# 目次

1. 非臨床試験計画概略 ..... 5
2. 薬理試験 ..... 7
2.1 効力を裏付ける試験 ..... 7
2.2 副次的薬理試験 ..... 8
2.3 安全性薬理試験 ..... 8
3. 薬物動態試験 ..... 9
3.1 吸収 ..... 9
3.2 分布 ..... 9
3.3 代謝 ..... 9
3.4 排泄 ..... 10
4. 毒性試験 ..... 11
4.1 拡張単回投与毒性試験 ..... 11
4.2 反復投与毒性試験 ..... 11
4.2.1 ラット ..... 11
4.2.2 イヌ ..... 12
4.3 遺伝毒性試験 ..... 13
4.4 がん原性試験 ..... 14
4.5 生殖発生毒性試験 ..... 14
4.5.1 胚・胎児発生毒性試験 ..... 14
4.6 局所刺激性試験 ..... 14
4.7 その他の毒性試験 ..... 14
4.7.1 バレメトスタットトシル酸塩のラット 13 週間反復投与試験で観察されたリンパ腫及びリンパ芽球の免疫組織化学染色による探索 ..... 14
4.7.2 バレメトスタットトシル酸塩の 3 ヵ月間反復経口投与によるラット胸腺に対する探索毒性試験 ..... 15
4.7.3 バレメトスタットトシル酸塩の 3 ヵ月間反復経口投与によるラット胸腺に対する毒性試験 ..... 15
4.7.4 バレメトスタットトシル酸塩の 3 ヵ月間反復経口投与による加齢ラット胸腺に対する毒性試験 ..... 16
4.7.5 光毒性試験 ..... 16
5. 総括及び結論 ..... 17
5.1 薬理 ..... 17
5.2 薬物動態 ..... 18
5.3 毒性 ..... 19
5.4 曝露マージン ..... 24

6. 参考文献一覧.....25

## 表一覧

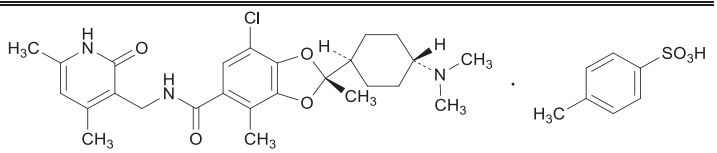
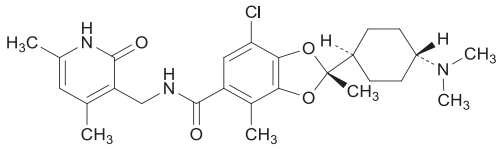
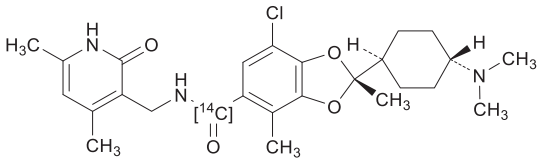
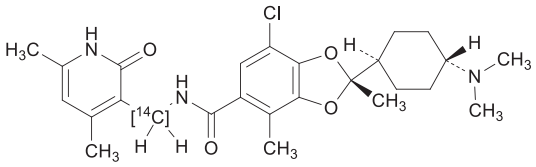
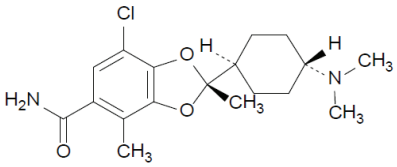
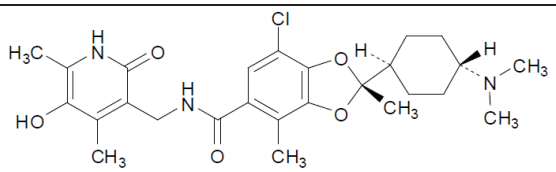
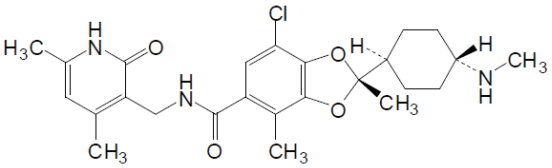
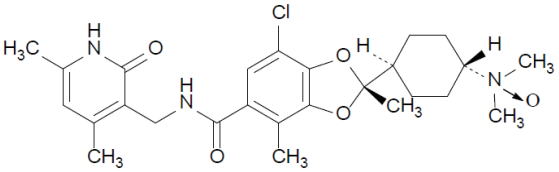
表 2.4.5-1 予想臨床用量及び非臨床試験における全身曝露量の比較に基づくバレメトスタットトシル酸塩の曝露マージン.....24

## 略語一覧

| 略語 | 略していない表現（英） | 略していない表現（日） |
|---|---|---|
| AAG | alpha1-acid glycoprotein | α1-酸性糖蛋白 |
| αβ | CD8 and T-cell receptor αβ | CD8 及び T-cell receptor αβ |
| AML | acute myeloid leukemia | 急性骨髄性白血病 |
| ATL | adult T-cell leukemia | 成人 T 細胞白血病 |
| AUC24h | area under the plasma concentration-time curve up to 24h | 投与 24 時間後までの血漿中濃度－時間曲線下面積 |
| AUCinf | area under the plasma concentration-time curve up to infinity | 無限大時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積 |
| AUClast | area under the plasma concentration-time curve up to the last quantifiable time | 定量可能な最終時点までの血漿中濃度－時間曲線下面積 |
| CD | cluster of differentiation | － |
| Cmax | maximum plasma concentration | 最高血漿中濃度 |
| DLBCL | diffuse large B-cell lymphoma | びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 |
| DN | CD4 and CD8 double negative | CD4 及び CD8 共陰性 |
| DP | CD4 and CD8 double positive | CD4 及び CD8 共陽性 |
| DRF | dose range-finding | 用量設定 |
| EFD | embryo-fetal development | 胚・胎児発生 |
| EZH | enhancer of zeste homolog | － |
| FOB | functional observational battery | 機能観察総合評価 |
| $GI_{50}$ | concentration causing 50% growth inhibition | 50%増殖抑制濃度 |
| GLP | Good Laboratory Practice | 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準 |
| HEK | human embryonic kidney | ヒト胎児由来腎 |
| hERG | human ether-à-go-go-related gene | ヒト遅延整流性カリウムチャネル遺伝子 |
| HNSTD | highest non-severely toxic dose | 重篤な毒性が発現しない最大用量 |
| HSA | human serum albumin | ヒト血清アルブミン |
| H3K27 | histone 3 lysine 27 | ヒストン H3 の 27 番目のリジン残基 |
| $IC_{50}$ | concentration causing 50% inhibition | 50%阻害濃度 |
| ICH | International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use | 医薬品規制調和国際会議 |
| IHC | immunohistochemistry | 免疫組織化学 |
| MM | multiple myeloma | 多発性骨髄腫 |
| MPE | mean photo effect | 平均光作用 |
| MTD | maximum tolerated dose | 最大耐量 |
| NOAEL | no observed adverse effect level | 無毒性量 |
| PLD | phospholipidosis | リン脂質症 |
| QTc | corrected QT | 補正された QT |
| QWBA | quantitative whole-body autoradioluminography | 定量全身オートラジオルミノグラフィー |
| SCID | severe combined immune deficiency | 重症複合免疫不全 |
| $STD_{10}$ | severely toxic dose in 10% of animals | 供試動物の 10%に重篤な毒性が発現する用量 |
| t1/2 | terminal elimination half-life | 終末相の消失半減期 |
| TGIn | tumor growth inhibition rate (net) | 腫瘍純増殖抑制率 |
| TK | toxicokinetic(s) | トキシコキネティクス |
| Tmax | time to reach maximum plasma concentration | 最高血漿中濃度到達時間 |
| Treg | regulatory T cell | 制御性 T 細胞 |
| TRR | tumor regression rate | 腫瘍退縮率 |
| UVA | ultraviolet light A | 紫外線 A 波 |
| WBP | whole body plethysmography | 全身プレチスモグラフィー |

－：該当する表記なし

## 化合物一覧

| 化合物名 | 定義 | 構造式 |
|---|---|---|
| バレメトスタットトシル酸塩（DS-3201b） | 原薬 |  |
| バレメトスタット（DS-3201a） | 原薬のフリー体 |  |
| $^{14}$C 標識バレメトスタット | バレメトスタットの $^{14}$C 標識体 |  又は  |
| CALZ-1808a | バレメトスタットの酸化代謝物 |  |
| CALZ-1809a | バレメトスタットの酸化代謝物 |  |
| CALZ-1810a | バレメトスタットの *N*-脱メチル代謝物 |  |
| CALZ-1811a | バレメトスタットの酸化代謝物 |  |

## 1. 非臨床試験計画概略

医薬品規制調和国際会議（International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use: ICH）M3（R2）「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」（2009 年 6 月）及び ICH S9「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン」（2009 年 10 月）を含め、米国、EU、及び日本の規制ガイドラインと製品の特徴に基づいて、バレメトスタットトシル酸塩の非臨床試験戦略を策定した。

非臨床試験では、バレメトスタットトシル酸塩及び $^{14}C$ 標識バレメトスタット（［$^{14}C$］バレメトスタット）の用量は、フリー体であるバレメトスタットの用量として表示する。

