目次

1　緒言 4

2　申請する効能効果及び用法用量 5

図目次

図 2.6.1-1　ダリナパルシンの構造式.....4

略語及び用語の説明

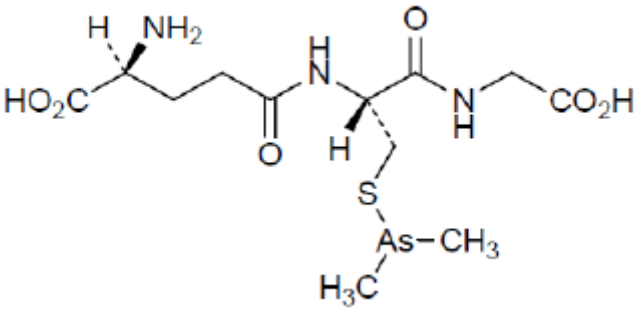
記号	日本語	英語
INN	国際一般名	International Nonproprietary Name
JAN	医薬品一般的名称	Japanese Accepted Name
SP-02	ダリナパルシンの開発コード（別称：ZIO-101、SGLU-1）	Development code of darinaparsin (other name: ZIO-101, SGLU-1)

1　緒言

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、グルタチオン抱合体構造を有する有機ヒ素化合物である。ダリナパルシンは、腫瘍細胞に対して増殖抑制作用、アポトーシス及び細胞周期停止の誘導作用を、並びに血管新生阻害作用を示すことから、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。ダリナパルシン注射剤は、ガラス製バイアルに充填された無菌・白色～灰白色の凍結乾燥注射剤であり、1 バイアル中にダリナパルシンを 150 mg 含有する。pH 調節剤として塩酸及び水酸化ナトリウムを含む。ダリナパルシン注射剤のバイアル（ダリナパルシン 150 mg 含有）に注射用水 1.8 mL を注入してダリナパルシン溶解液を調製する。その後、生理食塩液を加えて投与用溶液を調製する。

一般名：darinaparsin（INN）、ダリナパルシン（JAN）
化学名：L-γ-Glutamyl-*S*-(dimethylarsanyl)-L-cysteinylglycine
分子量：411.31

図 2.6.1-1　ダリナパルシンの構造式



2　申請する効能効果及び用法用量

【予定する効能・効果】

再発又は難治性の末梢性 T 細胞リンパ腫

【予定する用法・用量】

通常、成人にはダリナパルシンとして 1 日 1 回 300mg/m^2（体表面積）を 1 時間かけて 5 日間点滴静注した後、16 日間休薬する。この 21 日間を 1 サイクルとして投与を繰り返す。なお、患者の状態により適宜減量する。

目次

1 まとめ 8
2 効力を裏付ける試験 10
2.1 *In vitro* 細胞増殖抑制作用 10
2.1.1 ヒト TCL 細胞に対する増殖抑制作用 10
2.1.2 各種ヒト造血器腫瘍細胞に対する増殖抑制作用 10
2.1.3 初代培養白血病細胞に対する作用 13
2.1.4 各種ヒト腫瘍細胞に対する増殖抑制作用 15
2.2 作用機序に関する検討 16
2.2.1 アポトーシス誘導作用 16
2.2.2 G2/M 期での細胞周期停止の誘導 19
2.2.3 アポトーシス経路に対する作用 21
2.3 ATO の作用機序との比較 25
2.4 *In vivo* 抗腫瘍作用 31
2.4.1 ヒト MM 細胞異種移植マウスに対する作用 31
2.5 血管新生阻害作用 32
3 副次的薬理試験 35
4 安全性薬理試験 36
4.1 中枢神経系への影響 36
4.2 心血管系への影響 36
4.2.1 *In vitro* 試験 36
4.2.2 *In vivo* 試験 40
4.3 呼吸器系への影響 41
5 薬力学的薬物相互作用試験 42
5.1 ヒト MM 細胞におけ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 42
5.2 ヒト TCL 細胞におけるダリナパルシン及び既存の PTCL 治療薬との併用効果 46

6　考察及び結論.....48

7　図表.....50

参考文献.....51

表目次

表 2.6.2-1　ダリナパルシンによる各種ヒト造血器腫瘍細胞の増殖抑制率（%）（MTS 法）.....11

表 2.6.2-2　ダリナパルシンによる各種ヒト造血器腫瘍細胞の増殖抑制率（%）（MTT 法）.....11

表 2.6.2-3　ダリナパルシンによる各種ヒト造血器腫瘍細胞の生存率（%）（トリパンブルー染色法）.....12

表 2.6.2-4　ヒト腫瘍細胞パネルに対するダリナパルシンの増殖抑制作用.....15

表 2.6.2-5　HUVEC に対するダリナパルシンの増殖抑制作用.....33

表 2.6.2-6　安全性薬理試験項目一覧.....36

表 2.6.2-7　ダリナパルシンのモルモット摘出心臓を用いた心臓伝導系に対する影響.....39

表 2.6.2-8　各種ヒト TCL 細胞に対するダリナパルシンと PTCL 治療薬との併用による増殖抑制作用.....46

図目次

図 2.6.2-1　ダリナパルシンによるヒト TCL 細胞の生存率 10

図 2.6.2-2　ダリナパルシン及び亜ヒ酸ナトリウムによる各種ヒト造血器腫瘍細胞の生存率 13

図 2.6.2-3　AML 患者由来 PBMC のコロニー形成に対するダリナパルシンの作用 14

図 2.6.2-4　HL60 細胞のコロニー形成に対するダリナパルシンの作用 14

図 2.6.2-5　健康被験者由来 PBMC のコロニー形成に対するダリナパルシンの作用 15

図 2.6.2-6　ダリナパルシンの推定作用機序 16

図 2.6.2-7　HL60 細胞におけるダリナパルシンのアポトーシス誘導作用 17

図 2.6.2-8　NB4 細胞におけるダリナパルシンのアポトーシス及びネクローシス誘導作用 18

図 2.6.2-9　HL60 細胞におけるダリナパルシンのアポトーシス及びネクローシス誘導作用 19

図 2.6.2-10　HL60 及び NB4 細胞の細胞周期進行に対するダリナパルシンの作用 20

図 2.6.2-11　HL60 細胞におけるダリナパルシンによる G2/M 期における細胞周期停止の誘導に対する NAC の作用 21

図 2.6.2-12　HL60 細胞におけるダリナパルシンの細胞内スーパーオキシド産生作用 22

図 2.6.2-13　HL60 細胞におけるダリナパルシンの細胞内 H_2O_2 産生作用 22

図 2.6.2-14　ダリナパルシン及び ATO によるミトコンドリアからのシトクロム c 遊離 23

図 2.6.2-15　ダリナパルシン及び ATO によるミトコンドリア膨化作用 24

図 2.6.2-16　HL60 細胞におけるダリナパルシンのカスパーゼ-9 及びカスパーゼ 8 活性化 25

図 2.6.2-17　ダリナパルシンで処理した NB4 及び HL60 細胞における Bcl-2 タンパク質濃度 26

図 2.6.2-18　ダリナパルシン及び ATO の細胞傷害作用に対する細胞内 GSH の影響 27

図 2.6.2-19　PML/RARα 融合遺伝子を発現した U937/PR9 細胞に対するダリナパルシン及び ATO の増殖抑制作用 29

図 2.6.2-20　ダリナパルシン及び ATO 処理による NB4 細胞の CD11b 陽性比率 30

図 2.6.2-21　ダリナパルシン及び ATO 処理による NB4 細胞の NBT 陽性比率 30

図 2.6.2-22　LAGλ-1 移植マウスの腫瘍体積に対するダリナパルシンの作用 31

図 2.6.2-23　LAGλ-1 移植マウスの血清中 hIgG レベルに対するダリナパルシンの作用.....32

図 2.6.2-24　血管内皮細胞チューブ形成に対するダリナパルシンの阻害作用.....33

図 2.6.2-25　マトリゲルプラグアッセイにおけるダリナパルシンの血管新生阻害作用.....34

図 2.6.2-26　ダリナパルシンの hERG 阻害作用の濃度依存性.....37

図 2.6.2-27　ヒト MM 細胞に対するダリナパルシンとメルファランとの併用による増殖抑制作用.....43

図 2.6.2-28　ヒト MM 細胞に対するダリナパルシンとボルテゾミブとの併用による増殖抑制作用.....44

図 2.6.2-29　ヒト MM 細胞に対するダリナパルシンとドキソルビシンとの併用による増殖抑制作用.....45

図 2.6.2-30　Molt-4 細胞に対するダリナパルシンとフォロデシン又はプララトレキサートとの併用によるアポトーシス誘導作用.....47

図 2.6.2-31　Molt-4 細胞に対するダリナパルシンとロミデプシンとの併用によるアポトーシス誘導作用.....47

略語及び用語の説明

略語又は用語	日本語	英語
AML	急性骨髄性白血病	Acute myeloid leukemia
APL	急性前骨髄球性白血病	Acute promyelocytic leukemia
ATO	三酸化ヒ素	Arsenic trioxide
BrdU	ブロモデオキシウリジン	Bromodeoxyuridine
CI	併用係数	Combination index
CM-H_2DCFDA	5,6-カルボキシ-2',7'-ジクロロフルオレセイン-ジアセテート	5,6-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein-diacetate
C_{max}	最高血漿中濃度	Maximum concentration in plasma
CsA	シクロスポリン A	Cyclosporine A
dP/dt_{max}	左室圧一次微分最大値	Maximum rate of left ventricular rise
dP/dt_{min}	左室圧一次微分最小値	Maximum rate of left ventricular fall
DNA	デオキシリボ核酸	Deoxyribonucleic acid
ECG	心電図	Electrocardiogram
ELISA	酵素結合免疫吸着測定法	Enzyme-linked immuno-sorbent assay
FGFb	線維芽細胞増殖因子	Fibroblast growth factor
GSH	グルタチオン	Glutathione
HEK	ヒト胚腎臓	Human embryonic kidney
HEPES	4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
hERG	ヒト ether-à-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
H_2O_2	過酸化水素	Hydrogen peroxide
HUVEC	ヒト臍帯静脈内皮細胞	Human umbilical vein endothelial cells
IC_{50}	50%阻害濃度	50% inhibitory concentration
L-BSO	L-ブチオニンスルホキシミン	L-Buthionine sulfoximine
MM	多発性骨髄腫	Multiple myeloma
MTS	3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
MTT	3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NAC	N-アセチルシステイン	N-Acetylcysteine
NBT	ニトロブルーテトラゾリウム	Nitro blue tetrazolium
NCI	米国国立癌研究所	National Cancer Institute
PARP	ポリ（アデノシン二リン酸-リボース）ポリメラーゼ	Poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase
PBMC	末梢血単核細胞	Peripheral blood mononuclear cells

略語又は用語	日本語	英語
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応	polymerase chain reaction
PI	ヨウ化プロピジウム	Propidium iodide
PS	フォスファチジルセリン	Phosphatidylserine
PTCL	末梢性 T 細胞リンパ腫	Peripheral T-cell lymphoma
PTPC	ミトコンドリア透過性遷移孔複合体	Permeability transition pore complex
QTc 間隔	補正 QT 間隔	QT interval corrected for heart rate
ROS	活性酸素種	Reactive oxygen species
SCID	重症複合免疫不全症	Severe combined immunodeficiency
SDS-PAGE	ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
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)
TCL	T 細胞リンパ腫	T-cell lymphoma
T_{p-e}	T 波頂点から T 波終末点	Peak-to-end of the T wave
VEGF	血管内皮細胞増殖因子	Vascular endothelial growth factor
WST-1	2-(4-ヨードフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウム	2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium
XTT	ナトリウム 3’-[1-[(フェニルアミノ)-カルボニル]-3, 4-テトラゾリウム]-ビス(4-メトキシ-6-ニトロ)ベンゼン-スルホン酸水和物	Sodium 3′-[1-[(phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzene-sulfonic acid hydrate

1　まとめ

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。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（PTCL）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。

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。ダリナパルシンは、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増殖抑制作用を示した。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 に対する阻害作用は比較的弱かった。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 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。ヒ素を含む医薬品としては、三酸化ヒ素（ATO）を製剤化した ATO 製剤（トリセノックス®注）が再発又は難治性の急性前骨髄球性白血病（APL）治療薬として上市されている。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 の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。ヒト多発性骨髄腫（MM）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）の細胞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。

安全性薬理試験では、中枢神経系、心血管系及び呼吸器系の機能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投与による影響は認められなかった。心血管系に対する影響として、*in vitro* 試験ではダリナパルシンはヒト ether-à-go-go 関連遺伝子（hERG）を発現させたヒト胚腎臓（HEK）細胞において濃度依存的に 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 100 μmol/L の適用濃度で QT 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、心電図（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。呼吸器系に対する影響評価では、ダリナパルシンは覚醒イヌへの単回静脈内投与において 15 mg/kg まで呼吸機能に対する影響を示さなかった。

薬力学的薬物相互作用試験では、各種腫瘍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 T 細胞リンパ腫細胞において、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。

2　効力を裏付ける試験

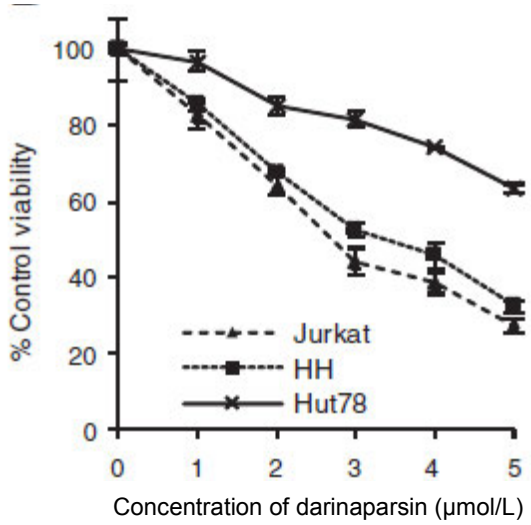
2.1　*In vitro* 細胞増殖抑制作用

2.1.1　　ヒト TCL 細胞に対する増殖抑制作用

試験番号：Ravi 2014、添付資料番号：4.2.1.1.1

ヒト TCL 細胞（Jurkat、HH 及び Hut78）を用いて、ダリナパルシンの細胞増殖抑制作用を評価した。各細胞（1×10^4 cell/100 µL）を 96 穴プレートに播種し、ダリナパルシン（1～5 µmol/L）存在下で 72 時間培養後、3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド（MTT）法により総細胞数に示す生細胞の割合（生存率）を評価した。ダリナパルシンは Jurkat、HH 及び Hut78 細胞に対していずれも濃度依存的に生存率を低下させ、50%阻害濃度（IC_{50}）値はそれぞれ 2.7、3.2 及び 6.7 µmol/L であった（図 2.6.2-1）。

図 2.6.2-1　　ダリナパルシンによるヒト TCL 細胞の生存率



Source: Ravi 2014, Figure1 B

2.1.2　　各種ヒト造血器腫瘍細胞に対する増殖抑制作用

試験番号：SP02-PD-01、添付資料番号：4.2.1.1.2

試験番号：SP02-PD-06、添付資料番号：4.2.1.1.3

各種ヒト造血器腫瘍細胞［APL（NB4、HL60）、急性骨髄単球性白血病（KBM3）、急性骨髄性白血病（AML）（AML-2、AML-3）、慢性骨髄性白血病（KBM5、KBM7）、TCL（Jurkat）、B 細胞リンパ腫（Raji）、MM（CAG）、急性リンパ芽球性白血病（Z-119）］を用いて、ダリナパルシンの細胞増殖抑制作用を評価した（試験番号 SP02-PD-01）。各細胞（5×10^4 ～4×10^5 cell/well）を 96 穴プレートに播種し、ダリナパルシン存在下で最長 72 時間培養後、3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム（MTS）法又は MTT 法により生細胞数を測定し、対照群（未処理）に対する細胞増殖率の IC_{50} 値を算出

した。また、各細胞（5×10^4 cell/mL）を 24 穴プレートに播種し、ダリナパルシンで 72 時間処理後、トリパンブルー染色法により生細胞数を測定し、対照群に対する生存率の IC_{50} 値を算出した。

MTS 法において、各細胞はダリナパルシンの 72 時間処理により濃度依存的に増殖が抑制され、その IC_{50} 値は 1.9～4.7 μmol/L であった（表 2.6.2-1）。同様の結果は MTT 法でも認められた（表 2.6.2-2）。また、トリパンブルー染色法において、ダリナパルシンは各細胞の生存率を低下させ、その IC_{50} 値は MTS 及び MTT 法で得られた IC_{50} 値と同様であった（表 2.6.2-3）。

表 2.6.2-1　　ダリナパルシンによる各種ヒト造血器腫瘍細胞の増殖抑制率（%）（MTS 法）

Cell Line	Darinaparsin Concentration (μmol/L)						IC_{50} (μmol/L)
	0	1	2	4	6	8	
KBM7	100	63.1	33.1	14.1	5.3	1.3	1.9
NB4	100	69.7	40.4	23.1	7.9	ND	2.3
HL60	100	94.6	68.4	26.8	14.7	12.3	2.9
Z-119	100	100.5	98.2	51.6	12.4	5.1	4.4
KBM5	100	106.9	96.8	73.0	20.8	9.8	4.7

Data represents % of control cell growth.
IC_{50} =50% inhibitory concentration; ND = not determined
Source: Study Report SP02-PD-01, Table 6

表 2.6.2-2　　ダリナパルシンによる各種ヒト造血器腫瘍細胞の増殖抑制率（%）（MTT 法）

Cell Line	Darinaparsin Concentration (μmol/L)							IC_{50} (μmol/L)
	0	1	2	4	5	6	8	
AML-2	100	73.9	31.2	13.5	ND	4.2	6.4	<2
AML-3	100	89.9	49.1	29.3	ND	21.1	16.4	<2
KBM7	100	76.8	39.8	14.3	ND	9.9	9.9	<2
NB4	100	57.5	8.2	3.4	-0.8	ND	ND	<2
HL60	100	82	116	61	48	ND	ND	<4
Jurkat	100	96.2	75.7	47.2	21.4	ND	ND	<4
Raji	100	98.7	83	38	40	ND	ND	<4
CAG	100	89.4	91.5	60.4	32.7	ND	ND	<5
KBM5	100	94.7	88.7	53.7	ND	30.2	25.0	<6

Data represents % of control cell growth.
IC_{50} = 50% inhibitory concentration; ND = not determined
Source: Study Report SP02-PD-01, Table 7

