目次

1 非臨床試験計画概略 7
1.1 薬理 7
1.2 薬物動態 8
1.3 毒性 8
2 薬理試験 10
2.1 効力を裏付ける試験 10
2.2 副次的薬理試験 11
2.3 安全性薬理試験 11
2.4 薬力学的薬物相互作用 12
3 薬物動態試験 13
3.1 分析法 13
3.2 吸収 13
3.3 分布 13
3.4 代謝 14
3.5 排泄 14
3.6 薬物動態学的薬物相互作用 14
4 毒性試験 16
4.1 単回投与毒性試験 16
4.2 反復投与毒性試験 16
4.3 遺伝毒性試験 17
4.4 がん原性試験 17
4.5 生殖発生毒性試験 17
4.6 局所刺激性試験 17
4.7 その他の毒性試験 17
4.8 全身曝露 18

5　総括及び結論.....19

参考文献.....23

表目次

表 2.4-1　ダリナパルシンの非臨床毒性試験の NOAEL における曝露量とヒトでの臨床推奨用量における曝露量に基づく曝露量比.....18

図目次

図 2.4-1　ダリナパルシンの構造式.....7

図 2.4-2　ダリナパルシンの推定作用機序.....11

略語及び用語の説明

略語又は用語	日本語	英語
ATO	三酸化ヒ素	Arsenic trioxide
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	Area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 24 hrs
BCRP	-	Breast cancer resistance protein
C_{max}	最高血漿中濃度	Maximum concentration in plasma
CYP	シトクロム P450	Cytochromes P450
DMA^{V}	ジメチルアルシン酸	Dimethyl arsenic acid
DMA^{III}-Cysteine	ジメチルアルシン酸-システイン	Dimethyl arsenic acid cysteine
$DMMTA^{V}$	ジメチルモノチオアルシン酸	Dimethyl monothiol-arsenic acid
$DMMTA^{V}GS$	ジメチルアルシノチオールグルタチオン	Dimethyl arsinothioyl glutathione
ECG	心電図	Electrocardiogram
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準	Good Laboratory Practice
GSH	グルタチオン	Glutathione
HEK	ヒト胚腎臓	Human embryonic kidney
hERG	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子	Human ether- à-go-go related gene
hIgG	ヒト免疫グロブリン G	Human immunoglobulin G
HUVEC	ヒト臍帯静脈内皮細胞	Human umbilical vein endothelial cells
ICP/MS	誘導結合プラズマ質量分析	Inductively coupled plasma mass spectrometry
IC_{50}	50%阻害濃度	50% inhibitory concentration
ICH	医薬品規制調和国際会議	International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
IARC	国際がん研究機関	International Agency for Research on Cancer
$K_{I, app}$	最大不活性化速度の 50%の速度をもたらすみかけの阻害薬の濃度	Apparent inhibitor concentration producing half the maximal rate of inactivation
K_{inact}	最大不活性化速度定数	Maximum inactivation rate constant
MM	多発性骨髄腫	Multiple myeloma
MTD	最大耐量	Maximum tolerated dose
NOAEL	無毒性量	No observed adverse effect level
NRU	ニュートラルレッド取り込み	Neutral red uptake
OAT	-	Organic anion transporter
OATP	-	Organic anion transporting polypeptide
OCT	-	Organic cation transporter
PBMC	末梢血単核細胞	Peripheral blood mononuclear cells
P-gp	P-糖蛋白質	P-glycoprotein

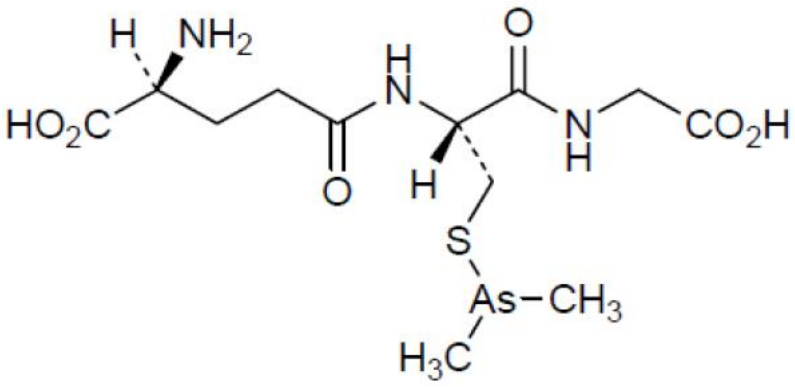
略語又は用語	日本語	英語
QTc 間隔	補正 QT 間隔	QT interval corrected for heart rate
ROS	細胞内活性酸素種	Reactive oxygen species
SP-02	ダリナパルシンの開発コード（別称：ZIO-101、SGLU-1）	Development code of darinaparsin (other name: ZIO-101, SGLU-1)
$t_{1/2}$	消失半減期	Hal-life
TCL	T 細胞リンパ腫	T-cell lymphoma
$TMAsO^V$	トリメチルアルシンオキシド	Trimethyl arsenic oxide
TK	トキシコキネティクス	Toxicokinetics

1　非臨床試験計画概略

ダリナパルシン（開発コード：SP-02、ZIO-101、SGLU-1）は、無機ヒ素化合物の生体内中間代謝物であり、グルタチオン（GSH）抱合体構造を有する有機ヒ素化合物である（図 2.4-1）。米国 The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center 及び Texas A&M University で創製された後、米国 ZIOPHARM Oncology, Inc.によって開発されてきたが、2011 年 3 月にソレイジア･ファーマ株式会社が本邦を含むアジア太平洋地域における独占的開発・販売権を取得した。ダリナパルシンは、抗腫瘍活性を示し、本邦においては再発又は難治性の末梢性 T 細胞リンパ腫を適応症とした注射剤として開発された。ダリナパルシンの市販予定製剤は凍結乾燥注射剤であり、注射用水で溶解し、生理食塩液で希釈して使用する。申請予定の用法用量では、ダリナパルシン 300 mg/m^2 を 1 日 1 回 5 日間連日点滴静注後 16 日間休薬するサイクルを 1 サイクルとし、繰り返し投与される。ヒ素を含む医薬品としては、無機ヒ素化合物である三酸化ヒ素（ATO）を製剤化した ATO 製剤（トリセノックス®注）があり、再発又は難治性の急性前骨髄球性白血病に対する治療薬として上市されている。しかし、ATO 製剤は QT 延長や完全房室ブロック等の不整脈に代表される全身毒性と抗腫瘍効果との関係により治療域が狭く、使用が制限される場合がある（Hermine et al. 2004、Hussein et al. 2003、List et al. 2003）。

