の質的異常はなく、心拍数、PR 間隔及び QRS 時間では被験物質投与に関連する影響は認められなかった。11 日目の 1.25 mg/kg 投与後における雌の PR 間隔は、対照群と比較して統計学的に有意に延長した。11 日目及び 20 日目における 1.25 mg/kg 群雌の QT 間隔は統計学的に有意に延長した。雌雄のデータを合算して溶媒対照群のデータと比較したところ、10%超の QTc 延長が、0.75 mg/kg 群で 1 回（11 日目の投与後に）、1.25 mg/kg 群で 2 回（11 日目及び 20 日目の投与後に）生じた。QTc 変化は、少なくとも部分的には、被験物質投与に関連する血清カリウム及び血清カルシウムの低下に起因する可能性がある（以下参照）。0.25 mg/kg 投与では ECG パラメータの定性的及び定量的異常は認められなかった。0.75 mg/kg/日及び 1.25 mg/kg/日投与が QTc に及ぼした作用は有害な影響と判断された。

0.75 mg/kg 以上の用量群雌雄で、被験物質投与に関連する赤血球系パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン及びヘマトクリット値）の減少が認められ、雌の重症度がより高かった。回復期間終了時には、赤血球数減少は雄で完全に、雌で部分的に回復していた。網状赤血球数は 0.75 mg/kg 及び 1.25 mg/kg 群の雌雄で対照群と比較して低く、これは他の採血時と比較して 2 週目でより顕

著であった。回復期間内に網状赤血球数は改善又は回復した。リンパ球数は 2 週目に 0.75 mg/kg 及び 1.25 mg/kg 群の雌雄で対照群と比較して低かった。雌雄ともリンパ球数の回復は投与終了時までに始まり、回復期間中持続した。2 週目と他の採血時との間における血液学的検査値の相違は、QD から QOD への投与間隔の変更に起因する可能性がある。

被験物質投与に関連する活性化部分トロンボプラスチン時間の延長は、対照群と比較して 1.25 mg/kg 群の雌雄で 2 週目に認められたが、投与期間中の 6 週目までに改善が始まって回復期間中持続したため、同様に投与間隔の変更に起因する可能性がある。

0.75 mg/kg 以上の用量群雌雄で、対照群と比較して被験物質投与に関連する電解質（ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウム及びリン）の変化が認められた。これらの変化は、部分的には消化管液及び電解質の減少、あるいはアルブミン減少に起因する可能性がある。1.25 mg/kg 群の雌 2 匹で 2 週目に測定可能なレベルのトロポニン I が認められた。0.75 mg/kg 及び 1.25 mg/kg 群の雌雄で 2 週目及び／又は投与終了時に総タンパク質、アルブミン及びアルブミン／グロブリン比の散発的で軽度の低下が認められ、これらは被験物質投与に関連する可能性があるものの、程度が低いため有害な影響ではないと判断された。また、1.25 mg/kg の雌雄で 4 週目に被験物質投与に関連するクレアチニンの減少が認められたが、その程度から有害な影響ではないと判断された。全ての臨床化学的検査値の変化は、6 週目以前及び回復期間内に回復した。

雌雄イヌの胸腺重量は全用量群で減少しており、被験物質投与に関連して病理組織学的検査で認められた胸腺萎縮と関連していると考えられた。1.25 mg/kg/日群の雌雄で脾臓重量が減少し、病理組織学的検査で認められた脾臓のリンパ球枯渇と関連すると考えられた。回復期間の終了時点で、全ての臓器重量は全般的に対照群と同じレベルに回復した。

被験物質投与と関連した唯一の剖検所見は胸腺及び脾臓の小型化であり、これらの所見は上記の臓器重量に対する影響及び病理組織学的には萎縮又はリンパ球枯渇と相関していた。

病理組織学的検査では、骨髄、リンパ節、脾臓及び胸腺に被験物質投与に関連する影響が認められた。1.25 mg/kg 群では骨髄低形成、並びにリンパ節、脾臓及び胸腺のリンパ球枯渇が認められ、4 匹に肺炎を生じ安楽殺に至ったと考えられた。0.75 mg/kg 群の雄 1 匹に軽度の骨髄低形成及び中等度の胸腺萎縮が生じた。これらの変化は 4 週間の回復期間終了時には認められなかった。これらの作用は 0.75 mg/kg 及び 1.25 mg/kg 投与による有害な影響と判断された。

眼科学的検査、並びに収縮期、拡張期及び平均動脈圧値には被験物質投与に関連する所見が認められなかった。尿検査値には被験物質投与に関連する影響が認められなかった。

0.25 mg/kg 群には毒性学的に意義がある変化が認められなかったこと、さらには 0.75 mg/kg 以上の用量群で体重、摂餌量、病理組織学的所見及び QTc 間隔に被験物質投与と関連した有害な影響が認められたことから、本試験の NOAEL は 0.25 mg/kg と判断された。当該用量における $AUC_{(0-48)}$ は雄で 58.2 ng・h/mL 及び雌で 29.8 ng・h/mL で、C_{max} は雄で 22.7 ng/mL 及び雌で 13.9 ng/mL であった。

2.6.6.3.6 イヌにおける HBI-8000 の 13 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復試験（試験番号 20092737）

評価資料[4.2.3.2-6] 20092737

GLP 適合の QOD での 13 週間経口投与毒性試験及び 4 週間回復試験を実施し、毒性及び毒性変化の回復性、進行性、又は遅発性について評価した。

雌雄各 5 匹／群に 0.25、0.75、又は 1.25 mg/kg の HBI-8000 を QOD で 13 週間強制経口投与し

た。13 週間投与終了時に、各投与群の雌雄各 3 匹を安楽殺して剖検した。各群残りの雌雄各 2 匹には 4 週間の回復期間を設定した。

13 週間の投与期間及び 4 週間の回復期間を通じて死亡は認められなかった。HBI-8000 の全用量群で歩行異常、四肢の使用制限、及び円背位が認められたが、これらは断続的であり、無治療で、あるいは限定的な獣医学的治療（3～7 日間のメロキシカム投与）で回復した。これらの徴候は回復し一過性であったことから、有害な影響ではないと判断された。

1.25 mg/kg 群の雄には主に試験の最初の 5 週間に体重増加量のわずかな減少が生じ、対照群と比較して 1～89 日目を通した体重増加量は 38%低く、89 日目の平均体重は 7%低かった。その他に平均体重及び体重増加量に対する影響はなかった。1.25 mg/kg 群雌雄の回復期間中における体重増加量は対照群より大きかったため、結果的に 1～119 日目の試験期間を通した体重増加量は大きくなった。