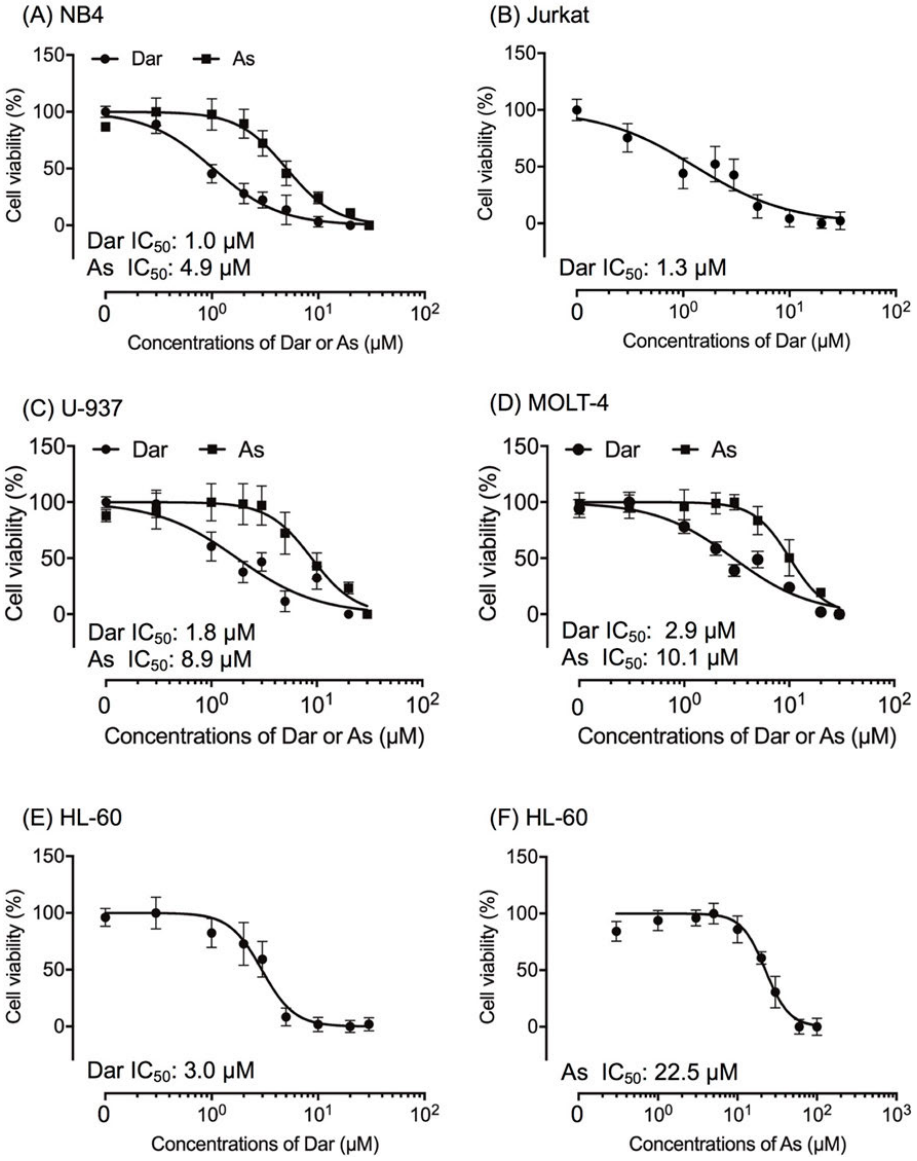
表 2.6.2-3　　ダリナパルシンによる各種ヒト造血器腫瘍細胞の生存率（%）（トリパンブルー染色法）

Cell Line	Darinaparsin Concentration (µmol/L)					IC_{50} (µmol/L)
	0	1	2	4	5	
NB4	100	88	24	0.7	0.7	<2
CAG	100	71	48	37	21	<2
KBM3	100	98	50	24	12	2
Z-119	100	72	62	17	17	<4
HL60	100	96	80	11	2.5	<4
Jurkat	100	90	62	ND	20.4	<5

Data represents % of control cell survival.
IC_{50} = 50% inhibitory concentration; ND = not determined
Source: Study Report SP02-PD-01, Table 8

各種ヒト造血器腫瘍細胞［APL（NB4、HL60）、TCL（Jurkat、Molt-4）、組織球性リンパ腫（U-937）］に対するダリナパルシンの細胞増殖抑制作用を、ATO と同じ三価の無機ヒ素化合物である亜ヒ酸ナトリウム（$NaAsO_2$）と比較した（試験番号 SP02-PD-06）。各細胞（2×10^5 cell/mL）を 96 穴プレートに播種し、ダリナパルシン又は亜ヒ酸ナトリウム（いずれも 0.3、1、2、3、5、10、20 又は 30 µmol/L、ただし、HL60 細胞に対する亜ヒ酸ナトリウムの濃度は 1、3、5、10、20、30、60 又は 100 µmol/L）存在下で 24 時間培養後、2-(4-ヨードフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウム（WST-1）法により生細胞数を測定し、対照群（未処理）に対する生存率の IC_{50} 値を算出した。各細胞はダリナパルシンの 24 時間処理により濃度依存的に増殖が抑制された。ダリナパルシンに対する感受性は NB4、Jurkat、U-937、Molt-4 及び HL60 細胞の順に高く、IC_{50} 値はそれぞれ 1.0、1.3、1.8、2.9 及び 3.0 µmol/L であった（図 2.6.2-2）。一方、亜ヒ酸ナトリウムの NB4、U-937、Molt-4 及び HL60 細胞に対する IC_{50} 値は、4.9、8.9、10.1 及び 22.5 µmol/L であり、いずれもダリナパルシンの作用と比較して弱かった。

図 2.6.2-2　　ダリナパルシン及び亜ヒ酸ナトリウムによる各種ヒト造血器腫瘍細胞の生存率



Dar = darinaparsin; As = sodium arsenite
Source: Study Report SP02-PD-06, Figure 1

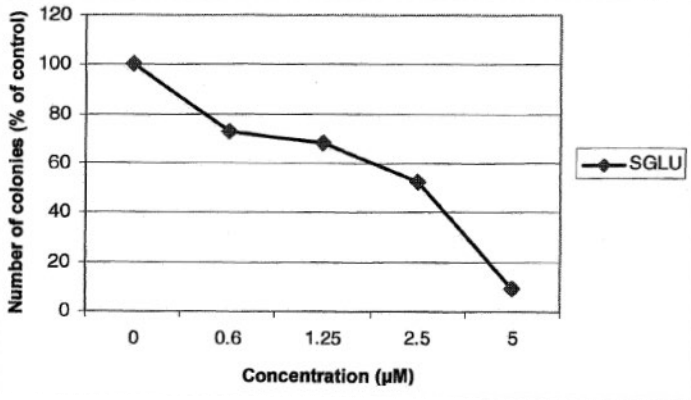
2.1.3　　初代培養白血病細胞に対する作用

試験番号：SP02-PD-01、添付資料番号：4.2.1.1.2

AML 患者由来の細胞を用いて、ダリナパルシンの初代培養白血病細胞に対する増殖抑制作用を評価した。AML 患者（2 名）及び健康被験者（2 名）由来 PBMC をサイトカイン含有半固形メチルセルロース培地に懸濁し、96 穴プレート（4×10^4 cell/well）に播種した。各細胞をダリナパルシン添加／非添加で 8 日間培養後、顕微鏡下で細胞が 50 個以上集積しているコロニー数を計測し、対照群（未処理）でのコロニー数と比較したコロニー形成率により増殖抑制作用を評価した。患者由来 PBMC に対してダリナパルシンは濃度依存的にコロニー形成を阻害し、IC_{50} 値は約

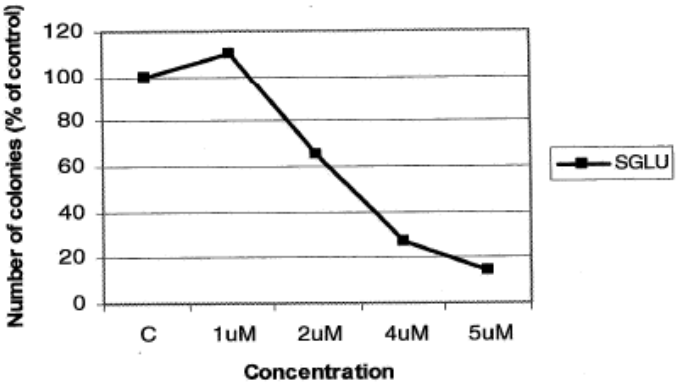
2.5 µmol/L であった（代表例を図 2.6.2-3 に示す）。この値は、HL60 細胞を 5 日間培養し、同様にコロニー形成阻害を検討した結果（IC_{50} 値：約 2.75 µmol/L）と同程度であった（図 2.6.2-4）。一方、AML 患者由来 PBMC 及び HL60 細胞のコロニー形成に対するダリナパルシンの最大抑制率は約 75%であったのに対し、同様の濃度範囲での健康被験者由来 PBMC に対する最大抑制率は約 50%であった（代表例を図 2.6.2-5 に示す）。以上の結果より、ダリナパルシンは AML 患者由来 PBMC 及び HL60 細胞のコロニー形成を濃度依存的に抑制するが、健康被験者由来 PBMC に対する作用は比較的弱いことが明らかとなった。

図 2.6.2-3　　AML 患者由来 PBMC のコロニー形成に対するダリナパルシンの作用



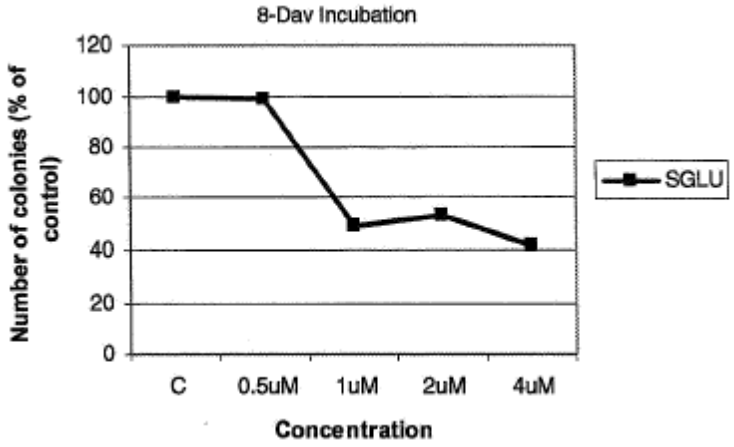
SGLU = darinaparsin
Source: Study Report SP02-PD-01, Figure 18

図 2.6.2-4　　HL60 細胞のコロニー形成に対するダリナパルシンの作用



SGLU = darinaparsin
Source: Study Report SP02-PD-01, Figure 19

図 2.6.2-5　　健康被験者由来 PBMC のコロニー形成に対するダリナパルシンの作用



SGLU = darinaparsin
Source: Study Report SP02-PD-01, Figure 20A

2.1.4　　各種ヒト腫瘍細胞に対する増殖抑制作用

試験番号：SP02-PD-01、添付資料番号：4.2.1.1.2
試験番号：Mann 2009、添付資料番号：4.2.1.1.4

白血病、MM 及び各種固形癌由来細胞を含む米国国立癌研究所（NCI）のヒト腫瘍細胞パネルを用いて、ダリナパルシンの増殖抑制作用を検討した。各種腫瘍細胞をダリナパルシン存在下で 48 時間培養後、スルホローダミン B を用いた吸光光度法により細胞数を測定し、対照群（未処理）に対する細胞増殖率の IC_{50} 値を算出した。ダリナパルシンは各種腫瘍由来細胞に対して広範囲な濃度で増殖抑制作用を示し、特に白血病細胞に対して最も強い作用を示した。

表 2.6.2-4　　ヒト腫瘍細胞パネルに対するダリナパルシンの増殖抑制作用

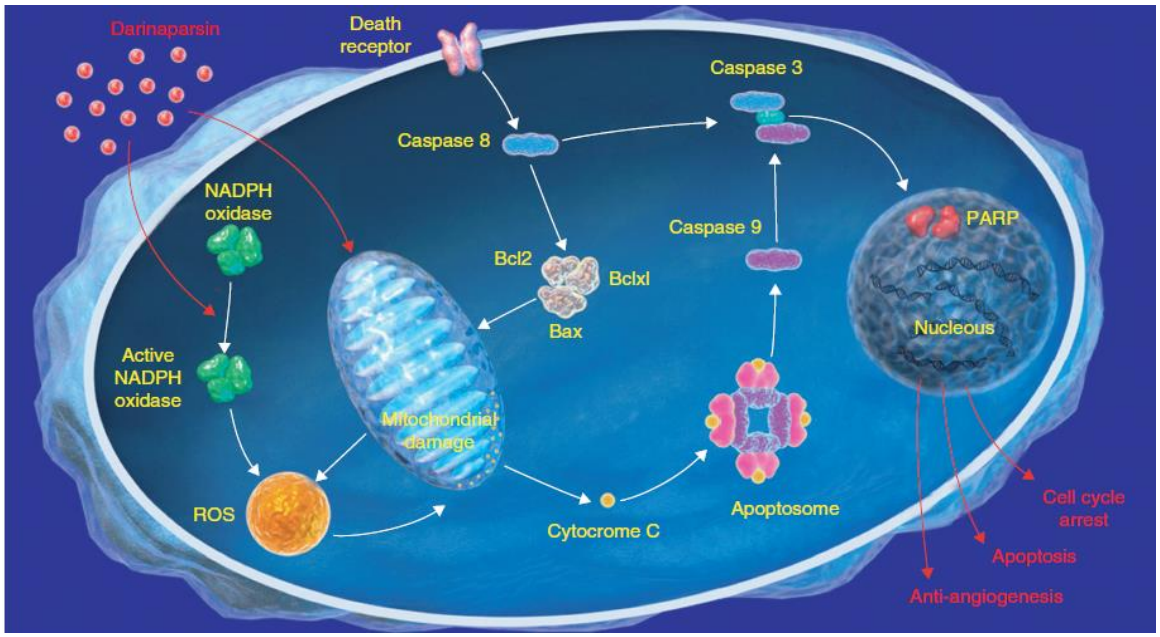
Tumor source	No. of cell lines per tumor type	IC_{50} average (µmol/L)	IC_{50} range (µmol/L)
Leukemia	5	0.04	0.02-0.2
NSCL	9	0.4	0.09-2.0
Colon	7	0.2	0.09-0.4
CNS	6	0.6	0.1-4.0
Melanoma	8	0.3	0.1-0.6
Ovarian	6	0.3	0.04-8.0
Renal cancer	8	0.2	0.05-0.5
Prostate	2	0.2	0.09-0.3
Breast	8	0.1	0.03-0.09
Hepatocellular carcinoma	1	4	4

Data shown are the average of three separate experiments.
CNS = central nervous system; IC_{50} = 50% inhibitory concentration; NSCL = non-small cell lung
Source: Mann 2009, Table 2

2.2　作用機序に関する検討

ダリナパルシンは複雑で多様な作用機序を有している。ダリナパルシンは、ATO と同様、ミトコンドリア機能障害、ROS 産生促進及び細胞内シグナル伝達経路の調節作用を有するが（図 2.6.2-6）、ATO とは異なるシグナル伝達経路の調節作用を介して、腫瘍細胞の G2/M 期細胞周期停止及びアポトーシスを誘導する。さらにダリナパルシンは、血管新生阻害作用を有する（図 2.6.2-6）。

図 2.6.2-6　　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

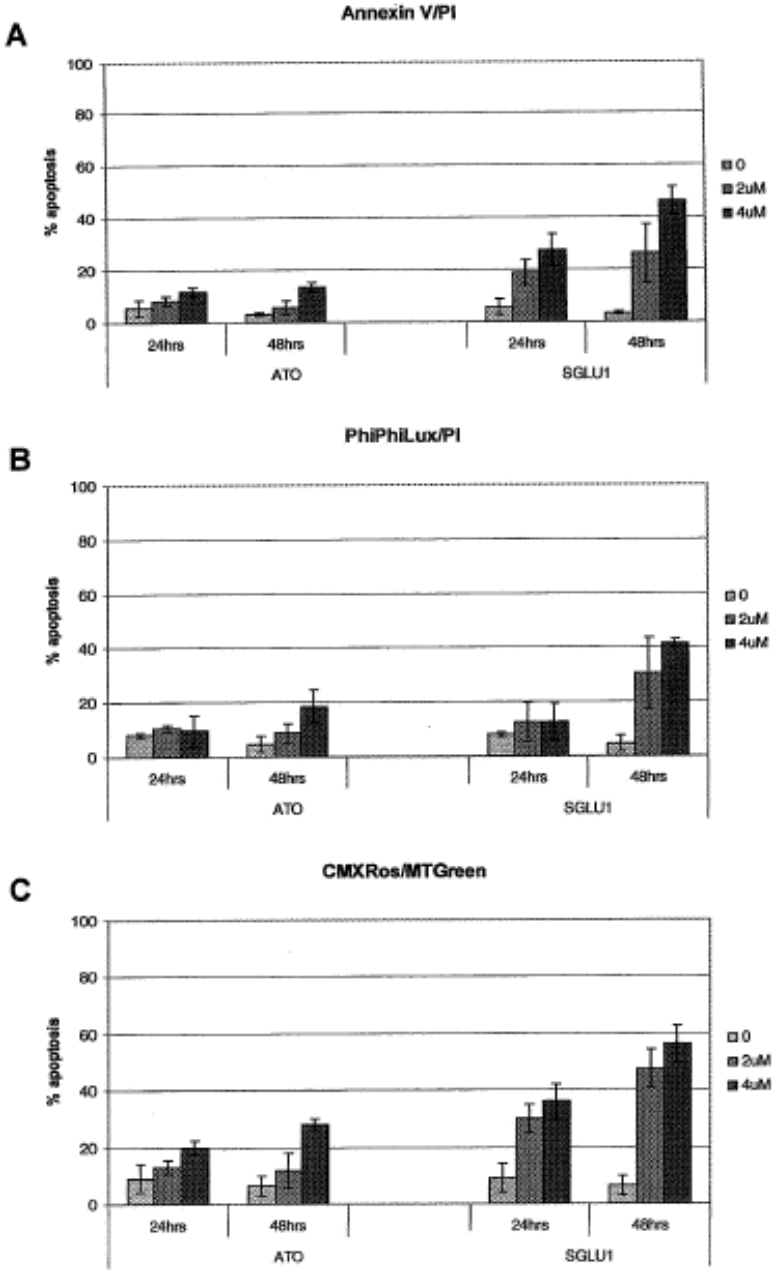
2.2.1　　アポトーシス誘導作用

試験番号：SP02-PD-01、添付資料番号：4.2.1.1.2
試験番号：SP02-PD-06、添付資料番号：4.2.1.1.3

正常細胞では細胞膜の内側に存在するフォスファチジルセリン（PS）が、アポトーシス初期に膜表面へ露出する。HL60 細胞をダリナパルシン又は ATO（2 又は 4 μmol/L）で 24 又は 48 時間処理し、細胞膜外側に分布する PS を Annexin V を用いたフローサイトメトリー法により検出し、アポトーシス誘導作用を評価した（試験番号 SP02-PD-01）。また、アポトーシス経路に重要な役割を果たすカスパーゼ-3 の活性化を、蛍光性基質 PhiPhiLux G1D2 を用いたフローサイトメトリー法により検出した。いずれもヨウ化プロピジウム（PI）による共染色によりネクローシス細胞を除外した。さらに、ミトコンドリア膜電位低下を蛍光プローブ CMXRos/MTGreen を用い

たフローサイトメトリー法により検出した。ダリナパルシン及び ATO は、Annexin V/PI（図 2.6.2-7 A）、PhiPhiLux/PI（図 2.6.2-7 B）及び CMXRos/MTGreen（図 2.6.2-7 C）のシグナルをいずれも濃度及び時間依存的に増加させ、アポトーシス誘導の初期現象であるミトコンドリア膜電位低下作用が確認された。