ダリナパルシンの薬理作用、薬物動態及び毒性を明らかにするため、*in vitro* 試験及び各種動物を用いた非臨床試験を実施した。

図 2.4-1　ダリナパルシンの構造式



1.1　薬理

効力を裏付ける試験では、ダリナパルシンの *in vitro* 細胞増殖抑制作用、作用機序、*in vivo* 抗腫瘍作用及び血管新生阻害作用を検討した。ヒト T 細胞リンパ腫（TCL）細胞を含む各種ヒト造血器腫瘍細胞、各種固形癌由来細胞及び初代培養白血病細胞を用いてダリナパルシンの増殖抑制作用を検討した。作用機序の検討では、ダリナパルシンによるアポトーシス誘導作用及び細胞周期停止誘導作用を複数の腫瘍細胞を用いて評価した。また、ヒト多発性骨髄腫（MM）細胞異種

移植マウスモデルを用いてダリナパルシンの *in vivo* 抗腫瘍作用を検討した。血管新生阻害作用は、血管内皮細胞を用いた *in vitro* 試験及びマトリゲルプラグアッセイによる *in vivo* 試験で検討した。

安全性薬理試験では、ラットにおける中枢神経系に対する影響、ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）カリウム電流に対する影響、モルモット摘出心臓における心臓伝導系に対する影響並びにイヌにおける心血管系及び／又は呼吸器系への影響を評価した。

薬力学的薬物相互作用試験では、ヒト MM 細胞及び TCL 細胞の増殖抑制作用に対するダリナパルシンとその他の抗悪性腫瘍薬の併用効果を検討した。

1.2 薬物動態

ダリナパルシン投与後の曝露の評価では、誘導結合プラズマ質量分析（ICP/MS）法を用いてサロゲート物質としてのヒ素濃度を測定した。

ダリナパルシンを静脈内投与したときの吸収について、イヌ単回静脈内投与試験、ラット及びイヌ 18 週間反復投与毒性試験並びにウサギ胚・胎児毒性試験で評価した。組織内分布試験ではラットに ^{76}As-ダリナパルシンを静脈内投与したときの組織中放射能濃度及び尿糞中排泄を評価した。マウス、ラット、イヌ、ウサギ、サル及びヒト血漿中タンパク結合率の評価では、ダリナパルシンは血漿に添加後、速やかに分解することが示唆されたため、ダリナパルシン由来ヒ素含有化合物の血漿中タンパク結合率として評価した。また、血漿中の主成分であるジメチルアルシン酸（DMA^V）のタンパク結合率を検討した。さらに、ラット、イヌ及びヒト血球移行性試験を実施した。ダリナパルシンの代謝試験ではヒト肝細胞を用いた *in vitro* 代謝試験並びにイヌ及びサル *in vivo* 代謝試験を実施した。排泄試験については、上述のラット組織内分布試験での評価の他に、イヌ及びサルでの静脈内投与後の尿糞中排泄（サルでは尿のみ）を評価した。薬物相互作用に関する評価では、ヒトプール肝ミクロソームを用いたシトクロム P450（CYP）に対する阻害作用、ヒト肝細胞を用いた CYP 誘導作用、Caco-2 及び各種トランスポーター発現系細胞を用いてトランスポーターの基質又は阻害剤となる可能性について評価した。

1.3 毒性

ダリナパルシンの非臨床毒性プロファイルを明らかにするため、マウス、ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験、*in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験、ウサギを用いた生殖発生毒性試験並びに *in vitro* 光毒性試験を実施した。試験に用いたこれらの動物種は一般的に広く毒性試験に使用されている。ダリナパルシンは進行がん患者の治療を目的としているため、医薬品規制調和国際会議（ICH）S9 ガイドラインに従い、がん原性試験、受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験並びに出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験は実施しなかった。さらに、不純物の安全性の検討のために 1%不純物A*を含有するダリナパルシンを用いたラット反復投与毒性試験を実施した。

＊ 新薬承認情報提供時に置換

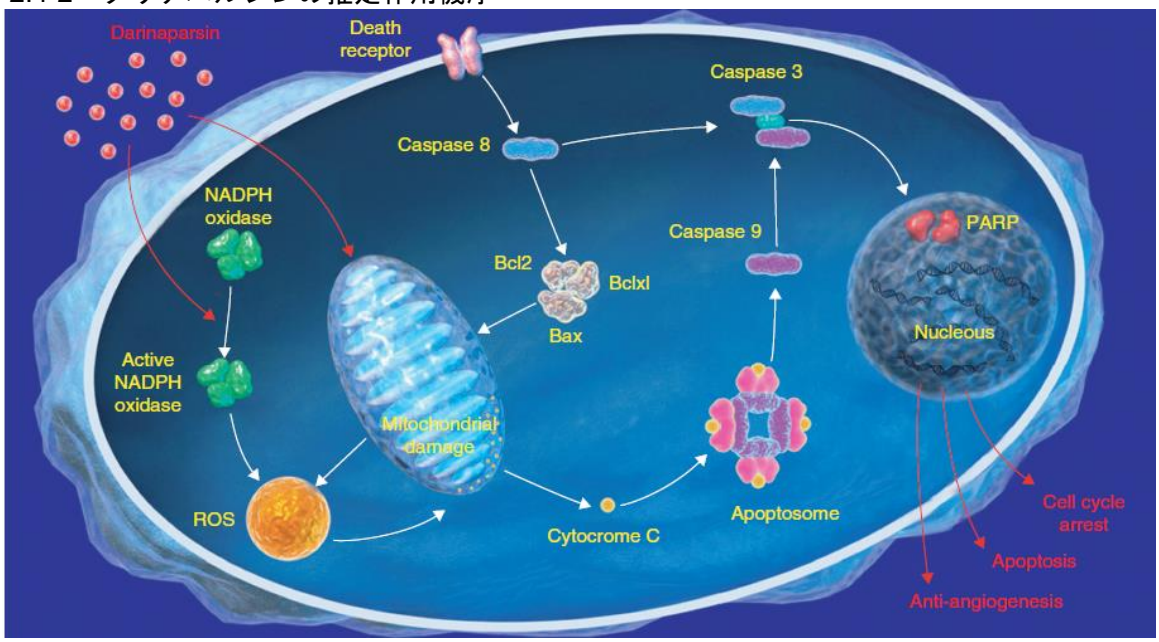
トキシコキネティクス（TK）評価ではダリナパルシンのサロゲート物質として血漿中ヒ素濃度を測定した。重要な毒性試験は医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に従って実施した。

