目次

1. まとめ....5
2. 単回投与毒性試験....9
2.1 ラット....9
2.1.1 ラット拡張型単回経口投与毒性試験....9
2.2 イヌ....10
2.2.1 イヌ拡張型単回経口投与毒性試験....10
3. 反復投与毒性試験....11
3.1 ラット....11
3.1.1 ラット 14 日間反復経口投与毒性試験....11
3.1.2 ラット 4 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験....12
3.1.3 ラット 13 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験....14
3.2 イヌ....16
3.2.1 イヌ 14 日間反復経口投与毒性試験....16
3.2.2 イヌ 4 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験....18
3.2.3 イヌ 13 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験....20
4. 遺伝毒性試験....22
4.1 細菌を用いた復帰突然変異試験....22
4.2 チャイニーズハムスター肺由来細胞を用いた in vitro 小核試験....23
4.3 ラット骨髄小核試験....23
4.4 ラット肝小核試験....23
5. がん原性試験....23
6. 生殖発生毒性試験....23
6.1 バレメトスタットトシル酸塩の経口投与によるラットの胚・胎児発生に関する予備試験....23
7. 局所刺激性試験....24
8. その他の毒性試験....24
8.1 毒性機序研究....24
8.1.1 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検索....24
8.1.2 バレメトスタットトシル酸塩の 3 ヵ月反復経口投与によるラット胸腺に対する探索毒性試験....25
8.1.3 バレメトスタットトシル酸塩の 3 ヵ月反復経口投与によるラット胸腺に対する毒性試験....27
8.1.4 バレメトスタットトシル酸塩の 3 ヵ月反復経口投与による加齢ラット胸腺に対する毒性試験....29

8.2　光毒性試験 30
9.　考察 30
10.　結論 37
11.　参考文献 38

表一覧

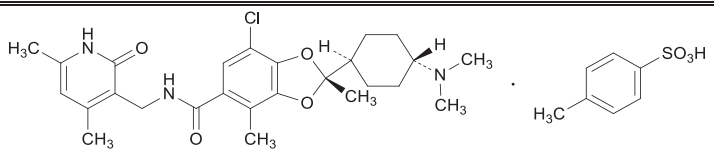
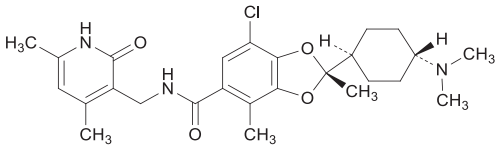
表 2.6.6.1-1　バレメトスタットトシル酸塩の毒性試験の概要 5
表 2.6.6.2-1　ラットにおけるバレメトスタットトシル酸塩の単回経口投与後のトキシコキネティクスパラメータ 9
表 2.6.6.2-2　イヌにおけるバレメトスタットトシル酸塩の単回経口投与後のトキシコキネティクスパラメータ 10
表 2.6.6.3-1　ラットにおけるバレメトスタットトシル酸塩の 14 日間反復経口投与後のトキシコキネティクスパラメータ 12
表 2.6.6.3-2　ラットにおけるバレメトスタットトシル酸塩の 4 週間反復経口投与後のトキシコキネティクスパラメータ 14
表 2.6.6.3-3　ラットにおけるバレメトスタットトシル酸塩の 13 週間反復経口投与後のトキシコキネティクスパラメータ 16
表 2.6.6.3-4　イヌにおけるバレメトスタットトシル酸塩の 14 日間反復経口投与後のトキシコキネティクスパラメータ 17
表 2.6.6.3-5　イヌにおけるバレメトスタットトシル酸塩の 4 週間反復経口投与後のトキシコキネティクスパラメータ 20
表 2.6.6.3-6　イヌにおけるバレメトスタットトシル酸塩の 13 週間反復経口投与後のトキシコキネティクスパラメータ 22
表 2.6.6.8-1　バレメトスタットトシル酸塩の 3 ヵ月反復経口投与によるラット胸腺に対する探索毒性試験の群構成 25
表 2.6.6.8-2　バレメトスタットトシル酸塩の 3 ヵ月反復経口投与によるラット胸腺に対する毒性試験の群構成 27
表 2.6.6.8-3　加齢ラットにおけるバレメトスタットトシル酸塩の 3 ヵ月反復経口投与後のトキシコキネティクスパラメータ 30
表 2.6.6.10-1　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 37