図 2.6.2-7　　HL60 細胞におけるダリナパルシンのアポトーシス誘導作用



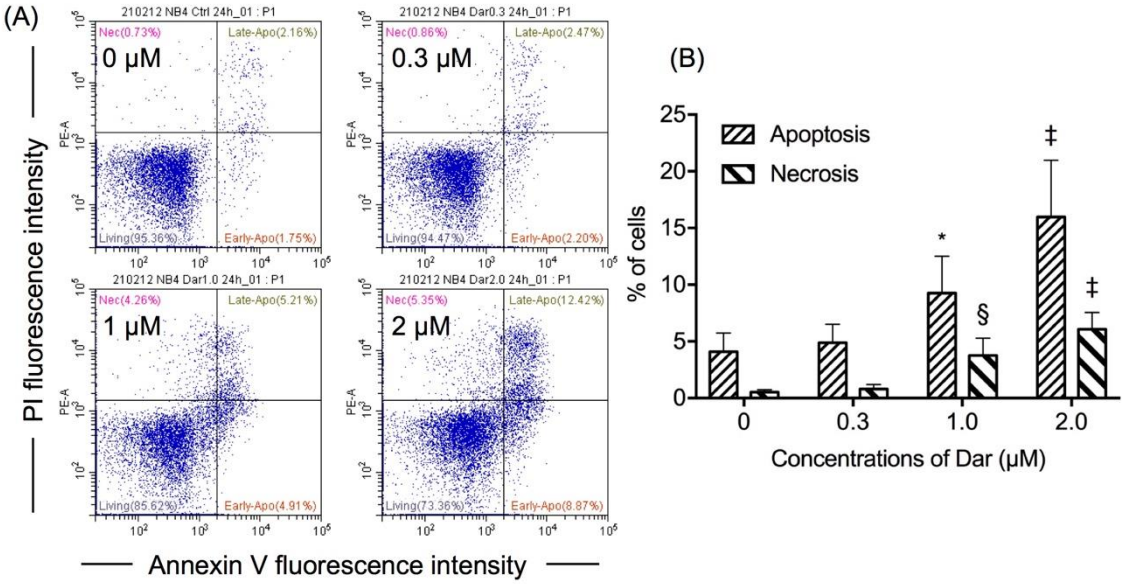
ATO = arsenic trioxide; PI = propidium iodide SGLU1 = darinaparsin
Source: Study Report SP02-PD-01, Figure 9

NB4 及び HL60 細胞を各濃度のダリナパルシンで 24 時間処理し、Annexin V/PI を用いたフローサイトメトリー法によりアポトーシス及びネクローシス誘導作用を検討した（試験番号 SP02-

PD-06)。生細胞、アポトーシス細胞及びネクローシス細胞を、それぞれ Annexin V 陰性 PI 陰性、Annexin V 陽性及び Annexin V 陰性 PI 陽性領域で検出した。

NB4 細胞において、ダリナパルシン（0.3、1 又は 2 µmol/L）は濃度依存的にアポトーシスを誘導し、その作用は 1 及び 2 µmol/L で対照群（未処理）と比較して有意であった。また、ダリナパルシンは濃度依存的なネクローシス誘導作用も示し、その作用は 1 及び 2 µmol/L で有意であった（図 2.6.2-8）。同試験でのダリナパルシンの NB4 細胞増殖抑制作用に対する IC_{50} 値（1.0 µmol/L：図 2.6.2-2）付近で、アポトーシス及びネクローシスの誘導が観察された。

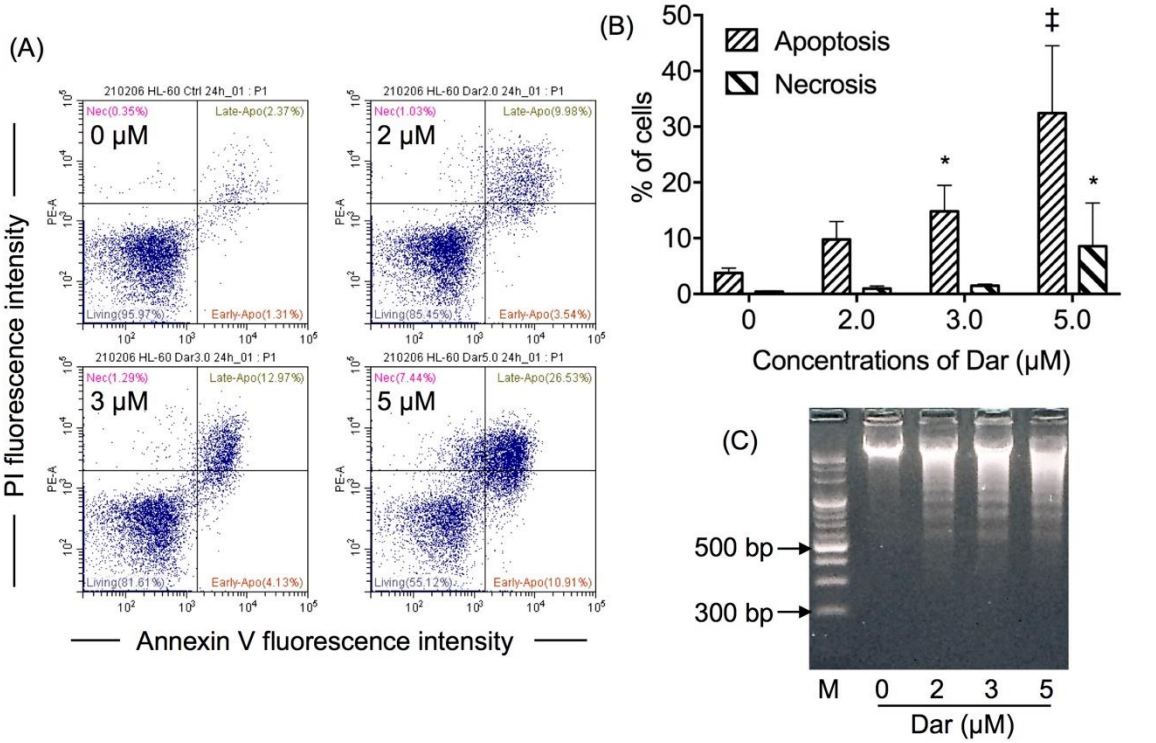
図 2.6.2-8　　NB4 細胞におけるダリナパルシンのアポトーシス及びネクローシス誘導作用



Statistical analysis was performed using one-way ANOVA analysis followed by Dunnett's for multiple comparison tests and differences were considered significant when $p \leq 0.05$ (*p<0.05, §p<0.001 and ‡p<0.0001 vs. untreated). Data are shown as the mean and SD from more than three independent experiments.
Dar = darinaparsin; PI = propidium iodide; SD = standard deviation
Source: Study Report SP02-PD-06, Figure 2

一方、HL60 細胞において、ダリナパルシン（2、3 又は 5 µmol/L）は濃度依存的なアポトーシス誘導作用を示し、その作用は 3 及び 5 µmol/L で有意であった（図 2.6.2-9）。また、最高濃度の 5 µmol/L でネクローシスの誘導が観察されたが、同試験での HL60 細胞増殖抑制作用に対するダリナパルシンの IC_{50} 値（3.0 µmol/L：図 2.6.2-2）付近では、ネクローシス誘導作用は認められなかった。さらに、アポトーシスによって断片化されたデオキシリボ核酸（DNA）をアガロースゲル電気泳動法により検出した結果、ダリナパルシンによる明らかな DNA 断片化が観察された（図 2.6.2-9 C）。

図 2.6.2-9　　HL60 細胞におけるダリナパルシンのアポトーシス及びネクローシス誘導作用



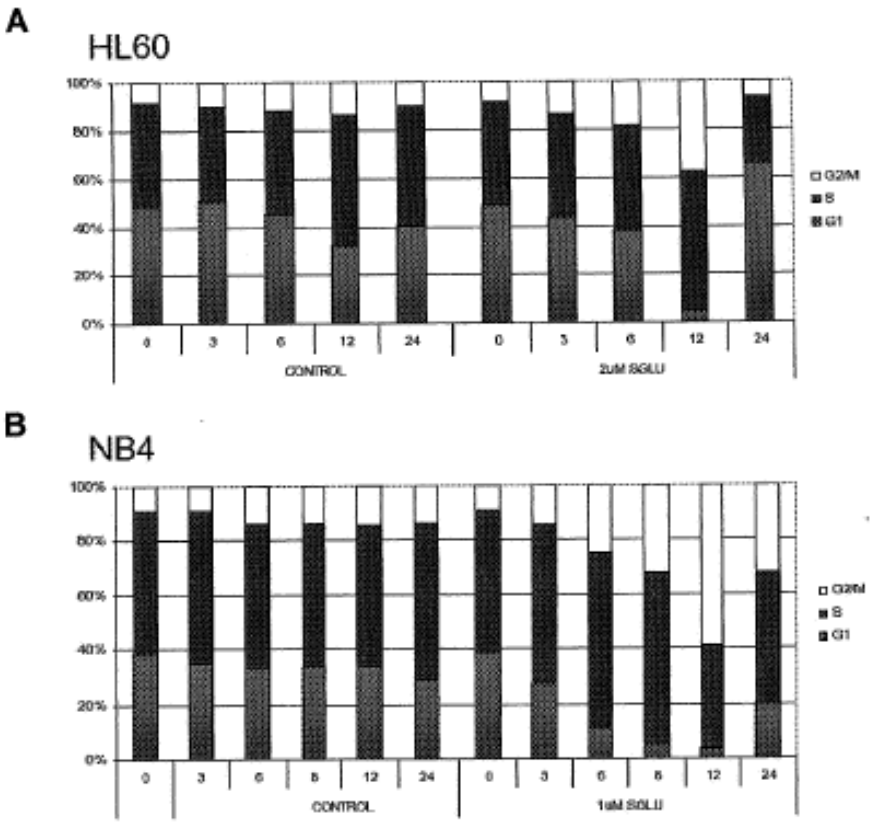
Statistical analysis was performed using one-way ANOVA analysis followed by Dunnett's for multiple comparison tests and differences were considered significant when $p \leq 0.05$ (*$p<0.05$ and ‡$p<0.0001$ vs. untreated). Data are shown as the mean and SD from more than three independent experiments.
Dar = darinaparsin; PI = propidium iodide; SD = standard deviation
Source: Study Report SP02-PD-06, Figure 3

2.2.2　　G2/M 期での細胞周期停止の誘導

試験番号：SP02-PD-01、添付資料番号：4.2.1.1.2

ダリナパルシンの細胞増殖抑制作用に対する細胞周期停止作用の関与を明らかにするため、HL60 及び NB4 細胞を用いて、ダリナパルシンの細胞周期の進行に対する影響を検討した。HL60 及び NB4 細胞をダリナパルシン（1 又は 2 μmol/L）で 12 時間処理後、PI 染色法を用いて細胞周期解析を実施した。また、HL60 細胞をダリナパルシン（2 又は 4 μmol/L）で 24 時間処理後、ブロモデオキシウリジン（BrdU）を添加した。取り込まれた BrdU を蛍光標識して S 期細胞を検出し、PI による DNA 染色と組み合わせて細胞周期各段階の割合をフローサイトメトリー法により評価した。PI 染色による細胞周期解析の結果、ダリナパルシンで処理した HL60 及び NB4 細胞では、G2/M 期の割合が増加した（それぞれ図 2.6.2-10 A 及び B）。また、BrdU 及び PI 染色による細胞周期解析でも、ダリナパルシンで処理した HL60 細胞において、G2/M 期での細胞周期停止の誘導が確認された（データ省略）。

図 2.6.2-10　　HL60 及び NB4 細胞の細胞周期進行に対するダリナパルシンの作用

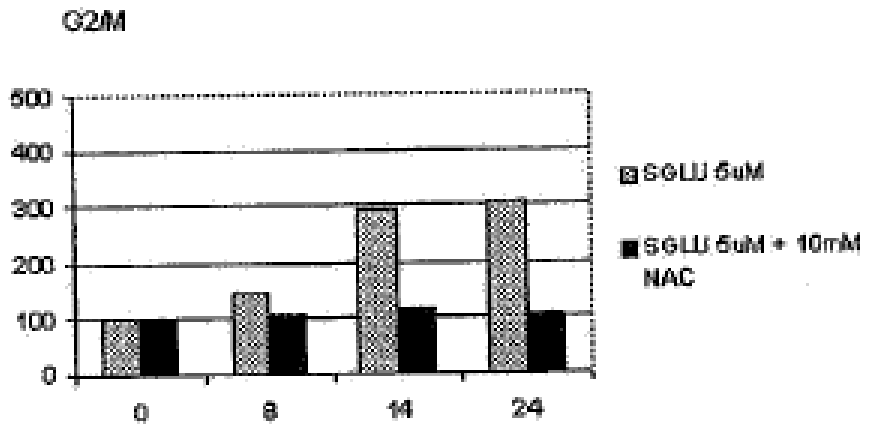


The vertical axis represents cell cycle distribution (%) and the horizontal axis represents time (hours).
SGLU1 = darinaparsin
Source: Study Report SP02-PD-01, Figure 13

次に、ダリナパルシンによる細胞周期停止の誘導作用に対する細胞内酸化還元状態の影響を検討した。HL60 細胞をダリナパルシン（5 μmol/L）単独又は GSH の前駆体である N-アセチルシステイン（NAC）（10 mmol/L）併用で処理し、G2/M 期細胞の割合をフローサイトメトリー法により比較した。その結果、ダリナパルシンによる G2/M 期における細胞周期停止の誘導作用は、NAC の併用により阻害された（図 2.6.2-11）。

以上の結果から、ダリナパルシンの G2/M 期における細胞周期停止誘導作用は細胞内酸化還元状態に影響されることが示唆された。

図 2.6.2-11　　HL60 細胞におけるダリナパルシンによる G2/M 期における細胞周期停止の誘導に対する NAC の作用



The vertical axis represents % of control and the horizontal axis represents time (hours).
NAC = N-Acetylcysteine; SGLU1 = darinaparsin.
Source: Study Report SP02-PD-01, Figure 14 I

2.2.3　アポトーシス経路に対する作用

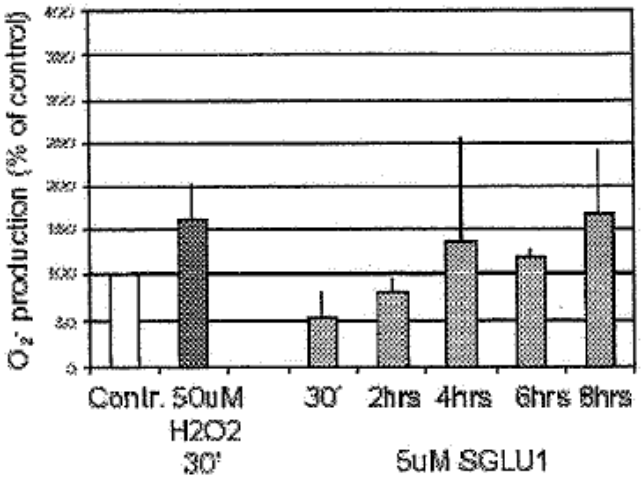
2.2.3.1　ROS 産生促進作用

試験番号：SP02-PD-01、添付資料番号：4.2.1.1.2

ダリナパルシンの細胞増殖抑制作用に対する細胞内 ROS 産生の関与を評価した。HL60 細胞を溶媒、ダリナパルシン（5 µmol/L）又は過酸化水素水（H_2O_2：陽性対照、50 µmol/L）で 30 分～8 時間処理後、回収 20 分前にジヒドロエチジウム（10 µmol/L）を添加した。酸化型エチジウムの蛍光シグナルをフローサイトメトリー法により検出し、細胞内スーパーオキシド濃度を測定した。また、HL60 細胞を ROS 検出蛍光試薬 5,6-カルボキシ-2',7'-ジクロロフルオレセイン-ジアセテート（CM-H_2DCFDA）（10 µmol/L）で 20 分間処理後、ダリナパルシン（5 µmol/L）を添加して 2～8 時間培養し、CM-H_2DCFDA の蛍光シグナルをフローサイトメトリー法により検出して細胞内 H_2O_2 濃度を測定した。ダリナパルシンは処理時間に応じてスーパーオキシド産生を促進させた（図 2.6.2-12）。また、細胞内 H_2O_2 濃度は、ダリナパルシン添加 2 時間後には対照群（未処理）と比較して 3 倍以上に増加した。この増加は一過性で、時間の経過と共に低下し、8 時間後には対照群レベルにまで低下した（図 2.6.2-13）。

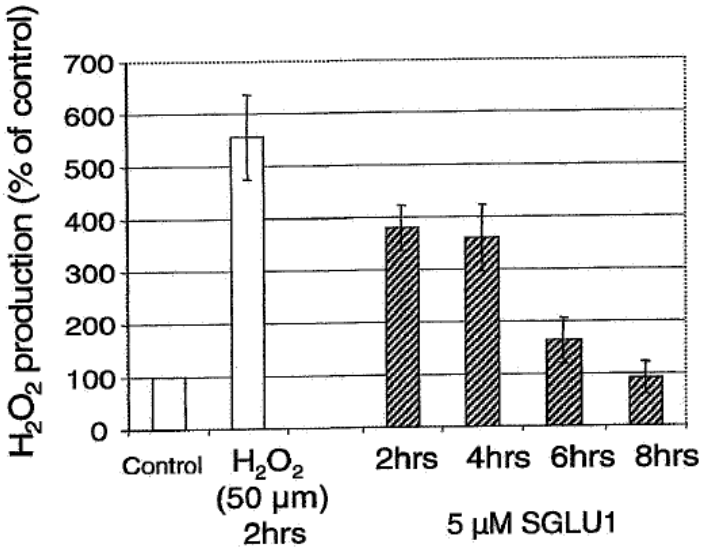
以上の結果から、ダリナパルシン処理後、H_2O_2 産生が早い段階で一過性に増加し、その後、スーパーオキシドが持続的に産生されることが示唆された。

図 2.6.2-12　　HL60 細胞におけるダリナパルシンの細胞内スーパーオキシド産生作用



H_2O_2 = hydrogen peroxide; SGLU1 = darinaparsin
Source: Study Report SP02-PD-01, Figure 15A

図 2.6.2-13　　HL60 細胞におけるダリナパルシンの細胞内 H_2O_2 産生作用



H_2O_2 = hydrogen peroxide; SGLU1 = darinaparsin
Source: Study Report SP02-PD-01, Figure 16A

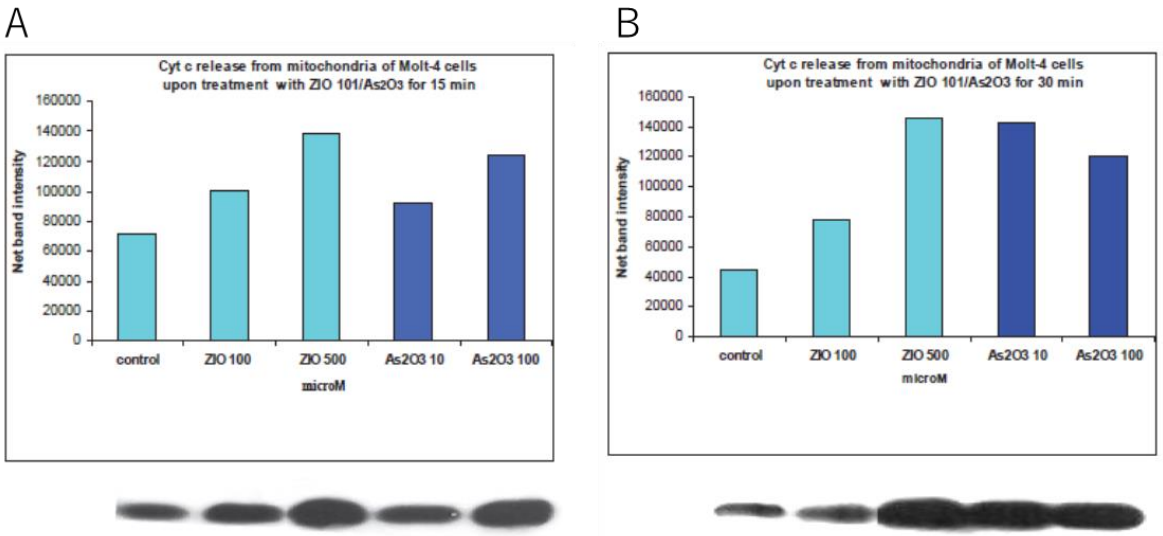
2.2.3.2　　ミトコンドリアに対する直接作用

試験番号：RES-1002、添付資料番号：4.2.1.1.5

ダリナパルシンによるミトコンドリア膜電位低下（2.2.1 項）が、ミトコンドリアに対する直接作用によるものか否かを、ヒト白血病細胞から単離したミトコンドリアを用いて検討した。本試験ではミトコンドリアを介した細胞死の特徴であるシトクロム c のミトコンドリアからの遊離を評価した。Molt-4 を機械的に溶解し、遠心分離により単離したミトコンドリア（2 mg/mL）をダリナパルシン（100 又は 500 µmol/L）又は ATO（10 又は 100 µmol/L）で 15 又は 30 分間処理し