2　薬理試験

2.1　効力を裏付ける試験

ダリナパルシンは、ヒト TCL 細胞を含む各種ヒト造血器腫瘍細胞及び固形癌由来細胞に対して広範な増殖抑制作用を示し、概して造血器腫瘍細胞に対して強力な作用を示した。また、ダリナパルシンは白血病細胞及び白血病患者由来末梢血単核細胞（PBMC）のコロニー形成を濃度依存的に阻害するが、健康被験者由来 PBMC に対する作用は比較的弱かった。ダリナパルシンは複雑で多様な作用機序を有している（図 2.4-2）。各種白血病細胞を用いてダリナパルシンの作用機序を検討した結果、ダリナパルシンはアポトーシス及び G2/M 期での細胞周期停止を時間及び濃度依存的に誘導することが示された。一部の細胞ではダリナパルシンによるネクローシスの誘導も観察された。ダリナパルシンはミトコンドリア膜電位低下、細胞内活性酸素種（ROS）産生、シトクロム c の細胞質内遊離及びカスパーゼ-9 活性化を介して、アポトーシスを誘導することが示された。一方、ATO を比較対象としてダリナパルシンの作用機序を検討した結果、ATO とは異なる作用として、ダリナパルシンのアポトーシス誘導作用に抗アポトーシスタンパク質 Bcl-2 の発現低下は必須ではないこと、細胞内 GSH 枯渇による影響はほとんどないこと、PML/RARα 融合タンパク質の分解は寄与していないこと、白血病細胞の顆粒球系への分化誘導作用は認められないことが示唆された。ヒト MM 細胞異種移植マウスモデルにおいて、ダリナパルシン 200 mg/kg（1 日 1 回週 3 回又は週 1 回投与）の静脈内投与により、腫瘍体積及び血清中ヒト免疫グロブリン G（hIgG）レベルが溶媒投与群と比較して減少した。ダリナパルシンは *in vitro* においてヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）の増殖及び血管内皮細胞のチューブ形成を抑制し、マウスを用いた *in vivo* マトリゲルプラグアッセイにおいて、ダリナパルシン 100 mg/kg（1 日 1 回 9 日間）の静脈内投与により血管新生阻害作用を示した。

図 2.4-2　ダリナパルシンの推定作用機序



The primary mode of apoptosis is through induction of ROS production, which occurs through activation of the NADPH oxidase complex and has a direct effect on mitochondrial membrane potential. Consequences of disruption of mitochondrial functions are release of cytochrome c, activation of the apoptosome and initiation of apoptosis. The result is cell cycle arrest, induction of apoptosis and anti-angiogenic activity.
Bax, Bclxl and Bcl2 = ant-apoptotic protein; NADPH = nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; PARP = poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase; ROS = reactive oxygen species.
Source: Mann 2009, Figure 1

2.2　副次的薬理試験

ダリナパルシンを用いた副次的薬理試験は実施していない。

2.3　安全性薬理試験

安全性薬理試験では、生命維持に重要な影響を及ぼす器官系である中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に対するダリナパルシンの影響を評価した。ラットを用いた Irwin 変法による中枢神経系への影響評価において、50 mg/kg までの単回静脈内投与でダリナパルシンによる影響は認められなかった。75 mg/kg 以上の投与では自発運動の低下、浅徐呼吸及び／又は流涎が投与 5 分後に一過性に認められた。心血管系に対する影響として、*In vitro* 試験においてダリナパルシンは hERG を発現させたヒト胚腎臓（HEK）細胞で濃度依存的に hERG カリウム電流を阻害した。モルモット摘出心臓を用いた試験では複数の心電図（ECG）パラメータに影響し、ダリナパルリンによる QT/QTc 間隔延長作用を含む刺激伝導系への作用が認められた。*In vivo* 試験ではテレメトリー装着覚醒イヌにおいてダリナパルシンの 30 mg/kg 単回静脈内投与で心拍数増加及び血圧上昇が一過性に認められ、ECG 検査で RR 間隔及び PR 間隔の短縮を認めた以外、心血管系への影響は認められなかった。また、呼吸器系に対する影響評価において、覚醒イヌへの 30 mg/kg の単回静脈内投与で呼吸数が増加したが、15 mg/kg までの用量では呼吸機能に対する影響は認められなかった。

2.4 薬力学的薬物相互作用

各種腫瘍細胞の増殖抑制作用に対するダリナパルシン及びその他の抗悪性腫瘍薬との併用効果を検討した。ヒト MM 細胞において、ダリナパルシンはメルファラン、ボルテゾミブ又はドキソルビシンとの併用により単剤と比較して増殖抑制作用を増大させることが示された。また、ヒト TCL 細胞において、ダリナパルシンはフォロデシン又はプララトレキサートの併用により相乗的な増殖抑制作用を示したが、ロミデプシンとの併用では拮抗作用を示した。

3　薬物動態試験

3.1　分析法

ダリナパルシンはヒ素化合物であることから、開発当時に利用可能であった ICP/MS 法を用いてヒ素濃度定量法を確立した。ダリナパルシンのサロゲート物質としてヒ素濃度を測定するため、ラット、イヌ及びウサギ血漿中ヒ素濃度定量法のバリデーション試験を実施した。いずれの動物種の定量法においても良好な選択性、直線性、日内及び日間真度並びに精度が得られ、ヒ素濃度としての定量範囲は 9.11～1821 ng/mL であった。ラット、イヌ及びウサギ血漿中ヒ素は -20°C で 175、222 及び 189 日、-70°C で 151、146 及び 148 日まで安定であった。凍結融解安定性はいずれの動物種ともに 3 回（-20°C 及び-70°C）まで安定であった。また、イヌ血液、血漿、尿及び糞中ヒ素濃度測定のためのバリデーション試験を実施した。血液及び血漿中ヒ素濃度の定量範囲は 0.01～2 μg/mL、尿中ヒ素濃度の定量範囲は 1～200 μg/mL、糞中ヒ素濃度の定量範囲は 1～200 μg/g であった。良好な選択性、直線性、日内真度及び精度が得られた。イヌ血液、血漿、尿及び糞は-80°C で 32、32、40 及び 39 日まで安定であった。