In vitro 試験では、バレメトスタットトシル酸塩及び酸化代謝物である CALZ-1809a について、polycomb repressive complex 2 complex における enhancer of zeste homolog （EZH）1 及び EZH2 のメチルトランスフェラーゼ活性に対する阻害作用、ヒト大腸癌細胞株 HCT116 内のヒストン H3 の 27 番目のリジン残基（histone 3 lysine 27: H3K27）のトリメチル化に対する阻害作用、並びに KARPAS-422（びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫［diffuse large B-cell lymphoma: DLBCL］）、MV-4-11（急性骨髄性白血病［acute myeloid leukemia: AML］）、MM.1S（多発性骨髄腫［multiple myeloma: MM］）、及び TL-Om1（成人 T 細胞白血病［adult T-cell leukemia: ATL］）に対する増殖抑制活性を評価した。In vivo 試験では、EZH2 遺伝子変異を発現する KARPAS-422 腫瘍を皮下移植した重症複合免疫不全（severe combined immune deficiency: SCID）マウスを用いて、バレメトスタットトシル酸塩の増殖抑制活性を評価した。

安全性薬理試験（心血管系）並びにラット及びイヌ反復投与毒性試験を実施し、安全性薬理学的パラメータ（心血管系、呼吸器系、及び中枢神経系）を評価した。バレメトスタットトシル酸塩は、すべての in vivo 試験で強制経口投与した。

薬物動態試験では、毒性試験の主要評価動物であるラット及びイヌを用いて、標識体（［$^{14}C$］バレメトスタット）又は非標識体（バレメトスタットトシル酸塩）の経口及び静脈内投与により各種検討を行った。吸収については、ラット及びイヌに［$^{14}C$］バレメトスタット又はバレメトスタットトシル酸塩を経口及び静脈内投与後のバレメトスタットの薬物動態プロファイルを検討した。なお、バレメトスタットトシル酸塩経口投与後のバレメトスタット血漿中濃度推移はトキシコキネティクス（toxicokinetics: TK）試験として検討した。分布については、［$^{14}C$］バレメトスタットをアルビノラット及び有色ラットに経口投与後の定量全身オートラジオルミノグラフィー（quantitative whole-body autoradioluminography: QWBA）により評価した。また、in vitro 試験にて血漿蛋白結合及び血球移行性を検討した。代謝については、イヌに［$^{14}C$］バレメトスタットを経口投与後の血漿、尿、糞、及び胆汁中代謝物を検討した。また、ラット、イヌ、及びヒト凍結保存肝細胞を用いて［$^{14}C$］バレメトスタットの in vitro 代謝についても検討した。排泄については、イヌに［$^{14}C$］バレメトスタットを経口及び静脈内投与後の尿、糞及び胆汁中への排泄を検討した。

ラット及びイヌを用いて、バレメトスタットトシル酸塩の拡張単回経口投与試験、14 日

間反復経口投与による用量設定（dose range-finding: DRF）試験、及び 4 週間又は 13 週間の反復経口投与試験（TK を含む、主試験）を実施した。主試験では 4 週間の回復期間を設け、ラット 4 週間反復経口投与試験には安全性薬理評価（呼吸器系及び中枢神経系）を加えた。また、in vitro 及び in vivo 遺伝毒性試験を実施し、光毒性試験を in vitro で実施した。さらに、ラットを用いた予備的な胚・胎児発生（embryo-fetal development: EFD）試験、及びラット 13 週間反復経口投与試験でみられたリンパ腫の機序検討を目的とした探索的試験を実施した。ラット及びイヌを用いた DRF 試験、ラットを用いた予備的 EFD 試験、及びラットを用いたリンパ腫の機序検討を目的とした探索的試験を除き、すべての毒性試験及び安全性薬理試験は、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（Good Laboratory Practice: GLP）に準拠して実施した。

# 2. 薬理試験

## 2.1 効力を裏付ける試験

3 つの in vitro 試験の結果から、バレメトスタットトシル酸塩の薬理活性／作用メカニズムが示された。バレメトスタットトシル酸塩による EZH1 及び EZH2 のメチルトランスフェラーゼ活性阻害効果を、酵素評価系によって測定した。バレメトスタットトシル酸塩は対照薬である EZH2 阻害薬と比較して、EZH2 に対しては同程度の阻害活性（50%阻害濃度［concentration causing 50% inhibition: $IC_{50}$］値: 6.0 nmol/L）を示し、かつ EZH1 に対してはより強い阻害活性（$IC_{50}$ 値: 10 nmol/L）を示した。バレメトスタットの酸化代謝物 CALZ-1809a の EZH1 及び EZH2 に対する $IC_{50}$ 値は、それぞれ 240 及び 26 nmol/L であった。また、ヒト大腸癌細胞株 HCT116 内の H3K27 トリメチル化に対するバレメトスタットトシル酸塩の阻害作用を評価した。バレメトスタットトシル酸塩は対照薬である EZH2 阻害薬と比較して強い H3K27 トリメチル化阻害活性を示し、$IC_{50}$ 値は 0.55 nmol/L であった。CALZ-1809a の H3K27 トリメチル化阻害活性はバレメトスタットトシル酸塩と比較して弱かった（$IC_{50}$ 値: 190 nmol/L）。さらに、バレメトスタットトシル酸塩のヒト造血器腫瘍細胞株 KARPAS-422（DLBCL）、MV-4-11（AML）、MM.1S（MM）、及び TL-Om1（ATL）に対する増殖抑制活性を検討した。バレメトスタットトシル酸塩はこれら 4 細胞株すべてに対して、対照薬である EZH2 阻害薬と比較して強い増殖抑制活性（50%増殖抑制濃度［concentration causing 50% growth inhibition: $GI_{50}$］値: 1.43～18.4 nmol/L）を示し、種々の造血器腫瘍細胞に対して増殖抑制を誘導する抗腫瘍薬として、高い有効性を示すことが示唆された。これら 4 細胞株に対する CALZ-1809a の増殖抑制活性はバレメトスタットトシル酸塩と比較して極めて弱かった（$GI_{50}$: 132～9970 nmol/L）。

In vivo 試験では、機能獲得型変異 EZH2 を発現する KARPAS-422 を SCID マウスに皮下移植したモデルを用いて、腫瘍増殖抑制効果を検討した。バレメトスタットトシル酸塩は 1.56、6.25、25、及び 100 mg/kg を 1 日 1 回、又は 0.781、3.13、12.5、及び 50 mg/kg を 1 日 2 回、21 日間経口投与した。EZH2 阻害薬タゼメトスタットは 200 mg/kg を 1 日 1 回又は 100 mg/kg を 1 日 2 回、21 日間経口投与した。バレメトスタットトシル酸塩は 100 mg/kg を 1 日 1 回、21 日間経口投与により、100%以上の腫瘍純増殖抑制率（tumor growth inhibition rate [net]: TGIn）かつ 19.2%の腫瘍退縮率（tumor regression rate: TRR）を示し、25 mg/kg を 1 日 1 回、21 日間経口投与によっても明らかな腫瘍増殖抑制効果が認められた。また、バレメトスタットトシル酸塩は 50 mg/kg を 1 日 2 回、21 日間経口投与により、100%以上の TGIn かつ 51.7%の TRR を示し、12.5 mg/kg を 1 日 2 回、21 日間経口投与によっても明らかな腫瘍増殖抑制効果が認められた。バレメトスタットトシル酸塩の腫瘍増殖抑制効果は、用量依存的であった（スピアマンの順位相関係数、$P < 0.0001$）。タゼメトスタットは、200 mg/kg を 1 日 1 回又は 100 mg/kg を 1 日 2 回投与のいずれにおいても、明らかな腫瘍増殖抑制効果を示さなかった。以上、バレメトスタットトシル酸塩は、機能獲得型変異 EZH2 を発現する KARPAS-422（DLBCL）の皮下移植マウスモデルに対して、1 日 1 回又は 1 日 2 回投与ともに、21 日間連日投与で用量依存的かつ統計学的に有意な抗腫瘍効果を示し、高

い有効性を示すことが確認された。また、バレメトスタットトシル酸塩の抗腫瘍活性は、最終投与後 13 日間は増加又は維持される傾向が認められた。

## 2.2　副次的薬理試験

副次的薬理試験は実施しなかった。

## 2.3　安全性薬理試験

ICH S7A 及び S7B に準じ、心血管系、中枢神経系、及び呼吸器系などの主要な生理機能に対する安全性薬理試験は、独立した試験として、あるいはバレメトスタットトシル酸塩の反復投与毒性試験に組み込んで実施した。