略語一覧

略語	略していない表現（英）	略していない表現（日）
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
αβ	CD8 and T-cell receptor αβ	CD8 及び T-cell receptor αβ
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
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
GALT	gut-associated lymphoid tissue	腸管関連リンパ組織
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
GSEA	gene set enrichment analysis	－
H3K27me3	trimethylated histone H3 lysine 27	トリメチル化されたヒストン H3 の 27 番目のリジン残基
HNSTD	highest non-severely toxic dose	重篤な毒性が発現しない最大用量
IHC	immunohistochemistry	免疫組織化学
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
PEG	polyethylene glycol	ポリエチレングリコール
PLD	phospholipidosis	薬物誘発性リン脂質症
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
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
Treg	regulatory T cell	制御性 T 細胞
UVA	ultraviolet light A	紫外線 A 波

－：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	

1. まとめ

バレメトスタットトシル酸塩の毒性プロファイルを、ラット及びイヌの拡張型単回経口投与試験（主試験）及び反復経口投与試験（用量設定［dose range finding: DRF］試験及び主試験）にて評価した。ラット（20、60、又は 200 mg/kg）及びイヌ（15、30、又は 60 mg/kg）の拡張型単回経口投与試験では、バレメトスタットトシル酸塩を単回経口投与後、14 日間の投与後観察期間を設けて無毒性量（no observed adverse effect level: NOAEL）を求めた。ラット（10、100、又は 1000 mg/kg／日）及びイヌ（30、100、又は 300 mg/kg／日）の DRF 試験では、バレメトスタットトシル酸塩を 1 日 1 回 14 日間反復経口投与し、最大耐量（maximum tolerated dose: MTD）を求めた。ラット（20～600 mg/kg／日）及びイヌ（7.5～60 mg/kg／日）の主試験では、バレメトスタットトシル酸塩を 4 又は 13 週間投与後、4 週間の回復期間を設けた。遺伝毒性は、in vitro 及び in vivo 遺伝毒性試験で評価した。バレメトスタットトシル酸塩の光毒性は、Balb/c 3T3 細胞を用いた in vitro 試験で評価した。また、ラットの予備的な胚・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。ラット及びイヌの 14 日間 DRF 試験、ラットの予備的な EFD 試験、並びに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以外のすべての毒性試験は、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（Good Laboratory Practice: GLP）に準拠して実施した。バレメトスタットトシル酸塩の毒性試験の概要を表 2.6.6.1-1 に示す。

表 2.6.6.1-1　バレメトスタットトシル酸塩の毒性試験の概要

試験の種類及び期間	投与経路	動物種／系統	添付資料番号	GLP 適用
単回投与毒性試験				
単回投与	強制経口	Crl:CD(SD)ラット	4.2.3.1-1	適
単回投与	強制経口	ビーグルイヌ	4.2.3.1-2	適
反復投与毒性試験				
14 日間	強制経口	Crl:CD(SD)ラット	4.2.3.2-1	不適
4 週間	強制経口	Crl:CD(SD)ラット	4.2.3.2-2	適
3 ヵ月	強制経口	Crl:CD(SD)ラット	4.2.3.2-3	適
14 日間	強制経口	ビーグルイヌ	4.2.3.2-4	不適
4 週間	強制経口	ビーグルイヌ	4.2.3.2-5	適
3 ヵ月	強制経口	ビーグルイヌ	4.2.3.2-6	適
遺伝毒性試験				
細菌を用いた復帰突然変異試験	In vitro	ネズミチフス菌及び大腸菌	4.2.3.3.1-1	適
In vitro 小核試験	In vitro	チャイニーズハムスター肺由来細胞	4.2.3.3.1-2	適
骨髄小核試験	強制経口	Crl:CD(SD)ラット	4.2.3.3.2-1	適
肝小核試験	強制経口	Crl:CD(SD)ラット	4.2.3.3.2-2	適
生殖発生毒性試験				
胚・胎児発生毒性試験	強制経口	Crl:CD(SD)ラット	4.2.3.5.2-1	不適

試験の種類及び期間	投与経路	動物種／系統	添付資料番号	GLP 適用
（予備試験）				
その他の毒性試験				
IHC 染色評価	強制経口	Crl:CD(SD)ラット	4.2.3.7.3-1	不適
胸腺に対する作用（予備試験）	強制経口	Crl:CD(SD)ラット	4.2.3.7.3-2	不適
胸腺に対する作用	強制経口	Crl:CD(SD)ラット	4.2.3.7.3-3	不適
加齢胸腺に対する作用	強制経口	Crl:CD(SD)ラット	4.2.3.7.3-4	不適
光毒性	In vitro	Balb/c 3T3 細胞	4.2.3.7.7-1	適