3.2　吸収

イヌにダリナパルシンを 30 mg/kg で単回静脈内投与したとき、最高血漿中濃度（C_{max}）は 3.79 μg/mL を示し、5.05 時間の消失半減期（$t_{1/2}$）で消失した。ラット及びイヌ 18 週間反復静脈内投与毒性試験の結果から、曝露［C_{max} 及び 0 時間から 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-}24}$）］に顕著な性差はみられなかった。ラットに 5、15、45 mg/kg で反復静脈内投与したとき、Day 1 では 5～45 mg/kg で用量比例性がみられたが、Day 110 では曝露の増加は用量の増加比を下回っていた。イヌに 3、10、30 mg/kg で反復静脈内投与したとき、Day 1 及び Day 110 ともに 3～30 mg/kg で用量比例性がみられた。蓄積性の評価では、ラットでは Day 110 で Day 1 に比較して低用量から蓄積性がみられたが（C_{max}：雄 4～21 倍、雌 6～11 倍、$AUC_{0\text{-}24}$：雄 5～34 倍、雌 7～17 倍）、イヌでは顕著な蓄積性はみられなかった（雌雄ともに 1.5 倍以内）。妊娠ウサギにダリナパルシンを 3、10、30 mg/kg で妊娠 6～18 日まで反復静脈内投与したとき、曝露は投与量の増加に伴い増加し、蓄積性はみられなかった。

3.3　分布

ラットに ^{76}As-ダリナパルシンを静脈内投与したとき、放射能濃度が最も高かったのは血液中であった。血液以外での組織中放射能濃度は低かったが、その中でも高い放射能が検出されたのは肺及び脾臓であった。血液を含むこれらの組織では投与 48 時間後まで一定の放射能濃度を維持した。

マウス、ラット、イヌ、ウサギ、サル及びヒト血漿中タンパク結合率を評価した。ダリナパルシンは血漿に添加後、速やかに分解することが示唆されたため、ヒ素含有化合物の血漿中タンパク結合率として評価した。その結果、マウス、ラット、ウサギ、サル及びヒトで 78.2%～94.7%

であったが、イヌでは 8.73%～29.9%と低かった。DMA^V はラット、イヌ及びヒト血漿中タンパク質とほとんど結合しなかった。また、ダリナパルシンを血液に添加後の血液－血漿中濃度比はラット、イヌ及びヒトで 1.53～6.41、8.60～10.8 及び 5.53～7.00 であり、いずれの種においても血球への移行性が高かった。

3.4 代謝

イヌにダリナパルシンを単回静脈内投与後の血漿、尿及び糞中には主に DMA^V が検出された。マイナーな成分としてジメチルモノチオアルシン酸（$DMMTA^V$）及びトリメチルアルシンオキシド（$TMAsO^V$）及びジメチルアルシナス酸（血漿のみ）が検出された。サルにダリナパルシンを静脈内投与したときの血漿中にダリナパルシンは検出されず、主な成分としては DMA^V が、マイナーな成分として $DMMTA^V$ 及び $TMAsO^V$ が検出された。ダリナパルシンは投与終了直後の血漿中にも検出されなかったことから、生体内で非常に不安定であることが示された。

ヒト肝細胞を用いた *in vitro* 代謝試験において、ダリナパルシンは緩衝液及び肝細胞中で約 1 時間の $t_{1/2}$ で消失した。緩衝液中でのインキュベートでは、主にダリナパルシン及び DMA^V が、マイナー化合物としてジメチルアルシノチオールグルタチオン（$DMMTA^VGS$）が検出された。ヒト肝細胞中でのインキュベートでは、ダリナパルシン、DMA^V、$DMMTA^V$、$DMMTA^VGS$ 及びジメチルアルシン酸-システイン（DMA^{III}-Cysteine）が検出された。緩衝液中でのインキュベートの結果と比較して、$DMMTA^V$ 及び DMA^{III}-Cysteine がダリナパルシンの代謝物として示唆された。

3.5 排泄

ラットに ^{76}As-ダリナパルシンを静脈内投与したときの投与 48 時間後までの尿糞中放射能排泄率は 2.29%及び 0.07%であった。

イヌにダリナパルシンを静脈内投与したとき大部分のヒ素は投与後 24 時間までに主に尿中に排泄され、投与後 168 時間までの尿糞中排泄率は投与量の 92.85%及び 1.14%であった。投与後 24 時間以降、糞中への排泄は確認されなかった。

サルに静脈内投与したとき、ヒ素は主に尿中に排泄され、投与 72 時間後までの尿中ヒ素排泄率は雌雄で 80.7%及び 73.1%であった。

3.6 薬物動態学的薬物相互作用

CYP 阻害作用の検討では、ダリナパルシンは CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19 及び CYP3A に対して阻害作用を示した。CYP1A2 に対する 50%阻害濃度（IC_{50}）値は 34.9～54.2 μmol/L、CYP2C8 に対する IC_{50} 値は 15.3～16.2 μmol/L、CYP3A に対する IC_{50} 値は 22.2～160 μmol/L であった。CYP2B6、CYP2C9 及び CYP2C19 に対して、時間依存的阻害パラメータである最大不活性化速度の 50%の速度をもたらすみかけの阻害薬の濃度（$K_{I, app}$）はそれぞ

れ 32.3、403 及び 117 μmol/L、最大不活性化速度定数（k_{inact}）はそれぞれ 0.0390、0.0985 及び 0.0464 min^{-1} であった。DMA^V の CYP に対する阻害作用は示されなかった。