心血管系に対する安全性薬理試験では、ヒト遅延整流性カリウムチャネル遺伝子（human ether-à-go-go-related gene: hERG）チャネルを安定的に発現するヒト胎児由来腎（human embryonic kidney: HEK）293 細胞を用いて、hERG 電流に対するバレメトスタットトシル酸塩の影響を評価した。hERG テール電流に対するバレメトスタットトシル酸塩の阻害率は最高濃度である 100 μmol/L で 22.7%であり、バレメトスタットトシル酸塩の $IC_{50}$ は 100 μmol/L より高かった。

hERG テール電流に対する $IC_{50}$ 値は 100 μmol/L（66 μg/mL）より高かった。しかし、30 及び 60 mg/kg／日を投与したイヌの 4 週間反復経口投与試験では、30 mg/kg／日以上の群で雌にのみ、補正された QT（corrected QT: QTc）間隔の延長が投与 4 週間目に認められた。平均最大延長率は 30 mg/kg／日群で 11%であり、60 mg/kg／日群では 19%であった。イヌの 7 日間反復投与テレメトリー試験では、60 mg/kg／日群で 7 日間投与後に QTc 間隔の軽度な延長がみられたが（最大延長率は QT 間隔で 7.2%、QTc 間隔で 8.3%）、15 mg/kg／日群では QTc 間隔の延長は認められなかった。以上の結果より、バレメトスタットトシル酸塩は 15 mg/kg／日を超える用量で弱い QTc 間隔の延長作用を示すと判断し、心血管系機能に対するバレメトスタットトシル酸塩の無毒性量（no observed adverse effect level: NOAEL）は 15 mg/kg／日と判断した。しかし、7.5、15、及び 30 mg/kg／日の用量で実施したイヌの 13 週間反復経口投与試験では、投与 4 及び 13 週目の検査において、いずれの用量でもバレメトスタットトシル酸塩に関連する変化は認められなかった。

ラットの 4 週間反復経口投与試験では、600 mg/kg／日までの連日投与で、機能観察総合評価（functional observational battery: FOB）に毒性所見は認められなかった。バレメトスタットトシル酸塩を投与された全投与群で、一過性の立ち上がり行動の減少がみられたが、投与を継続してもこの所見は消失し、他の関連所見もみられなかったことから、毒性学的意義はないと判断した。全身プレチスモグラフィー（whole body plethysmography: WBP）では、いずれの投与群でも影響はみられなかった。以上の結果より、バレメトスタットトシル酸塩は中枢神経系及び呼吸器系に影響を与えないと判断した。

# 3. 薬物動態試験

## 3.1 吸収

ラットにバレメトスタットトシル酸塩（20～200 mg/kg）を単回経口投与したとき、バレメトスタットの全身曝露量は雌雄ともに用量比を上回って増加した。最高血漿中濃度到達時間（time to reach maximum plasma concentration: Tmax）は 2.0～8.0 時間の範囲であった。

イヌにバレメトスタットトシル酸塩（15～60 mg/kg）を単回経口投与したとき、雌雄のイヌにおいてバレメトスタットの全身曝露量は用量の増加に伴い増加した。Tmax は 0.5～1.0 時間の範囲であった。終末相の消失半減期（terminal elimination half-life: t1/2）は約 3 時間であった。

雄性ラット及び雄性イヌにそれぞれ 20 及び 15 mg/kg でバレメトスタットトシル酸塩を単回経口投与したときのバイオアベイラビリティは、雄性ラット及び雄性イヌにバレメトスタットトシル酸塩を 1 mg/kg で単回静脈内投与したときの全身曝露量から算出すると、それぞれ約 5.2%及び約 71.4%であった。

絶食下の雄性イヌに［$^{14}$C］バレメトスタットを 3 mg/kg の用量で単回経口投与又は単回静脈内投与したときの血漿中放射能の無限大時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積（area under the plasma concentration-time curve up to infinity: AUCinf）は、それぞれ 1760 及び 3010 ng eq·h/mL であった。血液中放射能の濃度－時間プロファイルは血漿中放射能とほぼ平行に推移した。

## 3.2 分布

アルビノラット及び有色ラットを用いて、［$^{14}$C］バレメトスタットを単回経口投与したときの組織分布を QWBA によって評価した。アルビノラットでは、ほぼすべての組織中の放射能濃度が投与 4 又は 7 時間後に最高値に到達した。投与 168 時間後に放射能が検出可能であった組織は、大腸内容物、顎下腺、及び精巣のみであった。有色ラットでの放射能の分布プロファイルは、眼球及びぶどう膜を除き、アルビノラットと同様であった。眼球及びぶどう膜では、放射能が投与 168 時間後まで検出され、メラニン親和性が示唆された。

バレメトスタット（0.6～10 μg/mL）の血漿蛋白結合率は、マウスで 72.8%～82.6%、ラットで 58.1%～59.7%、イヌで 58.7%～74.4%、及びヒトの血漿で 78.0%～96.6%であった。バレメトスタット（0.6～10 μg/mL）は、α1‐酸性糖蛋白質（alpha1-acid glycoprotein: AAG）に 56.0%～92.3%、ヒト血清アルブミン（human serum albumin: HSA）に 35.0%～38.7%で結合することから、主に AAG に結合することが示唆された。［$^{14}$C］バレメトスタットの血球移行率（0.3～5 μg/mL）は、マウスで 36.4%～41.1%、ラットで 50.4%～50.7%、イヌで 33.6%～40.5%、及びヒトで 12.3%～30.8%であった。

## 3.3 代謝

［$^{14}$C］バレメトスタット（10 μmol/L）を雄性ラット、雄性イヌ、及び男女混合ヒトの凍結肝細胞と 240 分間インキュベートし、バレメトスタットの代謝物プロファイルを定性的に

検討した。ラット及びイヌ凍結肝細胞中で検出された主な代謝物は酸化体及び *N*-脱メチル化体であった。また、［$^{14}$C］バレメトスタットはヒト凍結肝細胞中ではほとんど代謝されなかったものの、主な代謝反応は酸化であった。

［$^{14}$C］バレメトスタットをイヌに 3 mg/kg の用量で単回経口投与後に得られた血漿、尿、糞、及び胆汁中の代謝物を分析した。血漿、尿、糞、及び胆汁中の主要成分はバレメトスタットであった。血漿、尿、糞、及び胆汁中で認められた主な代謝物は酸化体及び *N*-脱メチル化体であった。

## 3.4　排泄

イヌに［$^{14}$C］バレメトスタットを単回経口投与したとき、投与 168 時間後までに投与量の 6.0%が尿中に、91.0%が糞中に排泄された。［$^{14}$C］バレメトスタットを単回静脈内投与したとき、投与 168 時間後までに投与量の 10.0%が尿中に、89.9%が糞中に排泄された。胆管カニューレを挿入したイヌに［$^{14}$C］バレメトスタットを単回経口投与したとき、投与 24 時間後までに投与量の 45.8%が胆汁中に排泄された。

# 4. 毒性試験

## 4.1 拡張単回投与毒性試験

バレメトスタットトシル酸塩を 20、60、及び 200 mg/kg の用量で Crl:CD(SD)ラットに単回経口投与する拡張型単回投与試験を実施し、TK プロファイルを評価した。本試験では、2 週間の投与後観察期間を設定し、遅発性の毒性又は認められた毒性の回復性を検討した。その結果、いずれの投与群でも毒性変化は認めらなかった。以上の結果より、NOAEL は 200 mg/kg、概略の致死量は 200 mg/kg 超と判断した。200 mg/kg の投与日における平均最高血漿中濃度（maximum plasma concentration: Cmax）及び定量可能な最終時点までの血漿中濃度–時間曲線下面積（area under the plasma concentration-time curve up to the last quantifiable time: AUClast）は、それぞれ 2360 ng/mL 及び 18,600 ng·h/mL であった。

バレメトスタットトシル酸塩を 15、30、及び 60 mg/kg の用量でビーグルイヌに単回経口投与する拡張型単回投与試験を実施し、TK プロファイルを評価した。本試験では、2 週間の投与後観察期間を設定し、遅発性の毒性又は認められた毒性の回復性を検討した。その結果、30 mg/kg 以上の群で、一過性の一般状態変化及び血漿中ヒスタミン濃度上昇が認められた。以上の結果より、NOAEL は 15 mg/kg、概略の致死量は 60 mg/kg 超と判断した。15 mg/kg の投与日における平均 Cmax 及び AUClast は、それぞれ 2250 ng/mL 及び 9030 ng·h/mL であった。

## 4.2 反復投与毒性試験

Crl:CD(SD)ラット及びビーグルイヌを用いて 13 週間までの反復経口投与試験を実施した。また、4 週間又は 13 週間反復経口投与試験で認められた影響の回復性を 4 週間の回復期間で評価した。

### 4.2.1 ラット

バレメトスタットトシル酸塩を 10、100、及び 1000 mg/kg／日の用量で雄性 Crl:CD(SD)ラットに 14 日間反復経口投与したときの毒性及び TK プロファイルを調べる DRF 試験を実施した。1000 mg/kg／日群では、投与 5 日目に死亡が認められ、残りの動物も状態悪化のため投与 6 日目に剖検に供した。加えて、体重及び摂餌量の減少が認められた。以上の結果より、最大耐量（maximum tolerated dose: MTD）は 100 mg/kg／日と判断した。100 mg/kg／日における Cmax 及び投与 24 時間後までの血漿中濃度–時間曲線下面積（area under the plasma concentration-time curve up to 24 h: AUC24h）は、それぞれ 2000 ng/mL 及び 20,900 ng·h/mL であった。

