目次

1 まとめ 5
2 単回投与毒性試験 8
3 反復投与毒性試験 8
3.1 マウス 5 日間反復静脈内投与試験 8
3.2 イヌ 5 日間反復静脈内投与試験 9
3.3 ラット 4 週間反復静脈内投与試験 9
3.4 イヌ 4 週間反復静脈内投与試験 10
3.5 ラット 18 週間反復静脈内投与試験 11
3.6 イヌ 18 週間反復静脈内投与試験 13
4 遺伝毒性試験 14
4.1 *In vitro* 14
4.1.1 細菌を用いる復帰突然変異試験 14
4.1.2 哺乳類細胞を用いる染色体異常試験 14
4.2 *In vivo* 15
4.2.1 *In vivo* マウス小核試験 15
5 がん原性試験 16
6 生殖発生毒性試験 16
6.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 16
6.2 胚・胎児発生に関する試験 16
6.2.1 ウサギ胚・胎児発生用量設定試験 16
6.2.2 ウサギ胚・胎児発生試験 17
6.3 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 18
7 局所刺激性試験 18
8 その他の毒性試験 19
8.1 不純物の毒性評価 19
8.1.1 不純物A* 19

＊ 新薬承認情報提供時に置換

8.1.2 不純物B* 及び不純物C*.....19
8.1.3 不純物D*.....20
8.2 *In vitro* 3T3 NRU 光毒性試験.....20
9 考察及び結論.....21
10 図表.....23
参考文献.....24

＊ 新薬承認情報提供時に置換

表目次

表 2.6.6-1　非臨床毒性試験プログラム 6

表 2.6.6-2　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..... 22

略語及び用語の説明

略語又は用語	日本語	英語
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 24hrs
ECG	心電図	Electrocardiogram
EBSS	アール平衡塩類溶液	Earle's balanced salt solution
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
HNSTD	重篤な毒性が発現しない最大投与量	Highest non-severely toxic dose
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
MNPCE	小核を有する多染性赤血球	Micronucleated polychromatic erythrocyte
MPE	平均光作用	Mean photo effect
MTD	最大耐量	Maximum tolerated dose
NOAEL	無毒性量	No observed adverse effect level
NCE	正染性赤血球	Normochromatic erythrocytes
NRU	ニュートラルレッド取り込み	Neutral red uptake
PCE	多染性赤血球	Polychromatic erythrocyte
PIF	光毒性係数	Photo-irritation-factor
QTc 間隔	補正 QT 間隔	QT interval corrected for heart rate
SD	-	Sprague-Dawley
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 names: ZIO-101, SGLU-1)
S9mix	Aroclor 1254 誘導肝ホモジネート S9 画分及び補酵素の混合液	Aroclor 1254-induced liver S9 fraction with cofactors for metabolic activation
STD_{10}	供試動物の 10%に重篤な毒性が発現する投与量	Severely toxic dose in 10% of the animals
TK	トキシコキネティクス	Toxicokinetics
UV	紫外線	Ultraviolet

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。

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。

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。非臨床毒性試験プログラムを表 2.6.6-1 に示す。

＊ 新薬承認情報提供時に置換

表 2.6.6-1　　非臨床毒性試験プログラム

試験の種類及び期間	動物種	投与経路	試験番号
反復投与毒性試験			
5 日間	マウス	静脈内	SGLU-01 [d]
5 日間	イヌ	静脈内	SGLU-02 [d]
4 週間 [a]	ラット	静脈内	R12-64-CD
4 週間 [a]	イヌ	静脈内	D12-64-CD
18 週間 [b]	ラット	静脈内	R14-S004-RD
18 週間 [b]	イヌ	静脈内	D14-S004-RD
遺伝毒性試験			
細菌を用いる復帰突然変異試験	細菌	*In vitro*	8253652
In vitro 染色体異常試験	ヒトリンパ球	*In vitro*	8253335
In vivo 小核試験	マウス	静脈内	8253336
生殖発生毒性試験			
胚・胎児発生試験（用量設定試験）	ウサギ	静脈内	Q12-64-SZ [d]
胚・胎児発生試験	ウサギ	静脈内	Q14-S004-2RP
その他の毒性試験			
不純物 A*の毒性試験 [c]	ラット	静脈内	[redacted]473-010
In vitro 光毒性試験	Balb/c 3T3 細胞	*In vitro*	[redacted]0001

GLP = 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
a：1 日 1 回 7 日間連日静脈内投与した後に 7 日間休薬するサイクルを 2 サイクル
b：1 日 1 回 5 日間連日静脈内投与した後に 16 日間休薬するサイクルを 6 サイクル
c：1 日 1 回 5 日間連日静脈内投与した後に 16 日間休薬するサイクルを 5 サイクル
d：非 GLP 試験

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した後に 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 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。反復静脈内投与試験における主な毒性所見として、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。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

* 新薬承認情報提供時に置換

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 週間試験では心電図（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。

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。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。

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。

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 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。

以上のとおり、ダリナパルシンの非臨床毒性プロファイルはマウス、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* 光毒性試験により明らかにされた。ヒ素化合物に共通又は関連する所見（一般症状、QTc 間隔の延長、生殖器及び造血器への影響、遺伝毒性）が認められたが、一般毒性試験で観察された所見には回復又は回復傾向が認められた。

＊ 新薬承認情報提供時に置換

2　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。

マウスでは 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* 小核用量設定試験において 250 mg/kg 以上の投与で死亡が認められたが 200 mg/kg までは死亡が認められなかった（3.1 項及び 4.2.1 項）。ラットでは 4 週間反復静脈内投与試験（1 日 1 回 7 日間連日投与後 7 日間休薬するサイクルを 2 サイクル）において 50 mg/kg 以上の投与で死亡が認められたが 30 mg/kg までは死亡が認められなかった。イヌでは 18 週間反復静脈内投与試験（1 日 1 回 5 日間連日投与後 16 日間休薬するサイクルを 6 サイクル）において 30 mg/kg の最高用量まで死亡は観察されなかった（3.6 項）。

以上より、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。

3　反復投与毒性試験

3.1　マウス 5 日間反復静脈内投与試験

試験番号：SGLU-01、添付資料番号：4.2.3.2.1

Swiss Webster 系マウス（雌雄各 5 匹／群）に 0（溶媒：生理食塩液）、50、100、150、200、250、300 及び 350 mg/kg/日（150～1050 mg/m^2/日）のダリナパルシンを 5～10 mL/kg の投与容量で 1 日 1 回、5 日間連日静脈内投与し、毒性試験を実施した。最終投与後 23～25 日間の観察期間を設定し、観察期間終了後に剖検した。

死亡、一般状態、体重並びに剖検所見及び病理組織学的検査所見を評価した。

250 mg/kg/日以上の投与で死亡が認められ、死亡率は用量増加に伴い上昇した。いずれの死亡も投薬に関連すると考えられた。250 mg/kg/日群の雌 1 匹が Day 5 に切迫屠殺された。300 mg/kg/日群の雄 1 匹及び雌 3 匹が Day 2 又は Day 3 の投与直後に死亡又は切迫屠殺された。350 mg/kg/日群の雄 3 匹及び雌 5 匹が、Day 1 又は Day 2 の投与直後に死亡又は切迫屠殺された。50 mg/kg/日以上の群の雌及び 100 mg/kg/日以上の群の雄で、投与直後に自発運動低下がみられた。自発運動低下は、投与後 7 日までに回復したことから毒性学的意義に乏しいと判断した。150 mg/kg/日以上の群の雌雄の数匹に、投与部位（尾）に腫脹及び／又は壊死が認められた。尾の壊死は Day 6～Day 14 に観察され、尾の壊死が初めて観察されてから概して 1～2 日以内に壊死したすべての尾の切断が必要となった。雄では、投与期間中に用量依存的な体重増加抑制傾向がみられたが、雌では認められなかった。剖検において肉眼所見は観察されなかった。病理組織学的検査では投薬に関連した病変が肺［線維性血栓（350 mg/kg/日群の雌雄）及び血管炎（300 mg/kg/日以上の群の雌）］、肝臓［肝細胞肥大（200 mg/kg/日以上の群の雌及び 250 mg/kg/日以上の群の雄）］、胸腺［リンパ球アポトーシス増加（350 mg/kg/日群の雌雄）］、精巣［精細管の変性（150 mg/kg/日以上の群の雄）］及び尾（投与部位）［血管炎、血栓及び出血を伴う壊死並びに潰瘍性皮膚炎（150 mg/kg/日以上の群の雄及び 200 mg/kg/日以上の群の雌）］に認められた。

以上より、本試験の NOAEL は、100 mg/kg/日（300 mg/m^2/日）、供試動物の 10%に重篤な毒性が発現する投与量（STD_{10}）は 250 mg/kg/日（750 mg/m^2/日）と判断した。

3.2 イヌ 5 日間反復静脈内投与試験

試験番号：SGLU-02、添付資料番号：4.2.3.2.2

ビーグル犬（雌雄各 2 匹／群）に 0（溶媒：生理食塩液）、4.2、8.4 及び 16.8 mg/kg/日（0、84、168、336 mg/m^2/日）のダリナパルシンを 1 日 1 回連日 5 日間、1 匹当たり 30 mL の投与容量で 1 時間かけて持続静注し、毒性試験を実施した。投与期間終了後（Day 7）又は回復期間終了後（Day 28 又は Day 29）に各群雌雄 1 匹を剖検した。

死亡、一般状態、体重、摂餌量、体温、ECG、血液学的検査値及び血液生化学的検査値並びに剖検所見及び病理組織学的検査所見を評価した。

試験期間中、死亡はみられず、投薬に関連した毒性徴候はみられなかった。16.8 mg/kg/日群で投与中に自発運動低下又は傾眠が散見されたが一過性であり毒性とはみなさなかった。回復期間終了時に 8.4 及び 16.8 mg/kg/日群で軽度の体重減少が認められたが、体重減少は溶媒対照群でも認められたことから、投薬には関連しないと判断した。体温、摂餌量、ECG、血液学的検査値及び血液生化学的検査値に投薬に関連した所見はみられなかった。

いずれの動物も剖検所見に異常は認められなかった。病理組織学的検査では、投与期間終了後に 8.4 及び 16.8 mg/kg/日群の雄で精巣に軽微から軽度の精細管変性／萎縮がみられた。精巣病変の程度には 8.4 及び 16.8 mg/kg/日群の間で明らかな差異はみられず、回復性も認められなかった。雌では、投与期間終了後に 16.8 mg/kg/日群の卵巣に卵胞変性／萎縮が認められた。卵巣病変に回復性は認められなかった。

以上より、本試験の NOAEL は雄で 4.2 mg/kg/日（84 mg/m^2/日）、雌で 8.4 mg/kg/日（168 mg/m^2/日）と判断した。

3.3 ラット 4 週間反復静脈内投与試験

試験番号：R12-64-CD、添付資料番号：4.2.3.2.3

Sprague-Dawley（SD）系ラット（雌雄各 3 匹／群）に 0（溶媒対照：生理食塩液）、30、50 及び 75 mg/kg/日のダリナパルシンを 3 mL/kg の投与容量で 1 日 1 回 7 日間連日静脈内投与した後に 7 日間休薬するサイクルを 2 サイクル行い、毒性試験を実施した。動物は Day 29 に剖検した。

死亡、一般状態、体重、体温、摂餌量、眼科学的検査所見、血液学的検査値、血液凝固検査値、血液生化学的検査値、尿検査値及び剖検所見を評価した。

50 mg/kg/日以上の投与で死亡が認められた（50 mg/kg/日群の雌 3/3 匹、75 mg/kg/日群の雄 2/3 匹及び雌 3/3 匹）。50 mg/kg/日群では Day 9 及び Day 22 にそれぞれ雌 2 匹及び雌 1 匹が死亡した。75 mg/kg/日群では、Day 5、Day 6、Day 22 及び Day 23 にそれぞれ雌 1 匹、雌 2 匹、雄 1 匹及び雄 1 匹が死亡又は切迫屠殺された。溶媒対照群及び 30 mg/kg/日群に死亡はみられなかっ

た。死亡は投薬に関連すると考えられた。死因は不明であるが、死亡例の剖検において肝臓辺縁の黒色化、肝臓の黄色領域、膵臓の蒼白化、消化管への淡黄色のゼリー状物質貯留、胃の拡張、小腸壁又は胃壁の菲薄化、副腎の暗赤色化並びに胸腺及び脾臓の小型化が認められた。