ダリナパルシンは、CYP2B6、CYP2C9 及び CYP3A4 に対して誘導作用を示し、最大誘導作用はそれぞれ 2.40～2.99 倍、2.25 倍及び 2.58～6.45 倍であった。また、DMA^V も CYP2B6、CYP2C8 及び CYP3A4 に対して誘導作用を示し、最大誘導作用はそれぞれ 2.23～3.50 倍、3.05 倍及び 2.74 倍であった。

トランスポーター基質認識性及び阻害作用の検討では、ダリナパルシン及び DMA^V ともに P-糖蛋白質（P-gp）、Breast cancer resistance protein（BCRP）、Organic anion transporting polypeptide（OATP）1B1、OATP1B3、Organic anion transporter（OAT）1、OAT3 及び Organic cation transporter（OCT）2 の基質ではないことが示された。また、ダリナパルシンによる P-gp に対する阻害作用がみられた（IC_{50} 値：133 μmol/L）が、BCRP、OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3 及び OCT2 に対する阻害作用は非常に弱いか又はみられなかった（IC_{50} 値：300 μmol/L 以上）。DMA^V はこれらのトランスポーターに対して阻害作用を示さなかった。

4　毒性試験

4.1　単回投与毒性試験

ダリナパルシンの単回投与毒性試験は実施していない。マウス 5 日間反復静脈内投与試験及び単回静脈内投与で実施した *in vivo* 小核用量設定試験、ラット 4 週間反復静脈内投与試験及びイヌ 18 週間反復静脈内投与試験の結果から、マウス及びラットにおける概略の致死量はそれぞれ 250 mg/kg（750 mg/m^2）及び 50 mg/kg（300 mg/m^2）、マウス、ラット及びイヌにおける最大耐量（MTD）はそれぞれ 200 mg/kg（600 mg/m^2）、30 mg/kg（180 mg/m^2）及び 30 mg/kg（600 mg/m^2）超であった。

4.2　反復投与毒性試験

ダリナパルシンの早期の研究開発ではマウス及びイヌを用いた 5 日間反復静脈内投与試験が実施された。その後、ラット及びイヌを用いた 4 週間及び 18 週間反復静脈内投与試験が実施された。4 週間試験ではダリナパルシンを 1 日 1 回 7 日間連日静脈内投与後 7 日間休薬する 14 日間を 1 サイクルとして 2 サイクル投与し、18 週間試験では申請予定の用法と同様、1 日 1 回 5 日間連日静脈内投与後 16 日間休薬する 21 日間を 1 サイクルとして 6 サイクル繰り返した。ラット及びイヌで観察された所見に種差を示唆する所見はなかった。ラット 18 週間試験の無毒性量（NOAEL）は 15 mg/kg/日（90 mg/m^2/日）、イヌ 18 週間試験の NOAEL は 3 mg/kg/日（60 mg/m^2/日）であった。ラット 4 週間及び 18 週間試験ではそれぞれ 50 mg/kg/日以上の群及び 45 mg/kg/日群の動物に死亡が観察された。イヌ 4 週間及び 18 週間試験ではそれぞれ 25 mg/kg/日及び 30 mg/kg/日までの投与で死亡は観察されなかった。主として投与期間中に流涎、嘔吐や軟便をはじめとする消化器症状、過剰興奮、嗜眠、自発運動低下、頻呼吸、結膜充血など、ヒ素化合物の急性毒性症状として知られている一般症状が観察され、さらにラットでは摂餌量低下による体重増加抑制がみられた。これらの所見は休薬期間中に回復性を示した。また、投与部位の浮腫、創傷、痂皮形成、潰瘍形成、炎症、壊死などの異常所見が観察された。投与部位の所見は回復性が示された。ラット 18 週間試験では血液学的検査における網状赤血球の増加並びに骨髄検査におけるリンパ球系比率の減少及び顆粒球系比率の上昇が認められたが、関連した病理組織学的検査所見は観察されず、回復がみられた。イヌ 18 週間試験では ECG 検査において補正 QT 間隔（QTc 間隔）の延長が認められたが、回復性がみられ、心臓に病理組織学的変化は認められなかった。病理組織学的検査ではいずれの動物種でも精巣に病変がみられた。精巣の病変は回復又は回復傾向を示した。ラット及びイヌの反復静脈内投与試験の結果から、ダリナパルシンの毒性標的臓器は生殖器及び造血器であることが示唆され、薬理作用（細胞増殖抑制作用）に関連すると考えられる。

4.3 遺伝毒性試験

ダリナパルシンの遺伝毒性試験では、2 つの *in vitro* 試験（細菌を用いる復帰突然変異試験及び哺乳類細胞を用いる染色体異常試験）の結果は陽性であったが、*in vivo* マウス小核試験は陰性であった。

4.4 がん原性試験

ダリナパルシンは進行がん患者の治療を目的としているため、がん原性試験は実施しなかった。

4.5 生殖発生毒性試験

ダリナパルシンは進行がん患者の治療を目的としているため、受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験並びに出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験は実施しなかった。ウサギを用いた胚・胎児発生試験では、NOAEL は母動物毒性については 3 mg/kg/日、胚・胎児発生毒性については 10 mg/kg/日であった。本試験において催奇形性は認められなかった。

4.6 局所刺激性試験

複数の試験の一般状態観察並びに剖検及び病理組織学的検査において、投与部位の浮腫、創傷、痂皮形成、潰瘍形成、炎症、壊死などの異常所見が観察された。ダリナパルシンの局所刺激性は否定できないが、投与手技に起因する変化である可能性も考えられ、少なくとも大動物（イヌ）における局所刺激性に関連する異常は病理組織学的変化を伴わない軽微な浮腫のみであった。

4.7 その他の毒性試験

原薬中の不純物管理として規格設定されている 不純物A*、不純物C*、不純物B*及び不純物D*について安全性評価を実施した。不純物A*は、1%不純物A*含有ダリナパルシンを 15 mg/kg/日（ラット 18 週間試験の NOAEL）の用量でラットに 15 週間（1 日 1 回 5 日間連日投与後 16 日間休薬するサイクルを 5 サイクル）投与し、毒性を検討した。その結果、死亡は認められず、その他の評価項目にも毒性所見は認められなかった。また、ダリナパルシン15 mg/kg/日群と比較して、1%不純物A*含有ダリナパルシン 15 mg/kg/日群で新たな毒性徴候は認められなかった。以上の結果より、不純物A*（規格値[redacted]%以下）の安全性は確認されていると判断した。不純物C*及び不純物B*は[redacted]。これらを考慮すると、不純物C* 及び不純物B*の毒性は同程度と考えられる。