バレメトスタットトシル酸塩を Crl:CD(SD)ラットに 4 週間反復経口投与したときの毒性及び TK プロファイルを評価し、認められた毒性について、4 週間の回復期間終了後の回復性を検討した。また、本試験の一部として、安全性薬理パラメータ（FOB 及び WBP）を評価した。バレメトスタットトシル酸塩を 60、200、及び 600 mg/kg／日の用量で Crl:CD(SD)ラットに 4 週間反復経口投与した結果、600 mg/kg／日群では重度の一般状態の悪化並びに

体重及び摂餌量の減少が認められた。また、雌 1 例を投与 7 日目に切迫解剖し、600 mg/kg／日群の残りの動物を投与 11 日目までに早期解剖した。また、600 mg/kg／日を 10 日間投与された雌 2 例が 11 日目に死亡した。その他に 200 mg/kg／日群の TK 評価動物 1 例も死亡した。ただし、この個体は TK 用サテライト動物であったため、詳細な毒性評価を実施しなかった。600 mg/kg／日群では、血液学的検査、凝固系検査、及び血液化学的検査値の変化に加え、骨髄、リンパ細網組織、消化管、及び腎臓に病理組織学的変化が認められた。また、200 mg/kg／日群で一過性の体重増加量減少がみられ、60 又は 200 mg/kg／日群で赤血球系パラメータ及び白血球数の減少、並びに胸腺に病理組織学的変化が認められた。これらの変化は 4 週間の回復期間後に回復した。以上の結果より、供試動物の 10%に重篤な毒性が発現する用量（severely toxic dose in 10% of animals: $STD_{10}$）は 200 mg/kg／日より大と判断した。200 mg/kg／日の投与 28 日目における Cmax 及び AUClast は、それぞれ 2900 ng/mL 及び 20,400 ng·h/mL であった。

バレメトスタットトシル酸塩を 20、60、及び 200 mg/kg／日の用量で Crl:CD(SD)ラットに 13 週間反復経口投与した結果、20 及び 200 mg/kg／日群で重度の一般状態の悪化が認められ、投与 60 及び 99 日目に早期解剖を行った。20 mg/kg／日群では、早期解剖された動物に加え試験終了時に安楽殺された動物でもリンパ腫が認められた。免疫組織化学（immunohistochemistry: IHC）染色では、リンパ腫は胸腺原発の T 細胞リンパ腫であることが確認された（4.7.1 参照）。200 mg/kg／日群でみられた所見の一部には、バレメトスタットトシル酸塩の薬理作用が関連していると考えられた。すべての用量における生存動物で認められた病理組織学的変化は、13 週間反復経口投与試験でのみ認められた過骨化を除き、概ね 4 週間反復経口投与試験で認められた臓器毒性と一致していた。4 週間の回復期間後において、投与期間中にみられた臨床所見及び骨の過骨化を除く病理組織学的所見は回復又は回復傾向を示した。本試験では、20 mg/kg／日群でリンパ腫がみられたことから、$STD_{10}$ は求められなかった。

### 4.2.2　イヌ

バレメトスタットトシル酸塩を 30、100、及び 300 mg/kg／日の用量でビーグルイヌに 14 日間反復経口投与したときの毒性及び TK プロファイルを調べる DRF 試験を実施した。100 及び 300 mg/kg／日群では投与 1 日目に重篤な一般状態変化又は死亡が認められたため、4 日間の休薬後、100 mg/kg／日を 15 mg/kg／日に、300 mg/kg／日を 60 mg/kg／日に減量した。減量後の 15、30、及び 60 mg/kg／日の用量における忍容性は良好であり、60 mg/kg／日群では主として小腸及び骨髄に毒性変化が認められた。また、体重及び摂餌量の減少並びに白血球数及び血小板数の減少が認められた。一般症状としては、30 及び 60 mg/kg／日群では、四肢（耳介を含む）の発赤、又は眼周囲の腫脹が認められたが、これらの変化は 30、100、又は 300 mg/kg／日の単回投与後にみられた一過性のヒスタミン濃度の上昇に関連する変化と考えられた。100 mg/kg で死亡が発生したことに基づき、本試験における MTD は 60 mg/kg／日と判断した。60 mg/kg／日の投与 14 日目における Cmax 及び AUClast

の平均値は、それぞれ 13,450 ng/mL 及び 63,050 ng·h/mL であった。

バレメトスタットトシル酸塩を 15、30、及び 60 mg/kg／日の用量でビーグルイヌに 4 週間反復経口投与した結果、60 mg/kg／日群では重篤な一般状態変化並びに体重及び摂餌量の減少が認められ、投与 16 日～28 日目に雄全例及び雌 1 例が早期解剖され、雌 1 例が死亡した。病理組織学的検査では、60 mg/kg／日群の早期解剖例で骨髄、リンパ細網組織、消化管、及び腎臓に、生存例では胸腺に、30 mg/kg／日群ではリンパ組織及び胃に所見が認められた。また、体重及び摂餌量減少に加え 14 日間 DRF 試験でみられたアレルギー様反応を含む一般状態変化が認められた。赤血球パラメータの減少及びいくつかの血液化学的検査値への影響も認められた。4 週間の回復期間後、生存動物では、認められた変化はすべて回復した。30 mg/kg／日以上の群の雌で QTc 間隔の延長がみられ、雌雄で一過性かつタキフィラキシー性のヒスタミン濃度の上昇が認められた。60 mg/kg／日群で死亡が認められたことに基づき、重篤な毒性が発現しない最大用量（highest non-severely toxic dose: HNSTD）は 30 mg/kg／日と判断した。30 mg/kg／日における Cmax 及び AUClast の平均値は、それぞれ 6200 ng/mL 及び 32,400 ng·h/mL であった。

バレメトスタットトシル酸塩を 7.5、15、及び 30 mg/kg／日の用量でビーグルイヌに 13 週間反復経口投与した結果、30 mg/kg／日群の雄で重度の陰嚢皮膚の変化がみられたため投与 51 日目に早期解剖された。早期解剖例及び生存例の病理組織学的検査では、すべての用量群でリンパ細網組織、精巣、精巣上体に所見が認められた。また、7.5 mg/kg／日群で陰茎包皮に、15 mg/kg／日以上の群で陰嚢皮膚及び結膜に、30 mg/kg／日群では眼周囲皮膚及び角膜に所見が認められた。さらに、一過性の血漿中ヒスタミン濃度の上昇を伴う一般状態変化、及び概ね 4 週間反復経口投与試験と同様の血液学的パラメータの変化が認められた。病理組織学的所見は、精巣の所見を除いて回復又は回復傾向を示した。30 mg/kg／日群の雄での早期安楽殺に基づき、HNSTD は、雄で 15 mg/kg／日（Cmax 及び AUClast の平均値は、それぞれ 2150 ng/mL 及び 7360 ng·h/mL）、及び雌で 30 mg/kg／日（Cmax 及び AUClast の平均値は、それぞれ 4100 ng/mL 及び 19,600 ng·h/mL）と判断した。

## 4.3　遺伝毒性試験

バレメトスタットトシル酸塩の遺伝毒性を、細菌を用いた復帰突然変異試験、in vitro 小核試験、及び経口投与によるラット骨髄及び肝小核試験で評価した。

細菌を用いた復帰突然変異試験では、代謝活性化系の有無にかかわらず、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

In vitro 小核試験では、代謝活性化系存在下の 6 時間処理群で、統計学的に有意な小核を有する細胞数の増加が認められた。

In vivo 小核試験では、バレメトスタットトシル酸塩を単回投与した雄性ラットの骨髄で、小核を有する多染性赤血球の出現頻度に有意な増加は認められなかった。

肝臓を用いた小核試験では、部分肝切除の約 24 時間前及び約 24 時間後にバレメトスタットトシル酸塩をそれぞれ 1 回投与した雄性ラットを用いて評価した。その結果、小核を有す

る肝細胞の出現頻度に有意な増加は認められなかった。

以上の結果から、バレメトスタットトシル酸塩が in vivo で遺伝毒性を示す可能性は低いことが示された。

## 4.4　がん原性試験

ICH S9 に基づき、がん原性試験は実施しなかった。

## 4.5　生殖発生毒性試験

ICH S9 に基づき、受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験及び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。

### 4.5.1　胚・胎児発生毒性試験

胚・胎児発生に関する予備試験では、バレメトスタットトシル酸塩を 20、60、及び 200 mg/kg／日の用量で妊娠ラットの妊娠 7～17 日（着床から硬口蓋閉鎖までの期間）に 1 日 1 回反復経口投与し、母動物及び胚・胎児発生に及ぼす影響を検討した。

20 mg/kg／日群で体重増加抑制がみられ、60 mg/kg／日以上の群で体重及び摂餌量の低値が認められた。

20 mg/kg／日群では、着床後胚欠損率の高値がみられ、60 mg/kg／日以上の群では、母動物全例で全胚・胎児死亡が認められた。20 mg/kg／日群の生存胎児では、内臓異常はみられなかったが、肋骨欠損、腰椎欠損、頸肋、肋骨短小、及び胸椎体分離などの骨格異常又は骨格変異が高頻度に認められた。したがって、バレメトスタットトシル酸塩はすべての用量で母動物の毒性及び胚・胎児致死を誘発し、20 mg/kg／日で催奇形性を示したことから、母動物の一般毒性及び生殖の NOAEL、並びに次世代発生の NOAEL は決定できなかった。