30 mg/kg/日群では、流涎が観察された（雄 3/3 匹及び雌 2/3 匹）。雄 1 匹で投与部位の創傷又は痂皮形成がみられた。50 mg/kg/日群では、全動物に投与直後に異常呼吸又は頻呼吸、流涎及び潮紅がみられ、雄 1 匹及び雌 1 匹で投与直後に鼻又は足首の浮腫がみられた。これらの所見は 1 時間以内に回復した。また、同群では投与部位の創傷又は痂皮形成、自発運動低下、削痩及び被毛粗剛が散見された。75 mg/kg/日群では、全動物で投与直後に異常呼吸又は頻呼吸、流涎及び潮紅がみられ、雄 1 匹で投与直後に足首の浮腫がみられた。これらの所見は 2 時間以内に回復した。その他、同群では自発運動低下、削痩、虚脱、嗜眠、被毛粗剛、鼻汁、軟便、肛門周囲の汚れ及び尾の浮腫が散見された。

体重増加抑制が、30、50 及び 75 mg/kg/日群の雄で Day 7～Day 28 に認められ、しばしば統計学的有意差を認めた。雌では、50 mg/kg/日群で Day 7 に統計学的に有意な体重増加抑制及び体重低値が認められた。統計学的に有意な摂餌量低下が、雌では 50 及び 75 mg/kg/日群の Week 1 に、雄では 30 及び 50 mg/kg/日群の Week 4 並びに 75 mg/kg/日群の Week 3 及び Week 4 に認められた。

すべての生存動物において、体温、血液学的検査値、血液凝固検査値、血液生化学的検査値及び尿検査値に毒性学的に有意な変化は認められなかった。また、眼科学的検査でも異常所見は認められなかった。

生存動物の剖検において、30 mg/kg/日群の雄 1 匹で脾臓の小型化が認められた以外、投薬に関連した所見は観察されなかった。

以上より、本試験の NOAEL は雌雄とも 30 mg/kg/日（180 mg/m^2/日）未満、重篤な毒性が発現しない最大投与量（HNSTD）は雄で 50 mg/kg/日（300 mg/m^2/日）、雌で 30 mg/kg/日（180 mg/m^2/日）と判断した。

3.4　イヌ 4 週間反復静脈内投与試験

試験番号：D12-64-CD、添付資料番号：4.2.3.2.4

ビーグル犬（雌雄各 1 匹／群）に 0（溶媒対照：生理食塩液）、5、15 及び 25 mg/kg/日のダリナパルシンを 0.5 mL/kg の投与容量で 1 日 1 回 7 日間連日静脈内投与した後に 7 日間休薬するサイクルを 2 サイクル行い、毒性試験を実施した。動物は Day 29 に剖検した。

死亡、一般状態、体重、体温、摂餌量、ECG、眼科学的検査所見、血液学的検査値、血液凝固検査値、血液生化学的検査値、尿検査値及び剖検所見を評価した。

試験期間を通じて死亡はみられなかった。一般状態観察では、15 mg/kg/日以上の群で、投与直後に過剰興奮又は不快感、異常運動、流涙、潮紅、結膜充血、流涎、泡沫の喀出及び掻痒が、25 mg/kg/日群で跳躍や転倒、嘔気、嘔吐、線維束性収縮及び虚脱が観察されたが、いずれも 1 時間以内に回復した。また、25 mg/kg/日群の雌 1 匹に Day 16 の投与前に水様便が認められた。

体重、摂餌量、体温、ECG、眼科学的検査所見、血液学的検査値、血液凝固検査値、血液生化学的検査値及び尿検査値に投薬に関連した異常は認められなかった。

剖検において、5 mg/kg/日群の雌 1 匹に腸間膜に赤色の腫瘤を認めたが、用量依存性がなかったことから投薬に関連しないと考えられた。この他、剖検において異常所見は認められなかった。

以上より、本試験の NOAEL は 5 mg/kg/日（100 mg/m^2/日）と判断した。

3.5　ラット 18 週間反復静脈内投与試験

試験番号：R14-S004-RD、添付資料番号：4.2.3.2.5

SD 系ラット（雌雄各 15 匹／群）に 0（溶媒対照：生理食塩液）、5、15 及び 45 mg/kg/日のダリナパルシンを 2.5 mL/kg の投与容量で 1 日 1 回 5 日間連日投与後 16 日間休薬するサイクルを 6 サイクル繰り返し、毒性試験を実施した。

1 群あたり雌雄各 15 匹中 10 匹は投与期間終了時（最終投与後 16 日、Day 127）剖検群に、残る 5 匹は 4 週間の回復期間終了時（Day 155）剖検群に割り当てた。さらに、TK 評価のために溶媒対照群には雌雄各 4 匹、投薬群には 1 群あたり雌雄各 12 匹のラットを追加した。

死亡、一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査所見、血液学的検査値、血液凝固検査値、血液生化学的検査値及び尿検査値並びに骨髄検査所見、臓器重量、剖検所見及び病理組織学的検査所見を評価した。TK 評価結果の詳細は 2.6.4.3.2.1 項に示した。

毒性評価群の 5 mg/kg/日群の雄 1 匹及び 45 mg/kg/日群の雌 2 匹がそれぞれ Day 143、Day 49 及び Day 92 に死亡した。さらに、TK 評価群の 45 mg/kg/日群で雌 1 匹が Day 71 に死亡した。
5 mg/kg/日群の雄 1 匹の病理組織学的検査に投薬に関連した変化は認められず、用量依存性もなかったことから、死亡は投薬に関連しないと判断した。一方、45 mg/kg/日群の雌 3 匹の死亡は、いずれも投薬に関連があると考えられた。毒性評価群の 45 mg/kg/日群の雌 2 匹では、一般状態観察において第 2 サイクルの投与期間中（Day 22 又は Day 23）以降、過剰興奮、旋回、嗜眠、円背位、流涎、流涙、眼脂、鼻汁、潮紅、軟便、肛門周辺の汚れ、被毛粗剛などが観察され、投与部位（尾）に浮腫、退色化、痂皮形成、潰瘍形成及び／又は切断が認められた。これらの動物では剖検で投与部位（尾）の暗赤色化及び／又は切断が観察され、関連する所見として病理組織学的検査において、投与部位（尾）に痂皮形成、炎症及び／又は壊死が観察された。

一般状態観察では、45 mg/kg/日群の動物に、死亡動物に認められた所見と同様の所見が観察された。すなわち、第 1 サイクルの投与期間中は Day 2～Day 5 に雌 1 匹において尾の浮腫が観察されたのみであった。第 2 サイクル以降の投与期間中に過剰興奮、旋回、潮紅、流涎及び流涙がほぼ全動物に観察された。同群の動物では、その他の所見として投与期間終了時までに嗜眠、円背位、被毛粗剛、落屑、蒼白、被毛の光沢の消失、軟便、肛門周辺の汚れ、眼脂及び／又は鼻汁並びに尾の浮腫、退色化、潰瘍形成、痂皮形成及び／又は切断がみられた。

45 mg/kg/日群の雄で、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な体重の低値が認められた（Day 112 で-10.0%、$p \leq 0.05$）。体重増加量は、45 mg/kg/日群の雌雄で第 2 サイクル投与後以降、溶媒対照群と比較して低下又は低下傾向がみられた（雄の Week 5、Week 7、Week 10、Week 11 及び

Week 16 並びに雌の Week 4 で有意、p≤0.05）。5 及び 15 mg/kg/日群の雄でも第 5 サイクル以降、統計学的に有意な体重増加量の低値（5 mg/kg/日群の Week 13 及び Week 16 並びに 15 mg/kg/日群の Week 16、p≤0.05）を認めたが、変化が軽微であること、及びこれらの群に体重の低値を認めなかったことから毒性とはみなさなかった。45 mg/kg/日群の雌雄の体重増加抑制は、各投与サイクル中の休薬期間に回復性が示された（雄の Week 15 で溶媒対照群と比較して有意に高値、p≤0.05）。

摂餌量は、45 mg/kg/日群の雌雄で投与期間中の低下又は低下傾向が認められた［Week 16 において溶媒対照群と比較して雄で-15.7%（有意差なし）、雌で-30.4%（有意差あり、p≤0.05）］。45 mg/kg/日群の雌雄でみられた摂餌量低下は、各投与サイクル中の休薬期間に回復性が示された（雌の Week 5、Week 8、Week 11 及び Week 14 で溶媒対照群と比較して有意に高値、p≤0.05）。

血液学的検査において、45 mg/kg/日群の雌雄で Day 127 に、投薬に関連した網状赤血球数の増加がみられた。血液凝固検査、血液生化学的検査、尿検査及び眼科学的検査では投薬に関連した所見はみられなかった。

骨髄検査では、5、15 及び 45 mg/kg/日群の雄におけるリンパ球系比率の減少並びに 5 及び 45 mg/kg/日群の雄における顆粒球系比率の上昇が認められた。これらの変動は投薬に関連する可能性はあるが、病理組織学的所見は認められず毒性学的意義は限定的であると判断した。骨髄検査でみられた変化は 4 週間の回復期間終了後には認められなかった。

投与期間終了時の臓器重量測定では、投薬に関連した所見として 45 mg/kg/日群の雄の精巣上体及び精巣の絶対重量及び対脳重量比の低値が認められた。

投与期間終了時の剖検では、45 mg/kg/日群の雌 1/8 匹に尾の切断及び退色化が観察され、関連する所見として病理組織学的検査において炎症及び壊死が認められた。

投与期間終了時の病理組織学的検査では、45 mg/kg/日群の雄 7/10 匹の精巣に伸長精子細胞の軽微から軽度の変性が認められ、精巣上体の管腔内細胞残屑を伴った。また、精巣の精細管変性／萎縮が 5 及び 45 mg/kg/日群の各群雄 2/10 匹に観察され、ときに精巣上体の精子減少及び／又は管腔内細胞残屑を伴った。5 mg/kg/日群の所見は軽微又は中等度であり、精細管変性／萎縮はこの系統のラットの背景データにも認められ、用量依存性を示さなかったことから自然発生病変と判断した。45 mg/kg/日群の所見（軽微及び重度各 1 匹）については伸長精子細胞の変性と無関係に発現しているが、投薬との関連性は不明である。回復期間終了後の病理組織学的検査では伸長精子細胞の変性は認められず、回復性が示された。精細管変性／萎縮は 5 及び 45 mg/kg/日群の雄 2/4 匹及び 2/5 匹に観察された。投与部位（尾）に投薬に関連した所見は認められず、被験物質による局所反応は回復性が示された。以上のとおり、本試験の NOAEL は 15 mg/kg/日（90 mg/m^2/日）と判断した。NOAEL における Day 110 でのヒ素濃度としての全身曝露量［0 時間から 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-}24}$）］は雄で 52144 ng·h/mL、雌で 34160 ng·h/mL であった。

3.6　イヌ 18 週間反復静脈内投与試験

試験番号：D14-S004-RD、添付資料番号：4.2.3.2.6

ビーグル犬（雌雄各 6 匹／群）に 0（溶媒対照：生理食塩液）、3、10 及び 30 mg/kg/日のダリナパルシンを 0.5 mL/kg の投与容量で 1 日 1 回 5 日間連日投与後 16 日間休薬するサイクルを 6 サイクル繰り返し、毒性試験を実施した。

1 群あたり雌雄各 6 匹中 4 匹は投与期間終了時（最終投与後 16 日、Day 127）に、残る 2 匹は 4 週間の回復期間終了後（Day 155）に剖検した。

死亡、一般状態、体重、摂餌量、体温、ECG、眼科学的検査所見、血液学的検査値、血液凝固検査値、血液生化学的検査値、尿検査値及び TK 並びに骨髄検査所見、臓器重量、剖検所見及び病理組織学的検査所見を評価した。TK 評価結果の詳細は 2.6.4.3.2.2 項に示した。

試験期間中、死亡はみられなかった。一般状態観察では、第 1 サイクルから第 6 サイクルまでの投与日に、3 mg/kg 以上の群において過剰興奮、異常運動、眼瞼腫脹／潮紅、流涎及び掻痒が、10 mg/kg 以上の群で嗜眠、虚脱、流涙、眼脂及び嘔吐が、さらに 30 mg/kg 群では振戦／身震い、線維束性収縮、鼻汁及び泡沫の喀出が認められた。また、投与期間（Day 1～Day 127）を通して、3 mg/kg 以上の群で結膜充血、軟便、潮紅及び投与部位の浮腫が、30 mg/kg 以上の群で血便が観察された。これらの所見は投薬に関連すると考えられたが、3 mg/kg 群における所見の頻度（発現例数及び総発現回数）は低く、散発的であったことから毒性とはみなさなかった。

試験期間を通じて、体重、体重増加量、摂餌量、体温、眼科学的検査所見、血液学的検査値、血液凝固検査値、血液生化学的検査値、尿検査値、骨髄検査所見に被験物質と関連する変化は認められなかった。