＊ 新薬承認情報提供時に置換

不純物C*は、既承認の[redacted]の[redacted]として使用されており[redacted]、[redacted]の臨床投与量と比較したとき、不純物として投与される不純物C*及び不純物B*の 1 日最大投与量は十分に低いことから安全性は確認されていると判断した［不純物C*の規格値[redacted]%以下、不純物B*の規格値[redacted]%以下及び不純物C*と不純物B*の量の和の規格値[redacted]%未満］。不純物D*([redacted]、[redacted])は、ヒト及び動物のいずれの試験においてもダリナパルシン投与後に認められた主要な分解／代謝物である。したがって、ダリナパルシンの非臨床試験及び臨床試験において不純物D*（規格値[redacted]%以下）の安全性は確認されていると判断した。

In vitro 3T3 ニュートラルレッド取り込み（NRU）光毒性試験では、ダリナパルシンに光毒性は示されなかった。

4.8 全身曝露

ラット及びイヌ 18 週間反復静脈内投与試験並びにウサギ胚・胎児発生試験で得られたNOAELにおける定常状態での曝露量（$AUC_{0\text{-}24}$）とヒトでの臨床推奨用量における曝露量（$AUC_{0\text{-}24}$）に基づく曝露量比を表 2.4-1 に示す。ラット 18 週間反復静脈内投与試験での曝露量比は雄で 2.2、雌で 1.4 であったが、イヌ 18 週間反復静脈内投与試験では雄で 0.12、雌で 0.11 であった。また、ウサギ胚・胎児発生試験では母動物毒性については 0.16、胚・胎児発生毒性では 0.39 であ った。

表 2.4-1　ダリナパルシンの非臨床毒性試験の NOAEL における曝露量とヒトでの臨床推奨用量における曝露量に基づく曝露量比

Type of study (Study Number)	**NOAEL (mg/kg/day)**	**NOAEL (mg/m^2/day)**	**$AUC_{0\text{-}24}$ at NOAEL [a] (ng•h/mL)**	**Exposure Margin[b]**
Repeat Dose Toxicity Study				
18-Week Study in Rats (R14-S004-RD)	15	90	Male: 52144 Female: 34160	Male: 2.1 Female: 1.4
18- Week Study in Dogs (D14-S004-RD)	3	60	Male: 2798 Female: 2680	Male: 0.12 Female: 0.11
Reproductive and Development Toxicity Study				
Embryo-Fetal Development Toxicity Study in Rabbits (Q14-S004-2RP)	Maternal: 3 Fetal: 10	Maternal: 36 Fetal: 120	Maternal: 3937 Fetal: 9393	Maternal: 0.16 Fetal: 0.39

NOAEL = No observed adverse effect level, $AUC_{0\text{-}24}$ = Area under the concentration-time curve from time 0 to 24 hrs
a: Values (Day 110 for rat and dog, Gestation Day 18 for rabbit) were shown as arsenic concentration corrected for molecular weight (darinaparsin: 411.31, As: 74.92), using the equation, As conc. = darinaparsin conc. × (74.92 / 411.31).
b: Based on the human $AUC_{0\text{-}24}$ (24005.9 ng•h/mL) at clinical dose of 300 mg/m^2/day on Day 5 in the clinical study (Study No. SP-02L02, Module 2.7.2.2.2.4).

* 新薬承認情報提供時に置換

5　総括及び結論

ダリナパルシンの薬理作用、薬物動態及び毒性について明らかにするため、*in vitro* 試験及び各動物種を用いた非臨床試験を実施した。

ダリナパルシンは、ヒト TCL 細胞を含む各種ヒト造血器腫瘍及び固形癌由来細胞に対して広範な増殖抑制作用を示し、概して造血器腫瘍細胞に対して強力な作用を示した。ダリナパルシンの作用機序として、アポトーシス及び G2/M 期での細胞周期停止を誘導することが示され、一部の細胞ではネクローシスの誘導も観察された。ダリナパルシンは、ATO と同様、主にミトコンドリア機能障害（膜電位低下）、ROS 産生及び細胞内シグナル伝達経路の調節（カスパーゼ-9 活性化）を介して、アポトーシスを誘導することが示された。一方、ATO とは異なり、ダリナパルシンは白血病細胞の顆粒球系への分化を誘導せず、そのアポトーシス誘導作用に Bcl-2 タンパク質の発現低下及び PML/RARα 融合タンパク質の分解は必須ではないことが示唆された。また、ダリナパルシンの作用に対する細胞内 GSH 枯渇の影響はほとんど認められなかった。ヒト MM 細胞異種移植モデルマウスにおいて、ダリナパルシンは腫瘍体積だけでなく、hIgG 産生も減少させたことから、MM だけでなく、IgG 上昇を伴うその他の各種腫瘍に対するダリナパルシンの有効性も期待される。さらに、ダリナパルシンは *in vitro* 及び *in vivo* 試験において血管新生阻害作用を示し、ダリナパルシンが固形癌に対しても有効性を示す可能性が示唆された。

安全性薬理試験では、ラットの中枢神経系に対する影響を評価した Irwin 変法による試験において 50 mg/kg までの単回静脈内投与でダリナパルシンの影響は認められなかった。また、呼吸器系に対する影響評価では、覚醒イヌへの 15 mg/kg 以下の単回静脈内投与は呼吸機能に対する影響を示さなかった。ラット及びイヌ 18 週間反復静脈内投与毒性試験におけるダリナパルシン単回投与後の C_{max} に基づくと、安全性薬理試験におけるラット（50 mg/kg）及びイヌ（15 mg/kg）への単回投与時の C_{max} はいずれも臨床推奨用量投与時の C_{max} より高いと考えられる。したがって、臨床使用上、ダリナパルシンが中枢神経系及び呼吸機能へ重篤な影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。心血管系に対する影響を評価する *in vitro* 試験では、hERG カリウム電流の濃度依存的な阻害及びモルモット摘出心臓における刺激伝導系に対する影響がみられた。*In vivo* 試験では、覚醒イヌへの 30 mg/kg 単回静脈内投与で心拍数増加及び血圧上昇が一過性に認められ、ECG 検査で RR 間隔及び PR 間隔の短縮を認めた以外、心血管系への影響は認められなかった。しかしながら、イヌを用いた 18 週間反復静脈内投与試験（0、3、10 又は 30 mg/kg/日）では、ECG 検査において 10 mg/kg 以上の群で QTc 間隔の延長が認められており、ダリナパルシンによる QT/QTc 間隔延長作用の可能性が示唆されている。QT/QTc 間隔の延長は ATO でも観察されている（トリセノックス®注 10 mg の申請資料概要 2.6.2 項）。