1.25 mg/kg 群の雄に認められた体重増加量減少は、最初の 5～6 週間中の摂餌量減少と一致した。その他の群の雌雄における摂餌量の変化は、体重及び体重増加量に影響することはなかった。摂餌量減少及び全般的な一般状態の悪化を踏まえ、1.25 mg/kg/日群の 3 匹には補助餌料を与えた。

HBI-8000 投与に関連する血液学的検査値における有害な影響として、90 日目に 0.75 mg/kg 以上の用量群雌雄における平均赤血球系パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン及びヘマトクリット値）、並びに平均リンパ球数に減少が認められた。これらの変化は 119 日目には正常範囲内に回復した。

被験物質投与に関連する臨床化学的検査値の変化として、13 日目及び 90 日目の 1.25 mg/kg 群で尿素窒素の増加が認められた。また、13 日目の 0.75 mg/kg 以上の用量群及び 90 日目の 1.25 mg/kg 群の雌雄でグロブリンの増加、並びにアルブミン及びアルブミン／グロブリン比の減少が認められた。

被験物質投与に関連する剖検所見が、0.75 mg/kg 以上の用量群で肺（暗色化及び斑状の変色）に、1.25 mg/kg 群で生殖器官（精巣、精巣上体、前立腺、卵巣及び子宮の小型化）、リンパ組織（縦隔リンパ節の暗色化、胸腺への異物沈着及び脾臓の淡色巣）、及び皮下組織（異物沈着）に認められた。回復期間終了時には被験物質に関連する剖検所見が認められなかった。

HBI-8000 投与に関連する臓器重量の変化としては、0.75 mg/kg 以上の用量群で精巣上体、前立腺、卵巣、精巣及び子宮重量の減少、1.25 mg/kg 群で最終体重（雄）、甲状腺（雄）及び胸腺重量（雄）の減少が認められた。また、0.75 mg/kg 以上の用量群で肺重量（雄）の増加、1.25 mg/kg 群で肺重量（雌）の増加が認められた。回復期間終了時（119 日目）には、甲状腺、卵巣、子宮及び胸腺の重量に変化は認められなかった。一方、雄の生殖器官（精巣上体、前立腺及び精巣）及び肺の重量変化は遺残していた。

被験物質投与に関連する病理組織学的変化として、0.75 mg/kg 以上の用量群で GALT のリンパ球枯渇、肺胞における混合細胞性炎症、並びに精巣上体、前立腺、子宮及び卵巣の萎縮が、1.25 mg/kg 群で甲状腺の濾胞萎縮、肺胞の出血、脾臓の結節性過形成、腸間膜リンパ節、縦隔リンパ節及び胸腺のリンパ球枯渇、並びに精巣精細管、膣及び子宮頚管の萎縮が認められた。

被験物質投与に直接起因して生じた病理組織学的変化は、0.75 mg/kg 以上の用量群で GALT、肺（炎症）及び卵巣に、1.25 mg/kg 群で甲状腺、肺（出血）、腸間膜リンパ節、胸腺及び精巣に認められた。これらの所見のうち、肺の炎症（出血を伴う混合性細胞浸潤）、並びに卵巣及び精細管の萎縮は有害な影響と考えられた。

被験物質投与に関連する二次的変化と考えられた病理組織学的変化は、0.75 mg/kg 以上の用量

群で精巣上体、肺、前立腺及び子宮に、1.25 mg/kg 群で子宮頸部、縦隔リンパ節、脾臓及び膣に認められた。回復期間の終了時点で、甲状腺、肺（出血）、腸間膜リンパ節、胸腺及び脾臓の病理組織学的所見は完全に回復した。さらに、GALT、肺（混合性細胞浸潤）、雄性生殖器（精巣、精巣上体及び前立腺）、雌性生殖器（子宮頸部、子宮及び膣）、並びに縦隔リンパ節の病理組織学的所見は、部分的に回復した。

眼科学的検査、心電図、血液凝固検査、臨床化学的検査及び尿検査値には毒性学的に意義がある HBI-8000 投与に関連する変化は認められなかった。

HBI-8000 の 0.25、0.75 及び 1.25 mg/kg 群における投与期間終了時の平均 $AUC_{(0-24)}$値は、雄でそれぞれ 55.6、371 及び 455 ng· h/mL、雌でそれぞれ 79.0、415 及び 669 ng· h/mL であった。HBI-8000 の 0.25、0.75 及び 1.25 mg/kg 群における平均 C_{max} 値は、雄でそれぞれ 22.0、165 及び 209 ng/mL、雌でそれぞれ 38.1、172 及び 283 ng/mL であった。

以上の結果に基づき、NOAEL 及び MTD はそれぞれ 0.25 mg/kg 及び 1.25 mg/kg 以上と判断された。0.25 mg/kg の HBI-8000 投与時の $AUC_{(0-24)}$は、雄で 55.6 ng· h/mL、雌で 79.0 ng· h/mL、C_{max} は雄で 22.0 ng/mL、雌で 38.1 ng/mL であった。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

2.6.6.4.1 ネズミチフス菌及び大腸菌を用いる復帰突然変異試験（試験番号 9601677）

評価資料[4.2.3.3.1-1] 9601677

HBI-8000 における遺伝毒性の可能性を検討する目的で、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。

ラット肝ミクロソーム（S9 mix）の存在下及び非存在下において、ネズミチフス菌（*Salmonella typhimurium*）（TA1535、TA1537、TA98、及び TA100 株）及び大腸菌（*Escherichia coli*）WP2 *uvrA* 株に対し、5000 μg/プレート（本アッセイでの標準的な限界用量）以下の濃度範囲における HBI-8000 で、プレート法による細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。標準的な陽性対照物質に対する細菌株の反応によって、本試験系の感度及び S9 mix の活性を確認した。

HBI-8000 曝露後に、試験菌株の不十分な生育又は消失、及び復帰変異コロニー数の大幅な低下が認められなかったことから、試験に用いた濃度の被験物質は試験菌株に対し毒性を示さないことが示された。代謝活性化系の S9 mix の存在下及び非存在下で、高濃度の HBI-8000 処理では沈殿が認められたことから、被験物質の最大曝露量であることが示唆された。S9 mix の存在下及び非存在下で、いずれの濃度の HBI-8000 曝露によっても、試験菌株に復帰変異体コロニー数の明らかな増加は認められなかった。