ECG 検査では、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な QTc 間隔の延長（10 及び 30 mg/kg 群の雌）が認められた。また、統計学的に有意な心拍数の増加（全投薬群の雄又は雌）がみられたが、心拍数増加には用量依存性は認められず、散発的で変化の程度も小さかったことから、毒性とはみなさなかった。回復期間終了後の ECG 検査では投薬に関連した異常は観察されなかった。

投与期間終了時の臓器重量測定では、30 mg/kg 群の雄に精巣の対体重重量比の減少が認められた。投与期間終了時の剖検において投薬に関連した所見は認められなかった。

投与期間終了時の病理組織学的検査では、10 及び 30 mg/kg 群の雄に精巣での精子細胞の滞留（軽微又は軽度）が認められた。本所見は 10 mg/kg 群では回復期間中に部分的な回復がみられたが、30 mg/kg 群では回復性が認められなかった。

以上のとおり、本試験の NOAEL は 3 mg/kg/日（60 mg/m^2/日）と判断した。NOAEL における Day 110 でのヒ素濃度としての全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24}$）は雄で 2798 ng·h/mL、雌で 2680 ng·h/mL であった。

4　遺伝毒性試験

4.1　*In vitro*

4.1.1　　細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：8253652、添付資料番号：4.2.3.3.1.1

Salmonella typhimurium 株（TA98、TA100、TA1535 及び TA1537）及び *Escherichia coli* 株 WP2*uvr*A を用いてプレート法により、ラット由来 Aroclor 1254 誘導肝ホモジネート S9 画分及び補酵素の混合液（S9mix）存在下又は非存在下で、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。用量設定試験（濃度：6.67～5000 µg/plate）の結果から、1 回目の試験のダリナパルシン濃度は、TA98、TA100、TA1535 及び TA1537 株については S9mix 存在下及び非存在下のいずれについても 6.00～250 µg/plate、WP2*uvr*A 株については、S9mix 存在下及び非存在下でそれぞれ 19.0～500 µg/plate 及び 6.00～250 µg/plate とした。WP2*uvr*A 株では S9mix 存在下で濃度依存的な復帰突然変異体数の増加が認められた。細胞毒性が認められなかった最高濃度である 150 µg/plate における復帰突然変異体数は溶媒対照の 4.6 倍であり、陽性判定基準（2 倍以上）及び背景値の範囲を超える増加を示した。その他の菌株では S9mix 存在下及び非存在下のいずれについても陽性を示す復帰突然変異体数の増加は認められなかった。

続いて確認試験を 1 回目と同条件で実施した。確認試験においても WP2*uvr*A 株は S9mix 存在下で陽性であった。さらに、TA1537 株において S9mix 存在下で濃度依存的な復帰突然変異体数の増加が認められた。細胞毒性が認められなかった最高濃度である 100 µg/plate における復帰突然変異体数は陽性判定基準（3 倍以上）を超える溶媒対照の 3.6 倍であった。

以上のとおり、本試験条件下においてダリナパルシンの細菌を用いる復帰突然変異試験の結果は陽性であった。

4.1.2　　哺乳類細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：8253335、添付資料番号：4.2.3.3.1.2

ヒト末梢血リンパ球をラット由来 S9mix 存在下又は非存在下でダリナパルシンと 3 時間処理し、*in vitro* 染色体異常試験を実施した。当初、28.5～4200 µg/mL の濃度で試験したが、非常に強い毒性が認められたことから、0.170～25.0 µg/mL の濃度で再試験を実施した。処理開始約 24 時間後に細胞を収穫し、S9mix 存在下では 12.3、17.5 及び 25.0 µg/mL、S9mix 非存在下では 6.00、8.58 及び 12.3 µg/mL の濃度について染色体異常の有無を検討した。S9mix 存在下及び非存在下のいずれについても、ダリナパルシンは染色体の構造異常を誘発した。一方、数的異常は観察されなかった。

以上のとおり、本試験条件下においてダリナパルシンの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。

4.2 *In vivo*

4.2.1 *In vivo* マウス小核試験

試験番号：8253336、添付資料番号：4.2.3.3.2.1

CD-1 系マウスにダリナパルシンを単回静脈内投与し、*in vivo* 小核試験を実施した。

用量設定試験では、100、180、250 及び 500 mg/kg のダリナパルシンを雌雄マウスに 10 mL/kg の投与容量で単回静脈内投与した（100 mg/kg 群：雌雄各 3 匹、180 mg/kg 群：雄 3 匹、250 mg/kg 群：雌雄各 3 匹、500 mg/kg 群：雌雄各 2 匹）。その結果、250 mg/kg 以上の投与で死亡が認められ、小核試験の適切な最高用量は 160 mg/kg と推定された。

小核試験では、0（溶媒：生理食塩液）、40、80 及び 160 mg/kg のダリナパルシンを雄マウス（5 匹／群）に単回静脈内投与し、投与 24 時間後及び 48 時間後（溶媒対照群及び 160 mg/kg 群のみ）に骨髄標本を作製した。陽性対照群のマウス（雄 5 匹／群）にはシクロフォスファミド（80 mg/kg）を経口投与し、投与 24 時間後に評価した。骨髄塗抹標本は、各動物あたり少なくとも 2000 個の多染性赤血球（PCE）について小核の発現頻度を評価した。さらに、各動物あたり少なくとも 500 個の赤血球について PCE 及び正染性赤血球（NCE）数を計数し、骨髄細胞毒性を評価した。

全投薬群に毒性徴候が観察された。これらは投与直後の半眼（全投薬群）、透明な口腔内分泌物（40 及び 80 mg/kg 群）及び軽度の運動失調（160 mg/kg 群）並びに投与 1 時間後の半眼（80 及び 160 mg/kg 群）であった。

ダリナパルシンは、全投薬群のいずれの時点でも小核を有する多染性赤血球（MNPCE）の発現率に有意な増加を示さなかった。また、骨髄細胞毒性（すなわち、統計学的に有意な PCE：NCE 比低下）は認められなかった。

以上のとおり、本試験条件下においてダリナパルシンの小核試験の結果は陰性であった。

5　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。

6　生殖発生毒性試験

6.1　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

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は実施しなかった。

6.2　胚・胎児発生に関する試験

6.2.1　　ウサギ胚・胎児発生用量設定試験

試験番号：Q12-64-SZ、添付資料番号：4.2.3.5.2.1

妊娠 New Zealand White ウサギ（6 匹／群）に 0（溶媒対照：生理食塩液）、2.5、10 及び 40 mg/kg/日のダリナパルシンを妊娠 6～18 日まで 2 mL/kg の投与容量で 1 日 1 回静脈内投与した。母動物は妊娠 29 日に剖検し、子宮内検査及び胎児の外表検査を実施した。また、母動物の死亡及び一般状態観察並びに体重及び摂餌量測定を実施した。

0、2.5、10 及び 40 mg/kg/日群の妊娠動物数はそれぞれ 5、4、3 及び 3 匹であった。40 mg/kg/日群の 2 匹が妊娠 10 及び 17 日に死亡した。投薬に関連した流産及び早産はなかった。10 mg/kg/日群の 1 匹が妊娠 20 日に流産したが、流産の前に臨床所見は観察されず、低頻度かつ用量依存性を認めなかったことから投薬に関連しないと考えられた。

一般状態観察では、10 mg/kg/日以上の群で用量依存的に縮瞳及び流涎が投与直後に観察され、投与初日から食欲不振、飼料の食べ残し、糞便減少並びに投与部位（耳）の浮腫及び熱感が継続的に認められた。さらに 40 mg/kg/日群では投与直後の眼漏及び啼鳴、並びに投与初日から投与部位に退色化、痂皮形成及び潰瘍形成が認められた。また、40 mg/kg/日群の 2 匹に妊娠 7 及び 13 日にそれぞれ観察された後肢の脱力は剖検時までに回復しなかった。2.5 及び 10 mg/kg/日群の各 1 匹に投与期間中の体重減少及び散発的な摂餌量低下が認められ、40 mg/kg/日群の全動物に投薬に関連した体重の減少及び増加抑制並びに摂餌量低下が認められた。

母動物の剖検では、40 mg/kg/日群の途中死亡動物 2 匹に次の所見が観察された：妊娠 17 日死亡動物における口腔内の白色粘液様分泌物、心尖部の蒼白化、脾臓の暗色化、肝臓内側左葉の白色帯状領域、膣口周辺の赤色分泌物、子宮内の全吸収胚及び投与部位の浮腫。妊娠 10 日死亡動物における肛門周囲の汚れ、直腸末端粘膜の血餅、肝臓外側左葉の黄色領域、両子宮角の着床痕並びに投与部位の浮腫、被毛湿潤及び潰瘍。40 mg/kg/日群の生存動物 1 匹では子宮のびまん性赤変領域が観察された。生存動物の子宮内検査では、40 mg/kg/日群の 1 匹に全吸収胚が認められ

た。2.5 及び 10 mg/kg/日群では母動物の剖検所見及び子宮内検査所見並びに胎児の外表検査所見、体長及び尾の長さに異常は認められなかった。

以上の結果より、ウサギ胚・胎児発生毒性試験のダリナパルシンの用量には 3、10 及び 30 mg/kg/日を選択した。

6.2.2 ウサギ胚・胎児発生試験

試験番号：Q14-S004-2RP、添付資料番号：4.2.3.5.2.2

妊娠 New Zealand White ウサギ（24 匹／群）に 0（溶媒対照：生理食塩液）、3、10 及び 30 mg/kg/日のダリナパルシンを妊娠 6～18 日まで投与容量 1 mL/kg で 1 日 1 回静脈内投与し、胚・胎児に対する影響を検討した。母動物は妊娠 29 日に剖検し、子宮内検査及び胎児検査（胎児の外表、内臓及び骨格の評価）を実施した。また、母動物の死亡及び一般状態観察並びに体重及び摂餌量測定を実施した。さらに妊娠 6 及び 18 日に各群 6 匹から採血し、TK 評価を実施した。TK 評価結果の詳細は 2.6.4.3.2.3 項に示した。

10 mg/kg/日群の 1 匹が妊娠 19 日に死亡し、30 mg/kg/日群の 5 匹がそれぞれ妊娠 13、14、17（2 匹）及び 20 日に死亡した。また、30 mg/kg/日群の 3 匹がそれぞれ妊娠 17、18 及び 23 日に流産した。これらの動物のほとんどで、投与中に縮瞳、流涙及び流涎が、投与直後に過剰興奮（啼鳴）、さらには糞便減少又は欠如、及び投与部位（耳）の異常所見が観察され、投与期間中の摂餌量低下がみられた。これらの死亡及び流産は投薬に関連すると考えられた。

生存動物では 30 mg/kg/日群において投与期間中の体重増加抑制及び摂餌量低下が観察された。一般状態観察では、10 mg/kg/日群以上で投与中の縮瞳、流涙及び流涎、投与直後の過剰興奮（啼鳴）並びに投与部位の潮紅、浮腫、変色、痂皮形成及び熱感が観察された。30 mg/kg/日群に比べ 10 mg/kg/日群でこれらの所見がみられた動物数は少なかった。さらに 30 mg/kg/日群において投与直後の嗜眠並びに糞便減少又は欠如及び投与部位の潰瘍形成が観察された。剖検では、投薬に関連した所見として 10 及び 30 mg/kg/日群のそれぞれ 1/24 匹（死亡動物 1 匹）及び 18/24 匹（生存動物 12 匹、流産動物 1 匹及び死亡動物 5 匹）に投与部位の異常（浮腫、潰瘍形成、痂皮形成、暗色化及び／又は乾燥）が観察され、そのうちの数匹では後耳介溝、首の皮膚又は耳甲介まで進展した。

子宮内検査では、30 mg/kg/日群において投薬に関連した妊娠子宮重量及び生存胎児数の減少、着床率及び胎児生存率の低下傾向並びに着床前又は着床後胚死亡率、総吸収胚数、早期吸収胚数、総吸収胚率及び早期吸収胚率の上昇傾向が認められた。胎児検査（胎児の外表、内臓及び骨格の評価）に投薬に関連した所見は認められなかった。

以上のとおり、本試験条件下では 10 mg/kg/日以上の群で母動物に死亡及び一般状態観察における異常所見が認められ、30 mg/kg/日群で流産、投与期間中の体重増加抑制及び摂餌量低下、妊娠子宮重量減少並びに平均生存胎児数の減少が観察された。胎児毒性は母動物毒性によるものと考えられた。NOAEL は母動物毒性については 3 mg/kg/日（36 mg/m^2/日）、胚・胎児発生毒性については 10 mg/kg/日（120 mg/m^2/日）と判断した。3 及び 10 mg/kg/日における妊娠 18 日の母動物