## 4.6　局所刺激性試験

投与経路が経口投与であるため、局所刺激性試験は実施しなかった。

イヌ 13 週間反復経口投与試験では、7.5 mg/kg／日群で陰茎包皮に、15 mg/kg／日以上の群で陰嚢皮膚及び結膜に、30 mg/kg／日群では眼周囲皮膚及び角膜に炎症性の組織学的変化が認められ、バレメトスタットトシル酸塩の局所刺激性との関連性が否定できなかった。

## 4.7　その他の毒性試験

### 4.7.1　バレメトスタットトシル酸塩のラット 13 週間反復投与試験で観察されたリンパ腫及びリンパ芽球の免疫組織化学染色による探索

ラット 13 週間反復経口投与試験（4.2.1）で認められたリンパ腫及び胸腺のリンパ芽球の免疫学的表現型を確認する目的で、この試験で取得した未染色標本を用いて cluster of differentiation（CD）マーカーの IHC を実施した。

胸腺、腎臓、脾臓、リンパ節、肝臓、及び肺でみられたリンパ腫は、T リンパ球のマーカ

ーである CD3 ε 及び CD8 α 陽性であったが、B リンパ球のマーカーである CD79 α 陰性であった。このことから、ラット試験でみられたリンパ腫は T 細胞リンパ腫であると考えられた。リンパ芽球過形成がみられた標本では、胸腺皮質のリンパ球は CD3 ε と CD8 α 陽性であったが、200 mg/kg／日群では CD3 ε 陽性細胞の方が CD8 α 陽性細胞よりも高頻度に認められた。本試験の結果と胸腺皮質での T リンパ球の CD3 及び CD8 の発現パターンから、過形成を起こしているリンパ芽球は CD4 及び CD8 共陰性（CD4 and CD8 double negative: DN）3、DN4、及び CD4 及び CD8 共陽性（CD4 and CD8 double positive: DP）T 細胞からなり、リンパ芽球の増殖はモノクローナル性ではないことが示唆された。

### 4.7.2　バレメトスタットトシル酸塩の 3 ヵ月間反復経口投与によるラット胸腺に対する探索毒性試験

バレメトスタットトシル酸塩のラット 13 週間反復経口投与試験で観察されたリンパ腫の発生機序を検討するため、バレメトスタットトシル酸塩を 20 mg/kg／日の用量で雄性 Crl:CD(SD)ラットに 1 ヵ月、2 ヵ月、又は 3 ヵ月間反復経口投与し、胸腺及び末梢血中のリンパ球サブセット解析を実施するとともに、胸腺について遺伝子発現解析を実施した。投与に起因する死亡が投与 71 日目に認められた。また、2 例が瀕死又は体重減少のため、投与 65 日目及び 71 日目に早期解剖された。病理組織学的検査では、胸腺及び他臓器に浸潤したリンパ腫が認められた。加えて、3 ヵ月投与群の 1 例でリンパ腫が認められた。結果として、リンパ腫は過去に実施したラット 13 週間反復経口投与試験において 20 mg/kg／日群で認められた発生率とほぼ同等であった。末梢血又は胸腺を用いた解析の結果、バレメトスタットトシル酸塩により誘発されるリンパ腫では、末梢血中で未熟 T 細胞数が増加し、胸腺では CD3 陽性 T 細胞数及び CD8 陽性 T 細胞数の増加を示す特徴的な T 細胞分化が認められた。癌遺伝子の活性化、がん抑制遺伝子の抑制、又は T 細胞分化の異常が、ラットにおけるリンパ腫の発症機序であることが示唆された。

### 4.7.3　バレメトスタットトシル酸塩の 3 ヵ月間反復経口投与によるラット胸腺に対する毒性試験

ラットでみられたリンパ腫の発生機序及びリンパ腫発症に至る変化の回復性を調べるため、バレメトスタットトシル酸塩を 20 又は 60 mg/kg／日の用量で雄性 Crl:CD(SD)ラットに 3 ヵ月間投与した。その結果、20 mg/kg／日群では、回復群の動物を含む計 7 例が体重減少のため早期解剖された。リンパ腫は、20 mg/kg／日群の早期解剖例に加え 2 ヵ月及び 3 ヵ月投与動物で認められ、その頻度は先に実施されたラット 13 週間反復経口投与試験と同程度であった。一方、60 mg/kg／日群では、ラット 13 週間反復経口投与試験と同様にリンパ腫は認められなかった。20 mg/kg／日群では、胸腺の DP T 細胞における MYC、DN T 細胞、制御性 T 細胞（regulatory T cell: Treg）、及びインターフェロン関連遺伝子の変動が、CD3 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、CD8 及び T-cell receptor αβ（CD8 and T-cell receptor αβ: αβ）陽性 T 細胞、DP T 細胞、又は DN T 細胞の増加を特徴とするリンパ腫発症に関係していると考え

られた。また、胸腺 T 細胞におけるゲノム突然変異はリンパ腫発症には関与していなかった。しかし、末梢血 CD3 陽性細胞を用いた経時的な検査では、リンパ腫に至る変化を確認することができなかった。さらにバレメトスタットトシル酸塩によるリンパ腫発症に至る変化の回復性は、この試験では結論することができなかった。

### 4.7.4　バレメトスタットトシル酸塩の 3 ヵ月間反復経口投与による加齢ラット胸腺に対する毒性試験

バレメトスタットトシル酸塩によるリンパ腫が加齢ラットでも発症するか検討するため、バレメトスタットトシル酸塩を 10 又は 20 mg/kg／日の用量で雄性 Crl:CD(SD)ラット（投与開始時 55 週齢）に 3 ヵ月間反復経口投与した。胸腺の病理組織学的検査に加え、胸腺のリンパ球サブセット解析を実施した。その結果、CD4 陽性 T 細胞の絶対数及び相対数の減少並びに CD8 陽性 T 細胞の相対数の増加が認められた。しかし、先に実施した試験で認められたリンパ腫は、加齢ラットでは認められなかった。

### 4.7.5　光毒性試験

マウス線維芽細胞である Balb/c 3T3 A31 クローンを用いて、紫外線 A 波（ultraviolet light A: UVA）非照射及び照射の両条件下でニュートラルレッド取り込みアッセイを行い、バレメトスタットトシル酸塩の光毒性を評価した。用量設定試験の結果から、本試験では、Balb/c 3T3 細胞にバレメトスタットトシル酸塩を 0.781～100 μg/mL で 1 時間処理後に紫外線 A 波を照射（5 J/cm$^2$）した。その結果、$IC_{50}$ 値を算出できなかったため、光毒性係数は算出できなかった。平均光作用（mean photo effect: MPE）は−0.008（MPE が 0.1 未満で光毒性なし）であった。以上の結果より、バレメトスタットトシル酸塩は光毒性を示さないと判断した。

# 5. 総括及び結論

## 5.1 薬理

バレメトスタットトシル酸塩の薬理活性及び作用機序は in vitro 及び in vivo で確認した。バレメトスタットトシル酸塩は、EZH1 及び EZH2 のメチルトランスフェラーゼ活性に対して阻害作用を示した。また、酸化代謝物 CALZ-1809a は、バレメトスタットトシル酸塩に比べ弱いながら、EZH1 及び EZH2 に対して阻害活性を示した。バレメトスタットトシル酸塩は、ヒト大腸癌細胞の HCT116 細胞において、EZH2 阻害剤と比較して、H3K27 のトリメチル化を阻害した。また、CALZ-1809a は、バレメトスタットトシル酸塩に比べ弱いながら、H3K27 のトリメチル化を強く阻害した。バレメトスタットトシル酸塩は、ヒト造血器腫瘍細胞株 KARPAS-422（DLBCL）、MV-4-11（AML）、MM.1S（MM）、TL-Om1（ATL）に対して、対照薬 EZH2 阻害剤よりも強力な増殖抑制活性を示したことから、バレメトスタットトシル酸塩は造血器腫瘍細胞に対して増殖抑制を誘発する抗腫瘍薬として高い効力を有することが示唆された。また、CALZ-1809a は、バレメトスタットトシル酸塩に比べ極めて弱い増殖抑制活性を示した。バレメトスタットトシル酸塩（1.56～100 mg/kg／日）は、機能獲得型変異 EZH2 を発現する KARPAS-422 の皮下移植腫瘍モデルに対して、用量依存的に有意な抗腫瘍効果を示した。対照薬である EZH2 阻害剤（タゼメトスタット）は、200 mg/kg／日で有意な抗腫瘍効果を示さなかった。