以上、本 *in vitro* 試験の結果、HBI-8000 は変異原性陰性と判断された。規制当局のガイドラインに従って実施した本 *in vitro* 変異原性試験の結果から、HBI-8000 に遺伝毒性作用は認められなかった。

2.6.6.4.2 ヒト末梢血リンパ細胞における *In Vitro* 哺乳類染色体異常試験（試験番号 9601678）

評価資料[4.2.3.3.1-2] 9601678

HBI-8000 における遺伝毒性の可能性を検討することを目的に、ヒト末梢血リンパ細胞における *in vitro* 哺乳類染色体異常試験を実施した。

ヒト末梢血リンパ細胞に 0.8～390 μg/mL の HBI-8000 を添加して、4 時間（S9 mix の存在下及び非存在下）、又は 21 時間（S9 mix の非存在下）培養した。S9 mix は、哺乳類の代謝活性化モデルとして使用した。陽性対照物質のマイトマイシン C 及びシクロホスファミド一水和物では、染色体損傷を示す細胞の比率が統計学的に有意に増加し、本試験系の感度及び S9 mix の効果が確認された。

いずれの実験条件下においても明らかな細胞毒性は認められなかった。標準的な最高濃度である 1 mM の HBI-8000 を添加した培養細胞では、分裂中期異常の発現率に統計学的に有意な増加は認められなかった。S9 mix 存在下の最高用量処理終了後には、培地に沈殿が認められた。

規制当局のガイドラインに従って実施した本 *in vitro* 染色体異常試験の結果、HBI-8000 に遺伝毒性作用は認められなかった。

2.6.6.4.3 ラットにおける *In Vivo* 小核試験（試験番号 9800415）

評価資料[4.2.3.3.2-1] 9800415

HBI-8000 における遺伝毒性の可能性を検討することを目的に、ラットを用いて強制経口投与の小核試験を実施した。

各群雌雄 5 匹の Sprague-Dawley 系ラットに 10、20、又は 40 mg/kg/日（MTD）の HBI-8000 を 2 日間強制経口投与した。安楽殺した各ラットから左右の大腿骨を摘出した。骨髄を摘出して遠心分離し、顕微鏡のスライドグラスに容易に塗抹できるよう少量のウシ胎仔血清で細胞ペレットを再懸濁した。塗抹標本を固定して蛍光色素で染色した。計 4000 個／匹の幼若赤血球（IE）について染色体損傷を示す小核の有無を計数した。さらに、骨髄毒性の可能性を検討するため、計 500 個／匹以上の赤血球について IE の比率を計数した。

HBI-8000 を投与したラットでは小核を有する幼若赤血球（MIE）の明らかな増加は認められず、本 *in vivo* 試験において HBI-8000 は染色体損傷を誘導しないことが示された。さらに、IE の比率に明らかな減少が認められなかったことから、検討した用量範囲の被験物質に骨髄毒性がないことが示された。

以上、雌雄の Sprague-Dawley 系ラットに対し MTD である 40 mg/kg/日以下の用量で 2 回（0 時間目及び 24 時間目）強制経口投与した小核試験の結果、HBI-8000 は IE に対し染色体損傷を誘発しなかった。

2.6.6.5 がん原性評価

がん原性試験は実施しなかった。ICH S9 ガイドラインに従い、がん原性試験は不要と判断された。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

生殖発生毒性試験は実施しなかった。ICH S9 ガイドライン（2010）に従い、雌雄の受胎能については、ラット（試験番号 1515-002 及び 20092736）並びにイヌ（試験番号 1515-001 及び 20092737）の反復投与試験における生殖器の詳細な検査により評価した。ラットの 13 週間反復経口投与試験（試験番号 20092736）では、前立腺重量の減少が観察された。イヌの 13 週間反復経口投与毒性試験（試験番号 20092737）では、被験物質投与に関連する精巣所見（精巣の小型化、精巣重量減少及び精細管の萎縮）、及び前立腺の萎縮が雄で認められた。また、卵巣と子宮の萎縮が雌で認められた。これらの変化はすべて、部分的に回復した。精巣や卵巣の重量減少や病理組織学的所

見は、HBI-8000 に類似する HDAC 阻害活性に関連しロミデプシンでも認められている[イストダックス点滴静注用 10 mg 審議結果報告書 （平成 29 年 6 月 7 日）]。反復投与毒性試験で認められた雌雄の生殖器におけるこれらの所見に基づいて、HBI-8000 は男女の受胎能に影響を与える可能性があることが示唆された。

HBI-8000 は進行がん患者の治療を目的とした医薬品であることから、ICH S9 ガイドラインに従い、これらの情報に基づき、さらなる受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験は不要と判断した。

ICH S9 ガイドラインでは、「抗悪性腫瘍薬の胚・胎児発生に関する試験は、製造販売承認申請までには実施すべきであるが、遺伝毒性が陽性で、分裂の速い細胞（例：陰窩細胞、骨髄など）を標的とする医薬品や、発生毒性を誘発することが既に知られている系統の医薬品について、これらの試験は製造販売承認申請においても必須でない」と記載されている。以下の情報に基づき、HBI-8000 はこの系統に該当すると考えられることから、ICH S9 ガイドラインに従い、胚及び胎児発生に関する毒性試験は不要と判断した。不要な試験の実施は、動物倫理（3R の原則）の観点からも不適切と考える。

- HBI-8000 に遺伝毒性は認められなかったが、骨髄が標的であり、ラット及びイヌにおける一般毒性試験で骨髄低形成が認められている。骨髄及びリンパ抑制が、いずれの種の反復経口投与毒性試験でも一貫した毒性作用として観察された
- HDAC 阻害作用に起因する催奇形性が複数の文献で報告されている（Eikel 2006; Menegola 2006; Giavini 2014）。HDAC 阻害剤の中、entinostat（MS-275）及びボリノスタットは、それぞれ、ベンズアミドクラスの選択的クラス I HDAC 阻害剤及びヒドロキサム酸クラスの汎-HDAC 阻害剤を代表している（Eckschlager 2017）。entinostat（MS-275）及びボリノスタットはいずれも発生毒性を有する薬剤として知られている（Giavini 2014; Wise 2007）。化学構造の類似性に加え、HDAC アイソタイプの阻害における活性と選択性より、HBI-8000 は、ベンズアミドクラスの選択的クラス I HDAC 阻害剤に分類され、HBI-8000 は *in vitro* 及び *in vivo* で entinostat と同様の薬力学的プロファイルを示した（2.6.2 薬理試験概要文及び Ning 2012 を参照）。さらに、HBI-8000 は *ex vivo* においてボリノスタットと同レベルまで、ヒト PBMC 中のアセチル化ヒストン H3 レベルを上昇させた（2.6.2 薬理試験概要文）。したがって、HBI-8000 は、これら HDAC 阻害剤に共通する毒性として胚・胎児発生毒性を有する可能性が非常に高い。