た。反応液を遠心分離し、上清タンパク質をドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）により分画し、特異的抗体を用いてシトクロム c をウェスタンブロット法により検出した。ダリナパルシン及び ATO による 15 又は 30 分間処理により、いずれも対照群と比較してシトクロム c の遊離増加が認められた（それぞれ図 2.6.2-14 A 及び B）。

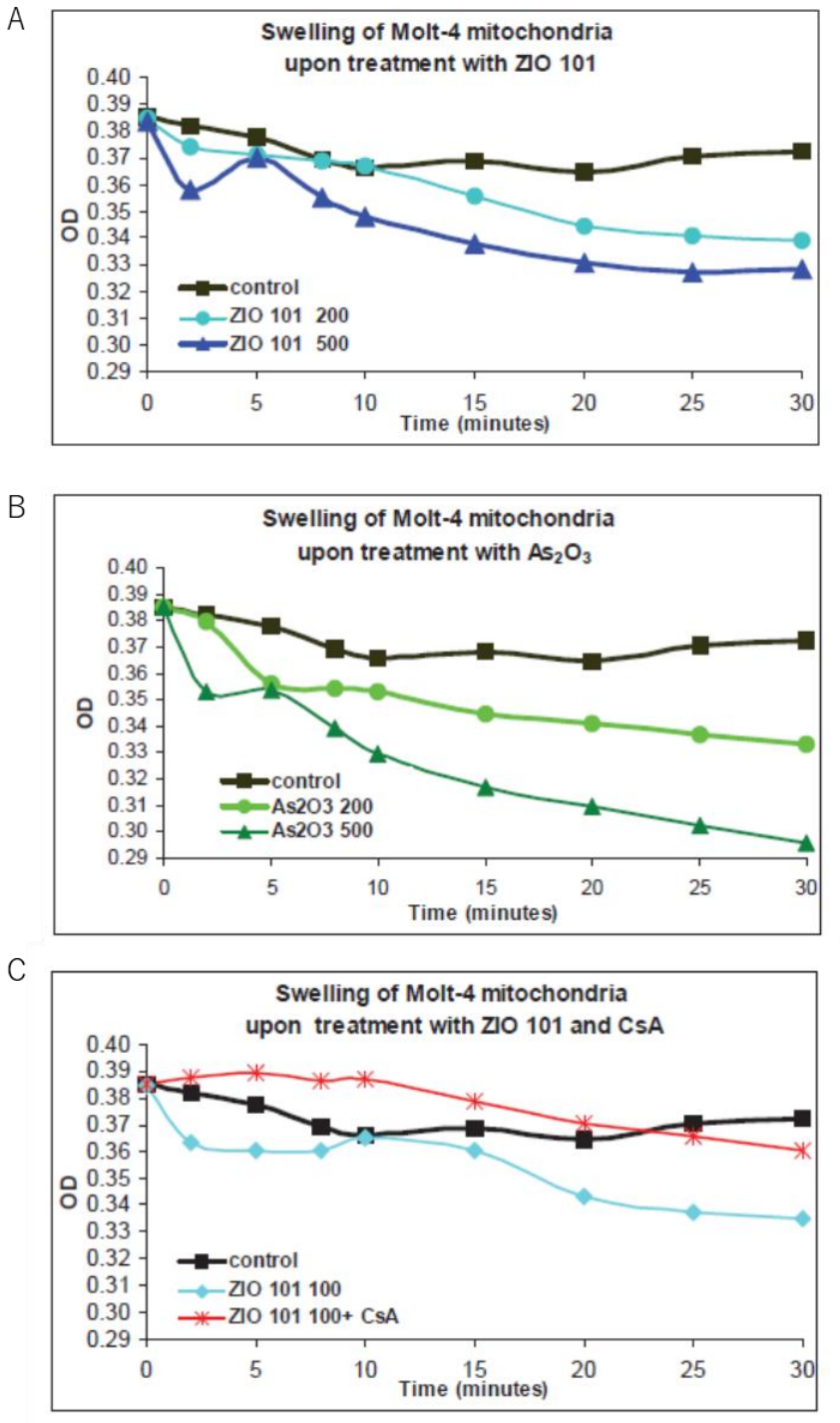
図 2.6.2-14　　ダリナパルシン及び ATO によるミトコンドリアからのシトクロム c 遊離



Mitochondria were incubated with darinaparsin or arsenic trioxide for the indicated periods of time. Cytochrome c was determined by Western blotting in the supernatant fraction, and quantitated. Representative results of 3 similar experiments are shown.
As_2O_3 = arsenic trioxide; Cyt c = cytochrome c; ZIO = darinaparsin
Source: Study Report RES-1002, Figure 5

次に、ミトコンドリア機能障害の指標としてミトコンドリアの膨化を評価した。Molt-4 細胞から単離したミトコンドリア懸濁液（100 µg タンパク質/well）をダリナパルシン（200 又は 500 µmol/L）又は ATO（200 又は 500 µmol/L）で最大 30 分間処理した。ミトコンドリア懸濁液の 540 nm での吸光度減少を指標として、ミトコンドリア膨化を評価した。ダリナパルシン及び ATO 処理により、ミトコンドリア懸濁液の吸光度はいずれも濃度依存的に減少した（それぞれ図 2.6.2-15 A 及び B）。ミトコンドリア膨化に対する ATO の作用はダリナパルシンよりも強い傾向を示した。また、ダリナパルシンによるミトコンドリア膨化に対して、ミトコンドリア透過性遷移孔複合体（PTPC）開口阻害剤であるシクロスポリン A（CsA）の作用を検討した結果、ダリナパルシン（100 µmol/L）のミトコンドリア膨化作用は CsA（10 µmol/L）の添加により抑制された（図 2.6.2-15 C）。

図 2.6.2-15　　ダリナパルシン及び ATO によるミトコンドリア膨化作用



Mitochondria were incubated with darinaparsin (concentrations in µmol/L) (A), arsenic trioxide (concentrations in µmol/L) (B) or darinaparsin (100 µmol/L) and cyclosporine A (10 µmol/L) (C) in the indicated concentrations in micromolar for the indicated periods of time. Swelling was determined spectrophotometrically. Representative results of 3 similar experiments are shown.
As_2O_3 = arsenic trioxide; CsA = cyclosporine A ZIO 101 = darinaparsin
Source: Study Report RES-1002, Figure 6, 7 and 8

以上の結果から、ダリナパルシン及び ATO はいずれもミトコンドリアに直接障害を与え、シトクロム c を遊離させることが明らかとなった。ダリナパルシンによるミトコンドリアの膨化が

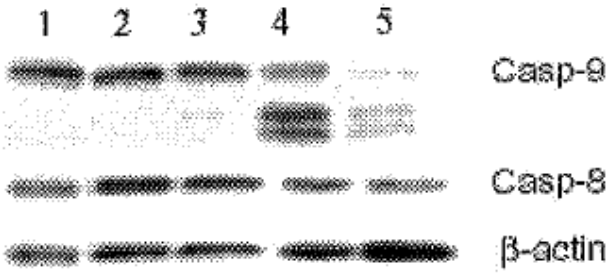
CsA により抑制されたことから、ダリナパルシンのミトコンドリアにおける作用部位は PTPC であることが示唆された。

2.2.3.3　　カスパーゼ-9 活性化

試験番号：SP02-PD-01、添付資料番号：4.2.1.1.2

ダリナパルシンによるアポトーシス誘導作用の内因性アポトーシス経路活性化に対する関与の有無を検討した。HL60 細胞を溶媒（図 2.6.2-16、レーン 1）又はダリナパルシン（0.5、1、5 又は 10 µmol/L；図 2.6.2-16、レーン 2～5）で 24 時間処理後、全細胞溶解物を用いてカスパーゼ-8 及びカスパーゼ-9 をウェスタンブロット法により検出した。検出には全長（前駆）型カスパーゼ-9（47 kDa）、断片（活性）型カスパーゼ-9（37/35-kDa）、全長（前駆）型カスパーゼ-8（55/50 kDa）に対する抗体を用いた。β-アクチンをローディングコントロールとして用いた。ダリナパルシン処理細胞において、カスパーゼ-9（断片型の発現）及びカスパーゼ-8（全長型の減少）の活性化が濃度依存的に認められたが、カスパーゼ-9 活性化はカスパーゼ-8 活性化よりも低い濃度で認められた。以上の結果より、ダリナパルシンにより誘導されるアポトーシスには、カスパーゼ-9 による内因性アポトーシス経路活性化が関与していることが示唆された。

図 2.6.2-16　　HL60 細胞におけるダリナパルシンのカスパーゼ-9 及びカスパーゼ 8 活性化



Lane 1: vehicle, lane 2-5: darinaparsin (0.5, 1, 5 and 10 µmol/L, respectively)
Source: Study Report SP02-PD-01, Figure 11

2.3　ATO の作用機序との比較

2.3.1.1　　抗アポトーシスタンパク質 Bcl-2 発現低下

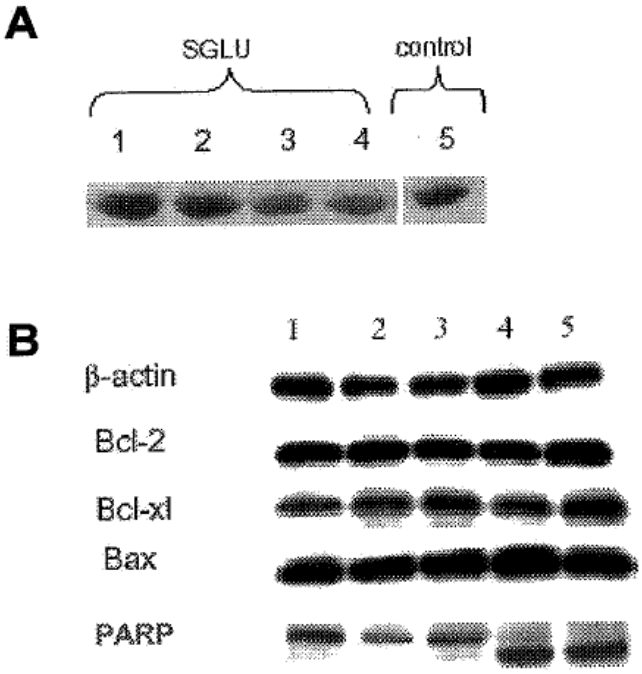
試験番号：SP02-PD-01、添付資料番号：4.2.1.1.2

ATO によるアポトーシス誘導の作用機序には、抗アポトーシスタンパク質 Bcl-2 の発現低下の関与が示唆されていることから（Chen et al. 1996）、ダリナパルシンによる Bcl-2 の分解作用を検討した。NB4 細胞を溶媒（図 2.6.2-17A、レーン 5）又はダリナパルシン（0.5、1、5 又は 10 µmol/L；図 2.6.2-17 A、レーン 1～4）で 24 時間処理後、全細胞溶解物を用いて、Bcl-2 の分解を免疫沈降法及びウェスタンブロット法により検出した。また、HL60 細胞を溶媒（図 2.6.2-17 B、レーン 1）又はダリナパルシン（0.5、1、5 又は 10 µmol/L；図 2.6.2-17 B、レーン 2～5）で同様に処理し、Bcl-2（26 kDa）、及び Bcl-2 ファミリータンパク質の Bcl-xL（2 kDa）又は Bax

（23 kDa）を検出した。アポトーシス誘導の指標としてポリ（アデノシン二リン酸-リボース）ポリメラーゼ（PARP）（89 kDa）の断片を検出し、β-アクチンをローディングコントロールとして用いた。

NB4 細胞では、5 又は 10 µmol/L のダリナパルシン処理で Bcl-2 の分解が検出された。一方、同様に処理した HL60 細胞において、Bcl-2、Bcl-xL 及び Bax の分解はいずれも認められなかった。しかし、5 又は 10 µmol/L のダリナパルシン処理による PARP 断片の発現が認められ、ダリナパルシンによるアポトーシス誘導が確認された。以上の結果から、ダリナパルシンによるアポトーシス誘導作用に Bcl-2 タンパク質の発現低下は必須ではないことが示唆された。

図 2.6.2-17　　ダリナパルシンで処理した NB4 及び HL60 細胞における Bcl-2 タンパク質濃度



PARP = poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase; SGLU: darinaparsin.
A: NB4 cells, Lane 1-4; darinaparsin (0.5, 1, 5 and 10 µmol/L, respectively), Lane 5; vehicle
B: HL60 cells, Lane 1; vehicle, Lane 2-5; darinaparsin (0.5, 1, 5 and 10 µmol/L, respectively)
Source: Study Report SP02-PD-01, Figure 12

2.3.1.2　　細胞内 GSH の関与

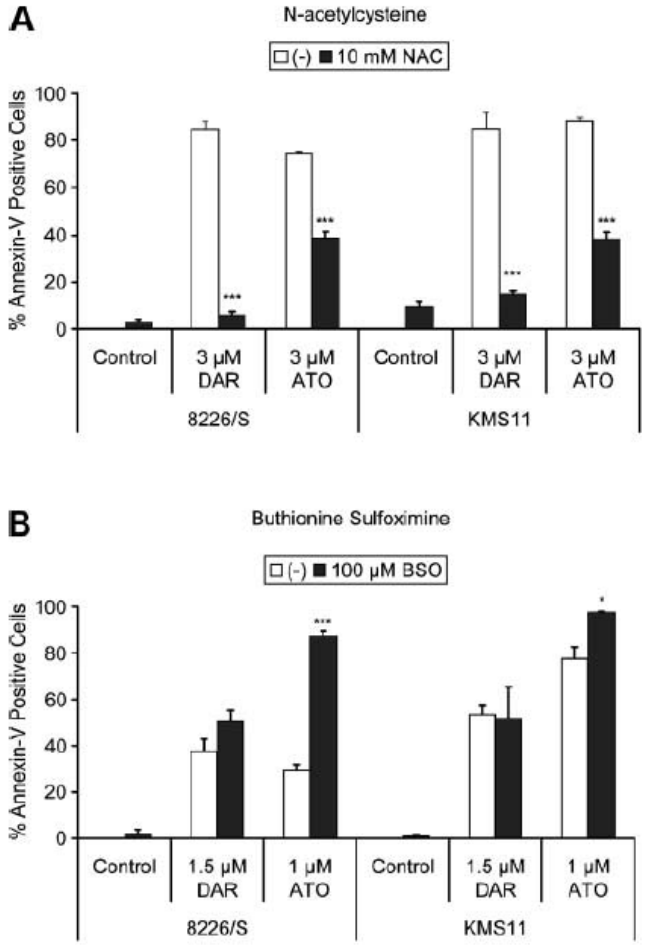
試験番号：Matulis 2009、添付資料番号：4.2.1.1.6

ATO の細胞傷害活性は標的細胞内の GSH 濃度と強く相関することが示唆されている。GSH 合成阻害薬である L-ブチオニンスルホキシミン（L-BSO）により GSH の *de novo* 合成を阻害して細胞内 GSH を枯渇させると ATO はより強い細胞傷害作用を示し、逆に、GSH の前駆体である NAC の添加により細胞内 GSH 濃度を増加させると、ATO の細胞傷害作用は阻害される（Bahlis et al. 2002、Grad et al. 2001、Maeda et al. 2004）。ダリナパルシンの増殖抑制作用に対する細胞内

GSH 濃度の影響を検討するため、ヒト MM 細胞 8826/S 及び KMS11（2.5 ×10^5 cell/mL）を L-BSO（100 µmol/L）又は NAC（10 mmol/L）の存在／非存在下でダリナパルシン（1.5 又は 3 µmol/L）又は ATO（1 又は 3 µmol/L）で 48 時間処理後、Annexin V/PI を用いたフローサイトメトリー法によりアポトーシス細胞を検出し、細胞生存率に対する作用を評価した。

NAC の併用により、ダリナパルシン及び ATO による細胞傷害作用はいずれの細胞でも阻害された（図 2.6.2-18 A）。一方、L-BSO の併用で ATO による作用はいずれの細胞でも増強したが、ダリナパルシンの作用はほとんど変化せず、GSH 枯渇による影響はないことが示された（図 2.6.2-18 B）。

図 2.6.2-18　　ダリナパルシン及び ATO の細胞傷害作用に対する細胞内 GSH の影響



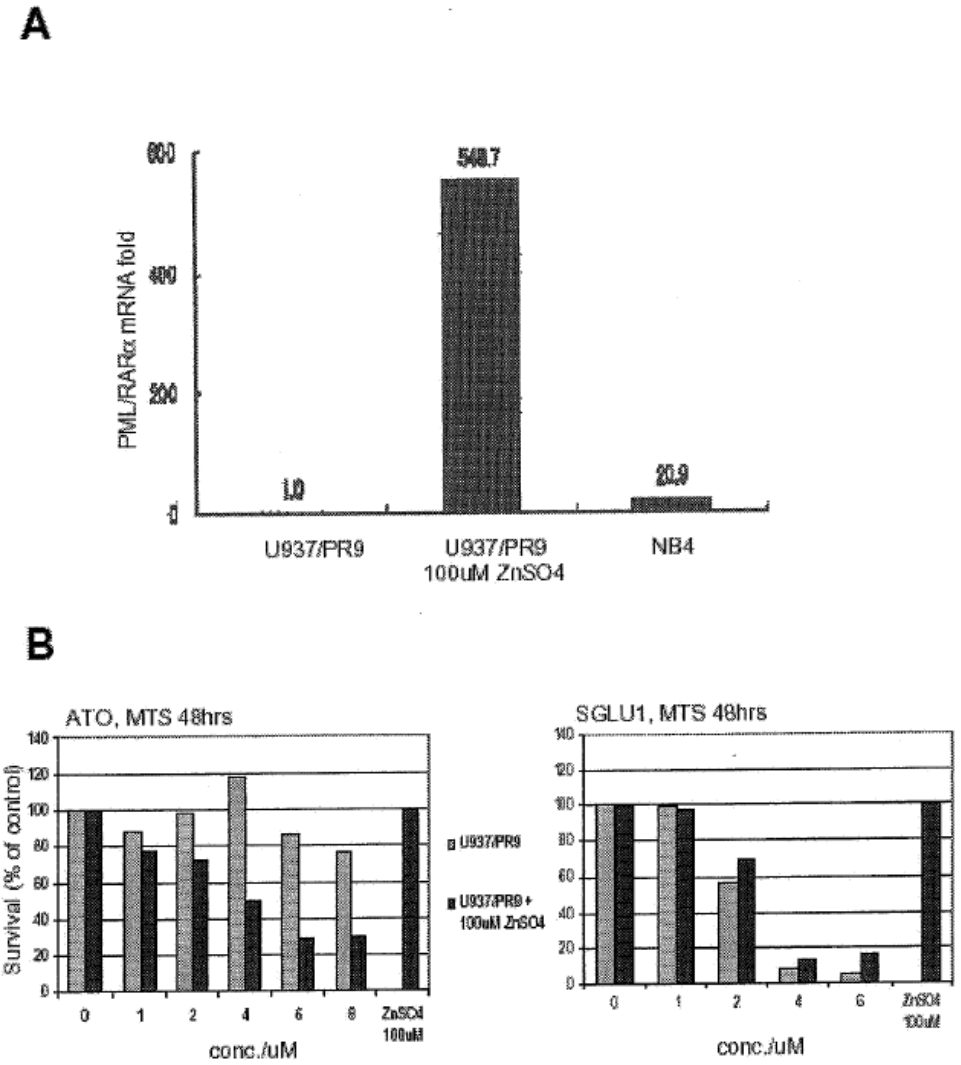
Differential effect of thiol-containing compounds on darinaparsin and ATO activity. 8226/S or KMS11 cells were treated with indicated concentrations of darinaparsin or ATO alone or in combination with (A) 10 mmol/L NAC, or (B) 100 µmol/L buthionine sulfoximine for 48 h. Data are graphed as percent of control Annexin V-positive cells. Mean ± SE of at least three independent experiments. Student's t test was used to compare differences among darinaparsin or ATO and experimental combinations, with 95% confidence intervals. *, $p<0.05$; ***, $p<0.001$.
ATO = arsenic trioxide; BSO = buthionine sulfoximine; DAR = darinaparsin; NAC= N-acetylcysteine; SE = standard error.
Source: Matulis 2009, Figure 2