心血管系安全性薬理は、in vitro の hERG 試験、並びにイヌの 4 週間反復経口投与試験における心電図評価及びイヌのテレメトリー試験にて評価した。hERG 試験では、$IC_{50}$ 値は 100 μmol/L（66 μg/mL）より高かった。しかし、イヌの 4 週間反復経口投与試験で心電図検査を実施した結果、約 4 週間の反復経口投与後、30 及び 60 mg/kg／日群の雌のみで QTc 間隔の延長が認められた。最大延長率は、30 mg/kg／日群で 11%、60 mg/kg／日群で 19%であった。イヌのテレメトリー試験では 60 mg/kg／日群で 7 日間投与後に有意な QTc 間隔の延長が認められた。延長の程度は 4 週間反復経口投与試験と比較して弱く、15 mg/kg／日群では有意な延長はみられなかった。したがって、バレメトスタットトシル酸塩は 15 mg/kg／日を超える用量で軽度の QTc 間隔の延長作用を示すと判断し、NOAEL は 15 mg/kg／日と判断した。イヌの 13 週間反復経口投与試験で心電図検査を実施した結果、最高用量である 30 mg/kg／日までバレメトスタットトシル酸塩に関連する変化は認められず、イヌの 4 週間反復経口投与試験でみられた QTc 間隔の延長は、投与期間の延長によって増悪しなかった。

ラット 4 週間反復経口投与試験において、中枢神経系機能及び呼吸器系機能に対するバレメトスタットトシル酸塩の影響を、60、200、及び 600 mg/kg／日の用量で評価した。その結果、バレメトスタットトシル酸塩の全投与群で、投与に起因する立ち上がり行動の減少が認められたが、この所見は一過性であり、その他の行動所見を伴わなかったため、毒性学的意義はないと判断した。また、呼吸器系機能にはバレメトスタットトシル酸塩に関連する影響はみられなかった。

## 5.2 薬物動態

ラットにバレメトスタットトシル酸塩（20～200 mg/kg）を単回経口投与したとき、バレメトスタットの全身曝露量は雌雄ともに用量比を上回って増加したが、明確な性差は認められなかった。Tmax は 2～8 時間の範囲であった。イヌにバレメトスタットトシル酸塩（15～60 mg/kg）を単回経口投与したとき、雌雄のイヌにおいてバレメトスタットの全身曝露量は用量の増加に伴って増加した。Tmax は 0.5～1 時間の範囲であった。t1/2 は雌雄ともに約 3 時間であった。

雄性ラット及び雄性イヌにそれぞれ 20 及び 15 mg/kg でバレメトスタットトシル酸塩を単回経口投与したときのバイオアベイラビリティは、雄性ラット及び雄性イヌにバレメトスタットトシル酸塩を 1 mg/kg で単回静脈内投与したときの全身曝露量から算出すると、それぞれ約 5.2%及び約 71.4%であった。

絶食下の雄性イヌに［$^{14}$C］バレメトスタットを 3 mg/kg の用量で単回経口投与及び単回静脈内投与したときの血漿中放射能の AUCinf は、それぞれ 1760 及び 3010 ng eq.h/mL であった。血液中の放射能濃度-時間プロファイルは血漿中放射能濃度とほぼ同様であった。

組織分布は QWBA を用いて評価した。アルビノラットでは、投与 168 時間後に放射能が検出可能であった組織は、大腸内容物、顎下腺、及び精巣のみであった。有色ラットの眼球及びぶどう膜では、放射能は投与 168 時間後まで検出され、メラニン親和性の可能性が示唆された。

バレメトスタットの血漿蛋白結合率（0.6～10 µg/mL）は、マウス、ラット、イヌ、及びヒトの血漿中で 58.1%～96.6%であった。マウス、イヌ、及びヒト血漿では濃度依存性が確認されたが、ラット血漿では確認されなかった。バレメトスタットのヒト血漿蛋白結合率は、他の動物種における結合率と比較して高い傾向が認められた。バレメトスタットの AAG への結合は、HSA と比較して高く、バレメトスタットは主に AAG に結合することが示唆された。［$^{14}$C］バレメトスタット（0.3～5 µg/mL）の血球移行率は、マウス、ラット、イヌ、及びヒトで 12.3%～50.7%であった。

肝細胞を用いた代謝比較試験では、ラット及びイヌにおいてバレメトスタットの代謝が認められ、検出された主な代謝物は酸化体及び *N*-脱メチル化体であった。また、［$^{14}$C］バレメトスタットはヒト凍結肝細胞中ではほとんど代謝されなかったものの、主な代謝反応は酸化であった。

［$^{14}$C］バレメトスタットをイヌに 3 mg/kg の用量で単回経口投与後に得られた血漿、尿、糞、及び胆汁中代謝を分析した。血漿、尿、糞、及び胆汁中の主要成分はバレメトスタットであった。血漿、尿、糞、及び胆汁中で認められた主な代謝物は酸化体及び *N*-脱メチル化体であった。酸化体である CALZ-1809a は尿、糞、及び胆汁試料中で、*N*-脱メチル体である CALZ-1810a は血漿、糞及び胆汁中で検出された。

また、胆汁中では他の酸化体である CALZ-1808a 及び CALZ-1811a が低濃度で検出され、血漿では CALZ-1808a がわずかに検出された。なお、CALZ-1809a 及び CALZ-1810a はヒト血漿中でも検出された（2.7.2）。

［$^{14}$C］バレメトスタットをイヌに単回経口投与後、168 時間後までに投与した放射能の 6.0%が尿中に、91.0%が糞中に排泄された。［$^{14}$C］バレメトスタットを単回静脈内投与後、投与 168 時間後までに投与した放射能の 10.0%が尿中に、89.9%が糞中に排泄された。胆管カニューレを挿入したイヌに［$^{14}$C］バレメトスタットを単回経口投与後、投与 24 時間後までに投与した放射能の 45.8%が胆汁中に排泄された。以上から、［$^{14}$C］バレメトスタットの主排泄経路は胆汁を介した糞中排泄であることが示された。

## 5.3　毒性

バレメトスタットトシル酸塩による毒性標的臓器はラットとイヌで概ね類似しており、イヌでは骨髄、リンパ細網組織、消化管、腎臓、及び雄性生殖器に、ラットではリンパ細網組織、骨、肝臓、腎臓、雄性生殖器、及び雌性生殖器に毒性所見が認められた。

ラット又はイヌにバレメトスタットトシル酸塩を単回経口投与したとき、ラットでは、200 mg/kg の用量まで毒性変化は認められなかった。イヌでは、30 mg/kg 以上の群で主に一般状態変化を伴う血漿中ヒスタミン濃度の上昇が認められた。イヌで認められた発赤及び腫脹は投与後 1 時間以内に認められたヒスタミン遊離に関連していると思われ、反復経口投与試験のイヌにおける影響と一致していた。なお、イヌ DRF 試験では、単回投与後に 100 mg/kg／日群の 1 例を一般状態の悪化により早期解剖した。単回投与時の概略の致死量は、ラットでは 200 mg/kg 超であり、イヌでは 100 mg/kg と判断した。

4 週間までの反復経口投与試験では、ラットでは 600 mg/kg／日以上、イヌでは 60 mg/kg／日以上の用量で忍容性を示さず死亡が認められた。死亡に先立って、瀕死状態に関連する複数の重篤な一般状態変化がみられ、体重及び摂餌量の減少が認められた。

DRF 試験及び 4 週間反復経口投与試験で早期解剖された動物では、血液学的検査で汎血球減少がみられ、骨髄の細胞密度低下と相関していた。同様の変化は生存動物でも認められたが、その程度は弱かった。さらに、胸腺、脾臓、又はリンパ節を含むリンパ細網組織で萎縮が認められた。骨髄細胞密度低下は、分裂阻害作用を有する抗がん剤投与による骨髄抑制として知られている所見である[1]ことから、造血器への影響はバレメトスタットトシル酸塩の細胞分裂抑制による影響の可能性が考えられた。一方、ラットでみられたリンパ組織への影響の大部分は、体重及び摂餌量の減少、血液化学的検査値の変化、及び副腎皮質肥大との関連を考慮すると、ストレス関連の変化である可能性が考えられた[2]。

ラットで、消化管に病変が観察された。剖検では、異常内容物、並びに多発性の暗色巣又は陥凹領域が認められた。内容物は灰白色の摂取物であり、病理組織学的検査では、主に粘膜下織に至る粘膜のびらん又は単核細胞浸潤を伴う拡張が認められた。このびらん及び摂取物の蓄積による消化管運動低下が途中死亡に関連した可能性がある。同様の病理組織学的変化は早期に死亡したイヌでも認められ、胃の単核細胞浸潤並びに小腸の細胞浸潤及び粘膜変性がみられたが、その発生機序は不明であった。これらの消化管病変は死亡例より重症度は低いが生存例でも認められた。

早期解剖された雄性ラットでは、剖検時に多発性の腎皮質褪色巣が認められ、限局性から

多発性の尿細管変性と関連しており、一般状態の悪化に至った一因と考えられた。MTD を超える用量のバレメトスタットトシル酸塩を投与されたイヌの生存例及び死亡例では、いずれにおいても皮質及び皮髄境界部におけるびまん性の尿細管変性が認められ、死亡に関係した可能性がある。

ラット DRF 試験では、100 mg/kg／日以上の群で、脳、腎臓、肝臓、肺、及び消化管を含む様々な臓器にリン脂質症（phospholipidosis: PLD）を誘発する可能性を示唆する空胞化又は泡沫細胞浸潤が認められた。薬物性 PLD は長期投与後に発生する傾向にあり、投与中止後にしばしば回復するためその意義は明らかになっていない。さらに、薬物性 PLD が永続的損傷の原因となるという決定的な証拠は得られていない[3]。