HBI-8000 は進行がん患者の治療を目的とした医薬品であることから、ICH S9 ガイドラインに従い、出生前及び出生後の毒性試験は不要と判断した。

2.6.6.7 局所刺激性試験

HBI-8000 の予定臨床投与経路は経口であることから、局所刺激性試験は実施しなかった。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 原薬の潜在的不純物 不純物F* のネズミチフス菌を用いる復帰突然変異試験（試験番号[redacted]08-368）

参考資料[4.2.3.7.6-1][redacted]08-368

HBI-8000 原薬の合成に使用する出発物質であり、製剤の潜在的な不純物である 不純物F* の遺伝毒性を検討する目的で、ネズミチフス菌（*Salmonella typhimurium*）（TA1535、TA1537、TA98、及び TA100 株）及び大腸菌（*Escherichia coli*）WP2 *uvrA* 株を用いて、復帰突然変異試験を実施した。

1 回目の実験及び確認実験では、いずれも 15、50、150、500、1500 及び 5000 µg/プレートの濃度の 不純物F* を 3 回試験した。1 回目の実験では 1.5 µg/プレート及び 5 µg/プレートでも検討した。いずれの細胞株のいずれの濃度においても沈殿は認められなかった。細胞毒性（すなわち自発的な復帰変異体及び／又は試験菌株の減少）は、1500 µg/プレート以上では代謝活性化系の存在下で TA1537 株に、5000 µg/プレートでは代謝活性化系の存在下及び／又は非存在下で TA1535 及び TA100 株に、並びに大腸菌 WP2 *uvrA* 株に認められた。陽性反応の判断基準に合致する復帰変異コロニー数増加は、代謝活性化系の存在下で TA1537、TA98、及び TA100 株に認められた。1 回目の実験では代謝活性化系の非存在下で TA98 株も軽微に陽性であったが、確認実験では陰性であった。本試験条件下において、代謝活性化系の存在下で、ネズミチフス菌 TA1537、TA98、及び TA100 株に対し 不純物F* は変異原性陽性であった。

以上の結果、 不純物F* は遺伝毒性を示した。しかし、最終製剤中の 不純物F* の量は多くはない。したがって、HUYABIO は最終出荷判定基準として本物質の規格を 5 ppm に設定し、遺伝毒性を有する出発物質の出荷前の最終製剤からの除去についての管理を継続する。

2.6.6.8.2 BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞を用いた *In Vitro* 光毒性試験（試験番号 20245854）

評価資料[4.2.3.7.7-1] 20245854

HBI-8000 の光毒性を評価する目的で、BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞を用いた *in vitro* 光毒性試験を GLP 適合下で実施した。陽性対照物質にはプロメタジンを用いた。

用量設定試験を実施したが、細胞毒性の IC_{50} 値を求めることはできなかった。本試験では、5 J/cm^2 の UVA、23 mJ/cm^2、24 mJ/cm^2、又は 25 mJ/cm^2 の UVB を照射した。細胞毒性の IC_{50} 値が求められない場合には、光毒性の評価には MPE 値が用いられる。プロメタジンの MPE 値が陽性基準値を超えていたのに対し、HBI-8000 の MPE 値は陽性基準値を下回っていた。

本試験の結果、HBI-8000 は光毒性反応を引き起こさないことが示された。

2.6.6.9 総括及び結論

毒性試験プログラムとして、Sprague-Dawley 系ラット及びビーグル犬を用いた用量設定試験、4 週間及び 13 週間毒性試験を実施した。

ラット及びイヌには類似する毒性徴候がみられた。摂餌量減少は体重減少を引き起こした。下痢は頻回に生じた。軽度～中等度の骨髄低形成が生じ、白血球数、好中球数、リンパ球数、網状赤血球数及び血小板数の減少に至った。さらに、リンパ節にはリンパ球枯渇が生じた。グロブリン、アルブミン及びカルシウム値は減少した。胃、小腸、大腸及び心筋における出血が低頻度で、

＊新薬承認情報提供時に不純物名を置き換え

特に高用量群で認められた。肺に出血及び線維症を伴う炎症が、特に高用量群に認められた。試験結果からは、HBI-8000 の曝露量が小さい場合には毒性が低下するため、QD 投与より QOD 投与の忍容性が良好であることが示された。

イヌ 4 週間試験で認められた QTc 延長は、被験物質投与に関連した血清カリウム及び血清カルシウムの減少に続発する変化と考えられた。イヌ 13 週間試験では QTc 間隔の変化は認められなかった。

ラットでは、3～40 mg/kg の用量範囲で QOD 投与した。MTD は 40 mg/kg QOD 未満、NOAEL は 3 mg/kg QOD であった。イヌでは、0.25～2.5 mg/kg の用量範囲で検討した。1～2.5 mg/kg QD の 21 日間投与では、MTD が 2 mg/kg 未満であることが示された。イヌ 4 週間試験では、0.25～1.25 mg/kg QD の 12 日間投与では顕著な毒性が生じたため、残りの試験期間では用法を QOD に変更した。13 週間の QOD 投与の結果、NOAEL は 0.25 mg/kg と判断された。

予定臨床用法用量（40 mg 週 2 回 [BIW]投与の 25 日目）における平均 $AUC_{0\text{-}tau}$ は 6010 ng· h/mL であり、ラット及びイヌにおける 13 週間反復経口投与試験で示された MTD での平均 $AUC_{(0\text{-}24)}$の 2.8～13.2 倍にあたる（表 2.6.6-2）。しかし、これらの毒性試験で認められた所見は、臨床試験で認められた有害事象と同等であると考えられた（2.7.4 臨床的安全性の概要参照）。