2.3.1.3　PML/RARα 融合遺伝子導入細胞に対する作用

試験番号：SP02-PD-01、添付資料番号：4.2.1.1.2

t（15;17）転座は急性前骨髄性白血病で認められる染色体異常で、PML 遺伝子と RARα 遺伝子との相互転座により PML/RARα 融合遺伝子が形成される。ATO の作用機序の一部として PML/RARα 融合タンパク質分解の関与が示唆されている（Miller et al. 2002-1、Soignet et al. 2001）。白血病細胞のダリナパルシンに対する感受性への PML/RARα 融合タンパク質関与の有無を確認するため、ATO に抵抗性である U937 細胞に Zn^{2+}誘導性 PML/RARα 融合遺伝子を導入し、U937/PR9 細胞を作製した。$ZnSO_4$（100 μmol/L）で 3 時間処理した U937/PR9 細胞では、同処理した NB4 細胞又は非処理 U937/PR9 細胞と比較して、PML/RARα mRNA が高発現していることがポリメラーゼ連鎖反応（PCR）解析により確認された（図 2.6.2-19 A）。$ZnSO_4$ 処理／非処理 U937/PR9 細胞をダリナパルシン（1、2、4 又は 6 μmol/L）又は ATO（1、2、4、6 又は 8 μmol/L）で 48 時間処理後、MTS 法により生細胞数を測定し、増殖抑制作用を評価した（図 2.6.2-19 B）。ダリナパルシン及び ATO はいずれも $ZnSO_4$ 処理 U937/PR9 細胞の増殖を濃度依存的に抑制した。一方、$ZnSO_4$ 非処理細胞の増殖を抑制したのはダリナパルシンのみであった。以上の結果から、ダリナパルシンの増殖抑制作用に PML/RARα 融合タンパク質分解は寄与していないことが示唆された。

図 2.6.2-19　　PML/RARα 融合遺伝子を発現した U937/PR9 細胞に対するダリナパルシン及び ATO の増殖抑制作用



A: After treatment with $ZnSO_4$ (100 µmol/L) for 3 hours, expression of PML/RARα mRNA in untreated or treated U937/PR9 cells and treated NB4 cells was analyzed by quantitative real-time PCR assay.
B: After $ZnSO_4$-induced PML/RARα expression and treatment with ATO (1, 2, 4, 6 or 8 µmol/L) or darinaparsin (1, 2, 4 or 6 µmol/L) for 48 hours, cell numbers were measured by the MTS assay.
ATO = arsenic trioxide; PCR = polymerase chain reaction; SGLU1 = darinaparsin
Source: Study Report SP02-PD-01, Figure 6

2.3.1.4　　分化誘導作用

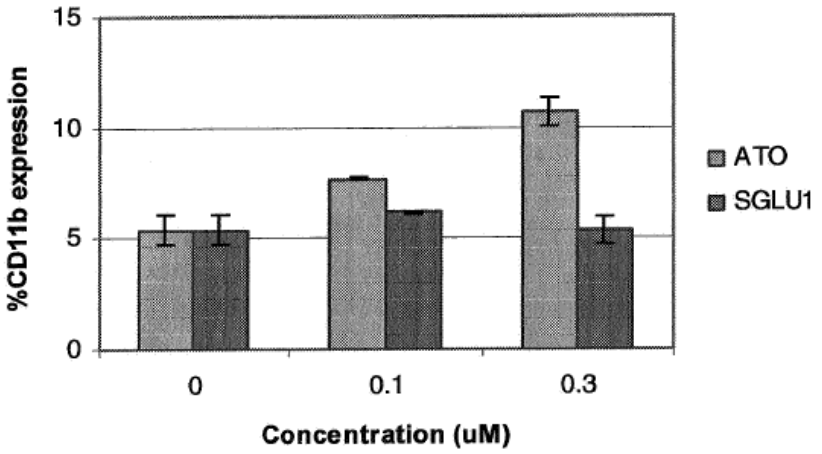
試験番号：SP02-PD-01、添付資料番号：4.2.1.1.2

ATO は PML/RARα 融合タンパク質を発現した細胞の分化を誘導することが報告されており（Miller et al. 2002-2）、ATO の増殖抑制作用には分化誘導作用の関与が示唆されている。ダリナパルシンの増殖抑制作用に対する分化誘導作用の関与の有無を明らかにするため、NB4 細胞を用いて骨髄系細胞の成熟マーカーである CD11b の発現を検討した。NB4 細胞をダリナパルシン又は ATO（0.1 又は 0.3 µmol/L）で 72 時間処置後、抗 CD11b 抗体を添加し、フローサイトメトリー法により CD11b 陽性細胞の割合を解析した。また、顆粒球系への分化の指標であるニトロブル

ーテトラゾリウム（NBT）還元能を測定するため、NB4 細胞をダリナパルシン又は ATO（いずれも 0.1 又は 0.3 μmol/L）で 96 時間処置後、NBT（1 mg/mL）及びホルボール 12-ミリスタート 13-アセタート（200 ng/mL）を添加した。NBT を取り込み、青色のホルマザンへ還元した NBT 陽性細胞数を光学顕微鏡検査にて測定した。

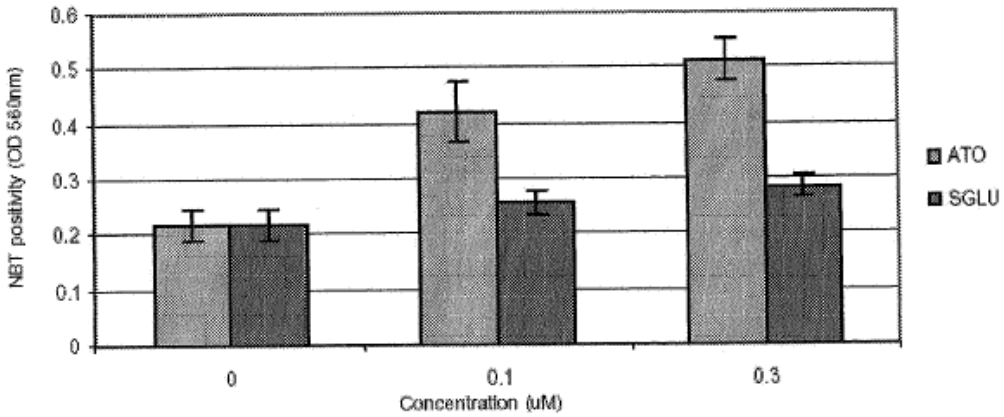
ダリナパルシン処理後の CD11b 陽性細胞の割合は非処理細胞と同程度であったが、ATO 処理では濃度依存的に増加し、0.3 μmol/L では約 2 倍増加した（図 2.6.2-20）。また、ダリナパルシン処理後の NBT 陽性細胞数は非処理細胞と同程度であったが、ATO 処理細胞では濃度依存的に増加した（図 2.6.2-21）。以上の結果から、ATO と異なり、ダリナパルシンは NB4 細胞の顆粒球系への分化を誘導しないことが示された。

図 2.6.2-20　　ダリナパルシン及び ATO 処理による NB4 細胞の CD11b 陽性比率



ATO = arsenic trioxide; SGLU1 = darinaparsin
Source: Study Report SP02-PD-01, Figure 7

図 2.6.2-21　　ダリナパルシン及び ATO 処理による NB4 細胞の NBT 陽性比率



ATO = arsenic trioxide; SGLU1 = darinaparsin
Source: Study Report SP02-PD-01, Figure 8

2.4 *In vivo* 抗腫瘍作用

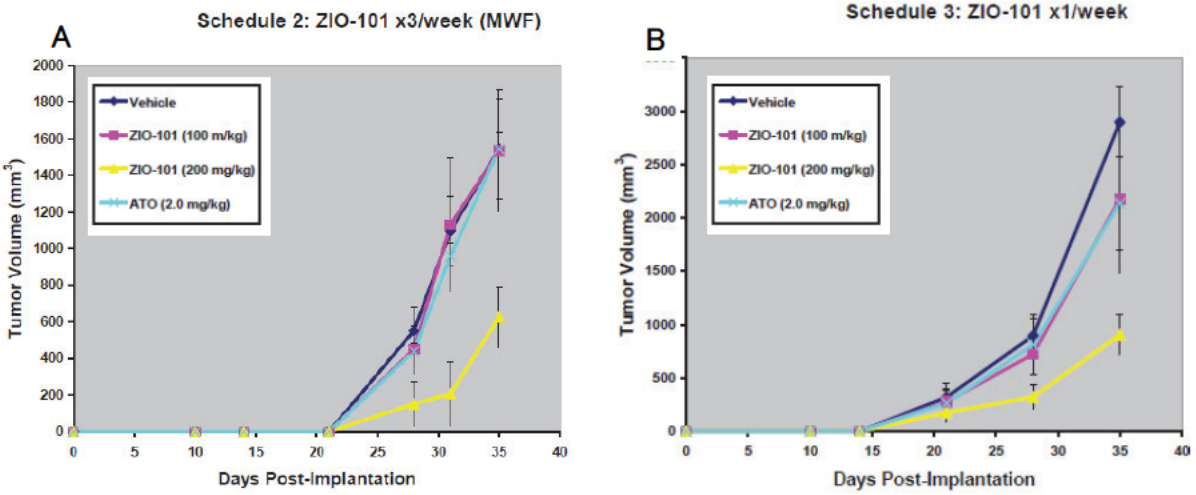
2.4.1 ヒト MM 細胞異種移植マウスに対する作用

試験番号：SP02-PD-03、添付資料番号：4.2.1.1.7

ヒト MM 細胞異種移植片 LAGλ-1 を移植したマウスを用いてダリナパルシンの抗腫瘍効果を検討した。重症複合免疫不全症（SCID）マウス（6～8 週齢、雄）の後肢筋肉内に LAGλ-1 （2.0～4.0 mm^3）を移植してマウス異種移植モデルを作製した。移植 14 日後、眼窩静脈叢から採血して酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）により血清中 hIgG レベルを測定し、その値を基準に群分けした（5 匹／群）。ダリナパルシンは 50 又は 100 mg/kg の 1 日 2 回週 5 回、100 又は 200 mg/kg の 1 日 1 回週 3 回又は、100 又は 200 mg/kg の 1 日 1 回週 1 回の 3 つの異なる投与スケジュールで静脈内投与した。溶媒（生理食塩液）又は ATO（2 mg/kg）は 1 日 1 回週 5 回腹腔内投与した。腫瘍の直径をノギスで週 1 回測定し、次の近似式により腫瘍体積を算出した：$4/3\pi \times (W/2)^2 \times (L/2)$（W：短径、L：長径）。また、ELISA により血清中 hIgG レベルを週 1 回測定した。

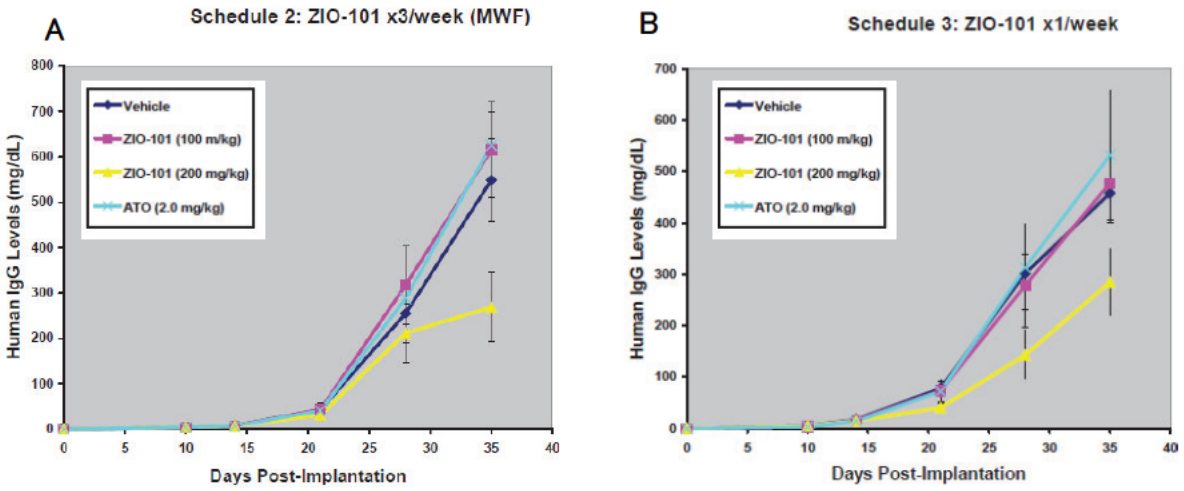
ダリナパルシン 200 mg/kg の 1 日 1 回週 3 回（図 2.6.2-22 A）及び週 1 回（図 2.6.2-22 B）投与により、溶媒投与群と比較して LAGλ-1 移植マウスの腫瘍体積の減少が認められた。また、血清中 hIgG レベルもダリナパルシン 200 mg/kg の 1 日 1 回週 3 回（図 2.6.2-23 A）及び週 1 回（図 2.6.2-23 B）投与により溶媒投与群と比較して減少した。一方、ダリナパルシン 100 mg/kg の 1 日 1 回週 3 回及び週 1 回並びに ATO 投与群の腫瘍体積及び血清中 hIgG レベルは溶媒投与群と同様であった。また、ダリナパルシン 50 又は 100 mg/kg の 1 日 2 回週 5 回投与後の腫瘍体積及び血清中 hIgG レベルは、溶媒投与群と同様であり、抗腫瘍効果は認められなかった（データ省略）。

図 2.6.2-22 LAGλ-1 移植マウスの腫瘍体積に対するダリナパルシンの作用



A: darinaparsin x3/week、B: darinaparsin x1/week
ZIO-101 = darinaparsin; ATO = arsenic trioxide
Source: Study Report SP02-PD-03, Figure 2B and 3B

図 2.6.2-23　　LAGλ-1 移植マウスの血清中 hIgG レベルに対するダリナパルシンの作用



A: darinaparsin x3/week、B: darinaparsin x1/week
ZIO-101 = darinaparsin; ATO = arsenic trioxide
Source: Study Report SP02-PD-03, Figure 2A and 3A

2.5　血管新生阻害作用

2.5.1.1　*In vitro* 試験

試験番号：SP02-PD-02、添付資料番号：4.2.1.1.8

ダリナパルシンの血管新生阻害作用を、HUVEC を用いた 3 つの異なる試験系（細胞生存試験、[^{3}H]チミジン取り込み試験、血管内皮細胞チューブ形成試験）で評価した。細胞生存試験では、HUVEC（6250 cell/well）を 96 穴プレートで 24 時間培養後、各濃度のダリナパルシン（0.1、1、2、5、8、10 又は 20 µmol/L）を添加し、各処理時間（2、4 又は 6 日）において、生存細胞由来の ATP 量を指標に増殖抑制作用を評価した。[^{3}H]チミジン取り込み試験では、細胞生存試験と同様に HUVEC を処理し、各処理時間での[^{3}H]チミジン添加後、細胞中 DNA に取り込まれた[^{3}H]チミジン量をシンチレーションカウンターで定量し、増殖抑制作用を評価した。血管内皮細胞チューブ形成試験では、細胞外マトリックスでコーティングした 96 穴プレートに播種した HUVEC（15000 cell/well）に各濃度のダリナパルシン（0.01、0.05、0.1、0.5、2.0、10 又は 50 µmol/L）を添加して 18 時間培養した。培養後、光学顕微鏡観察及び画像解析により平均チューブ長を測定し、血管内皮細胞チューブ形成に対する抑制作用を評価した。

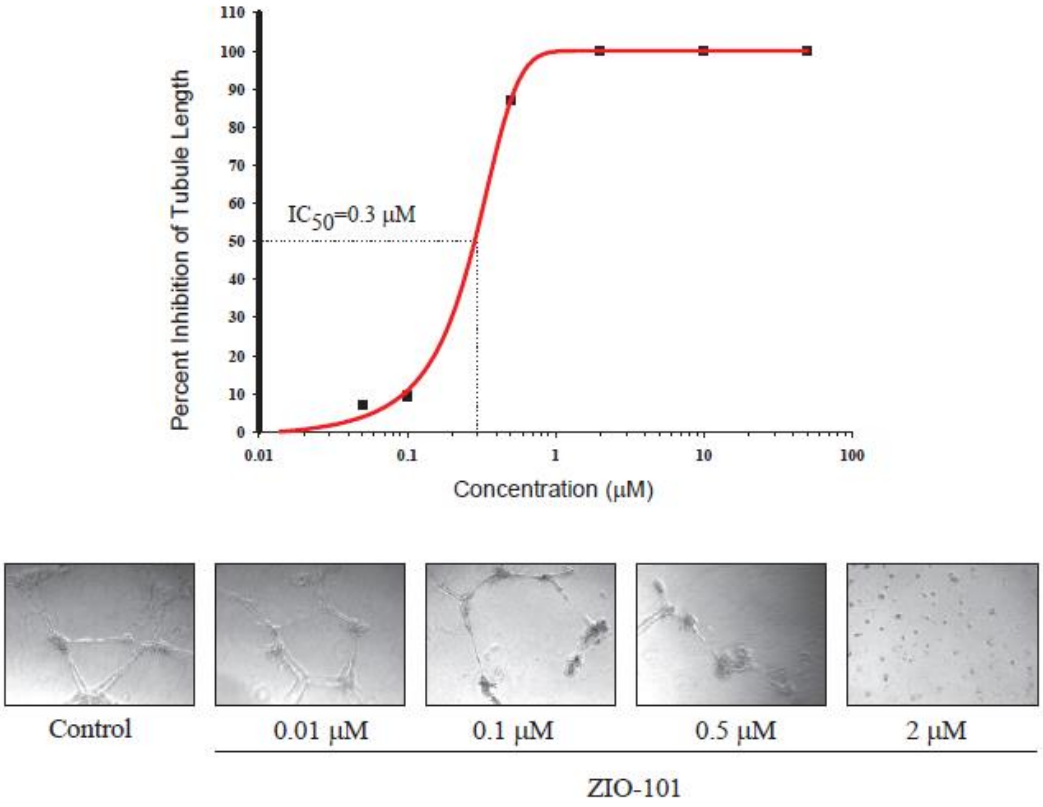
細胞生存試験及び[^{3}H]チミジン取り込み試験において、ダリナパルシンは HUVEC の細胞増殖を濃度依存的に抑制した（IC_{50} 値：0.35～1.1 µmol/L 及び<0.1～0.51 µmol/L）（表 2.6.2-5）。また、ダリナパルシンは血管内皮細胞のチューブ形成を IC_{50} 値 0.3 µmol/L で阻害した（図 2.6.2-24）。