のヒ素濃度としての全身曝露量（AUC_{0-24}）は、3937 及び 9393 ng·h/mL であった。催奇形性は認められなかった。

6.3　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

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、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。

7　局所刺激性試験

マウス 5 日間反復静脈内投与試験（3.1 項）の 150 mg/kg/日以上、ラット 4 週間反復静脈内投与試験（3.3 項）の 30 mg/kg/日以上及びラット 18 週間反復静脈内投与試験（3.5 項）の 45 mg/kg/日の投与で、一般状態観察、剖検及び／又は病理組織学的検査において投与部位（尾）の浮腫、創傷、痂皮形成、潰瘍形成、炎症、壊死等の異常所見が観察された。しかし、異常の発現は散発的で試験期間を通して異常所見が認められない動物もあり、ダリナパルシンの局所刺激性は否定できないものの投与手技に起因する変化である可能性も考えられた。イヌ 18 週間反復静脈内投与試験（3.6 項）の 3 mg/kg/日以上の投与で、一般状態観察で前肢または後肢の投与部位に浮腫が認められたが、投与期間終了時の剖検及び病理組織学的検査では異常が認められず、イヌ 5 日間（3.2 項）及び 4 週間反復静脈内投与試験（3.4 項）ではいずれの投薬群（5～25 mg/kg/日）においても投与部位の異常は認められていない。ウサギ胚・胎児発生試験では用量設定試験（6.2.1 項）及び本試験（6.2.2 項）のいずれでも 10 mg/kg/日以上の投与で、一般状態観察及び剖検に類似した投与部位（耳）の異常所見が観察され、40 mg/kg/日群（用量設定試験）あるいは 30 mg/kg/日群（本試験）に比べ 10 mg/kg/日群では投与部位の異常所見がみられた動物数は少なかった。

以上、ダリナパルシンの局所刺激性は否定できないが、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。

8　その他の毒性試験

8.1　不純物の毒性評価

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。

8.1.1　不純物 A*

SD 系ラット（雌雄各 10 匹／群）に 0（溶媒対照：生理食塩液）、15 mg/kg/日のダリナパルシン及び 15 mg/kg/日の 1%不純物 A*を含有するダリナパルシンを 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 サイクル繰り返し、1%不純物 A*含有ダリナパルシンの毒性を検討した（試験番号：[redacted]473-010、添付資料番号：4.2.3.7.6.1）。死亡、一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査所見、血液学的検査値、血液凝固検査値、血液生化学的検査値及び尿検査値並びに骨髄検査所見、臓器重量、剖検所見及び病理組織学的検査所見を評価した。

試験期間中、1%不純物 A*含有ダリナパルシン 15 mg/kg/日群のラットに死亡は認められず、その他の評価項目にも毒性所見は認められなかった。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* の規格値（[redacted]%以下）の安全性は確認されていると判断した。なお、不純物 A*はダリナパルシンと同様、[redacted]を有する有機ヒ素化合物であり、*in vitro* 遺伝毒性陽性であると考えられるため、不純物 A* の遺伝毒性試験は実施しなかった。

8.1.2　不純物B* 及び 不純物C*

[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。不純物C* は、既承認の[redacted]の[redacted]として使用されており、静脈内投与の1 日最大投与量は[redacted] mg である[redacted]。ダリナパルシンの申請1 日投与量は 300 mg/m^2 であることから日本人の平均体表面積（1.609 m^2）（藏澄ら 1994）から算出した 1 日投与量は483 mg であり、このとき不純物C* 規格値[redacted]%以下）の1 日最大投与量は[redacted] mg である。以上より、規格限度値の不純物C* の 1 日投与量は、既承認の[redacted]の1 日最大投与量の[redacted] mg をはるかに下回るため、不純物C* の安全性は確認されている。一方、不純物B* の安全性を評価する試験は実施されていない。しかしながら、上述のとおり、不純物C* 及び 不純物B* の安全性は同程度と考えられることから、不純物B* 規格値[redacted]%以下、1 日最大投与量[redacted] mg）についても安全性は確認されてい

* 新薬承認情報提供時に置換

ると判断される。同様に、　不純物C*　と　不純物B*　の量の和（規格値[redacted]%未満、1 日最大投与量[redacted] mg）についても安全性は確認されていると判断した。

8.1.3　不純物D*

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（2.7.2.2.2.4 項、2.6.4.5.1.1 項及び 2.6.4.5.1.2 項）。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* の規格値（[redacted]%以下）の安全性は確認されていると判断した。

8.2　*In vitro* 3T3 NRU 光毒性試験

試験番号：[redacted]0001、添付資料番号：4.2.3.7.7.1

ダリナパルシンの光毒性を検討するため、Balb/c 3T3 細胞を用いた光毒性試験を実施した。ダリナパルシンはアール平衡塩類溶液（EBSS）に溶解して細胞に添加し、1 時間処理した。陽性対照にはクロルプロマジンを使用した。

予備試験の濃度は紫外線（UV）A 照射及び非照射のいずれについても 0.0128、0.064、0.32、1.6、8、40、200 及び 1000 µg/mL とした。予備試験では UVA 照射及び非照射の条件下における NRU の 50%阻害濃度（IC_{50}）値はそれぞれ 9.405 及び 11.13 µg/mL であり、このときの光毒性係数（PIF）は 1.415、平均光作用（MPE）は 0.137 であった。

本試験の濃度は UVA 照射及び非照射のいずれについても 1.125、2.25、4.5、9、18、36、72 及び 144 µg/mL とした。本試験では UVA 照射及び非照射の条件下における IC_{50} 値はそれぞれ 3.129 及び 6.73 µg/mL であり、このときの PIF は 2.185、MPE は 0.032 であった。

In vitro 3T3 NRU 試験の判定基準（被験物質が PIF<2 あるいは MPE<0.1 の場合は「光毒性なし」、PIF>2 及び<5 あるいは MPE>0.1 及び<0.15 の場合は「光毒性の可能性あり」、PIF>5 あるいは MPE>0.15 の場合は「光毒性あり」とする）に基づくと、本試験の結果は「光毒性なし」であった。

以上より、本試験条件下ではダリナパルシンに光毒性は示されなかった。

＊ 新薬承認情報提供時に置換

9　考察及び結論

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、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 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 NOAEL は 15 mg/kg/日（90 mg/m2/日）、イヌ 18 週間試験の NOAEL は 3 mg/kg/日（60 mg/m2/日）であった。反復静脈内投与試験における主な毒性所見として、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（製品評価技術基盤機構 2008）、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。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、回復性がみられた。病理組織学的検査ではラットにおいて精巣の精細管変性／萎縮及び伸長精子細胞の変性が、イヌでは精巣での精子細胞の滞留が観察された。精巣の病変は回復又は回復傾向を示した。イヌ 5 日間試験で観察された精巣の精細管変性／萎縮及び卵巣の卵胞変性／萎縮はイヌ 18 週間試験では観察されなかった。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。この他、イヌの ECG 検査では QTc 間隔の延長が認められた。回復期間終了後の ECG 検査では異常は観察されなかった。

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。

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。胎児毒性は母動物毒性によるものと考えられた。本試験において催奇形性は認められなかった。

複数の試験における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。

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。

＊ 新薬承認情報提供時に置換

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_{0-24}）とヒトでの臨床推奨用量における曝露量（AUC_{0-24}）に基づく曝露量比を表 2.6.6-2 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 2.6.6-2　　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_{0-24} 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: 2.2 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_{0-24} = 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_{0-24} (24005.9 ng•h/mL as arsenic) 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).

以上のとおり、ダリナパルシンの非臨床毒性プロファイルはマウス、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* 光毒性試験により明らかにされた。ヒ素化合物に共通又は関連する所見（一般症状、QTc 間隔の延長、生殖器及び造血器への影響、遺伝毒性）（製品評価技術基盤機構 2008）が認められたが、一般毒性試験で観察された所見には回復又は回復傾向が認められた。

10 図表

本文中に記載した。

参考文献

藏澄 美仁、堀越 哲美、土川 忠浩、松原 斎樹. 日本人の体表面積に関する研究. 日生気誌. 1994;31(1):5-29. (4.3.23)

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)

[redacted] (4.3.24)

2.6.7.1 ج 2

2.6.7.2 Ł ◖ ◦ ◖ ◖ Ң Ł ▫ ◒ ☻ Ł ◖ ◦ ◖ ◖ Ң Ł ▫ ◒ ☻ — ج 5

2.6.7.3 Ł ◖ ◦ ◖ ◖ Ң Ł ▫ ◒ ☻ Ł ◖ ◦ ◖ ◖ Ң Ł ▫ ◒ ☻ — ج 6

2.6.7.4 بي fi ♫ Ł 7

2.6.7.5 ج 7

2.6.7.6 ج ⌂ ض — 8

2.6.7.7 ج ⌂ 11

2.6.7.8 *In Vitro* ز 24

2.6.7.9 *In Vivo* ز 31

2.6.7.10 ⅜ ╪ 32

2.6.7.11 ⌂ ض — 32

2.6.7.12 ┘ ╕ ≠ — ⌐ Δ ╢ 32

2.6.7.13 ┴ قمم ⌐ Δ ╢ 33

2.6.7.14 ┘ — ک┘ ⌐ ف— ⌐ Δ ╢ 37

2.6.7.15 37

2.6.7.16 ⁄ —س— 38

2.6.7.1 ب

Test article: Darinaparsin

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day [a])	Testing Facility	GLP [b]	Study Number	Location in CTD
Repeated Dose Toxicity	Swiss Webster Mice	Intravenous	5 days	0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350	[redacted], US	No	SGLU-01	4.2.3.2.1
Repeated Dose Toxicity	Beagle Dogs	Intravenous	5 days	0, 4.2, 8.4, 16.8	[redacted], US	No	SGLU-02	4.2.3.2.2
Repeated Dose Toxicity	Sprague-Dawley Rats	Intravenous	4 weeks (2 cycles of 7 days of dosing followed by a 7-day non-dosing period)	0, 30, 50, 75	[redacted], China	Yes	R12-64-CD	4.2.3.2.3
Repeated Dose Toxicity	Beagle Dogs	Intravenous	4 weeks (2 cycles of 7 days of dosing followed by a 7-day non-dosing period)	0, 5, 15, 25	[redacted], China	Yes	D12-64-CD	4.2.3.2.4
Repeated Dose Toxicity	Sprague-Dawley Rats	Intravenous	18 weeks (6 cycles of 5 days of dosing followed by a 16-day non-dosing period)	0, 5, 15, 45	[redacted], China	Yes	R14-S004-RD	4.2.3.2.5

2.6.7.1 ب ⅝

Test article: Darinaparsin

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day [a])	Testing Facility	GLP [b]	Study Number	Location in CTD
Repeated Dose Toxicity	Beagle Dogs	Intravenous	18 weeks (6 cycles of 5 days of dosing followed by a 16-day non-dosing period)	0, 3, 10, 30	[redacted], China	Yes	D14-S004-RD	4.2.3.2.6
Genotoxicity (Bacterial reverse mutation test)	*S. typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, and TA1537) and *E. coli* (WP2*uvr*A)	*In Vitro*	-	TA98, TA100, TA1535, and TA1537: 6.00 ï 250 ε g/plate WP2*uvr*A: 6.00 ï 500 ε g/plate	[redacted] US	Yes	8253652	4.2.3.3.1.1
Genotoxicity (Chromosomal aberrations test)	Cultured Human Lymphocytes	*In Vitro*	-	+S9: 12.3 ï 25.0 ε g/mL -S9: 6.00 ï 12.3 ε g/mL	[redacted] US	Yes	8253335	4.2.3.3.1.2
Genotoxicity (Bone marrow micronucleus assay)	CD-1 Mice	Intravenous	Single	0, 40, 80, 160	[redacted] US	Yes	8253336	4.2.3.3.2.1

2.6.7.1 ب ⅝

Test article: Darinaparsin

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day [a])	Testing Facility	GLP [b]	Study Number	Location in CTD
Embryo-Fetal Development Toxicity - DRF	NZW Rabbits	Intravenous	From GD 6 through GD 18 (once daily)	0, 2.5, 10, 40	[redacted], China	No	Q12-64-SZ	4.2.3.5.2.1
Embryo-Fetal Development Toxicity	NZW Rabbits	Intravenous	From GD 6 through GD 18 (once daily)	0, 3, 10, 30	[redacted], China	Yes	Q14-S004-2RP	4.2.3.5.2.2
Repeated Dose Toxicity of Impurity A*	Sprague-Dawley Rats	Intravenous	15 weeks (5 cycles of 5 days of dosing followed by a 16-day non-dosing period)	0, 15[c]	[redacted], Japan	Yes	[redacted]473-010	4.2.3.7.6.1
Phototoxicity	Balb/c 3T3 Fibroblasts	*In Vitro*	-	± UVA light: Preliminary test: 0.0128 – 1000 µg/mL Main test: 1.125 – 144 µg/mL	[redacted], UK	Yes	[redacted]0001	4.2.3.7.7.1

DRF = Dose-range finding; NZW = New Zealand White; GD = Gestation day; [redacted]; UK = United Kingdom; US = United States; UV = Ultraviolet

a: Unless otherwise specified. For Repeated Dose Toxicity, the Highest No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) is underlined.
b: An entry of "Yes" indicates that the study report includes a GLP compliance statement.
c: Darinaparsin and darinaparsin containing 1% Impurity A* were used as test articles.