表 2.6.6-2 ラット及びイヌにおける 13 週間反復経口投与毒性試験の最大耐量（MTD）でのトキシコキネティクスパラメータ

Species	MTD (mg/kg)	$AUC_{(0\text{-}24)}$ (ng·h/mL)	C_{max} (ng/mL)
Rat[a)]	9	1900 (male) 2150 ng·h/mL (female)	245 (male) 467 (female)
Dog[b)]	>1.25	455 (male) 669 (female)	209 (male) 283 (female)

$AUC_{0\text{-}24}$ = 0 時間から 24 時間までの血中濃度－時間曲線下面積; C_{max} = 最大血中濃度; MTD = 最大耐量.
a) ラットにおける 13 週間反復経口投与後 4 週間回復毒性試験（試験番号 20092736）89 日目
b) イヌにおける 13 週間反復経口投与毒性後 4 週間回復毒性試験（試験番号 20092737）89 日目

遺伝毒性試験の結果、HBI-8000 に遺伝毒性は認められなかった。しかし、HBI-8000 原薬の合成に使用する出発物質で製剤の潜在的な不純物である 不純物 F＊ には遺伝毒性が認められたため、HUYABIO は最終出荷判定基準として本物質の規格を 5 ppm に設定し、遺伝毒性を有する出発物質の出荷前の製剤からの除去についての管理を継続する。

HBI-8000 の BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞を用いた *in vitro* 光毒性試験の結果、HBI-8000 は光毒性反応を引き起こさないことが示された。

2.6.6.10 参考文献

Eckschlager T, Plch J, Stilborova M, Hrabeta J. Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs. Int J. Mol Sci. 2017; 18: 1414.

Eikel D, Lampen A, Nau H. Teratogenic effects mediated by inhibition of histone deacetylases: evidence from quantitative structure activity relationships of 20 valproic acid derivatives. Chem Res Toxicol. 2006; 19(2): 272-8.

Everds NE, Snyder PW, Bailey KL, et al. Interpreting stress responses during routine toxicity studies: a review of the biology, impact, and assessment. Toxicologic Pathol. 2013;41(4):560-614.

＊新薬承認情報提供時に不純物名を置き換え

Frith CH, Botts MP, Jokinen JJ, et al. Non proliferative lesion of the endocrine system in rats. Guides for Toxicology Pathology, Society of Toxicologic Pathology. pp 1-22, 2000.

Giavini E, Menegola E. Teratogenic activity of HDAC inhibitors. Curr Pharm Des. 2014; 20(3): 543842.

Menegola E, Di Renzo F, Bruccia ML, Giavini E. Inhibition of histone deacetylase as a new mechanism of teratogenesis. Birth Defects Res C Embryo Today. 2006; 78(4): 345-53.

Ning Z-Q, Li Z-B, Newman MJ, et al. Chidamide (CS055/HBI-8000): a new histone deacetylase inhibitor of the benzamide class with antitumor activity and the ability to enhance immune cell-mediated tumor cell cytotoxicity. Cancer Chemother Phamacol. 2012; 69: 901-9.

Rudmann D, Cardiff R, Chouinard L, et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse mammary, Zymbal's, preputial, and litoral glands. Toxicol Pathol. 2012 Aug;40(6 Suppl):7S-39S.

Wise LD, Turner KJ, Kerr JS. Assessment of developmental toxicity of vorinostat, histone deacetylase inhibitor, in Sprague-Dawley rats and Dutch Belted rabitts. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicolgy. 2007; 80(1): 57-68.

イストダックス点滴静注用 10 mg 審議結果報告書 （平成 29 年 6 月 7 日）. 5.5 項 生殖発生毒性. Available from:
https://www.pmda.go.jp/drugs/2017/P20170628001/380809000_22900AMX00586000_A100_2.pdf

ツシジノスタット
ハイヤスタ錠 10mg

第 2 部 CTD の概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.7 毒性試験概要表

Huya Japan 合同会社

略号一覧表

略語・用語	内容
APTT	活性化部分トロンボプラスチン時間
AUC_{0-24}	0 時間から 24 時間までの血漿濃度－時間曲線下面積
AUC_{0-t}	0 時間から最後の測定可能濃度までの血漿濃度－時間曲線下面積
C_{max}	最大血漿中濃度
DMSO	ジメチルスルホキシド
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験実施の基準
IC_{50}	50%阻害濃度
MCH	平均血球ヘモグロビン
MCHC	平均血球ヘモグロビン濃度白血球
MCV	平均血球体積
MPE	Mean photo effect
MTD	最大耐量
QD	1 日 1 回
QOD	2 日に 1 回
SD	標準偏差
UVA	紫外線 A 波
UVB	紫外線 B 波

目次

頁
略号一覧表 2
2.6.7 毒性試験概要表 4
2.6.7.1 毒性試験：一覧表 4
2.6.7.2 トキシコキネティクス試験の一覧 6
2.6.7.3 トキシコキネティクス：血漿中トキシコキネティクス成績の一覧 7
2.6.7.4 毒性試験：被験物質ロット一覧 9
2.6.7.5 毒性試験：単回投与毒性試験（重要な試験以外の試験） 10
2.6.7.6 毒性試験：反復投与毒性試験（重要な試験以外の試験） 11
2.6.7.7 毒性試験：反復投与毒性試験（重要な試験） 13
2.6.7.7.1 HBI-8000：ラットにおける 4 週間経口投与毒性試験及び 4 週間回復試験 13
2.6.7.7.2 ラットにおける HBI-8000 の 13 週間強制経口投与毒性試験及び 4 週間回復試験 17
2.6.7.7.3 HBI-8000：イヌにおける 4 週間経口投与毒性試験及び 4 週間回復試験 22
2.6.7.7.4 イヌにおける 13 週間強制経口投与毒性試験及び 4 週間回復試験 28
2.6.7.8 遺伝毒性試験 33
2.6.7.8.1 *In Vitro*－ネズミチフス菌及び大腸菌を用いる復帰突然変異試験 33
2.6.7.8.2 *In Vitro*－ヒト末梢血リンパ細胞における哺乳類染色体異常試験 34
2.6.7.8.3 *In Vivo*－HBI-8000 ラットにおける哺乳類赤血球小核試験 35
2.6.7.9 がん原性試験 36
2.6.7.10 生殖発生毒性試験 36
2.6.7.11 幼若動物を用いた毒性試験 36
2.6.7.12 局所刺激性 36
2.6.7.13 その他の毒性試験 37
2.6.7.13.1 不純物Ｆ＊ のネズミチフス菌及び大腸菌を用いる復帰突然変異試験 37
2.6.7.13.2 光毒性試験 40