表 2.6.2-5　　HUVEC に対するダリナパルシンの増殖抑制作用

Treatment time point	IC_{50} (µmol/L) in HUVEC (Cell Viability Assay)	IC_{50} (µmol/L) in HUVEC (^{3}H-thymidine Incorporation Assay)
Day 2	1.1	<0.1
Day 4	0.7	0.51
Day 6	0.35	0.28

IC_{50} values of darinaparsin in each assay experiments were determined based on the dose response curves.
HUVEC = human umbilical vein endothelial cells; IC_{50} = 50% inhibitory concentration
Source: Study Report SP02-PD-02, p19

図 2.6.2-24　　血管内皮細胞チューブ形成に対するダリナパルシンの阻害作用



ZIO-101 = darinaparsin
Source: Study Report SP02-PD-02, p20

2.5.1.2　　*In vivo* 試験

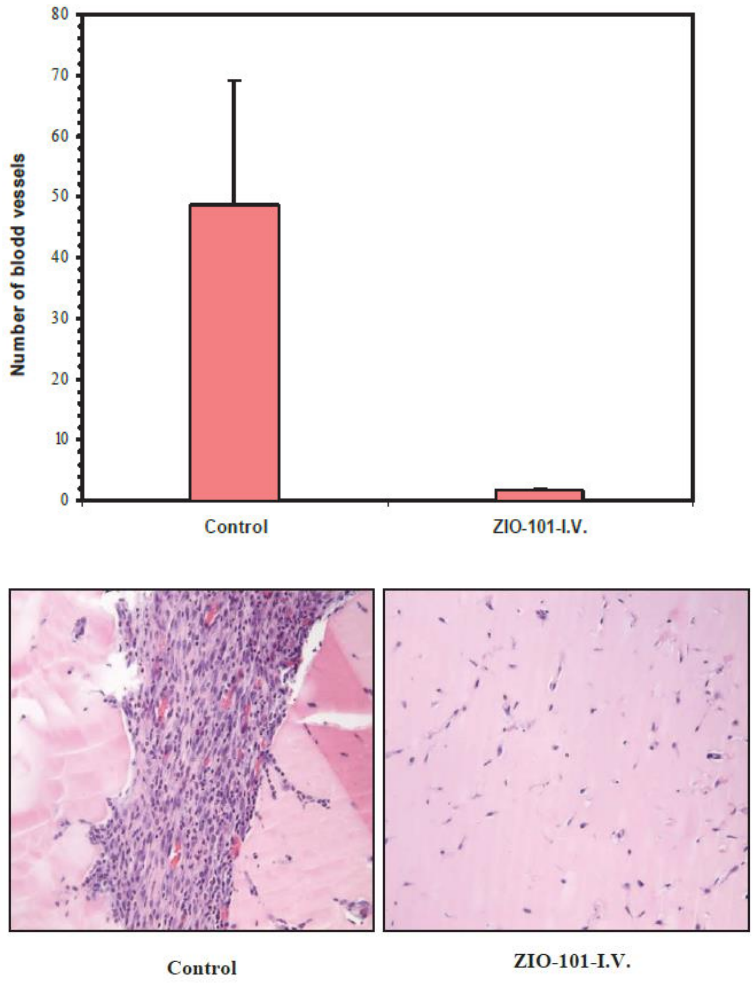
試験番号：12041、添付資料番号：4.2.1.1.9

ダリナパルシンの血管新生阻害作用をマトリゲルプラグアッセイにより評価した。

血管内皮細胞増殖因子（VEGF）（50 ng/mL）、線維芽細胞増殖因子（FGFb）（50 ng/mL）及びヘパリン（3 ng/ml）を含有するマトリゲル 500 µL を、C57BL マウス（7 週齢、雌）の両側腹部に皮下注入した（Day 0）。マトリゲル注入 2 日後から、ダリナパルシン 100 mg/kg（静脈内投与、5 匹）又は溶媒（生理食塩液）（経口投与、4 匹）を 1 日 1 回 9 日間投与した（被験物質毒性に関連した死亡が認められたため、Day 7 及び Day 9 の投与は実施しなかった）。マトリゲル注入

12 日後、麻酔下で皮下組織内のマトリゲルプラグを摘出し、10%ホルマリンで固定した。その後、パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリンエオジン染色を行い、顕微鏡下に各マトリゲルプラグの血管数を計測した。溶媒投与群では 5 つ、ダリナパルシン 100 mg/kg 投与群では 4 つのマトリゲルプラグが評価可能であった。その結果、ダリナパルシン 100 mg/kg 静脈内投与により対照群と比較してマトリゲルプラグの血管数が減少し、血管新生阻害作用が認められた（図 2.6.2-25）。

図 2.6.2-25　　マトリゲルプラグアッセイにおけるダリナパルシンの血管新生阻害作用



The data represent the mean ± standard error.
ZIO-101 = darinaparsin, I.V. = intravenous
Source: Study Report 12041, Figure 1

3　副次的薬理試験

該当する試験はない。

4　安全性薬理試験

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検討することを目的とした安全性薬理試験を実施した。ダリナパルシンで実施した安全性薬理試験を表 2.6.2-6 に示した。

表 2.6.2-6　　安全性薬理試験項目一覧

試験の種類	試験系	投与方法	試験番号
中枢神経系	ラット	静脈内	8275629
心血管系	HEK293 細胞	*In vitro*	110707.APJ
心血管系	HEK293 細胞	*In vitro*	O14-S-004-SP
心血管系	モルモットランゲンドルフ灌流心	*In vitro*	1017
心血管系	イヌ	静脈内	8253338
心血管系及び呼吸器系	イヌ	静脈内	D14-S004-SP
心血管系	イヌ	静脈内	[redacted]473-011

4.1　中枢神経系への影響

試験番号 8275629、添付資料番号 4.2.1.3.1

ラットを用いてダリナパルシンの中枢神経系に対する影響を Irwin 変法により評価した。7～8 週齢の雄ラット（Sprague-Dawley 系、6 匹／群）に 0（溶媒対照：生理食塩液）50、75 又は 150 mg/kg のダリナパルシンを 2 mL/kg の投与容量で単回静脈内投与した。Irwin 変法による評価は投与前並びに投与 5 分後、並びに 1.5、3、6 及び 24 時間後に実施した。

死亡例はなかった。Irwin 変法による観察では、75 mg/kg 以上の投与群で自発運動の低下及び軽度から中等度の浅徐呼吸がみられたほか、150 mg/kg 群で軽度の流涎がみられた。これらの所見は投与 5 分後に一過性に認められ、投与 1.5 時間後までに消失した。

50 mg/kg ではダリナパルシンによる影響は認められなかった。

4.2　心血管系への影響

4.2.1　*In vitro* 試験

4.2.1.1　hERG カリウム電流に対する影響

試験番号 110707.APJ、添付資料番号 4.2.1.3.2

試験番号 O14-S-004-SP、添付資料番号 4.2.1.3.3

hERG カリウム電流に対する影響を、hERG を安定的に発現させた HEK293 細胞を用い、細胞外液［4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸（HEPES）緩衝生理食塩液］にダ

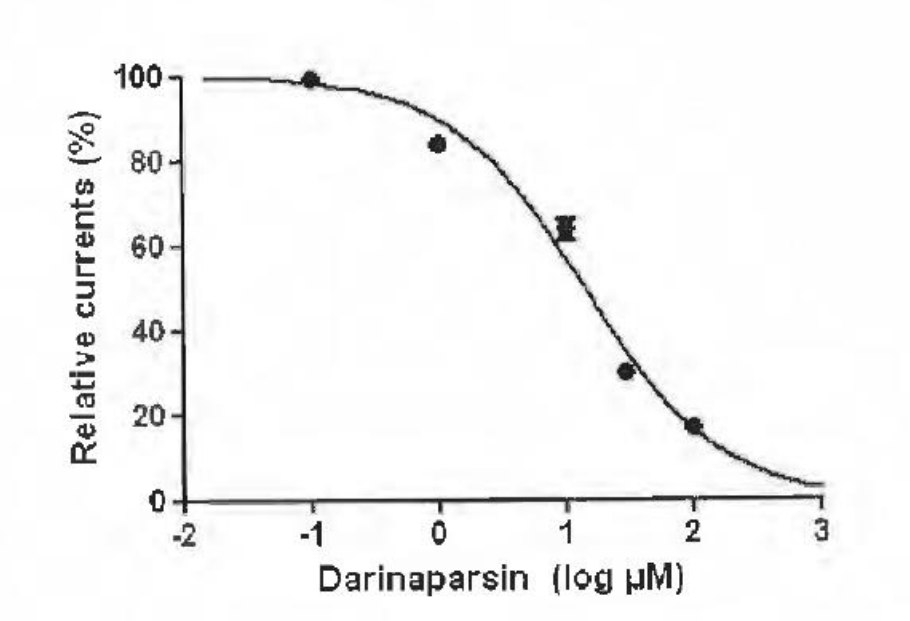
リナパルシンを添加してホールセルパッチクランプ法により評価した。細胞の膜電位を-80 mV で保持し、hERG カリウム電流を観察するために標的パルスで 20 mV に脱分極させた。値は n=3 の平均値±標準誤差で示した。

ダリナパルシンは生理的温度付近（33～35°C）において 30、100、300 及び 1000 µmol/L の濃度で hERG カリウム電流をそれぞれ-0.1 ± 0.3%、11.1 ± 1.6%、13.2 ± 1.7%及び 11.9 ± 0.7%阻害し、100、300 及び 1000 µmol/L では溶媒対照（1.0 ± 0.6%）と比較して統計学的に有意であった（$p<0.05$）（試験番号 110707.APJ）。

別の試験では、ダリナパルシンを室温条件下で 0（溶媒対照）、0.1、1、10、30 及び 100 µmol/L の濃度で適用したところ、濃度依存的に hERG カリウム電流を阻害し、IC_{50} 値は 14.19 µmol/L であった（図 2.6.2-26）（試験番号 O14-S-004-SP）。

以上より、ダリナパルシンによる hERG カリウムチャネル阻害作用の可能性が示唆された。

図 2.6.2-26　　ダリナパルシンの hERG 阻害作用の濃度依存性



Mean±SEM of relative hERG current. Vehicle control was taken as 100%, n = 3.
Source: Study Report O14-S-004-SP, Appendix I, Figure. I-2

4.2.1.2　　摘出心臓を用いた心臓伝導系に対する影響

試験番号 1017、添付資料番号 4.2.1.3.4

モルモットの摘出心臓を用いて、ダリナパルシンの心機能（電気生理学的及び機械的機能）に対する影響をランゲンドルフ法により評価した。ダリナパルシン（0.01、0.1、1、10 及び 100 µmol/L を漸増適用、n=4）又は陽性対照（キニジン：0.01、0.1、1 及び 10 µmol/L を漸増適用、n=1）を 15 分間灌流適用時の適用前後の双極誘導 ECG 及び等容性左室圧を計測し、RR 間隔、PQ 間隔、QRS 間隔、QT 間隔、補正 QT 間隔（QTc 間隔）及び ST-T 間隔、並びに左室圧一次微分最大値（dP/dt_{max}）及び最小値（dP/dt_{min}）の各パラメータを評価した。

10 μmol/L 以下の濃度ではダリナパルシンの心伝導系に対する作用は認められなかった。最高濃度である 100 μmol/L では RR 間隔が延長し、ダリナパルシンによる陰性変時作用が認められた。また、PQ 間隔、QRS 間隔、QT 間隔、QTc 間隔及び ST-T 間隔の延長も認められ、陰性変伝導作用及び QT/QTc 間隔延長作用が認められた。同濃度では dP/dt_{max} の減少及び dP/dt_{min} の増加もみられたことから陰性変力作用及び陰性変弛緩作用も示した。これらの作用はキニジンに類似したが、より高濃度で認められた（表 2.6.2-7）。

表 2.6.2-7　　ダリナパルシンのモルモット摘出心臓を用いた心臓伝導系に対する影響

Test and positive control articles	**Parameters (unit)**	**Concentrations of darinaparsin or quinidine (μmol/L)**					
		baseline	**0.01**	**0.1**	**1**	**10**	**100**
Darinaparsin (n=4)	RR (ms)	299 ± 24.70	348 ± 13.62	366 ± 9.66	383 ± 12.33	271 ± 14.05	469 ± 114.32
	QT (ms)	180 ± 9.79	200 ± 8.16	208 ± 7.50	219 ± 5.15	160 ± 15.14	361 ± 42.98
	QTc (ms)	269 ± 7.37	284 ± 8.04	290 ± 8.17	301 ± 5.32	246 ± 19.67	481 ± 71.48
	PQ (ms)	50 ± 10.61	64 ± 3.57	55 ± 13.54	71 ± 3.15	84 ± 3.15	335 ± 14.14
	QRS (ms)	23 ± 1.44	21 ± 2.39	22 ± 1.44	24 ± 3.75	20 ± 2.04	50 ± 4.56
	ST-T (ms)	158 ± 11.09	179 ± 7.47	191 ± 7.18	195 ± 3.54	140 ± 13.39	311 ± 39.28
	dP/dt_{max} (mmHg)	585 ± 48.53	690 ± 67.53	711 ± 91.70	683 ± 83.72	519 ± 82.07	261 ± 70.22
	dP/dt_{min} (mmHg)	-532 ± 30.95	-614 ± 59.62	-616 ± 75.14	-568 ± 60.83	-401 ± 64.05	-141 ± 35.82
Quinidine (n=1)	RR (ms)	320	305	300	375	410	NT
	QT (ms)	200	190	185	220	235	NT
	QTc (ms)	292	282	276	305	316	NT
	PQ (ms)	65	50	65	65	95	NT
	QRS (ms)	20	30	25	25	35	NT
	ST-T (ms)	180	160	160	195	200	NT
	dP/dt_{max} (mmHg)	509	711	887	848	578	NT
	dP/dt_{min} (mmHg)	-436	-645	-796	-716	-508	NT

The values are shown as mean±SEM.
dP/dt_{max} = maximum rate of left ventricular rise; dP/dt_{min} = maximum rate of left ventricular fall; NT = not tested; QTc = QT interval corrected for heart rate.
Source: Study Report 1017, Appendix C

4.2.2 *In vivo* 試験

試験番号 8253338、添付資料番号 4.2.1.3.5
試験番号 D14-S004-SP、添付資料番号 4.2.1.3.6
試験番号[redacted]473-011、添付資料番号 4.2.1.3.7

テレメトリー装着の覚醒ビーグル犬を用いた 3 つの安全性薬理試験で心血管系に対するダリナパルシンの影響を評価した。

1 つ目の試験では、雄 8 匹（初回投与時 13～27 ヵ月齢）に、0（溶媒対照：生理食塩液）、2、4 又は 6 mg/kg のダリナパルシンを 2 mL/kg の投与容量でラテン方格法にて Day 1、8、15 又は 22 に単回静脈内投与した。投与前から投与 48 時間後までの ECG パラメータ（QRS 間隔、PR 間隔、QT 間隔及び QTc 間隔）、心拍数、血圧（収縮期、拡張期及び平均動脈圧並びに脈圧）及び体温を評価した。6 mg/kg までの投与において、いずれの評価項目にもダリナパルシンによる影響はみられなかった（試験番号 8253338）。

2 つ目の試験では、雌雄各 4 匹（初回投与時 6～18 ヵ月齢）に 0（溶媒対照：生理食塩液）、8、15 又は 30 mg/kg のダリナパルシンを 0.5 mL/kg の投与容量でラテン方格法にて単回静脈内投与した。各投与間には 3 又は 4 日間の休薬期間を設定した。投与前から投与 24 時間後までの ECG パラメータ［RR 間隔、PR 間隔、QRS 間隔、QT 間隔、QTc 間隔及び T 波頂点から T 波終末点（$T_{p\text{-}e}$）間隔並びに QRS 電位及び ST 電位］、心拍数、血圧（収縮期、拡張期及び平均動脈圧並びに脈圧）及び体温を評価した。一般状態所見として興奮、よろめき歩行、結膜充血、流涙、潮紅、流涎、泡沫の喀出及び嘔吐が投与日に観察された。これらの所見は休薬期間には認められなかった。ダリナパルシンによる体温に対する影響はみられなかった。8 及び 15 mg/kg の投与では、心血管系（ECG パラメータ、心拍数及び血圧）に対する影響はみられなかった。30 mg/kg の投与では、投与 3 時間後に溶媒対照投与時と比較して統計学的に有意な心拍数の増加（35.17%）及び RR 間隔の短縮（24.38%）が認められた（$p<0.05$）。また、PR 間隔の短縮傾向（5.40%～9.37%）が投与 0.5～8 時間後に認められた。同用量では、統計学的に有意ではないものの、収縮期血圧（3.40%～17.61%）、拡張期血圧（2.85%～14.34%）及び平均動脈圧（3.05%～15.74%）の上昇傾向が投与 0.5 から 5 時間後まで認められた。心拍数及び血圧に対する影響の程度は小さく短期間で回復した（試験番号 D14-S004-SP）。

D14-S004-SP 試験は試験実施施設から GLP 適合性に関する文書を十分に入手できていないため、雄ビーグル犬を用いてさらに同様の検討を実施した。すなわち、雄 4 匹（馴化開始時 5～6 ヵ月齢）に 0（溶媒対照：生理食塩液）、8、15 又は 30 mg/kg のダリナパルシンをラテン方格法にて Day 1、8、15 又は 22 に同様に単回静脈内投与し、投与前から投与 24 時間後までの ECG パラメータ（PR 間隔、QRS 間隔、QT 間隔及び QTc 間隔）、心拍数及び血圧（収縮期、拡張期及び平均動脈圧）を評価した。一般状態所見として 15 又は 30 mg/kg の投与で各 1 匹の動物に投与終了 1 分前から 1 分後の間に嘔吐が観察された。8 及び 15 mg/kg の投与では、心血管系（ECG パラメータ、心拍数及び血圧）に対する影響はみられなかった。30 mg/kg の投与では、投与終了 0.5 時間後の全動物及び 1 時間後の 2/4 匹に溶媒対照投与時と比較して収縮期血圧（最大約 57%）、拡張期血圧（最大約 105%）及び平均動脈圧（最大約 76%）の上昇が認められ、用量別平均値に

統計学的有意差が認められた（p<0.05 又は 0.01）。同用量では、投与終了 0.5 時間後に 1 匹の動物で溶媒対照投与時と比較した心拍数の増加が認められた（約 118%）が、統計学的な差は認められなかった。ECG パラメータにダリナパルシン投与の影響はみられなかった（試験番号 [redacted]473-011）。