＊ 新薬承認情報提供時に置換

2.6.7.2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表

Test article: Darinaparsin

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Doses (mg/kg/day)	GLP [a]	Study Number	Location in CTD
18-week repeated dose toxicity	Sprague-Dawley Rats	Intravenous	5, 15, 45	Yes	R14-S004-RD	4.2.3.2.5
18-week repeated dose toxicity	Beagle Dogs	Intravenous	3, 10, 30	Yes	D14-S004-RD	4.2.3.2.6
Embryo-fetal development toxicity	NZW Rabbits	Intravenous	3, 10, 30	Yes	Q14-S004-2RP	4.2.3.5.2.2

NZW = New Zealand White
a: An entry of "Yes" indicates that the study report includes a GLP compliance statement.

2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧

Test article: Darinaparsin

	Steady State Arsenic[a] AUC_{0-24} (ng•h/mL) (Day of Blood Collection)					
Species	**Rat**		**Dog**		**Rabbit**	**Human**
Method of Administration	**Intravenous**		**Intravenous**		**Intravenous**	**Intravenous**
Gender	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Female**	**Male/Female**
Dose (mg/kg/day)						
3	-	-	2798 (D 110)	2680 (D 110)	3937 (GD 18)	-
5	46658 (D 110)	21760 (D 110)	-	-	-	-
8.1 [b]	-	-	-	-	-	24005.9 (D 5)
10	-	-	9036 (D 110)	9630 (D 110)	9393 (GD 18)	-
15	52144 (D 110)	34160 (D 110)	-	-	-	-
30	-	-	29309 (D 110)	27151 (D 110)	37714 (GD 18)	-
45	50267 (D 110)	54179 (D 110)	-	-	-	-

- = No data available; AUC_{0-24} = Area under the concentration-time curve from time 0 to 24 hrs; D = Day; GD = Gestation day

a: For rat, dog and rabbit, reported AUC_{0-24} of darinaparsin was converted to that of arsenic using the molecular weight (darinaparsin: 411.31, As: 74.92). As conc. = darinaparsin conc. × (74.92 / 411.31).

b: Based on the clinical dose of 300 mg/m^2/day in the clinical study (Study No. SP-02L02).

2.6.7.4 毒性試験：使用ロット

Test article: Darinaparsin

Drug Product Batch No.	Purity (%)	Specified Impurities (%)				Study Number	Type of Study
		Impurity A*	Impurity C*	Impurity B*	Impurity D*		
Proposed Specification	NA	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	NA	NA
ZIO00002	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	NA	R12-64-CD	Rat 4-week intravenous administration study
						D12-64-CD	Dog 4-week intravenous administration study
						8253652	Bacterial reverse mutation assay
						8253335	Chromosomal aberration study
						8253336	*In vivo* mouse bone marrow micronucleus assay
ZIO20001	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	NA	R14-S004-RD	Rat 18-week intravenous administration study
						D14-S004-RD	Dog 18-week intravenous administration study
						Q14-S004-2RP	Rabbit embryo-fetal development study
						[redacted]0001	*In vitro* 3T3 neutral red uptake phototoxicity test
18F28	NA	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]473-010	Rat 15-week intravenous administration study of Impurity A*

NA = Not applicable

2.6.7.5 単回投与毒性試験

該当資料なし

＊ 新薬承認情報提供時に置換

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

Test article: Darinaparsin

Species and Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)	Gender and No. per Group	NOAEL (mg/kg/day)	Noteworthy Findings	Study Number/ Location in CTD
Swiss Webster Mice	Intravenous (Saline)	5 days	0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350	5M, 5F	100	≥ 150 mg/kg/day: An apparent trend for decreased weight gain for males during the dosing period, Injection site reactions (swelling and/or necrosis of the tail), seminiferous tubules degeneration in testes, acute necrosis with vasculitis, thrombosis and hemorrhage in tail (M and/or F), ulcerative dermatitis in tail (M and/or F) ≥ 200 mg/kg/day: Hepatocellular hypertrophy (F only) ≥ 250 mg/kg/day: Mortality (F only), hepatocellular hypertrophy ≥ 300 mg/kg/day: Mortality, vasculitis in lungs (F only), 350 mg/kg/day: Fibrin thrombi, increased apoptosis of thymus lymphocytes STD_{10} = 250 mg/kg/day	SGLU-01/ 4.2.3.2.1
Beagle Dogs	Intravenous (Saline)	5 days	0, 4.2, 8.4, 16.8	2M, 2F (One male and one female dogs from each group were sacrificed on Day 7 and Day 28 or 29)	M: 4.2 F: 8.4	≥ 8.4 mg/kg/day: Seminiferous tubule degeneration/atrophy in testes 16.8 mg/kg/day: Follicular atrophy/degeneration in ovary Findings observed in reproductive organs were irreversible during the recovery period.	SGLU-02/ 4.2.3.2.2

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

Test article: Darinaparsin

Species and Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)	Gender and No. per Group	NOAEL (mg/kg/day)	Noteworthy Findings	Study Number/ Location in CTD
Sprague-Dawley Rats	Intravenous (Saline)	4 weeks (2 cycles of 7 days of dosing followed by a 7-day non-dosing period)	30, 50, 75	3M, 3F	< 30	Mortality (M: 75 mg/kg/day, F: ≥ 50 mg/kg/day) Salivation (≥ 30 mg/kg/day), Wound or scab at the injection site (30 and/or 50 mg/kg/day), Tachypnea/abnormal respiration; flush; ankle or snout edema; spontaneous activity decrease; emaciation; rough hairs (≥ 50 mg/kg/day), Soft stool; nasal discharge; dirty anal area; prostration; lethargy; tail edema (75 mg/kg/day) Decreases in body weight gain (M: ≥ 30 mg/kg/day, F: 50 mg/kg/day) Decrease in body weight (F: 50 mg/kg/day) Decrease in food consumption (M: ≥ 30 mg/kg/day, F: ≥ 50 mg/kg/day) Macroscopic Observations: Surviving animals - Reduction in spleen size (1M at 30 mg/kg/day, only) Dead animals - Dark red adrenal glands, a reduction of thymus and spleen size, pale pancreas, black liver edge, light yellow jelly substance in gastrointestinal, thinning wall of small intestine or stomach, a yellow area in liver, expansive stomach HNSTD = 50 (M) and 30 (F) mg/kg/day	R12-64-CD/ 4.2.3.2.3

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

Test article: Darinaparsin

Species and Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg/day)**	**Gender and No. per Group**	**NOAEL (mg/kg/day)**	**Noteworthy Findings**	**Study Number/ Location in CTD**
Beagle Dogs	Intravenous (Saline)	4 weeks (2 cycles of 7 days of dosing followed by a 7-day non-dosing period)	5, 15, 25	1M, 1F	5	No mortality Hyperexcitability or dysphoria; jump and tumble; unusual locomotion; lachrymation; flush; nausea; emesis; conjunctival congestion; salivation; fasciculation; spitting froth; prostration and/or pruritus (≥ 15 mg/kg/day, recovered within 1 hour after dosing), watery stool (1F at 25 mg/kg/day)	D12-64-CD/ 4.2.3.2.4

F = Female; HNSTD = Highest non-severely toxic dose; M = Male; NOAEL = No observed adverse effect Level; STD_{10} = Severely toxic dose in 10% of the animals

2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験

2.6.7.7A ラット 18 週間反復静脈内投与試験

Test article: Darinaparsin

Report Title: **AN 18-WEEK INTRAVENOUS TOXICITY STUDY OF DARINAPARSIN WITH A 4-WEEK RECOVERY PERIOD IN SPRAGUE-DAWLEY RATS**

Species/Strain: Rats/Sprague-Dawley

Duration of Dosing: Daily dosing for consecutive 5 days, followed by a 16-days pause, repeated for 6 dosing cycle.

Study No. R14-S004-RD

Initial Age: 6-8 weeks (M), 7-9 weeks (F)

Duration of Postdose: 4 weeks

Location in CTD: 4.2.3.2.5

Date of First Dose: [redacted], 20[redacted]

Method of Administration: Intravenous

GLP Compliance: Yes

Vehicle/Formulation: Saline

Special Features: None

No Observed Adverse Effect Level: 15 mg/kg/day

Daily Dose (mg/kg)		**0 (Control)**		**5**		**15**		**45**	
Gender: Number of Animals [a]		**M: 10+5 (4)**	**F: 10+5 (4)**	**M: 10+5 (12)**	**F: 10+5 (12)**	**M: 10+5 (12)**	**F: 10+5 (12)**	**M: 10+5 (12)**	**F: 10+5 (12)**
Toxicokinetics [b]: (n=4/time point)									
C_{max} (ng/mL)	**Day 1**	NA	NA	160	175	572	667	3024	2314
	Day 110	NA	NA	3392	1850	3557	3707	11093	14422
AUC_{0-24} (ng·h/mL)	**Day 1**	NA	NA	1369	1284	3300	3037	10122	7559
	Day 110	NA	NA	46658	21760	52144	34160	50267	54179

2.6.7.7A　　ラット 18 週間反復静脈内投与試験（続き）

Test article: Darinaparsin

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**5**		**15**		**45**	
Gender: Number of Animals [a]	**M: 10+5 (4)**	**F: 10+5 (4)**	**M: 10+5 (12)**	**F: 10+5 (12)**	**M: 10+5 (12)**	**F: 10+5 (12)**	**M: 10+5 (12)**	**F: 10+5 (12)**
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund [c]	0	0	1	0	0	0	0	3
Body Weight (mean ± SE, g or %) [d]								
Day 112 [e]	548 ± 11	-	-3.3	-	-2.7	-	-10.0*	-
Body Weight Gain (mean ± SE, g)								
Week 16 [f]	−1 ± 1	1 ± 2	−7 ± 1*	-3 ± 4	−8 ± 3*	-2 ± 2	−11 ± 3*	-10 ± 5
Food Consumption (mean ± SE, g/rat/day or %) [d]								
Week 16 [f]	23.10 ± 0.40	16.63 ± 0.57	-3.9	-6.0	-3.3	-9.4	-15.7	-30.4*
Clinical Observations								
Lethargy	-	0/15	-	0/15	-	0/15	-	1/15
Hyperexcitation	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	15/15	15/15
Circling	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	15/15	15/15

2.6.7.7A　　ラット 18 週間反復静脈内投与試験（続き）

Test article: Darinaparsin

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**5**		**15**		**45**	
Gender: Number of Animals [a]	**M: 10+5 (4)**	**F: 10+5 (4)**	**M: 10+5 (12)**	**F: 10+5 (12)**	**M: 10+5 (12)**	**F: 10+5 (12)**	**M: 10+5 (12)**	**F: 10+5 (12)**
Clinical Observations (continued)								
Hunched back	-	0/15	-	0/15	-	0/15	-	2/15
Lacrimation	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	14/15	14/15
Discharge (eye)	-	0/15	-	0/15	-	0/15	-	2/15
Nasal discharge	-	0/15	-	0/15	-	0/15	-	2/15
Salivation	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	15/15	15/15
Soft stool	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	6/15	9/15
Loose stools	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	3/15	12/15
Hair Sparse	-	0/15	-	0/15	-	0/15	-	3/15
Edema (tail)	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	9/15	5/15
Discoloration (tail)	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	1/15	2/15
Pale	-	0/15	-	0/15	-	0/15	-	1/15
Flush	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	15/15	15/15
Ulceration (tail)	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	1/15	3/15
Scab (tail)	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	3/15	3/15