薬力学的薬物相互作用試験において、ダリナパルシンは、ヒト MM 細胞に対してメルファラン、ボルテゾミブ又はドキソルビシンとの併用により単剤と比較して増殖抑制作用を増大させることが示された。また、ヒト TCL 細胞に対してフォロデシン又はプララトレキサートの併用により相乗的な増殖抑制作用を示したが、ロミデプシンとの併用では拮抗作用を示した。

ラット及びイヌにダリナパルシンを静脈内投与したときの曝露に顕著な性差はみられなかった。ラット及びイヌにダリナパルシンを反復静脈内投与したとき、イヌでは Day 1 及び Day 110

ともに用量比例性がみられたが、ラットでは Day 110 での曝露の増加は用量の増加比を下回っていた。ラットでは Day 110 で Day 1 に比較して蓄積性がみられたのに対し、イヌでは顕著な蓄積性はみられなかった。

ラットに ^{76}As-ダリナパルシンを静脈内投与したとき、放射能濃度が最も高かったのは血液中で、放射能濃度は投与後 48 時間までほぼ一定の値を示した。投与後 48 時間までに回収された放射能のほとんどは血液（41.6%）であり、カーカスの残存率も高かった（35.3%）。

ラットに三酸化ヒ素を投与した結果、血液中ヒ素の大部分が赤血球中のタンパクと結合し、長時間血液中に滞留すること（$t_{1/2}$ が 60 日）が報告されている（有吉ら 1974）。ラットにダリナパルシンを投与した時も同様に、血漿中のヒ素（ダリナパルシン由来のヒ素含有化合物）が赤血球中タンパクと結合したため投与 48 時間後でも尿や糞には殆ど排泄されず、蓄積性がみられたと考えられる。一方で、イヌ、サル及びヒト（2.7.2.2.2.4 項）においては、ダリナパルシン投与後の全血及び／又は血漿中濃度は速やかに減少してヒ素は尿中に排泄されるため、ラットで示唆された赤血球中タンパクと結合する可能性は低いと考えられる。

マウス、ラット、ウサギ、サル及びヒト血漿にダリナパルシンを添加した時の血漿中タンパク結合率は 78.2%～94.7%であったが、イヌ血漿中タンパク結合率は 8.73%～29.9%と他の動物種よりも低かった。DMA^V は、ラット、イヌ及びヒト血漿中タンパクとの結合を示さなかった。ラット、イヌ及びヒト血液にダリナパルシンを添加した時の *in vitro* 血球移行性試験から、いずれの種においても血球への移行性が高いことが明らかとなった。イヌでの血液－血漿中濃度比に *in vitro* と *in vivo* での乖離がみられた。この要因として、ダリナパルシンを血液に添加後の複数のヒ素含有化合物の血球移行性を評価していること、*in vitro* の閉鎖的な環境と *in vivo* の血液が循環している環境による差異などにより移行性に *in vitro* と *in vivo* で乖離がみられた可能性がある。

イヌ及びサルにダリナパルシンを静脈内投与したときの血漿中には主に DMA^V が検出された。イヌでは投与終了直後にわずかなダリナパルシンしか検出されず、サルでは検出されなかったことから、生体内でダリナパルシンは非常に不安定であることが示された。ヒト肝細胞を用いた *in vitro* 代謝試験において、緩衝液の結果の比較により DMA^V は非酵素的な分解により生成することが示唆された。ヒ素化合物の緩衝液中での安定性に関しては、グルタチオン抱合体が pH 及び温度の上昇に伴い分解しやすい傾向があるとの報告がある（Raab et al. 2004、Yehiayan et al. 2009）。静脈内投与されたダリナパルシンの DMA^V への変換に関与する酵素は不明であるが、ダリナパルシンの血漿中での不安定性及び緩衝液中においても DMA^V に変換することを考慮するとグルタチオン抱合体であるダリナパルシンから DMA^V への変換は主に非酵素依存的な分解であることが示唆される。

イヌ及びサルにダリナパルシンを静脈内投与したとき、ヒ素は主に尿中に排泄された。

CYP 阻害作用の検討では、ダリナパルシンは CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19 及び CYP3A に対して阻害作用有すると考えられた。また、ダリナパルシンは、CYP2B6、CYP2C9 及び CYP3A4 に対して誘導作用を示した。DMA^V の CYP に対する阻害作用は示されなかったが、CYP2B6、CYP2C8 及び CYP3A4 に対して誘導作用を示すと考えられた。トランスポーター基質認識性及び阻害作用の検討では、ダリナパルシン及び DMA^V ともに P-gp、

BCRP、OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3 及び OCT2 の基質ではないことが示された。また、ダリナパルシンによる P-gp に対する阻害作用がみられたが、BCRP、OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3 及び OCT2 に対する阻害作用は非常に弱いか又はみられなかった。DMA^V は P-gp、BCRP、OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3 及び OCT2 に対して阻害作用を示さなかった。非臨床 *in vitro* 試験で示されたダリナパルシンによる CYP 阻害作用、誘導作用及び P-gp 阻害作用については、臨床試験での血漿中濃度を考慮すると臨床的に大きな影響を与えないと考える（2.7.2.3.3.1 項）。また、DMA^V による誘導作用については、*in vitro* 試験でのメッセンジャーリボ核酸の誘導率が 2～3 倍程度と小さいこと、本剤の臨床での投与レジメンが 5 日間連日投与後に 16 日間休薬というサイクル（21 日間サイクル）であることから誘導作用は限定的と考えられる。