4.3 呼吸器系への影響

試験番号 D14-S004-SP、添付資料番号 4.2.1.3.6

テレメトリー装着の覚醒ビーグル犬を用いた安全性薬理試験（4.2.2 項、試験番号 D14-S004-SP）では、呼吸機能に対する影響も同時に検討した。ダリナパルシン 0（溶媒対照：生理食塩液）、8、15 又は 30 mg/kg の単回静脈内投与において、投与前から投与 24 時間後までの呼吸数及び一回換気量を評価した。30 mg/kg の投与で溶媒対照投与時と比較して呼吸数の増加（13.62%～75.45%）が一過性に投与 0.5 から 8 時間後まで認められ、投与 3 時間後では統計学的に有意であった（p<0.05）。8 及び 15 mg/kg の投与では、呼吸機能に対する影響はみられなかった。

5　薬力学的薬物相互作用試験

5.1　ヒト MM 細胞におけ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

試験番号：SP02-PD-04、添付資料番号：4.2.1.4.1

ヒト MM 細胞 RPMI-8226、U266 及び MM1S を用いて、ダリナパルシンとその他の抗悪性腫瘍薬（メルファラン、ボルテゾミブ、ドキソルビシン）との併用効果を評価した。各細胞（1×10^5 cell/well）を 96 穴プレートで 24 時間培養後、被験物質を添加した。48 時間後、MTS 法により生存細胞数を測定して増殖抑制作用を評価した。

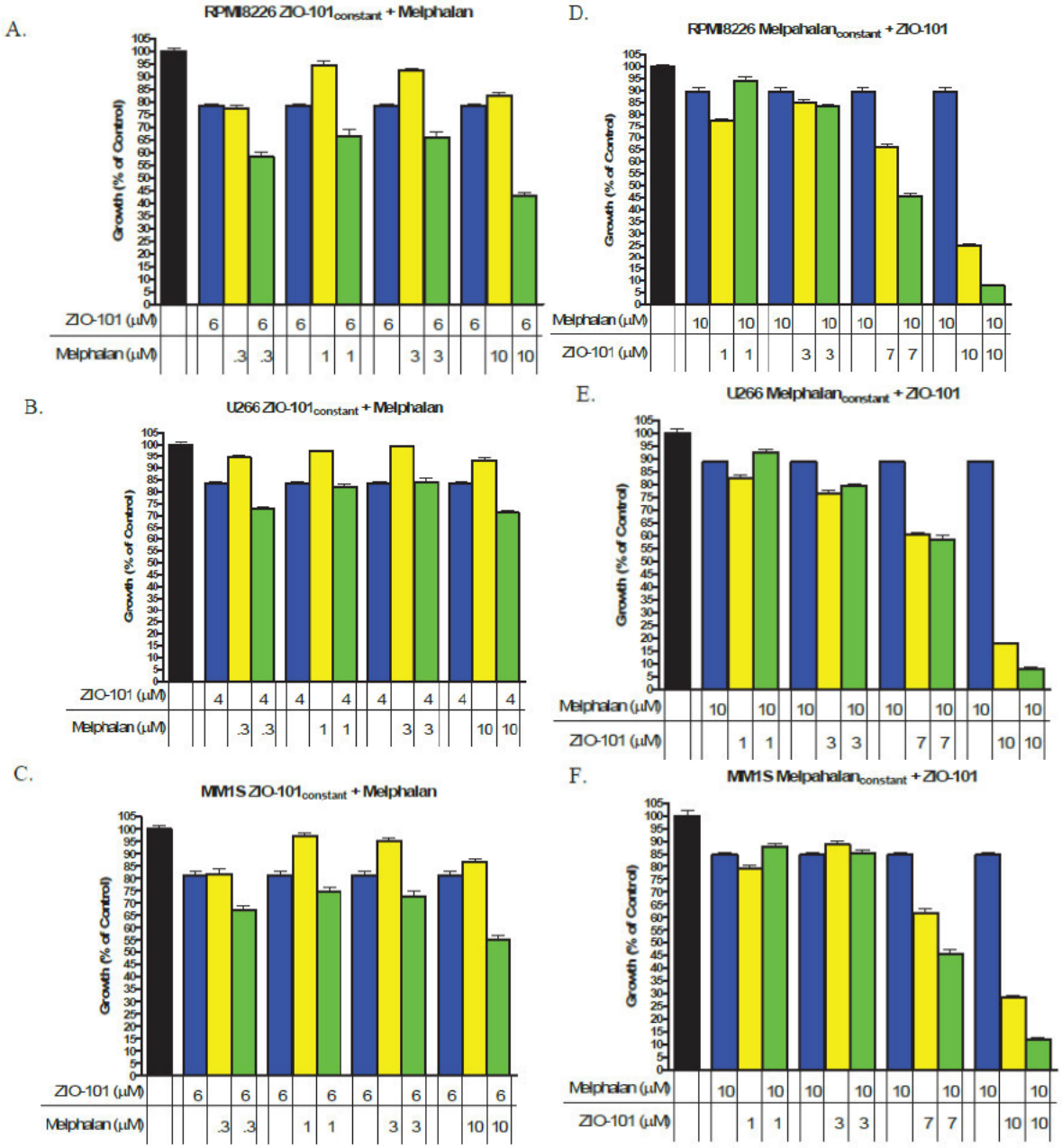
固定濃度のダリナパルシン（4 又は 6 μmol/L）と各濃度のメルファラン（0.3～10 μmol/L）との併用（図 2.6.2-27 A-C）並びに固定濃度のメルファラン（10 μmol/L）と各濃度のダリナパルシン（1～10 μmol/L）との併用（図 2.6.2-27 D-F）による増殖抑制作用を検討した。RPMI-8226（図 2.6.2-27 A 及び D）及び MM1S（図 2.6.2-27 C 及び F）細胞において、メルファランとダリナパルシンとの併用は単剤と比較してより強い増殖抑制作用を示した。U266 細胞の併用効果に対する感受性は他の細胞より弱かった（図 2.6.2-27 B 及び E）。

固定濃度のダリナパルシン（4 又は 6 μmol/L）と各濃度のボルテゾミブ（0.1～3 μmol/L）との併用（図 2.6.2-28 A-C）並びに固定濃度のボルテゾミブ（10 又は 15 μmol/L）と各濃度のダリナパルシン（0.5～8 μmol/L）との併用（図 2.6.2-28 D-F）による増殖抑制作用を検討した。いずれの MM 細胞でも最高濃度のダリナパルシンとボルテゾミブとの併用により増殖抑制作用は多少増大したが、特に U266 細胞では最高濃度のダリナパルシン（8 μmol/L）とボルテゾミブ（10 μmol/L）との併用により単剤と比較して明らかな増殖抑制作用の増大が認められた（図 2.6.2-28 E）。

固定濃度のダリナパルシン（1 又は 3 μmol/L）と各濃度のドキソルビシン（0.3～2.25 μmol/L）との併用効果を検討した結果（図 2.6.2-29 A-C）、U266 細胞に対する増殖抑制作用は、最高用量のドキソルビシン（1.75 μmol/L）とダリナパルシン（1 μmol/L）との併用により単剤と比較して明らかに増大した（図 2.6.2-29 B）。RPMI-8226（図 2.6.2-29 A）及び MM1S（図 2.6.2-29 C）細胞に対する併用効果は認められなかった。固定濃度のドキソルビシン（1.5 μmol/L）と各濃度のダリナパルシン（1～10 μmol/L）との併用効果を検討した結果、高用量のダリナパルシンとドキソルビシンとの併用によりいずれの MM 細胞でも単剤と比較して増殖抑制作用の増大が認められた（図 2.6.2-29 D-F）。

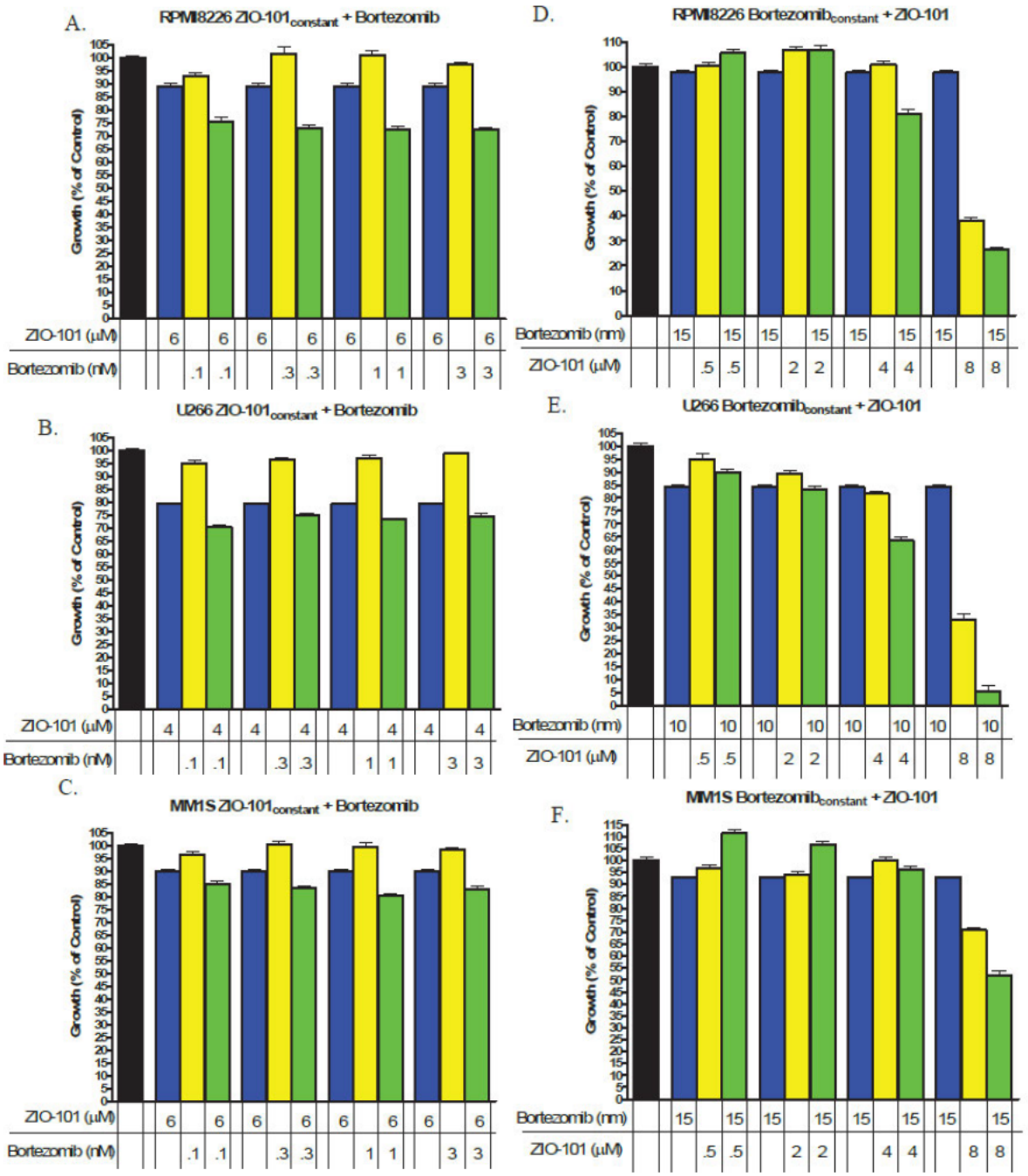
以上の結果より、ヒト MM 細胞において、ダリナパルシンはメルファラン、ボルテゾミブ又はドキソルビシンとの併用により単剤と比較して増殖抑制作用を増大させることが示された。

図 2.6.2-27　　ヒト MM 細胞に対するダリナパルシンとメルファランとの併用による増殖抑制作用



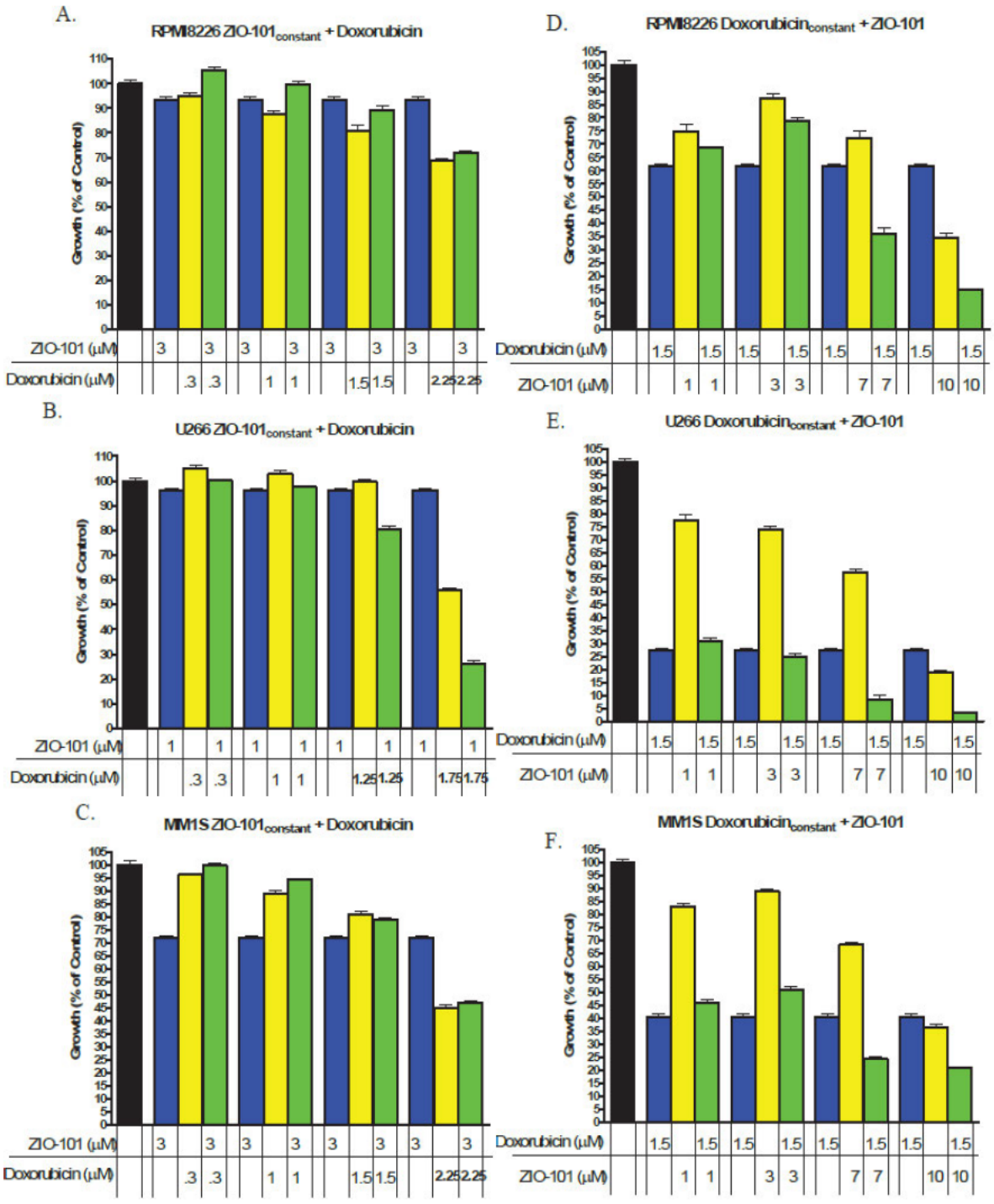
Effects of darinaparsin in combination with melphalan. RPMI-8226 (A), U266 (B) and MM1S (C) cells were treated with a constant concentration of darinaparsin and varying concentration of melphalan. Then RPMI-8226 (D), U266 (E) and MM1S (F) cells were treated with varying concentration of darinaparsin and a constant concentration of melphalan.
ZIO-101 = darinaparsin
Source: Study Report SP02-PD-04, Figure 2

図 2.6.2-28　　ヒト MM 細胞に対するダリナパルシンとボルテゾミブとの併用による増殖抑制作用



Effects of darinaparsin in combination with bortezomib. RPMI-8226 (A), U266 (B) and MM1S (C) cells were treated with a constant concentration of darinaparsin and varying concentration of bortezomib. Then RPMI-8226 (D), U266 (E) and MM1S (F) cells were treated with varying concentration of darinaparsin and a constant concentration of bortezomib.
ZIO-101 = darinaparsin
Source: Study Report SP02-PD-04, Figure 3

図 2.6.2-29　　ヒト MM 細胞に対するダリナパルシンとドキソルビシンとの併用による増殖抑制作用



Effects of darinaparsin in combination with doxorubicin. RPMI-8226 (A), U266 (B) and MM1S (C) cells were treated with a constant concentration of darinaparsin and varying concentration of doxorubicin. Then RPMI-8226 (D), U266 (E) and MM1S (F) cells were treated with varying concentration of darinaparsin and a constant concentration of doxorubicin.
ZIO-101 = darinaparsin
Source: Study Report SP02-PD-04, Figure 4

5.2　ヒト TCL 細胞におけるダリナパルシン及び既存の PTCL 治療薬との併用効果

試験番号：SP02-PD-05、添付資料番号：4.2.1.4.2

3 種類のヒト TCL 細胞（Jurkat、Molt-4 及び CCRF-CEM）を用いて、ダリナパルシンと既存の PTCL 治療薬（フォロデシン、プララトレキサート及びロミデプシン）との併用効果を評価した。各薬剤を IC_{50} 値前後の濃度で各細胞に添加し、72 時間処理後、ナトリウム 3'-[1-[(フェニルアミノ)-カルボニル]-3, 4-テトラゾリウム]-ビス(4-メトキシ-6-ニトロ)ベンゼン-スルホン酸水和物（XTT）法により細胞増殖抑制作用を評価した。併用効果の定量解析を行うため、Chou-Talalay 法による median-effect plot を用い、CalcuSyn Ver 3.0（BIOSOFT®）で併用係数（CI）を算出した（Chou 2010）。CI > 1.2 を拮抗的、CI = 0.8～1.2 を相加的、CI < 0.8 を相乗的作用と判定した。

ダリナパルシンは、Molt-4 細胞においてフォロデシンとの併用により、Jurkat、CCRF-CEM 及び Molt-4 細胞においてプララトレキサートとの併用により、相乗作用を示した（フォロデシンの CI：0.46、プララトレキサートの CI：0.48～0.76）。一方、ダリナパルシンはいずれの細胞においてもロミデプシンとの併用では拮抗作用を示した（CI：1.22～3.7）（表 2.6.2-8）。