2.6.7.7A ラット 18 週間反復静脈内投与試験（続き）

Test article: Darinaparsin

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**5**		**15**		**45**	
Gender: Number of Animals [a]	**M: 10+5 (4)**	**F: 10+5 (4)**	**M: 10+5 (12)**	**F: 10+5 (12)**	**M: 10+5 (12)**	**F: 10+5 (12)**	**M: 10+5 (12)**	**F: 10+5 (12)**
Clinical Observations (continued)								
Dirty anal area	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	2/15	13/15
Hair fluffiness	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	15/15	15/15
Desquamation	0/15	-	0/15	-	0/15	-	1/15	-
Break (tail)	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	1/15	2/15
Ophthalmoscopic Examinations	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology Day 127								
Reticulocyte Count (mean ± SE, $\times 10^{12}$/L)	0.183 ± 0.012	0.176 ± 0.010	0.190 ± 0.007	0.185 ± 0.011	0.199 ± 0.009	0.195 ± 0.012	0.258 ± 0.015*	0.293 ± 0.028*
Coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Bone Marrow Smear Day 127								
Granulocyte Series (mean ± SE, %)	43.00 ± 2.00	-	51.05 ± 2.47*	-	49.50 ± 1.57	-	50.80 ± 2.62*	-
Lymphocyte Series (mean ± SE, %)	30.15 ± 1.73	-	21.45 ± 1.78*	-	23.80 ± 1.43*	-	16.80 ± 2.16*	-

2.6.7.7A　　ラット 18 週間反復静脈内投与試験（続き）

Test article: Darinaparsin

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**5**		**15**		**45**	
Gender: Number of Animals [a]	**M: 10+5 (4)**	**F: 10+5 (4)**	**M: 10+5 (12)**	**F: 10+5 (12)**	**M: 10+5 (12)**	**F: 10+5 (12)**	**M: 10+5 (12)**	**F: 10+5 (12)**
Organ Weights Day 127								
Absolute Organ Weights (mean ± SE, g)								
Epididymides	1.395 ± 0.038	NA	1.325 ± 0.047	NA	1.345 ± 0.038	NA	1.146 ± 0.058*	NA
Testis	3.609 ± 0.162	NA	3.331 ± 0.132	NA	3.482 ± 0.103	NA	3.015 ± 0.137*	NA
Organ-to-Brain Weight Ratio (mean ± SE, %)								
Epididymides	0.641 ± 0.011	NA	0.611 ± 0.025	NA	0.613 ± 0.015	NA	0.536 ± 0.026*	NA
Testis	1.661 ± 0.075	NA	1.538 ± 0.070	NA	1.586 ± 0.039	NA	1.409 ± 0.059*	NA
Necropsy Day 127								-
Amputation (tail)	-	0/10	-	0/10	-	0/10	-	1/8
Discoloration (tail)	-	0/10	-	0/10	-	0/10	-	1/8
Microscopic Examination Day 127								
Epididymides No. examined	10	NA	10	NA	10	NA	10	NA
Cell Debris, Intraluminal Total	0	NA	1	NA	1	NA	10	NA
Minimal	0	NA	0	NA	1	NA	5	NA
Slight	0	NA	0	NA	0	NA	5	NA
Moderate	0	NA	1	NA	0	NA	0	NA

2.6.7.7A ラット 18 週間反復静脈内投与試験（続き）

Test article: Darinaparsin

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**5**		**15**		**45**	
Gender: Number of Animals [a]	**M: 10+5 (4)**	**F: 10+5 (4)**	**M: 10+5 (12)**	**F: 10+5 (12)**	**M: 10+5 (12)**	**F: 10+5 (12)**	**M: 10+5 (12)**	**F: 10+5 (12)**
Microscopic Examination Day 127 (continued)								
Sperm, Reduced, Luminal Total	0	NA	1	NA	0	NA	2	NA
Minimal	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Moderate	0	NA	1	NA	0	NA	1	NA
Testes No. examined	10	NA	10	NA	10	NA	10	NA
Degeneration/Atrophy, Tubular Total	0	NA	2	NA	0	NA	2	NA
Minimal	0	NA	1	NA	0	NA	1	NA
Moderate	0	NA	1	NA	0	NA	0	NA
Marked	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Degeneration, Elongate Spermatids Total	0	NA	0	NA	0	NA	7	NA
Minimal	0	NA	0	NA	0	NA	6	NA
Slight	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA

2.6.7.7A　　ラット 18 週間反復静脈内投与試験（続き）

Test article: Darinaparsin

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**5**		**15**		**45**	
Gender: Number of Animals [a]	**M: 10+5 (4)**	**F: 10+5 (4)**	**M: 10+5 (12)**	**F: 10+5 (12)**	**M: 10+5 (12)**	**F: 10+5 (12)**	**M: 10+5 (12)**	**F: 10+5 (12)**
Microscopic Examination Day 127 (continued)								
Venous, Injection Site No. examined	10	10	10	10	10	10	10	8
Inflammation Total	-	0	-	0	-	0	-	1
Moderate	-	0	-	0	-	0	-	1
Necrosis Total	-	0	-	0	-	0	-	1
Slight	-	0	-	0	-	0	-	1
Microscopic Examination Day 155								
Epididymides No. examined	5	NA	4	NA	5	NA	5	NA
Cell Debris, Intraluminal Total	0	NA	0	NA	0	NA	2	NA
Minimal	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Moderate	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Sperm, Reduced, Luminal Total	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Marked	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA

2.6.7.7A　　ラット 18 週間反復静脈内投与試験（続き）

Test article: Darinaparsin

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**5**		**15**		**45**	
Gender: Number of Animals [a]	**M: 10+5 (4)**	**F: 10+5 (4)**	**M: 10+5 (12)**	**F: 10+5 (12)**	**M: 10+5 (12)**	**F: 10+5 (12)**	**M: 10+5 (12)**	**F: 10+5 (12)**
Microscopic Examination Day 155 (continued)								
Testes No. examined	5	NA	4	NA	5	NA	5	NA
Degeneration/Atrophy, Tubular Total	0	NA	2	NA	0	NA	2	NA
Minimal	0	NA	2	NA	0	NA	1	NA
Moderate	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA

a: The first 10 animals/sex/group were designated for the necropsy at the end of dosing (16 days after administration of the last dosing). The last 5 animals/sex/group were designated for necropsy after the recovery period (4-week after the end of dosing necropsy). Toxicokinetic evaluation was conducted on satellite animals designated in parentheses.

b: Parameters are for arsenic. Reported values of darinaparsin was converted to that of arsenic using the molecular weight (darinaparsin: 411.31, As: 74.92). As conc. = darinaparsin conc. × (74.92 / 411.31).

c: In animals for the toxicity evaluation, one male in 5 mg/kg/day dose group and two females in 45 mg/kg/day dose group were found dead on Day 143, Day 49, and Day 92, respectively. In animals for toxicokinetics evaluation, one female in 45 mg/kg/day was found dead on Day 71.

d: For controls, group mean ± SE is shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

e: At the 2 days after the end of dosing of the 6th dosing cycle

f: From one day before dosing to 2 days after the end of dosing of the 6th dosing cycle

-: No noteworthy finding; AUC_{0-24} = Area under the concentration-time curve from time 0 to 24 hrs; C_{max} = Maximum concentration in plasma; F = Female; M = Male; NA = Not applicable; SE = Standard Error

*: $p \leq 0.05$ (Dunnett's or Mann-Whitney U test, vs concurrent vehicle control group)

2.6.7.7B　　イヌ 18 週間反復静脈内投与試験

Test article: Darinaparsin

Report Title: **AN 18-WEEK INTRAVENOUS TOXICITY STUDY OF DARINAPARSIN WITH A 4-WEEK RECOVERY PERIOD IN BEAGLE DOGS**

Species/Strain: Beagle dog

Duration of Dosing: Daily dosing for consecutive 5 days, followed by a 16-days pause, repeated for 6 dosing cycle.

Study No. D14-S004-RD

Initial Age: 5 - 7 months

Duration of Postdose: 4 weeks

Location in CTD: 4.2.3.2.6

Date of First Dose: [redacted], 20[redacted]

Method of Administration: Intravenous

GLP Compliance: Yes

Vehicle/Formulation: Saline

Special Features: None

No observed adverse effect Level: 3 mg/kg/day

Daily Dose (mg/kg)		**0 (Control)**		**3**		**10**		**30**	
Gender: Number of Animals [a]		**M: 4+2**	**F: 4+2**	**M: 4+2**	**F: 4+2**	**M: 4+2**	**F: 4+2**	**M: 4+2**	**F: 4+2**
Toxicokinetics [b]: (n=6)									
C_{max} (ng/mL)	**Day 1**	NA	NA	468	472	1420	1495	3783	4605
	Day 110	NA	NA	488	529	1627	1721	5480	5316
AUC_{0-24} (ng·h/mL)	**Day 1**	NA	NA	2147	1792	6940	7775	19831	20283
	Day 110	NA	NA	2798	2680	9036	9630	29309	27151
Noteworthy Findings									
Died or Sacrificed Moribund		0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight		-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight Gain		-	-	-	-	-	-	-	-

2.6.7.7B　　イヌ 18 週間反復静脈内投与試験（続き）

Test article: Darinaparsin

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**3**		**10**		**30**	
Gender: Number of Animals [a]	**M: 4+2**	**F: 4+2**	**M: 4+2**	**F: 4+2**	**M: 4+2**	**F: 4+2**	**M: 4+2**	**F: 4+2**
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations								
Number of Evaluated Animals	6	6	6	6	6	6	6	6
Lethargy	0	0	0	0	1	1	1	2
Hyperexcitable	0	0	2	2	4	4	6	6
Unusual locomotion	0	0	2	2	4	5	6	6
Prostration	0	0	0	0	1	1	2	2
Quivering/shivering	0	0	0	0	0	0	4	2
Fasciculation	-	0	-	0	-	0	-	1
Lacrimation	0	0	0	0	5	6	6	6
Discharge (Eye)	0	0	0	0	1	1	0	1
Eyelid swelling and redness	0	0	1	0	3	3	6	6
Abnormal Conjunctiva (Conjunctival congestion)	0	1	1	2	2	4	6	6
Nasal discharge	0	-	0	-	0	-	2	-
Salivation	0	0	3	3	6	6	6	6
Spitting froth	0	0	0	0	0	0	6	6

2.6.7.7B　　イヌ 18 週間反復静脈内投与試験（続き）

Test article: Darinaparsin

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**3**		**10**		**30**	
Gender: Number of Animals [a]	**M: 4+2**	**F: 4+2**	**M: 4+2**	**F: 4+2**	**M: 4+2**	**F: 4+2**	**M: 4+2**	**F: 4+2**
Clinical Observations (continued)								
Soft stool	0	0	1	0	0	0	4	3
Loose stools	0	0	0	0	1	0	1	1
Bloody stool	0	-	0	-	0	-	1	-
Emesis	0	0	0	0	1	2	5	5
Edema (Injection sites)	0	0	3	3	4	5	5	6
Flush (Around the mouth, both ears, front sole of limbs, foot pad of limbs, skin of whole body)	0	1	4	4	6	6	6	6
Pruritus	0	0	0	1	0	1	6	6
Body Temperature	-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiogram								
Heart Rate (mean ± SE, Beats/min)								
Pre-dose	89.0 ± 1.7	85.8 ± 7.5	96.2 ± 5.2	100.0 ± 3.6	100.2 ± 5.3	94.7 ± 6.7	99.3 ± 7.0	97.5 ± 6.8
Day 22	108.5 ± 7.5	108.3 ± 8.1	128.8 ± 6.4	130.2 ± 5.3	133.5 ± 7.7	122.8 ± 6.6	122.8 ± 9.7	146.2 ± 5.3*
Day 64	94.2 ± 8.6	105.8 ± 8.9	102.8 ± 8.9	106.3 ± 4.1	103.2 ± 7.5	110.5 ± 5.5	117.3 ± 8.0	136.8 ± 9.6*
Day 85	82.7 ± 6.6	96.7 ± 7.5	103.5 ± 4.6	116.5 ± 5.9	110.0 ± 7.5*	115.8 ± 8.8	116.0 ± 8.3*	117.2 ± 11.0
Day 106	107.8 ± 4.3	95.7 ± 5.3	117.2 ± 4.8	132.0 ± 6.4*	107.7 ± 2.1	113.0 ± 10.4	107.2 ± 13.3	120.5 ± 9.8