＊新薬承認情報提供時に不純物名を置き換え

2.6.7 毒性試験概要表

2.6.7.1 毒性試験：一覧表

試験の種類	種／系統	投与方法	投与期間	投与量	GLP 適合性	実施施設	試験番号	記載箇所	区分
単回投与毒性試験	イヌ／ビーグル	強制経口投与／錠剤	単回	1.25 mg/kg（強制経口），10 mg/頭（錠剤）	非適	[redacted]	[redacted]20176313	4.2.3.1-1	参考
反復投与毒性試験	ラット／Sprague-Dawley 系	強制経口投与	21 days 日間	10, 20, 40 mg/kg QOD	非適	[redacted]	11470-07	4.2.3.2-1	参考
	ラット／Sprague-Dawley 系	強制経口投与	4 週間 +4 週間回復期間	9, 18, 36 mg/kg QOD	適	[redacted]	1515-002	4.2.3.2-2	評価
	ラット／Sprague-Dawley 系	強制経口投与	13 週間 +4 週間回復期間	3, 9, 27 mg/kg QOD	適	[redacted]	20092736	4.2.3.2-3	評価
	イヌ／ビーグル	強制経口投与	19 日間	1 mg/kg（1～8 日間）; 1, 1.5, 2 mg/kg（9～13 日間）; 1, 2, 2.5 mg/kg（14～20 日間）	非適	[redacted]	11296-07	4.2.3.2-4	参考
	イヌ／ビーグル	強制経口投与	4 週間 +4 週間回復期間	0.25, 0.75, 1.25 mg/kg; QD +（12 日間） QOD（試験残り期間）	適	[redacted]	1515-001	4.2.3.2-5	評価
	イヌ／ビーグル	強制経口投与	13 週間 +4 週間回復期間	0.25, 0.75, 1.25 mg/kg QOD	適	[redacted]	20092737	4.2.3.2-6	評価

2.6.7.1 毒性試験：一覧表（続き）

試験の種類	種／系統	投与方法	投与期間	投与量	GLP 適合性	実施施設	試験番号	記載箇所	区分
遺伝毒性試験	*Salmonella typhimurium, Escherichia coli*	*In Vitro*	NA	最大 5000 µg/plate まで	適	[redacted]	9601677	4.2.3.3.1-1	評価
	ヒト末梢血リンパ球	*In Vitro*	NA	0.8～390 µg/mL	適	[redacted]	9601678	4.2.3.3.1-2	評価
	ラット／Sprague-Dawley 系	*In Vivo* 強制経口投与	2 日間	10, 20, 40 mg/kg	適	[redacted]	9800415	4.2.3.3.2-1	評価
その他の毒性試験：潜在的合成不純物の細菌を用いた復帰突然変異試験	*Salmonella typhimurium, Escherichia coli*	*In Vitro*	NA	15, 50, 150, 500, 1500, 5000 µg/plate	適	[redacted]	[redacted]08-368	4.2.3.7.6-1	参考
その他の毒性試験：*In vitro* 光毒性試験	BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞	*In Vitro*	NA	0.178～10.0 µg/mL	適	[redacted]	20245854	4.2.3.7.7-1	評価

略号：GLP（医薬品の安全性に関する非臨床試験実施の基準）, NA（該当なし）, QD（1 日 1 回）, QOD（2 日に 1 回）

2.6.7.2 トキシコキネティクス試験の一覧

試験の種類	試験系	投与方法	投与量	GLP	試験番号	記載箇所
単回投与毒性試験（クロスオーバー試験	イヌ／ビーグル	強制経口投与／錠剤	1.25 mg/kg（強制経口投与），10 mg/頭（錠剤）	非適	[redacted]20176313	4.2.3.1-1
反復投与毒性試験（21 日間）	ラット／Sprague-Dawley 系	強制経口投与	10, 20, 40 mg/kg QOD	非適	11470-07	4.2.3.2-1
反復投与毒性試験（4 週間）	ラット／Sprague-Dawley 系	強制経口投与	9, 18, 36 mg/kg QOD	適	1515-002	4.2.3.2-2
反復投与毒性試験（13 週間）	ラット／Sprague-Dawley 系	強制経口投与	3, 9, 27 mg/kg QOD	適	20092736	4.2.3.2-3
反復投与毒性試験（4 週間）	イヌ／ビーグル	強制経口投与	0.25, 0.75, 1.25 mg/kg; QD（12 日間）＋QOD（試験の残り期間）	適	1515-001	4.2.3.2-5
反復投与毒性試験（13 週間）	イヌ／ビーグル	強制経口投与	0.25, 0.75, 1.25 mg/kg QOD	適	20092737	4.2.3.2-6

略号：GLP（医薬品の安全性に関する非臨床試験実施の基準），NA（該当なし），QD（1 日 1 回），QOD（2 日に 1 回）

2.6.7.3 トキシコキネティクス：血漿中トキシコキネティクス成績の一覧

投与量（mg/kg）	試験期間（日）	AUC_{0-24} (ng h/mL)				C_{max} (ng/mL)			
		ラット		イヌ		ラット		イヌ	
		雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
0.25	1 [a)]	-	-	57.2	24.0	-	-	31.7	13.8
0.25	1 [b)]	-	-	64.7	59.7	-	-	35.8	29.4
0.25	28 [a)]	-	-	58.2	29.8	-	-	22.7	13.9
0.25	89 [b)]	-	-	55.6	79.0	-	-	22.0	38.1
0.75	1 [a)]	-	-	411	243	-	-	158	93.2
0.75	1 [b)]	-	-	211	353	-	-	74.7	160
0.75	28 [a)]	-	-	195	157	-	-	78.6	92.6
0.75	89 [b)]	-	-	371	415	-	-	165	172
1.25	1 [a)]	-	-	574	724	-	-	274	350
1.25	1 [b)]	-	-	502	417	-	-	298	232
1.25	28 [a)]	-	-	585	470	-	-	299	247
1.25	89 [b)]	-	-	455	669	-	-	209	283
1.25	1 [c)]	-	-	2210 [d)]	-	-	-	869	-
1 [e)]	21 [f)]	260	511	-	-	27.8	66.1	-	-
3	1 [g)]	573	961	-	-	90.5	132	-	-
3	89 [g)]	7.00	34.2	-	-	1.76	6.61	-	-
9	1 [h)]	2460	3240	-	-	438	712	-	-
9	1 [g)]	2460	3600	-	-	382	546	-	-
9	27 [h)]	2530	3590	-	-	468	817	-	-
9	89 [g)]	1900	2150	-	-	245	497	-	-
10	1 [f)]	2980	3660	-	-	420	961	-	-
10 mg/day [i)]	1 [c)]	-	-	1620 [d)]	-	-	-	444	-
10 mg/day [j)]	1 [c)]	-	-	1540 [d)]	-	-	-	622	-
18	1 [h)]	5020	9480	-	-	1030	2550	-	-
18	27 [h)]	5900	8200	-	-	2270	2470	-	-
27	1 [g)]	5810	8790	-	-	1440	2260	-	-