ラット DRF 試験の 100 mg/kg／日以上及びラット 13 週間反復経口投与試験の 20 mg/kg／日以上の群で骨に対する毒性変化が認められ、骨芽細胞の巣状増殖あるいはびまん性の骨の過骨化がみられた。頭蓋骨及び大腿骨では骨の肥厚も認められ、60 mg/kg／日以上の群では 4 週間の回復期間後でも回復しなかった。

EZH2 阻害による骨形成に対する影響としては、polycomb repressive complex 2-EZH2 複合体のエピジェネティックな阻害又は EZH2 の直接阻害による可能性が示されている[4]。EZH2 阻害による影響はラット DRF 試験における 100 mg/kg／日以上の群でみられた骨芽細胞の増殖と関連している可能性があるが、その発症機序は不明である。EZH1 又は 2 阻害と過骨化との関係性についても不明である。EZH1 又は 2 をノックアウトしたマウスでは、成長板の変形及び骨の長軸方向への成長不全を誘発する軟骨細胞増殖の抑制が示されている[5]。このことは、バレメトスタットトシル酸塩を投与されたラットの予備的 EFD 試験でみられた骨格異常及び骨格変異と一致する。しかし、EZH1 又は 2 機能の消失がラット 13 週間反復経口投与試験でみられた過骨化に関与するかは不明である。

ラット 13 週間反復経口投与試験では、200 mg/kg／日群の雄において、精巣、精巣上体、前立腺、精嚢腺、及び乳腺で所見が認められた。精巣では、肉眼的に弛緩した外観及び小型化がみられ、精上皮の変性又は萎縮が認められた。精巣の所見は、精巣上体における管腔内の精子数減少を伴っていた。加えて、肉眼的な小型化を伴う前立腺及び精嚢腺の萎縮と乳腺の小葉腺胞の萎縮が認められた。

4 週間の回復期間終了後も精巣における精上皮の消失は完全には回復せず、精巣上体における管腔内の精子数減少と関連していた。精巣上体では体部で上皮の空胞化も認められた。

200 mg/kg／日群の雌の生存例では、卵巣、子宮、膣、及び子宮頸部で萎縮が認められ、1 例では子宮水腫を伴っており、膣上皮の形態は持続的な発情休止期の像と一致していた。1 例では卵巣で黄体の肥大が認められた。この変化は膣上皮及び子宮頸部上皮の粘液化と関連しており、乳腺の小葉腺房の過形成を伴っていた。

4 週間の回復期間終了後にも子宮頸部及び子宮の変化は完全には回復せず、子宮水腫に伴う萎縮が認められた。子宮頸部では、上皮変性に伴う粘膜の好中球浸潤が認められ、1 例では上皮のムチン化も認められた。その他の雌性生殖器でみられた所見は、いずれも回復期間後に回復した。

イヌ 13 週間反復経口投与試験では、すべての投与量で精巣毒性が認められた。30 mg/kg／日群では、精巣で精上皮の萎縮に伴う間細胞（ライディッヒ細胞）の肥大／過形成が認められた。精巣上体では、すべての投薬群のイヌで管腔内精子のびまん性減少（無精子症）が認められた。これら精巣及び精巣上体の変化は 4 週間の回復期間終了後も回復しなかった。

全身及び耳介の発赤又は腫脹は、イヌで高頻度に認められた一般状態変化であるが、投与の延長により減弱傾向を示した。これらの所見は、イヌ 4 週間反復経口投与試験の投与 1～3 日目の投与後 1 時間以内に認められたヒスタミン遊離に関連する可能性が高いと考えられた。同様のヒスタミン遊離に関連した変化は DRF 試験でも認められた。これに対し、ラットではヒスタミン遊離は認められなかった。イヌは、ヒト臨床用医薬品として販売承認されている薬剤のヒスタミン遊離作用に対して最も高い感受性を示す動物種であることが知られている。これらの薬剤にはポリアミン系及びフルオロキノロン系化合物が含まれるが[6,7]、イヌで高い感受性を示すヒスタミン遊離刺激物質[8]をヒトに臨床使用しても、イヌでみられる症状変化は認められていない。

イヌ 4 週間反復経口投与試験では、投与前及び投与約 1 時間後に実施した心電図検査において、30 mg/kg／日以上の群の雌で用量依存的な QTc 間隔の延長が認められた。回復期間の検査では、QTc 間隔の延長は認められなかった。この結果は、テレメトリーを装着したイヌを用いて実施した試験において、60 mg/kg／日群で軽度な QTc 間隔の延長がみられたことと一致した。しかし、イヌ 13 週間反復経口投与試験では、投与 4 週目及び 13 週目の検査では 30 mg/kg／日群まで QTc 間隔の延長は認められなかった。

ラット及びイヌ 13 週間反復経口投与試験で認められたバレメトスタットトシル酸塩に関連する所見は、先に実施した 4 週間までの反復投与試験で認められた所見と概ね同様であったが、新たな所見も認められた。ラット 13 週間反復経口投与試験の主な所見は、低用量（20 mg/kg／日）群で認められた種々の臓器に浸潤するリンパ腫であった。CD マーカーを用いた IHC 染色の結果、胸腺、腎臓、脾臓、リンパ節、肝臓、及び肺のリンパ腫細胞は、T リンパ球マーカーである CD3 ε 及び CD8 α 陽性であったが、B リンパ球マーカーである CD79 α 陰性であることが示され、リンパ腫が T 細胞リンパ腫であることが確認された。リンパ芽球の過形成がみられた胸腺皮質のリンパ球も CD3 ε 及び CD8 α 陽性であった。しかし、200 mg/kg／日群では CD3 ε 陽性細胞の方が CD8 α 陽性細胞よりも高頻度に認められ、過形成を起こしているリンパ芽球は DN3、DN4、及び DP 細胞からなることが示唆された。これらのリンパ芽球が複数のフェノタイプで構成されていたことから、モノクローナル性増殖ではないと考えられた。

また、20 mg/kg／日以上の群で、リンパ組織萎縮が胸腺及びリンパ節で認められた。関連所見として、60 mg/kg／日以上の群で胸腺重量の減少、200 mg/kg／日群で血中リンパ球数の減少が認められた。早期及び試験終了時に安楽殺されたラットの胸腺では、リンパ芽球の過形成もみられた。この所見は、バレメトスタットトシル酸塩のリンパ細網系への作用に対する再生応答と判断された。回復期間終了時にはリンパ組織萎縮は完全に回復し、胸腺重量及び血中リンパ球数の変化も回復した。

ラット 13 週間反復経口投与試験で認められたリンパ腫の原因を調べるため、雄性ラットにバレメトスタットトシル酸塩を 20 mg/kg／日の用量で 1 ヵ月、2 ヵ月、又は 3 ヵ月間投与し、各時点で胸腺及び末梢血の評価を探索的に行った。その結果、バレメトスタットトシル酸塩によって誘発されたリンパ腫を有する動物では、末梢血中の未熟 T 細胞数の増加及び胸腺中の CD3 陽性 T 細胞数及び CD8 陽性 T 細胞数の増加を特徴とする特有の T 細胞分化が認められた。さらに、癌遺伝子の活性化、癌抑制遺伝子の抑制、又は T 細胞の分化異常は、ラットにおけるリンパ腫の発症に関係していることが示唆された。

ラットでみられたリンパ腫の発生機序及びリンパ腫発症に至る変化の回復性を調べるための追加試験を、雄性ラットを用いて実施した。20 又は 60 mg/kg／日の用量でラットに 2 又は 3 ヵ月間投与し、先に評価した探索試験と同様の検査項目について評価した。さらに本試験では、リンパ腫に至る初期変化を調べるために、同一動物について経時的な末梢血の評価を実施するとともに、休薬後に投与期間中にみられたリンパ腫に至る変化の回復性を評価した。その結果、60 mg/kg／日群では、ラット 13 週間反復経口投与試験と同様にリンパ腫は認められなかった。一方、20 mg/kg／日群では、これまでの試験と同様にリンパ腫が認められ、胸腺の DP T 細胞における MYC、DN T 細胞、Treg、及びインターフェロン関連遺伝子の変動が、CD3 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、αβ 陽性 T 細胞、DP T 細胞、又は DN T 細胞の増加を特徴とするリンパ腫発症に関係していると考えられた。また、胸腺について実施した whole genome sequence では、ゲノム突然変異はリンパ腫発症には関与していなかった。しかし、末梢血の経時的な評価では、リンパ腫に至る初期の変化を捉えることはできず、末梢血ではリンパ腫検出に有用なバイオマーカーを見出すことができなかった。また、数例の動物で休薬期間中にリンパ腫が認められたが、いずれの検査でもリンパ腫発症に至る初期変化を検出できなかったことから、バレメトスタットトシル酸塩によるリンパ腫発症に至る変化の回復性は、この試験では結論することができなかった。