2.6.7.7B　　イヌ 18 週間反復静脈内投与試験（続き）

Test article: Darinaparsin

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**3**		**10**		**30**	
Gender: Number of Animals [a]	**M: 4+2**	**F: 4+2**	**M: 4+2**	**F: 4+2**	**M: 4+2**	**F: 4+2**	**M: 4+2**	**F: 4+2**
Electrocardiogram (continued)								
QTc (mean ± SE, s)								
Pre-dose	-	0.232 ± 0.005	-	0.235 ± 0.009	-	0.238 ± 0.004	-	0.243 ± 0.004
Day 43	-	0.243 ± 0.002	-	0.247 ± 0.002	-	0.248 ± 0.004	-	0.263 ± 0.006*
Day 85	-	0.227 ± 0.006	-	0.238 ± 0.005	-	0.247 ± 0.003*	-	0.245 ± 0.003*
Day 106	-	0.230 ± 0.004	-	0.237 ± 0.004	-	0.242 ± 0.005	-	0.250 ± 0.003*
Ophthalmoscopic Examinations	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Bone Marrow Smear	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights Day 127								
Organ-to-Body Weight Ratio (mean ± SE, %)								
Testes	0.156 ± 0.010	NA	0.129 ± 0.003	NA	0.156 ± 0.012	NA	0.122 ± 0.006*	NA

2.6.7.7B　　イヌ 18 週間反復静脈内投与試験（続き）

Test article: Darinaparsin

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**3**		**10**		**30**	
Gender: Number of Animals [a]	**M: 4+2**	**F: 4+2**	**M: 4+2**	**F: 4+2**	**M: 4+2**	**F: 4+2**	**M: 4+2**	**F: 4+2**
Necropsy	-	-	-	-	-	-	-	-
Microscopic Examination								
Day 127								
Testes No. examined	4	NA	4	NA	4	NA	4	NA
Retention, Spermatid, Prominent Total	1	NA	0	NA	2	NA	2	NA
Minimal	1	NA	0	NA	1	NA	1	NA
Slight	0	NA	0	NA	1	NA	1	NA
Day 155								
Testes No. examined	2	NA	2	NA	2	NA	2	NA
Retention, Spermatid, Prominent Total	0	NA	0	NA	1	NA	2	NA
Minimal	0	NA	0	NA	1	NA	1	NA
Slight	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA

a: The first 4 animals/sex/group were designated for the necropsy at the end of dosing (16 days after administration of the last dosing). The last 2 animals/sex/group were designated for necropsy after the recovery period (4-week after the end of dosing necropsy).

b: Parameters are for arsenic. Reported values of darinaparsin was converted to that of arsenic using the molecular weight (darinaparsin: 411.31, As: 74.92). As conc. = darinaparsin conc. × (74.92 / 411.31).

-: No noteworthy finding; $AUC_{0\text{-}24}$ = Area under the concentration-time curve from time 0 to 24 hrs; C_{max} = Maximum concentration in plasma; F = Female; M = Male; NA = Not applicable.

*: $p \leq 0.05$ (Dunnett's or Mann-Whitney U test, vs concurrent vehicle control group)

2.6.7.8 *In Vitro* 遺伝毒性試験

2.6.7.8A 細菌を用いる復帰突然変異試験

Test article: Darinaparsin

Report Title: Bacterial Reverse Mutation Assay with a Confirmatory Assay

Study No. 8253652

Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells

No. of Independent Assays: 2

Location in CTD: 4.2.3.3.1.1

Strains: *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*

No. of Replicate Cultures: 3

GLP Compliance: Yes

Metabolizing System: Aroclor 1254-induced rat liver S9

No. of Cells Analyzed/Cultured: Not applicable

Vehicle: Test Article: Saline, Positive Control: DMSO except for sodium azide, which was dissolved in water

Date of Treatment:
<Initial assay> [redacted], 20[redacted]
<Confirmatory assay> [redacted], 20[redacted]

Treatment: Plate incorporation

Cytotoxic Effects:

<Initial assay> Cytotoxicity was observed at 250 µg/plate at tester strains: TA98, TA100, TA1535 and TA1537 in the presence and absence of S9; at 300 µg/plate with WP2*uvr*A in the presence of S9; and 100 µg/plate with WP2*uvr*A in the absence of S9
<Confirmatory assay> Cytotoxicity was observed at 250 µg/plate in the presence of S9 and at 100 µg/plate in the absence of S9 with TA98, TA100, TA1535 and TA1537; at 300 µg/plate in the presence of S9 and 100 µg/plate in the absence of S9 with WP2*uvr*A.

Genotoxic Effects:

<Initial assay> A dose related positive increase of revertants was found in WP2*uvr*A in the presence of S9. A positive increase was not observed with the other tester strains in the presence or absence of S9.
<Confirmatory assay> A dose related positive increase of revertants was found both in TA1537 and WP2*uvr*A test strains in the presence of S9. A positive increase was not observed with the other tester strains in the presence or absence of S9.
Therefore, darinaparsin was positive in the bacterial reverse mutation assay under this condition.

2.6.7.8A　　細菌を用いる復帰突然変異試験（続き）

Test article: Darinaparsin

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/plate)	Revertant Colony Counts (Mean ± SD)				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2*uvr*A
Initial Mutagenicity Assay							
With Activation	**Darinaparsin**	250	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	NC
		100	38.0 ± 7.0	170.0 ± 16.5	13.7 ± 5.5	10.0 ± 5.6	
		50	32.3 ± 8.1	103.7 ± 8.5	9.0 ± 1.0	9.0 ± 1.0	
		25	25.7 ± 7.0	98.0 ± 23.4	6.3 ± 1.2	12.0 ± 2.6	
		13	23.3 ± 8.1	87.7 ± 16.5	16.7 ± 4.2	6.7 ± 2.1	
		6	28.7 ± 4.6	90.3 ± 16.6	9.7 ± 0.6	7.7 ± 3.5	
	BP	2.5	157.7 ± 31.7	NC	NC	NC	
	2AA	2.5	NC	1185.3 ± 103.7	161.7 ± 31.3	105.7 ± 9.3	
	Darinaparsin	500	NC				0.0 ± 0.0
		300					0.3 ± 0.6
		150					39.7 ± 8.3
		75.0					24.0 ± 1.0
		38.0					21.0 ± 6.2
		19.0					14.3 ± 1.5
	2AA	25.0					317.0 ± 24.8
	Vehicle	-	27.3 ± 3.2	89.0 ± 14.9	11.3 ± 2.1	10.7 ± 2.9	8.7 ± 1.2

2.6.7.8A　　細菌を用いる復帰突然変異試験（続き）

Test article: Darinaparsin

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/plate)	Revertant Colony Counts (Mean ± SD)				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2*uvr*A
Initial Mutagenicity Assay							
Without Activation	**Darinaparsin**	250	3.0 ± 3.6	2.0 ± 2.0	2.0 ± 2.0	0.0 ± 0.0	1.7 ± 1.2
		100	21.0 ± 3.6	74.3 ± 16.8	11.3 ± 2.3	5.3 ± 3.1	14.0 ± 0.0
		50	22.0 ± 3.0	90.7 ± 13.6	10.7 ± 2.3	7.0 ± 2.6	23.7 ± 9.6
		25	17.0 ± 5.3	75.7 ± 6.4	8.0 ± 0.0	5.0 ± 4.4	20.7 ± 3.8
		13	18.0 ± 4.0	75.0 ± 8.7	12.3 ± 1.2	5.0 ± 1.0	17.0 ± 5.3
		6	18.3 ± 3.2	86.0 ± 6.2	11.0 ± 2.6	5.0 ± 1.0	19.0 ± 3.6
	Vehicle	-	18.0 ± 2.0	68.7 ± 7.1	7.7 ± 2.9	6.7 ± 0.6	20.3 ± 5.5
	2NF	1.0	227.7 ± 56.2	NC	NC	NC	NC
	SA	2.0	NC	1031.0 ± 41.1	891.0 ± 33.0	NC	NC
	ICR	2.0	NC	NC	NC	383.7 ± 37.8	NC
	4NQO	1.0	NC	NC	NC	NC	350.7 ± 36.8

2.6.7.8A　　細菌を用いる復帰突然変異試験（続き）

Test article: Darinaparsin

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/plate)	Revertant Colony Counts (Mean ± SD)				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2*uvr*A
Confirmatory Mutagenicity Assay							
With Activation	**Darinaparsin**	250	7.0 ± 6.6	1.3 ± 1.2	0.3 ± 0.6	1.0 ± 1.0	NC
		100	31.0 ± 3.0	149.0 ± 8.5	20.3 ± 1.2	12.0 ± 5.6	
		50	23.7 ± 6.4	139.0 ± 21.5	12.0 ± 1.7	8.3 ± 0.6	
		25	17.7 ± 2.1	133.0 ± 3.6	9.7 ± 2.5	6.3 ± 3.5	
		13	23.3 ± 3.5	105.3 ± 5.5	11.3 ± 2.9	4.7 ± 1.2	
		6	16.7 ± 0.6	107.7 ± 3.5	10.0 ± 2.0	1.7 ± 2.9	
		500	NC				0.0 ± 0.0
		300					1.7 ± 1.5
		150					20.0 ± 3.6
		75					18.7 ± 9.5
		38					17.7 ± 6.7
		19					7.3 ± 7.6
	Vehicle	-	18.7 ± 3.8	106.7 ± 7.4	12.0 ± 2.0	3.3 ± 4.9	8.7 ± 5.1
	BP	2.5	484.0 ± 4.4	NC	NC	NC	NC
	2AA	2.5	NC	661.0 ± 34.4	80.0 ± 2.6	98.3 ± 11.0	NC
	2AA	25.0	NC	NC	NC	NC	308.0 ± 266.9

2.6.7.8A 細菌を用いる復帰突然変異試験（続き）

Test article: Darinaparsin

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/plate)	Revertant Colony Counts (Mean ± SD)				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2*uvr*A
Confirmatory Mutagenicity Assay							
Without Activation	**Darinaparsin**	250	1.0 ± 1.0	0.0 ± 0.0	0.7 ± 0.6	0.7 ± 1.2	1.0 ± 1.7
		100	9.3 ± 2.3	48.7 ± 6.7	16.3 ± 8.1	3.3 ± 2.3	15.7 ± 11.7
		50	18.3 ± 5.0	92.7 ± 16.9	13.3 ± 3.2	6.7 ± 2.3	14.7 ± 3.8
		25	13.0 ± 0.0	93.3 ± 11.4	9.7 ± 2.1	5.3 ± 1.5	14.0 ± 9.8
		13	12.3 ± 5.5	93.3 ± 10.3	9.0 ± 0.0	5.0 ± 2.0	10.3 ± 10.0
		6	14.3 ± 6.4	89.7 ± 8.5	12.3 ± 6.0	5.0 ± 2.6	9.7 ± 6.8
	Vehicle	-	11.3 ± 3.1	100.3 ± 10.7	6.7 ± 3.2	4.7 ± 3.1	12.3 ± 4.7
	2NF	1.0	354.7 ± 76.0	NC	NC	NC	NC
	SA	2.0	NC	1228.0 ± 11.4	774.0 ± 17.5	NC	NC
	ICR	2.0	NC	NC	NC	491.7 ± 21.5	NC
	4NQO	1.0	NC	NC	NC	NC	157.3 ± 136.3

- = Not applicable; 2AA = 2-aminoanthracene; 2NF = 2-nitrofluorene; 4NQO = 4-nitroquinoline-N-oxide; BP = Benzo{a}pyrene; DMSO = Dimethyl sulfoxide; ICR = ICR-191; NC = Not conducted; SA = Sodium azide

2.6.7.8B 哺乳類細胞を用いる染色体異常試験

Test article: Darinaparsin

Report Title: Chromosomal Aberrations in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes **Study No. 8253335**

Test for Induction of: Chromosome aberrations **No. of Independent Assays: 1** **Location in CTD: 4.2.3.3.1.2**

Cells: Cultured human lymphocytes **No. of Replicate Cultures: 2** **GLP Compliance: Yes**

Metabolizing System: Aroclor 1254-induced rat liver S9 **No. of Cells Analyzed/Culture:**

Aberration: 50 (test article and positive control) or 100 (vehicle control), pp or er: 100

Vehicle: Test Article: Saline, Positive Controls: Water **Date of Treatment: [redacted], 20[redacted]**

Treatment: 3 hour treatment with and without S9

Cytotoxic Effects: In the assay with and without metabolic activation, the high dose of 25.0 and 12.3 µg/mL produced 43% and 22% reduction in mitotic index as compared with the vehicle control cultures, respectively.