ダリナパルシンのマウス及びラットにおける概略の致死量はそれぞれ 250 mg/kg（750 mg/m^2）及び 50 mg/kg（300 mg/m^2）、マウス、ラット及びイヌにおける MTD はそれぞれ 200 mg/kg（600 mg/m^2）、30 mg/kg（180 mg/m^2）及び 30 mg/kg（600 mg/m^2）超であった。

反復投与毒性試験では、流涎、嘔吐や軟便をはじめとする消化器症状、過剰興奮、嗜眠、自発運動低下、頻呼吸、結膜充血などの一般症状が観察され、ラットでは摂餌量低下による体重増加抑制がみられた。これらの所見は反復静脈内投与試験において休薬期間中に回復性を示した。ダリナパルシン投与により認められた一般症状はヒ素化合物に共通して認められる所見と考えられた（製品評価技術基盤機構 2008）。ダリナパルシンのラット及びイヌ 18 週間反復静脈内投与試験では、病理組織学的検査において生殖器への影響（ラットにおける精巣の精細管変性／萎縮及び伸長精子細胞の変性並びにイヌにおける精巣での精子細胞の滞留）が観察された。この他、ラット 18 週間反復静脈内投与試験では血液学的検査における網状赤血球の増加並びに骨髄検査におけるリンパ球系比率の減少及び顆粒球系比率の上昇が観察されたことから、ダリナパルシンの毒性の標的臓器は生殖器及び造血器であることが示唆された。生殖器及び造血器はヒ素化合物の毒性標的臓器としても知られており、薬理作用（細胞増殖抑制作用）に関連すると考えられる。ATO の反復投与毒性試験（ラット腹腔内投与及びイヌ静脈内投与）では、病理組織学的検査においてラットでは 1 mg/kg/日以上の投与で肝臓、中枢神経系及び骨髄に変化が認められ、イヌでは 1 mg/kg/日以上の投与で肝臓及び精巣に、3 mg/kg/日以上の投与で腎臓に変化が認められることが報告されている（トリセノックス®注 10 mg の申請資料概要 2.6.6 項）。ダリナパルシンの遺伝毒性試験では、2 つの *in vitro* 試験（細菌を用いる復帰突然変異試験及び哺乳類細胞を用いる染色体異常試験）の結果は陽性であったが、*in vivo* マウス小核試験は陰性であった。ヒ素化合物は遺伝毒性を有することが知られている（製品評価技術基盤機構 2008）。ダリナパルシンは進行がん患者の治療を目的としているため、がん原性試験は実施しなかった。しかしながら、ダリナパルシンの代謝物である DMA^V を初めとする種々の有機ヒ素化合物が発がん性に関する動物試験において腫瘍発生増加作用を示しており、国際がん研究機関（IARC）はヒ素及びヒ素化合物をグループ 1（ヒトに対して発がん性がある物質）に分類している（製品評価技術基盤機構 2008）。したがって、ダリナパルシンもヒトに対して発がん性がある物質に分類される。ダリナパルシンはウサギ胚・胎児発生試験において母動物毒性の認められる用量で胚・胎児発生毒性を示したが、催奇形性は示さなかった。しかし、ヒ素は胎盤を通過し、ヒ素化合物を用いた実験動物に対する

生殖発生毒性試験において、無機ヒ素化合物はラット、マウス及びハムスターへの単回腹腔内投与並びにマウスへの単回経口投与で催奇形性を示すことが報告されている（製品評価技術基盤機構 2008）。したがって、ダリナパルシンの胎盤通過性は不明であるが、潜在的生殖発生毒性を有すると考えられる。複数の試験の一般状態観察並びに剖検及び病理組織学的検査において、投与部位の浮腫、創傷、痂皮形成、潰瘍形成、炎症、壊死などの異常所見が観察された。ダリナパルシンの局所刺激性は否定できないが、投与手技に起因する変化である可能性も考えられ、少なくとも大動物（イヌ）における局所刺激性に関連する異常は病理組織学的変化を伴わない軽微な浮腫のみであった。臨床試験においても投与部位の刺激性が認められており、臨床使用時には中心静脈からの投与が推奨されている。原薬中の不純物管理として規格設定されている不純物A*、不純物C*、不純物B*及び不純物D*について安全性評価を実施した。その結果、いずれの不純物も安全性が確認された。*In vitro* 3T3 NRU 光毒性試験では、ダリナパルシンに光毒性は示されなかった。以上のように、*in vitro* 試験及び各種動物を用いたダリナパルシンの非臨床試験の結果から、ダリナパルシンの薬理作用、薬物動態及び毒性プロファイルが明らかとなった。

* 新薬承認情報提供時に置換

参考文献

Hermine O, Dombret H, Poupon J, Arnulf B, Lefrere F, Rousselot P, et al. Phase II trial of arsenic trioxide and alpha interferon in patients with relapsed/refractory adult T-cell leukemia/lymphoma. Hematol J 2004;5(2):130-4. (4.3.7)

Hussein MA. Trials of arsenic trioxide in multiple myeloma. Cancer Control 2003;10(5):370-4. (4.3.8)

List A, Beran M, DiPersio J, Slack J, Vey N, Rosenfeld CS, et al. Opportunities for Trisenox (arsenic trioxide) in the treatment of myelodysplastic syndromes. Leukemia 2003;17(8):1499-507. (4.3.11)

Raab A, Meharg AA, Jaspars M, Genney DR, Feldmann J. Arsenic–glutathione complexes—their stability in solution and during separation by different HPLC modes. J Anal At Spectrom. 2004;19(1):183-90. (4.3.20)

Yehiayan L, Pattabiraman M, Kavallieratos K, Wang X, Boise LH, Cai Y. Speciation, formation, stability and analytical challenges of human arsenic metabolites. J Anal At Spectrom. 2009;24(10):1397-405. (4.3.21)

製品評価技術基盤機構. 化学物質の初期リスク評価書 砒素及びその無機化合物. 2008. (4.3.18)

有吉敏彦、池田高士. ひ素化合物投与ラット、家兎におけるひ素の体内分布、排泄について. 衛生化学. 1974;20(5):290-5. (4.3.22)

[redacted] (4.3.24)