バレメトスタットトシル酸塩により誘発されるリンパ腫の、高年齢の患者に対する外挿性を検討するため、加齢ラット（投与開始時 55 週齢）に、より若いラット（投与開始時約 8 週齢）でリンパ腫を誘発した 20 mg/kg／日までの用量を投与し、胸腺への影響を探索的に評価した。その結果、胸腺のリンパ球サブセット解析において、20 mg/kg／日群で CD4 陽性 T 細胞の絶対数及び相対数の減少及び CD8 陽性 T 細胞の相対数の増加が認められた。これらの結果は、バレメトスタットトシル酸塩は加齢ラットにおいても胸腺の T 細胞分化に影響を及ぼすことを示唆するものである。一方、同用量を投与したより若いラットを用いた試験とは異なり、加齢ラットではリンパ腫は認められなかった。結論として、バレメトスタットトシル酸塩は加齢ラットの胸腺における T 細胞分化に影響するが、20 mg/kg／日の用量を投与された若い動物を用いた試験で認められたリンパ腫は、加齢ラットでは認められなかった。

イヌ 13 週間反復経口投与試験では、投与 49 日目以降に陰嚢皮膚に生じた裂傷に関連した早期安楽殺がみられた。陰嚢の病変は 15 mg/kg／日群の雄でも認められたが、30 mg/kg／日群と比較して軽度かつ忍容性を示した。陰嚢皮膚の病理組織学的検査では、早期安楽殺され

たイヌで表皮及び真皮の炎症性変化並びに表皮のびらん／潰瘍がみられた。15 mg/kg／日以上の群の生存例では、全例で回復傾向が認められた。

陰嚢皮膚及び陰茎包皮に形態変化を引き起こした原因は不明であったが、環境有害物質による化学刺激（刺激性接触皮膚炎）と同質の変化と考えられた[9,10]。顔面皮膚及び結膜の所見は、環境有害物質が付着した足蹠を介して自ら誘発した可能性があるが、これらの所見を誘発した刺激物質の種類は特定できなかった。対照群の陰嚢皮膚でも軽微な刺激性の所見が認められたが、皮膚炎及び結膜炎の発現頻度及び重症度が対照群よりバレメトスタットトシル酸塩投与群で高かったことを考慮すると、被験物質が局所（皮膚／眼）刺激物質として関与した可能性は否定できなかった。

足蹠発赤が発現した原因のもう 1 つの説明としては、投与開始 3 日後まで、ヒスタミン遊離が投与 1 時間以内に認められたことが考えられる。眼又は耳介にもヒスタミンに関連すると考えられる発赤が認められ、結膜炎の所見もヒスタミン遊離を原因とする可能性がある。

In vitro 遺伝毒性試験の結果、細菌を用いた復帰突然変異試験は陰性であったが、in vitro 小核試験では、小核を有する細胞の出現頻度の増加が認められた。しかし、ラットの骨髄及び肝臓を用いた小核試験は陰性であり、バレメトスタットトシル酸塩が in vivo で遺伝毒性を示す可能性は低いことが示された。

Balb/c 3T3 細胞を用いた評価では、バレメトスタットトシル酸塩は光毒性を示さないと判断された。

ラットの予備的な EFD 試験では、20 mg/kg／日以上の全用量群の母動物で毒性が認められた。胎児では、20 mg/kg／日群で着床後胚損失率が高値であり、60 mg/kg／日以上の群の全母動物において全胚・胎児死亡がみられた。20 mg/kg／日群の生存胎児では、骨格異常又は骨格変異が高頻度に認められた。結果として、母動物及び胎児の NOAEL は定められず、バレメトスタットトシル酸塩には催奇形性があると判断された。

バレメトスタットトシル酸塩を用いた反復経口投与試験によって、毒性標的と考えられる臓器及びほぼ忍容性を示す用量及び曝露が確認された。

ラット 13 週間反復経口投与試験でリンパ腫が認められたのと異なり、バレメトスタットトシル酸塩は加齢ラットではリンパ腫を誘発しなかった。ラット 13 週間反復経口投与試験で認められたラットリンパ腫がヒトでのリスクを意味するか否かは現時点では明らかではない。期待される臨床でのベネフィットとこの潜在的なリスクを考慮の上、バレメトスタットトシル酸塩を投与される患者では、慎重なモニタリングにより臨床的ベネフィットを得られると考えられる。

バレメトスタットトシル酸塩の毒性プロファイルは、一般毒性試験、遺伝毒性試験、生殖発生毒性試験、及びその他ラットにおけるリンパ腫の発症機序を検討するために実施した探索的試験で評価した。ラット及びイヌ両種における主な標的臓器は骨髄／末梢血造血、リンパ細網系、消化管、雄性生殖器、及び腎臓であり、さらにラットでは骨、肝臓、及び雌性生殖器、イヌで陰嚢に変化がみられた。一般状態変化を伴うヒスタミン遊離はイヌで認められ、病理組織学的なリンパ腫はラットで認められた。これらの標的臓器の一部は回復期間終

了後に回復性を示した。

## 5.4　曝露マージン

バレメトスタットトシル酸塩の推奨臨床用量である 200 mg／日における曝露との比較に基づく曝露マージンを表 2.4.5-1 に示す。バレメトスタットトシル酸塩の安全域は概ね狭く、軽度～重篤な毒性を伴うが、げっ歯類及び非げっ歯類両種で認められた標的毒性のプロファイル、重篤度、及び回復性に基づき、進行癌患者にバレメトスタットトシル酸塩を長期連日投与することは、非臨床のデータから妥当と判断した。

**表 2.4.5-1　予想臨床用量及び非臨床試験における全身曝露量の比較に基づくバレメトスタットトシル酸塩の曝露マージン**

| 動物種 | 試験種 | 用量 (mg/kg／日) | | | 平均 AUClast (ng·h/mL) | MoE[a] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ヒト | DS3201-A-J101 | 200 mg/day | | | 19,600[b] | - |
| ラット | 単回 | NOAEL | 雄 | 200 | 13,800 | 0.70× |
| | | | 雌 | 200 | 23,400 | 1.2× |
| イヌ | 単回 | NOAEL | 雄 | 15 | 10,200 | 0.52× |
| | | | 雌 | 15 | 7850 | 0.40× |
| ラット | 4 週間 | $STD_{10}$ | 雄 | 200 | 20,500 | 1.0× |
| | | | 雌 | 200 | 20,300 | 1.0× |
| イヌ | 4 週間 | HNSTD | 雄 | 30 | 32,600 | 1.7× |
| | | | 雌 | 30 | 32,200 | 1.6× |
| ラット | 13 週間 | $STD_{10}$ | 雄 | <20 | 3380 | <0.17× |
| | | | 雌 | <20 | 2010 | <0.10× |
| イヌ | 13 週間 | HNSTD | 雄 | 15 | 7360 | 0.38× |
| | | | 雌 | 30 | 19,600 | 1.0× |
| ラット | 胚胎児毒性 | NOAEL[c] | 雌 | <20 | 977[d] | <0.050× |

NOAEL: 無毒性量、HNSTD: 重篤な毒性が発現しない最大用量、$STD_{10}$: 供試動物の 10%に重篤な毒性が発現する用量
a: ヒト全身曝露量に対する曝露マージン
b: AUCtau（cycle 1、Day 15）（添付資料番号 5.3.3.2-1）
c: 胚・胎児発生に対する無毒性量
d: 13 週間投与試験の 20 mg/kg／日における雌ラットの投与 28 日目における全身曝露量

## 6. 参考文献一覧

1. Greaves P. Histopathology of Preclinical Toxicity Studies: interpretation and relevance in drug safety studies. 4th ed. Amsterdam: Elsevier B.V.; 2012.
2. Everds NE, Snyder PW, Bailey KL, et al. Interpreting stress responses during routine toxicity studies: a review of the biology, impact, and assessment. Toxicol Pathol. 2013;41(4):560-614.
3. Reasor MJ, Hastings KL, Ulrich RG. Drug-induced phospholipidosis: issues and future directions. Expert Opin Drug Saf. 2006;5(4):567-83.
4. Cao Y, Li L, Fan Z. The role and mechanisms of polycomb repressive complex 2 on the regulation of osteogenic and neurogenic differentiation of stem cells. Cell Prolif. 2021;54(5):e13032.
5. Liu JC, Garrison P, Nguyen Q et al. EZH1 and EZH2 promote skeletal growth by repressing inhibitors of chondrocyte proliferation and hypertrophy. Nat Commun. 2016;7:13685.
6. Mousli M, Bueb JL, Bronner C, et al. G protein activation: a receptor-independent mode of action for cationic amphiphilic neuropeptides and venom peptides. Trends Pharmacol Sci. 1990;11(9):358-62.
7. Mori K, Shibano M, Satoh H, et al. Differential response of mast cells separated from various organs and basophils of dogs to the fluoroquinolone antimicrobial levofloxacin. Arch Toxicol. 2001;75(4):227-33.
8. Mori K, Maru C, Takasuna K. Characterization of histamine release induced by fluoroquinolone antibacterial agents in-vivo and in-vitro. J Pharm Pharmacol. 2000;52(5):577-84.
9. Ginn PE et al. Skin and appendages. In: Maxie MG, ed. Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. 5th ed. Vol 1. Philadephia, PA: Elsevier; 2007:611-3.
10. Diegel KL et al. Integument. In: Haschek WM ed. Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology. 3rd ed. Vol 3. Elsevier; 2013;2253-61.