投与量（mg/kg）	試験期間（日）	AUC_{0-24} (ng h/mL)				C_{max} (ng/mL)			
		ラット		イヌ		ラット		イヌ	
		雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
27	89 g)	5270	8130	-	-	880	3920	-	-
36	1 h)	11000	14500	-	-	2520	4410	-	-
36	27 h)	12300	16800	-	-	3670	6640	-	-

略号：AUC_{0-24}（0時間から24時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積），AUC_{0-t}（0時間から最後の測定可能濃度までの血漿中濃度－時間曲線下面積），C_{max}（最大血漿中濃度），QD（1日1回），QOD（2日に1回）

a) トキシコキネティクスデータは4週間経口投与試験（12日間QDに続き，残りの試験期間はQOD）；試験番号1515-001
b) トキシコキネティクスデータは13週間経口投与（QOD）試験の結果；試験番号20092737
c) トキシコキネティクスデータはクロスオーバー試験の結果；試験番号[redacted]20176313
d) AUC_{0-t}; 試験番号[redacted]20176313
e) 予定投与量は10 mg/kgであったが、動物は投与期間の最終週に1 mg/kgを誤投与された。
f) トキシコキネティクスデータは21日間経口投与試験結果（QOD）；試験番号11470-07
g) トキシコキネティクスデータは13週間経口投与試験結果（QOD）；試験番号20092736
h) トキシコキネティクスデータは4週間経口投与試験結果（QOD）；試験番号1515-002
i) 非コート錠剤のHBI-8000を投与した；試験番号[redacted]20176313
j) コート錠剤のHBI-8000を投与した；試験番号[redacted]20176313

2.6.7.4 毒性試験：被験物質ロット一覧

ロット番号	含量（%）	規格設定された不純物（%）		試験番号	試験の種類
		Intermed. 2	Isomer		
1361:0065	95.5	0.29	1.46	11470-07	反復投与毒性試験
				1515-002	反復投与毒性試験
				1515-001	反復投与毒性試験
1333-0090	93.2	0.21	4.75	11296-07	反復投与毒性試験
15/127	99.2	NR	NR	[redacted]20176313	単回投与毒性試験（クロスオーバー試験）
				20092736	反復投与毒性試験
				20092737	反復投与毒性試験
				9601677	遺伝毒性試験
				9601678	遺伝毒性試験
				9800415	遺伝毒性試験
B160076	NR	NR	NR	[redacted]20176313	単回投与毒性試験（クロスオーバー試験）
6561-8-1	NR	NR	NR	[redacted]20176313	単回投与毒性試験（クロスオーバー試験）
17IA70.NJ00005	100.0	NR	NR	20245854	光毒性試験

NR: 報告なし

2.6.7.5 毒性試験：単回投与毒性試験（重要な試験以外の試験）

種／系統， 動物数及び性別／群	投与方法（溶媒／製剤）	投与量	MTD	特記すべき所見	試験番号／記載箇所
イヌ／ビーグル 雄 6 匹／群	1 日目：Cedarburg-Alcami 10 mg 非コート錠剤を投与 8 日目：Hovione-Alcami 10 mg コート錠剤を投与 15 日目：10%ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン，10%プロピレングリコール・逆浸透脱イオン（RODI）水溶液（pH 2.5 ± 0.1）を強制経口投与	1 及び 8 日目：10 mg/頭/日 15 日目：1.25 mg/kg/日	1.25 mg/kg 及び 10 mg/頭	1.25 mg/kg/日（強制経口投与）及び 10 mg/頭/日（コートあるいは非コートの錠剤）の HBI-8000 をイヌに単回経口投与した結果、良好な忍容性が認められた。	[redacted]20176313／4.2.3.1-1

2.6.7.6 毒性試験：反復投与毒性試験（重要な試験以外の試験）

種／系統， 動物数及び性別／群	投与方法 （溶媒／製剤）	投与期間	投与量	MTD	特記すべき所見	試験番号／記載箇所
ラット／Sprague-Dawley 系 雌雄各 5 匹／投与群	10%ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン，10%プロピレングリコールを含有する脱イオン水溶液（pH 2.5 に調整）を強制経口投与	21 日間	10, 20, 40 mg/kg QOD*	40 mg/kg 未満	試験期間中に 40 mg/kg 群の雄 3 匹が死亡した。3 匹の剖検所見では、肺の蒼白化、肝臓の変色、腹部脂肪の減少、消化管内の液体貯留、胃内のガス貯留、及び胸水貯留が認められた。 全投与群で投与に関連する体重増加量の減少が認められた。最大の減少は、高用量群で生存した雄に認められた。 中用量及び高用量群の動物で肺の蒼白化、及び脾臓における白色巣が認められた。高用量群の動物で投与に関連する白血球数（リンパ球）減少、及び好中球数並びに単核球数の増加が認められた。わずかではあるがプロトロンビン時間延長が認められ、HBI-8000 投与に関連すると考えられた。血清化学的検査でアルブミン、グロブリン、及び総タンパク質レベルに緩徐ではあるが投与に関連する変化が認められた。	11470-07／ 4.2.3.2-1