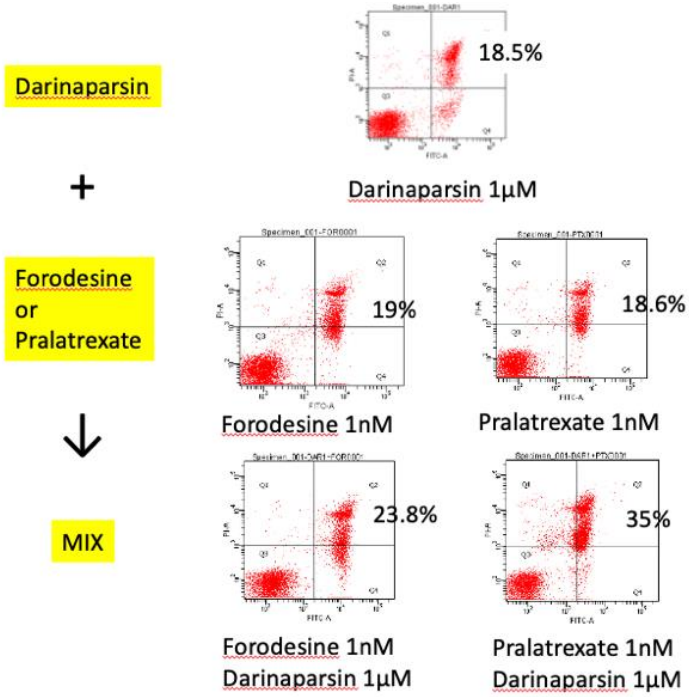
次に、相乗的な増殖抑制作用を示した Molt-4 細胞をダリナパルシン、フォロデシン、プララトレキサート及びロミデプシンの単独又は併用で 72 時間処理後、Annexin V/PI を用いたフローサイトメトリー法により、Annexin V 及び PI 陽性領域で後期アポトーシス細胞を検出した。各薬剤単剤での後期アポトーシス細胞%から IC_{50} 値を推定し、ダリナパルシン 1 μmol/L と併用する薬剤濃度を、プララトレキサート 1 nmol/L、フォロデシン 1 nmol/L、ロミデプシン 1 及び 3 nmol/L とした。Molt-4 細胞において、ダリナパルシンはフォロデシン又はプララトレキサートとの併用により相加的なアポトーシス誘導作用を示したが（図 2.6.2-30）、ロミデプシンとの併用ではアポトーシスの増強は認められなかった（図 2.6.2-31）。

表 2.6.2-8　　各種ヒト TCL 細胞に対するダリナパルシンと PTCL 治療薬との併用による増殖抑制作用

Anti-cancer Agent		Cell line	Dose ratio		CI	IC_{50} (μmol/L)	
Drug A	Drug B		Drug A	Drug B		Drug A	Drug B
Darinaparsin	Forodesine	Jurkat	100	1	0.9	2	0.01
		CCRF-CEM	100	1	1	3	0.003
		Molt-4	100	1	0.46	1.1	0.003
Darinaparsin	Pralatrexate	Jurkat	100	1	0.76	1.4	0.002
		CCRF-CEM	100	1	0.55	1.9	0.002
		Molt-4	100	1	0.48	2	0.002
Darinaparsin	Romidepsin	Jurkat	100	1	1.22	2.6	0.005
		CCRF-CEM	100	1	3.7	1.2	0.001
		Molt-4	100	1	2.2	0.94	0.003

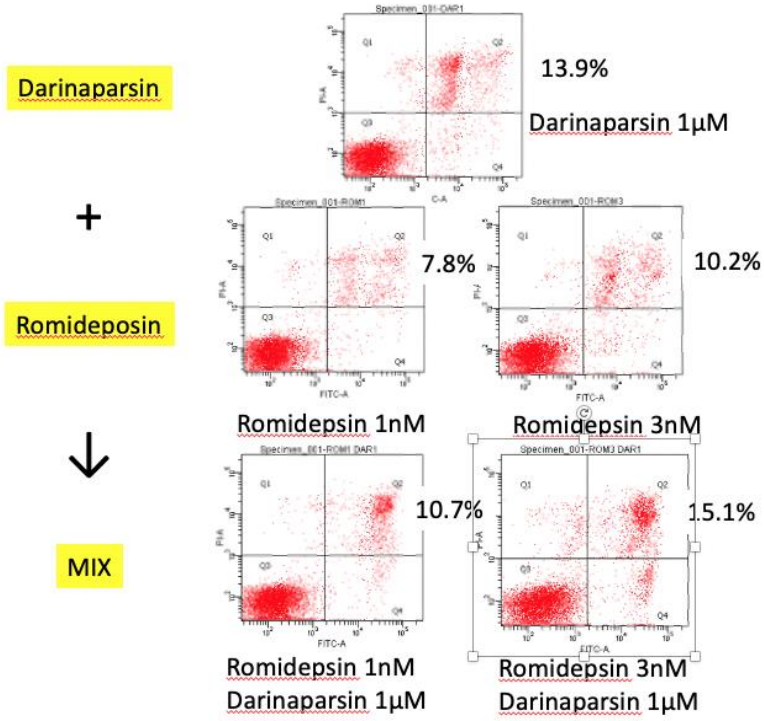
CI = combination index; IC_{50} = 50% inhibitory concentration
Source: Study Report SP02-PD-05, Table 1

図 2.6.2-30　　Molt-4 細胞に対するダリナパルシンとフォロデシン又はプララトレキサートとの併用によるアポトーシス誘導作用



Source: Study Report SP02-PD-05, Figure 1

図 2.6.2-31　　Molt-4 細胞に対するダリナパルシンとロミデプシンとの併用によるアポトーシス誘導作用



Source: Study Report SP02-PD-05, Figure 2

6　考察及び結論

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、ATO の細胞傷害活性は標的細胞内の GSH 濃度と強く相関することが示唆されているが（Bahlis et al. 2002、Grad et al. 2001、Maeda et al. 2004）、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。細胞内に取込まれた ATO は GSH と複合体を形成して、ABCC1 等のトランスポーターを介して効率的に細胞外に排出される（Dai et al. 1999、Davison et al. 2003、Yang et al. 1999）。ABCC1 を高発現したヒト腫瘍細胞は ATO に対する感受性が低下するが、これらの ATO 耐性細胞でもダリナパルシンによる細胞傷害作用は影響されないことが報告されており（Diaz et al. 2008）、これらのトランスポーターを高発現し化学療法に耐性を示す腫瘍に対してもダリナパルシンは有効性を示す可能性がある。また、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 レベル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投与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。ラットへの 45 mg/kg 単回静脈内投与時の最高血漿中濃度（C_{max}）（ヒ素濃度として 2669 ng/mL、2.6.4.3.2.1 項）に基づくと、50 mg/kg 単回静脈内投与時の C_{max} はヒト SP-02L02 試験においてダリナパルシン 300 mg/m^2 を 5 日間反復投与した時の定常状態の C_{max}（ヒ素濃度として 1359.4 ng/mL、2.7.2.2.2.4 項）の約 2 倍と推定され、臨床使用上、ダリナパルシンが中枢神経系へ重篤な影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。心血管系への影響として、*in vitro* 試験においてダリナパルシンは濃度依存的に hERG カリウム電流を阻害した。モルモットの摘出心臓を用いた試験では複数の ECG パラメータに影響し、ダリナパルシンによる 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。したがって、ダリナパルシンは hERG カリウムチャネルを含むナトリウム、カリウム及び／又はカルシウムチャネルの阻害を介した心伝導系への作用を有する可能性が示唆された。*In vivo* 安全性薬理試験では覚醒イヌへの単回静脈内投与によって 30 mg/kg の用量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 間隔の短縮がみられたが、その他に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（2.6.6.3.6 項及び 2.6.7.7B 項）、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。呼吸器系に対する影響評価では、覚醒イヌにダリナパルシンを単回静脈内投与したところ、30 mg/kg の静脈内投与で呼吸数が一過性に増加したが、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。イヌへの 10 mg/kg 単回静脈内投与時の C_{max}（ヒ素濃度として 1457 ng/mL、2.6.4.3.2.2 項）及び 3～30 mg/kg 投与時の C_{max} の用量比例性（2.6.4.3.2.2 項）を考慮すると、15 mg/kg 投与時の C_{max} はヒトへの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る。

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た。また、ダリナパルシンはヒト TCL 細胞に対してフォロデシン又はプララトレキサートと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。

7　図表

本文中に記載した。

参考文献

Bahlis NJ, Cafferty-Grad J, Jordan-McMurry I, Neil J, Reis I, Kharfan-Dabaja M, et al. Feasibility and correlates of arsenic trioxide combined with ascorbic acid-mediated depletion of intracellular glutathione for the treatment of relapsed/refractory multiple myeloma. Clin Cancer Res 2002;8(12):3658-68. (4.3.1)

Chen GQ, Zhu J, Shi XG, Ni JH, Zhong HJ, Si GY, et al. In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As2O3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As2O3 induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR alpha/PML proteins. Blood 1996;88(3):1052-61. (4.3.2)

Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. Cancer Res. 2010 Jan 15;70(2):440-6. (4.3.19)

Dai J, Weinberg RS, Waxman S, Jing Y. Malignant cells can be sensitized to undergo growth inhibition and apoptosis by arsenic trioxide through modulation of the glutathione redox system. Blood 1999;93(1):268 -77. (4.3.3)

Davison K, Cote S, Mader S, Miller WH. Glutathione depletion overcomes resistance to arsenic trioxide in arsenic-resistant cell lines. Leukemia 2003;17(5):931 -40. (4.3.4)

Diaz Z, Mann KK, Marcoux S, et al. A novel arsenical has antitumor activity toward As2O3-resistant and MRP1/ ABCC1-overexpressing cell lines. Leukemia 2008;22(10):1853 -63. (4.3.5)

Grad JM, Bahlis NJ, Reis I, Oshiro MM, Dalton WS, Boise LH. Ascorbic acid enhances arsenic trioxide-induced cytotoxicity in multiple myeloma cells. Blood 2001;98(3):805-13. (4.3.6)

Maeda H, Hori S, Ohizumi H, Segawa T, Kakehi Y, Ogawa O, et al. Effective treatment of advanced solid tumors by the combination of arsenic trioxide and L-buthionine-sulfoximine. Cell Death Differ 2004;11(7):737-46. (4.3.12)

Miller WH, Jr. Molecular targets of arsenic trioxide in malignant cells. Oncologist 2002;7 Suppl 1:14-9. (4.3.13)

Miller WH, Jr., Schipper HM, Lee JS, Singer J, Waxman S. Mechanisms of action of arsenic trioxide. Cancer Res 2002;62(14):3893-903. (4.3.14)

Soignet SL, Frankel SR, Douer D, Tallman MS, Kantarjian H, Calleja E, et al. United States multicenter study of arsenic trioxide in relapsed acute promyelocytic leukemia. J Clin Oncol 2001;19(18):3852-60. (4.3.15)

Yang CH, Kuo ML, Chen JC, Chen YC. Arsenic trioxide sensitivity is associated with low level of glutathione in cancer cells. Br J Cancer 1999;81(5):796 -9. (4.3.17)

目次

2.6.3.1 薬理試験：一覧表 2

2.6.3.2 効力を裏付ける試験 4

2.6.3.3 副次的薬理試験 4

2.6.3.4 安全性薬理試験 5

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 7

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

Test article: Darinaparsin

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Primary Pharmacodynamics					
Darinaparsin reduces cell viability in TCL cell lines	Human TCL cell lines	*In vitro*	Tufts University School of Medicine, Boston, Massachusetts, US	Revi 2014 (publication)	4.2.1.1.1
In vitro analyses of anti-cancer activity and mechanism of action of darinaparsin	Human-tumor cell lines Human PBMC	*In vitro*	[redacted], US	SP02-PD-01	4.2.1.1.2
Analyses of mechanism of anti-cancer activity of darinaparsin	Human-tumor cell lines	*In vitro*	[redacted], Japan	SP02-PD-06	4.2.1.1.3
Darinaparsin: a novel organic arsenical with promising anticancer activity	Human-tumor cell lines	*In vitro*	McGill University, Montreal, Canada	Mann 2009 (publication)	4.2.1.1.4
Analysis of darinaparsin mechanism of action	Isolated mitochondria	*In vitro*	[redacted], Israel	RES-1002	4.2.1.1.5
Darinaparsin induces a unique cellular response and is active in an arsenic trioxide-resistant myeloma cell line	Human MM cell lines	*In vitro*	University of Miami Miller School of Medicine, Miami, Florida, US	Matulis 2009 (publication)	4.2.1.1.6
Effects of darinaparsin on animal model of human multiple myeloma LAGλ-1	C.B-17 SCID/SCID mice bearing LAGλ-1 tumors	IV	[redacted], US	SP02-PD-03	4.2.1.1.7
In vitro antiangiogenic activity study of darinaparsin	HUVEC	*In vitro*	[redacted], US	SP02-PD-02	4.2.1.1.8
Antiangiogenic activity study of darinaparsin with matrigel plug assay	C57BL mice	IV	[redacted], US	12041	4.2.1.1.9
Secondary Pharmacodynamics					
NA					

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

Test article: Darinaparsin

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Safety Pharmacology					
Modified Irwin battery of tests in rats	Sprague-Dawley Rat	IV	[redacted], US	8275629 [a]	4.2.1.3.1
Effects on hERG current	HEK293 cells	*In vitro*	[redacted], US	110707.APJ [a]	4.2.1.3.2
Effects on hERG current	HEK293 cells	*In vitro*	[redacted], China	O14-S-004-SP	4.2.1.3.3
Effects in the Langendorff perfused heart	Langendorff guinea pig heart	*In vitro*	[redacted], US	1017	4.2.1.3.4
Cardiovascular study in conscious telemetered dogs	Beagle Dog	IV	[redacted], US	8253338 [a]	4.2.1.3.5
Cardiovascular and respiratory function study in conscious telemetered dogs	Beagle Dog	IV	[redacted], China	D14-S004-SP [a]	4.2.1.3.6
Cardiovascular study in conscious telemetered dogs	Beagle Dog	IV	[redacted], Japan	[redacted]473-011 [a]	4.2.1.3.7
Pharmacodynamic Drug Interactions					
In Vitro effects of darinaparsin in combination with bortezomib, melphalan, doxil	Human MM cell lines	*In vitro*	[redacted], US	SP02-PD-04	4.2.1.4.1
Combined antitumor effect of darinaparsin with other novel agents in TCL	Human TCL cell lines	*In vitro*	[redacted], Japan	SP02-PD-05	4.2.1.4.2

HEK = Human embryonic kidney; hERG = Human ether-à-go-go-related gene; HUVEC = Human umbilical vein endothelial cells; IV = Intravenous; MM = multiple myeloma; NA = not applicable; PBMC = Peripheral blood mononuclear cells; SCID = severe combined immunodeficient; TCL = T-cell lymphoma; US = United States
a: The study report contains a GLP compliance statement.

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2 項を参照のこと。

2.6.3.3 副次的薬理試験

ダリナパルシンを用いて実施した副次的薬理試験はない。

2.6.3.4 安全性薬理試験

Test article: Darinaparsin

Organ System(s) Evaluated	Test System	Method of Administration	Doses [a]	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP [b]	Study Number
Central nervous system	Sprague-Dawley Rats	Intravenous	0, 50, 75, 150 mg/kg	Male, n = 6	Administration of darinaparsin caused Irwin observation of low activity and slow and shallow respiration during the 5 minutes postdose at ≥75 mg/kg, and excessive salivation at 150 mg/kg. No effect of darinaparsin is observed at 50 mg/kg.	Yes	8275629
Cardiovascular system (hERG current)	HEK293 Cells	*In vitro*	0, 30, 100, 300, 1000 µmol/L	n = 3	Darinaparsin inhibited hERG current at 30, 100, 300 and 1000 µmol/L by (Mean ± SEM) -0.1 ± 0.3%, 11.1 ± 1.6%, 13.2 ± 1.7% and 11.9 ± 0.7%, respectively, versus 1.0 ± 0.6% in control (statistically significant at ≥100 µmol/L, $p<0.05$).	Yes	110707.APJ
Cardiovascular system (hERG current)	HEK293 Cells	*In vitro*	0, 0.1, 1, 10, 30, 100 µmol/L	n = 3	Darinaparsin inhibited the hERG currents in a concentration-dependent manner with IC_{50} value of 14.19 µmol/L.	No	O14-S-004-SP
Cardiovascular system (langendorff preparation)	Guinea Pig Heart	*In vitro*	Darinaparsin: 0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 µmol/L [c] Positive control (quinidine): 0, 0.01, 0.1, 1, 10 µmol/L [c]	Darinaparsin: n = 4 (number of hearts = 4) Quinidine: n = 1 (number of hearts = 1) Control (vehicle): n = 1 (number of hearts = 1)	At 100 µmol/L, RR, PQ, QRS, QT, QTc and ST-T interval lengthened. dP/dt_{max} decreased and dP/dt_{min} increased. The test article possesses negative chronotropy, dromotropy, inotropy and lusitropy. Darinaparsin has no effect at 10 µmol/L.	No	1017

2.6.3.4 安全性薬理試験（続き）

Test article: Darinaparsin

Organ System(s) Evaluated	Test System	Method of Administration	Doses [a]	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP [b]	Study Number
Cardiovascular system	Beagle Dogs (Telemetry-Instrumented)	Intravenous	0, 2, 4, 6 mg/kg	8 males (Latin square design)	No darinaparsin-related effects were observed on mortality, clinical observations, body weight or qualitative food consumption. Darinaparsin had no effect on qualitative or quantitative measures of ECG, heart rate, blood pressure, or body temperature through 48 hours postdose at up to 6 mg/kg.	Yes	8253338
Cardiovascular and respiratory system	Beagle Dogs (Telemetry-Instrumented)	Intravenous	0, 8, 15, 30 mg/kg	Male and female, n = 4/sex (Latin square design)	Abnormal clinical symptoms were noted on the dosing period including agitation, staggers, conjunctival congestion, lacrimation, flush, salivation, spitting froth, and emesis. At 30 mg/kg, heart rate increased at 3 hours after administration by 35.17% with corresponding RR interval shortening by 24.38% (statistically significant, $p<0.05$). A shortening trend for PR interval was also noted from 0.5 to 8 hours after administration with decrease by 5.40% -9.37%. Blood pressure revealed an elevation trend from 0.5 to 3 hours after administration by 3.40% - 17.61% (systolic), 2.85% - 14.34% (diastolic) and 3.05% - 15.74% (mean arterial), respectively. Respiratory frequency increased from 0.5 to 8 hours after administration by 13.62% -75.45% (statistically significant at 3 hours after administration, $p<0.05$). At 8 and 15 mg/kg, no test article-related changes were observed in ECG, heart rate, blood pressure, respiratory functions, and body temperature.	Yes	D14-S004-SP

2.6.3.4 安全性薬理試験（続き）

Test article: Darinaparsin

Organ System(s) Evaluated	Test System	Method of Administration	Doses [a]	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP [b]	Study Number
Cardiovascular system	Beagle Dogs (Telemetry-Instrumented)	Intravenous	0, 8, 15, 30 mg/kg	4 males (Latin square design)	At 15 and 30 mg/kg, clinical sign of vomiting was observed in 1 animal each between 1 minute before and after the end of dosing. At 30 mg/kg, increases in blood pressure were noted in all animals at 0.5 hours after the end of dosing and in 2 animals at 1 hour after the end of dosing by up to approximately 57% (systolic), 105% (diastolic) and 76% (mean) with statistically significance in the mean values when compared with the control values ($p<0.05$ or $p<0.01$). An increase in heart rate was noted in 1 animal at 0.5 hours after the end of dosing by approximately 118%. No darinaparsin-related changes in ECG parameters at any dose level.	Yes	[redacted]473-011

dP/dt_{max} = Maximum rate of left ventricular rise; dP/dt_{min} = Maximum rate of left ventricular fall; ECG = Electrocardiogram; GLP = Good Laboratory Practice; HEK = Human embryonic kidney; hERG = Human ether-à-go-go-related gene; IC_{50} = 50% inhibitory concentration; No. = Number; QTc = QT interval corrected for heart rate; SEM = Standard error of the mean.
a: Single dose unless specified otherwise.
b: An entry of "Yes" indicates that the study report contains a GLP compliance statement.
c: The hearts were perfused with escalating doses of test article.

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

2.6.2.5 項を参照のこと。