Genotoxic Effects: Significant increase in cells with chromosomal aberrations

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (µg/mL)	Mean Mitotic Index (%) [a]	Mean Number of pp Cells (%)	Mean Number of er Cells (%)	Mean Numbers of Cells with Structural Aberrations (%) [b]	
						-g	+g
Without Activation	Vehicle	-	0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Darinaparsin	6.00	0	0.0	0.0	49.0*	51.0
		8.58	14	1.0	0.0	70.0*	73.0
		12.3	22	1.0	1.0	74.0*	76.0
	MMC	1.00	-	0.0	0.0	50.0*	51.0

2.6.7.8B　　哺乳類細胞を用いる染色体異常試験（続き）

Test article: Darinaparsin

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (μg/mL)	Mean Mitotic Index (%)[a]	Mean Number of pp Cells (%)	Mean Number of er Cells (%)	Mean Numbers of Cells with Structural Aberrations (%) [b]	
						-g	+g
With Activation	Vehicle	-	0	0.0	0.0	0.5	2.5
	Darinaparsin	12.3	0	0.0	0.0	43.0*	46.0
		17.5	0	1.0	0.5	72.0*	73.0
		25.0	43	1.5	0.5	69.0*	71.0
	CP	25.0	-	0.0	0.0	36.0*	39.0

a: % mitotic index reduction as compared to the vehicle control

b: -g = number of cells with chromosome aberrations; +g = number of cells with chromosome aberrations + number cells with gaps

*: significantly greater in structural aberrations (-g), pp cells and er cells than the vehicle control, p≤0.01 (Fisher's Exact Test)

CP = Cyclophosphamide, MMC = Mitomycin C, pp = Polyploidy, er = Endoreduplication

- = Not applicable

2.6.7.9 *In Vivo* 遺伝毒性試験

2.6.7.9A マウス小核試験

Test article: Darinaparsin

Report Title: ***In Vivo*** **Mouse Bone Marrow Micronucleus Assay** **Study No. 8253336**

Test for Induction of: Micronuclei in bone marrow erythrocyte **Treatment Schedule: Single dose** **Location in CTD: 4.2.3.3.2.1**

Species/Strain: Mice/Hsd:ICR(CD-1) **Sampling Time: 24 and 48 hours** **GLP Compliance: Yes**

Age: 6 weeks old at treatment **Method of Administration: Test Article: Intravenous, Positive Controls: Oral**

Cells Evaluated: Polychromatic erythrocytes **Vehicle: Test Article: Saline, Positive Controls: Reverse Osmosis/Deionized Water**

Special Features: None **No. of Cells Evaluated/Animal: 2000** **Date of Dosing: [redacted], 20[redacted]**

Toxic/Cytotoxic Effects: Signs of clinical toxicity in the treated animals at 40, 80, and 160 mg/kg were observed. Cytotoxicity to the bone marrow was not seen.

Genotoxic Effects: None

Sampling Time	Test Article	Dose (mg/kg)	Gender and No. of Animals/Group	% MNPCE	Ratio PCE: NCE
24 hours postdose	Vehicle	-	M 5	0.19 ± 0.21	0.72 ± 0.22
	Darinaparsin	40	M 5	0.20 ± 0.17	0.74 ± 0.12
		80	M 5	0.10 ± 0.11	0.63 ± 0.23
		160	M 5	0.25 ± 0.22	0.43 ± 0.15
	Cyclophosphamide	80	M 5	3.61 ± 0.98*	0.55 ± 0.19
48 hours postdose	Vehicle	-	M 5	0.32 ± 0.33	0.69 ± 0.29
	Darinaparsin	160	M 5	0.13 ± 0.16	0.86 ± 0.29

Mean ± SD, M = Male

*: p≤0.05 (Dunnett's test, vs concurrent vehicle control group)

- = Not applicable; MNPCE = Micronucleated polychromatic erythrocytes; NCE = Normochromatic erythrocytes: PCE = Polychromatic erythrocytes

2.6.7.10 がん原性試験

該当する試験なし

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

Test article: Darinaparsin

Species / Strain	**Method of Administration (Vehicle / Formulation)**	**Dosing Period**	**Doses (mg/kg/day)**	**No. Per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number/ Location in CTD**
Rabbit/ NZW	Intravenous (Saline)	From GD 6 through GD 18	0, 2.5, 10, 40	6 F	≥ 2 mg/kg/day: decrease in body weight during dosing ≥ 10 mg/kg/day: clinical sings 40 mg/kg/day: mortality (2/6 animals), decrease and slow increase of body weight during dosing, decreased food consumption, necropsy findings in 2 dead animals and 1 survived animal, 100% resorption of implants in 1 dead and 1 survived animals Administration dose of 3, 10 and 30 mg/kg/day was selected for the definitive embryo-fetal developmental toxicity study in rabbits.	Q12-64-SZ /4.2.3.5.2.1

NZW = New Zealand White; GD = Gestation day; F = Female

2.6.7.12 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

該当する試験なし

2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

Test article: Darinaparsin

Report Title: **EMBRYO-FETAL DEVELOPMENTAL TOXICITY STUDY OF DARINAPARSIN ADMINISTERED INTRAVENOUSLY IN NEW ZEALAND WHITE RABBITS**

Study No. Q14-S004-2RP

Species/Strain: Rabbit/NZW

Duration of Dosing: From GD 6 through GD 18

Location in CTD: 4.2.3.5.2.2

Initial Age: 4-7 months

Day of Mating: Day 0

GLP Compliance: Yes

Date of First Dose: [redacted], 20[redacted]

Day of C-Section: GD 29

Design Similar to ICH 4.1.3: Yes

Method of Administration: Intravenous

Special Features: None

Vehicle: Saline

No Observed Adverse Effect Level: Maternal: 3 mg/kg/day, Fetal: 10 mg/kg/day

Daily Dose (mg/kg)		**0 (Control)**	**3**	**10**	**30**
Dams:	**Toxicokinetics[a] (n=6)**				
	C_{max} (ng/mL) GD 6	NA	492	1409	4994
	GD 18	NA	581	1423	5677
	AUC_{0-24} (ng·hr/mL) GD 6	NA	3581	9383	35638
	GD 18	NA	3937	9393	37714
	Number of Animals				
	Mated Females	24	24	24	24
	Pregnant	23	19	21	21
	Died or Sacrificed Moribund	0	0	1	5
	Abortion	0	0	0	3

2.6.7.13　生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験（続き）

Test article: Darinaparsin

Daily Dose (mg/kg)			**0 (Control)**	**3**	**10**	**30**
Dams:	**Premature Delivery**		0	0	1	0
	Pregnant Females Alive at Termination		23	19	19	14
	Pregnancy Rate (%)		95.8	79.2	87.5	87.5
	Litters Subjected to Fetal Examination		23	19	19	14
	Clinical Observations					
	Lethargy		0/24	0/24	0/24	2/24
	Hyperexcitation (Screaming)		0/24	0/24	1/24	21/24
	Lacrimation		0/24	0/24	2/24	24/24
	Miosis		0/24	0/24	13/24	24/24
	Salivation (Excessive saliva)		0/24	0/24	1/24	24/24
	Reduced or lack of defecation		0/24	0/24	0/24	22/24
	Injection site (Aural region):	**Edema**	0/24	0/24	3/24	22/24
		Discoloration	0/24	0/24	3/24	16/24
		Flush	0/24	0/24	2/24	19/24
		Ulceration	0/24	0/24	0/24	20/24
		Scab	0/24	0/24	4/24	21/24
		Fever	0/24	0/24	3/24	18/24

2.6.7.13　生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験（続き）

Test article: Darinaparsin

Daily Dose (mg/kg)		**0 (Control)**	**3**	**10**	**30**
Dams:	**Body Weight Gain (mean ± SE, kg) During Dosing**	0.230 ± 0.021	0.209 ± 0.036	0.216 ± 0.025	-0.026 ± 0.058*
	Food Consumption (mean ± SE, g/rabbit/day) GD 18	135.5 ± 6.9	131.9 ± 8.6	131.2 ± 7.6	84.1 ± 15.9*
	Necropsy Observations				
	Injection site (Ear): Edema, Scab, Ulceration, Arescent and/or Darkening	0/24	0/24	1/24	18/24
	Data of Cesarean Section Number of Litters evaluated	23	19	19	14
	Gravid Uterus Weight (mean ± SE, g)	441.36 ± 26.63	438.25 ± 27.01	465.01 ± 22.54	297.10 ± 52.73*
	Number of Mean Corpora Lutea Mean ± SE	10.0 ± 0.5	9.7 ± 0.5	11.1 ± 0.4	10.9 ± 0.7
	Number of Mean Implantation Mean ± SE	9.1 ± 0.6	8.8 ± 0.4	9.0 ± 0.5	8.4 ± 0.8
	Implantation Index (mean ± SE, %)	89.99 ± 2.81	91.58 ± 2.53	81.85 ± 4.02	77.10 ± 6.18
	Pre-Implantation Loss (mean ± SE, %)	10.01 ± 2.81	8.42 ± 2.53	18.15 ± 4.02	22.90 ± 6.18
	Post-Implantation Loss (mean ± SE, %)	12.58 ± 3.80	13.93 ± 4.48	11.15 ± 3.51	38.97 ± 9.62
	Live Fetus Mean ± SE	8.1 ± 0.7	7.7 ± 0.6	7.9 ± 0.5	4.9 ± 1.0*
	Index (mean ± SE, %)	87.42 ± 3.80	86.07 ± 4.48	88.85 ± 3.51	61.03 ± 9.62
	Total Resorption Mean ± SE	0.9 ± 0.3	0.7 ± 0.2	0.5 ± 0.2	3.0 ± 1.1
	Index (mean ± SE, %)	11.59 ± 3.39	10.67 ± 4.38	6.68 ± 2.71	34.40 ± 10.23

2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験（続き）

Test article: Darinaparsin

Daily Dose (mg/kg)			**0 (Control)**	**3**	**10**	**30**
Dams:	**Early Resorption**	**Mean ± SE**	0.9 ± 0.3	0.7 ± 0.2	0.5 ± 0.2	2.8 ± 1.0
		Index (mean ± SE, %)	11.23 ± 3.43	10.67 ± 4.38	6.15 ± 2.61	32.45 ± 9.84
	Dead fetus		-	-	-	-
Fetuses	**Body Weights (mean ± SE, g)** [b, c]	**Male**	40.296 ± 1.421 (23)	-0.6 (19)	3.2 (19)	-1.5 (12)
		Female	40.395 ± 1.673 (23)	-3.4 (18)	-2.1 (19)	-3.9 (11)
	Placenta Weights (mean ± SE, g) [b]		-	-	-	-
	Sex Ratio (Male/Female)		-	-	-	-
	External Findings		-	-	-	-
	Visceral Findings		-	-	-	-
	Skeletal Findings		-	-	-	-

a: Parameters are for arsenic. Reported values of darinaparsin was converted to that of arsenic using the molecular weight (darinaparsin: 411.31, As: 74.92). As conc. = darinaparsin conc. × (74.92 / 411.31).

b: Number of litters evaluated in parentheses. Two litters were all resorptions and one litter had no female fetus in 30 mg/kg/day dose group.

c: For controls, group mean ± SE are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

-: No noteworthy finding; $AUC_{0\text{-}24}$ = Area under the concentration-time curve from time 0 to 24 hrs; C_{max} = Maximum concentration in plasma; GD = Gestation day; NA = Not applicable; NZW = New Zealand White

*: $p \leq 0.05$ (Dunnett's or Mann-Whitney U test, vs concurrent vehicle control group)

2.6.7.14　生殖発生毒性試験： 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

該当する試験なし

2.6.7.15　局所刺激性試験

該当する試験なし

2.6.7.16 その他の毒性試験

Test article: Darinaparsin, Darinaparsin containing 1% Impurity A*

Species and Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number/ Location in CTD**
Toxicity of Impurity						
Rats/Crl:CD(SD)	Intravenous (Saline)	15 weeks (5 cycles of 5 days of dosing followed by a 16-day non-dosing period)	0 (Saline), 15 mg/kg/day of Darinaparsin, 15 mg/kg/day of Darinaparsin containing 1% Impurity A*	10M, 10F	No Darinaparsin or Darinaparsin (1%Impurity A*)-related death or moribundity was observed in any animal. Compared to the control group or 15 mg/kg/day Darinaparsin group, no Darinaparsin (1%Impurity A*)-related changes were noted because no clear synergistic or renewed toxicity was seen.	[redacted]473-010/ 4.2.3.7.6.1
Phototoxicity						
Balb/c 3T3 fibroblasts	*In Vitro* (Earle's Balanced Salts Solution)	NA	± UVA light: Preliminary test: 0.0128 – 1000 µg/mL Main test: 1.125 – 144 µg/mL	NA	Preliminary test: IC_{50}: 9.405 (+ UVA light) and 11.13 (- UVA light) µg/mL PIF: 1.415, MPE: 0.137 Main test: IC_{50}: 3.129 (+ UVA light) and 6.73 (- UVA light) µg/mL PIF: 2.185, MPE: 0.032	[redacted]0001/ 4.2.3.7.7.1

IC_{50} = 50% inhibitory concentration; MPE = mean photo effect; NA = Not applicable; PIF = photo-irritation-factor; UV = Ultraviolet

* 新薬承認情報提供時に置換