2.6.7.6 毒性試験：反復投与毒性試験（重要な試験以外の試験）（続き）

イヌ／ビーグル 雄 2 匹/投与群	10%ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン（HPBCD）, 10%プロピレングリコールを含有する脱イオン水溶液（pH を約 2.5）に調整）を強制経口投与、又はゼラチンカプセル製剤又及び錠剤として投与	19 日間	1 日目～8 日目：HPBCD, カプセル又は錠剤として 1 mg/kg を投与 9 日目～13 日目：HPBCD, カプセル及び錠剤をそれぞれ 1 mg/kg, 1.5 mg/kg 及び 2 mg/kg 投与 14 日目～20 日目：HPBCD, カプセル及び錠剤をそれぞれ 1.5 mg/kg, 2 mg/kg 及び 2.5 mg/kg 投与	2 mg/kg 未満	体重、一般状態観察所見、及び臨床病理学的検査値に対する影響は全用量群で一致していた。用量を変更した 14 日目以降試験終了時まで、観察所見には、黒色下痢又は下血、嘔吐、及び肛門出血が認められた。2 匹（1 匹は錠剤及びカプセル製剤として 1.0、2.0 及び 2.5 mg/kg を投与、別の 1 匹は HPBCD 溶液として 1.0、2.0 及び 2.5 mg/kg を投与）がおそらく下血及びそれに伴う脱水に関連して死亡した。その他、腸管出血、紫色調への肺の変色、骨髄低形成、トリグリセリド値低下、及び白血球数減少が認められた。さらに、強制経口投与した HBI-8000 溶液（10%HPBCD 及び 10%プロピレングリコールを含有する約 pH 2.0 の脱イオン水）では、固形剤形と比較して曝露が高くバラツキは少ない可能性があったものの、HBI-8000 の血漿中濃度に対する明らかな摂餌の影響はなかった。	11296-07／4.2.3.2-4

MTD: 最大耐量, QOD: 2 日に 1 回, *: 10 mg/kg 及び 20 mg/kg 投与群の 14, 16, 18 及び 20 日目に, 正しい投与量の 10 分の 1 量が誤投与された。

2.6.7.7 毒性試験：反復投与毒性試験（重要な試験）

2.6.7.7.1 HBI-8000：ラットにおける 4 週間経口投与毒性試験及び 4 週間回復試験

種／系統： ラット／CRL:CD（Sprague-Dawley）	投与期間：27 日間						試験番号： 1515-002	
試験開始時週齢： 8 週齢	回復期間：28 日間						記載場所： 4.2.3.2-2	
初回投与日：2008 年 2 月 15 日	投与方法：QOD 強制経口投与						GLP 適合性: 適合	
溶媒／剤形：10%ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン, 10%プロピレングリコールを含有する脱イオン水溶液；pH 2.5 (±0.1)[a)]								
特記事項：NA								
無毒性量：算出できず。								
投与量（mg/kg/回）	0（対照）		9		18		36	
動物数（トキシコキネティクス）：	雄: 0	雌: 0	雄: 7	雌: 7	雄: 7	雌: 7	雄: 7	雌: 7
トキシコキネティクス：$AUC_{0\text{-}24}$ (ng h/mL)								
1 日目	NA	NA	2460	3240	5020	9480	11000	14500
27 日目	NA	NA	2530	3590	5900	8200	12300	16800
トキシコキネティクス：$AUC_{0\text{-}48}$ (ng h/mL)								
1 日目	NA	NA	2610	3600	5360	11600	12800	16200
27 日目	NA	NA	2740	3750	6390	8980	15000	21600
トキシコキネティクス：C_{max}（mg/mL）								
1 日目	NA	NA	438	712	1030	2550	2520	4410
27 日目	NA	NA	468	817	2270	2470	3670	6640
特記すべき所見								
動物数（回復試験）：	雄: 10 (5)	雌: 10 (5)	雄: 10 (5)	雌: 10 (5)	雄: 10 (5)	雌: 10 (5)	雄: 10 (5)	雌: 10 (5)
死亡数又は瀕死殺数	0/15	0/15	1/15[b)]	0/15	1/15[c)]	0/15	0/15	0/15
体重（%）[d)], 25 日目	380.0	250.0	-6.82[##]	-5.68[#]	-11.24[##]	-9.24[##]	-19.08[##]	-12.60[##]
摂餌量（%）[d)], 25 日目～28 日目	23.31	17.36	-12.96[#]	-13.77	-17.50[##]	-24.08[##]	-45.90[##]	-32.43[##]
一般状態	-	-	-	-	-	-	-	-
機能観察総合評価法[e)]	-	-	-	-	-	-	-	-
眼科学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-

2.6.7.7.1 HBI-8000：ラットにおける 4 週間経口投与毒性試験及び 4 週間回復試験（続き）

投与量（mg/kg/回）：	0（対照）		9		18		36	
動物数（回復試験）：	雄: 10 (5)	雌: 10 (5)	雄: 10 (5)	雌: 10 (5)	雄: 10 (5)	雌: 10 (5)	雄: 10 (5)	雌: 10 (5)
血液学的検査								
赤血球数（10^6/μL）	8.152	-	7.877	-	7.805	-	7.569##	-
ヘモグロビン量（g/dL）	15.86	15.94	15.20	15.82	15.15	15.11#	14.15##	14.98##
ヘマトクリット値（%）	49.97	48.64	47.21#	47.73	46.19##	45.01##	43.07##	45.54##
網状赤血球数（10^3/μL）	133.15	141.72	96.84##	85.47##	84.14##	86.79##	64.24##	79.13##
白血球数（10^3/μL）	16.74	11.75	8.02**	7.15**	4.78**	5.23**	2.03**	2.34**
好中球数（10^3/μL）	2.360	1.273	0.758##	0.496##	0.571##	0.751##	0.519##	0.196##
リンパ球数（10^3/μL）	13.588	9.971	6.863##	6.251#	3.806##	4.052##	1.189##	1.846##
血小板数（10^3/μL）	1040.0	1055.5	1112.2	1063.3	922.6	771.6##	311.9##	696.1##
血液生化学的検査								
総タンパク質（g/dL）	6.50	6.65	6.16#	6.61	5.91##	6.05##	5.18##	5.70##
アルブミン（g/dL）	3.47	3.71	3.40	3.68	3.32	3.37#	2.86##	3.28##
グロブリン（g/dL）	3.03	2.94	2.76#	2.93	2.59##	2.68#	2.32##	2.42##
γ-グルタミルトランスフェラーゼ（U/L）	1.6	-	1.4	-	2.0	-	3.0##	-
ビリルビン（mg/dL）	0.15	-	0.12	-	0.17	-	0.22#	-
尿素窒素（mg/dL）	14.0	15.3	15.4	17.2	16.8##	21.1##	29.3##	21.1##
カルシウム（mg/dL）	11.86	11.73	11.24##	11.23#	11.20##	11.12##	10.92##	11.02##
尿検査	-	-	-	-	-	-	-	-
トロポニンI	-	-	-	-	-	-	-	-