IHC: 免疫組織化学、GLP: 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準

拡張型単回経口投与試験では、いずれの動物種でも、すべての用量で忍容性は良好であった。イヌにおいてのみ、30 mg/kg 以上の群で一過性の血漿中ヒスタミン遊離に関連する一般状態変化が認められた。これらの一般状態変化は、耳介、鼻口部、全身、眼、及び四肢の発赤、又は腫脹であった。ラット及びイヌでの NOAEL はそれぞれ 200 mg/kg 及び 15 mg/kg であり、概略の致死量はそれぞれ 200 mg/kg 超及び 60 mg/kg 超であった。

ラット及びイヌの DRF 試験では、ラットの 1000 mg/kg／日群及びイヌの 100 mg/kg／日以上の群で、重篤な毒性又は死亡が認められた。4 週間反復経口投与試験では、ラットの 600 mg/kg／日群及びイヌの 60 mg/kg／日群で死亡が認められた。概ね忍容性を示す用量は、ラットで 200 mg/kg／日、イヌで 30 mg/kg／日と判断されたが、イヌでは 30 mg/kg／日群で軽度の QTc 間隔の延長が認められた。ラットの DRF 試験では、1000 mg/kg／日群で体重減少が認められたほか、血液学的検査パラメータの変化（主に 100 mg/kg／日以上の群で赤血球数、10 mg/kg／日以上の群で白血球数の減少）も認められた。同様の変化は、イヌの 4 週間反復経口投与試験において 30 mg/kg／日群の雄性イヌで認められ、血小板数の減少も認められた。また、イヌでは、原因は不明であるが、30 mg/kg／日以上の用量で一過性の血漿中ヒスタミン濃度上昇がみられ、アレルギー様反応を示唆する一般状態変化も認められた。なお、ポリアミン系、フルオロキノロン系などの薬剤は、イヌで高感受性にヒスタミン遊離作用を示すことが知られているが、これらの薬剤をヒトに臨床使用したときに同様の高感受性は認められていない。

4 週間反復経口投与試験において、バレメトスタットトシル酸塩に関連する病理組織学的所見は、ラットとイヌで同様の組織に認められた。これらの変化のうち主なものは、骨髄の細胞数減少、リンパ細網組織の萎縮及びリンパ球減少、並びに消化管の粘膜上皮変性とそれに伴う単核細胞性炎症であった。また、腎尿細管変性も両動物種で認められた。ラット DRF 試験では、複数の臓器でリン脂質症（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。

ラット及びイヌの 4 週間反復経口投与試験では、生存例で認められた所見はすべて、4 週間の回復期間後に回復した。以上の結果より、ラットにおける供試動物の 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 より大、イヌ

における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。

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 週間反復経口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では、低用量（20 mg/kg／日）群にリンパ腫が認められ、多くの器官に種々の程度で腫瘍細胞が浸潤していた。リンパ腫がみられたラットの多くは早期安楽殺に至った。複数の細胞分化マーカーを用いた免疫組織化学（immunohistochemistry: IHC）染色により、このリンパ腫が胸腺由来の T 細胞リンパ腫であることが確認された。早期及び試験終了時に安楽殺された 60 mg/kg／日以上の群では、胸腺のリンパ芽球の過形成のほか、胸腺及びリンパ節の萎縮も認められた。その他の主な所見として、骨髄及び消化管の過形成、骨の過骨化、雄性生殖器及び乳腺の変性／萎縮、精巣上体の管腔内精子の減少、雌性生殖器の萎縮などが認められた。この試験では、先に実施した試験で認められたものと同様の一般状態変化及び末梢血の血液学的検査値の変化も認められた。

イヌ 13 週間反復投与試験では、高用量（30 mg/kg／日）の約 7 週間投与後、陰嚢皮膚に真皮の血管周囲における多巣性の混合細胞性炎症、表皮の過形成、及びびらん／潰瘍を特徴とする病変が認められた。また、精巣で精上皮の変性及び萎縮、間細胞（ライディッヒ細胞）の肥大／過形成が認められた。陰嚢皮膚の裂傷を含む一般状態の悪化のため、30 mg/kg／日群の雄は早期安楽殺に至った。中用量（15 mg/kg／日）でも陰嚢皮膚の所見が認められたが、軽度であった。本試験ではその他の所見として、胸腺の多巣性のリンパ芽球過形成を伴う萎縮、リンパ節及び腸管関連リンパ組織（gut-associated lymphoid tissue: GALT）の萎縮、脾臓で髄外造血の増加、骨髄の造血細胞の過形成などが認められた。その他に、結膜炎及び足蹠発赤、並びに末梢血の血液学的検査値の変化及びヒスタミン濃度の上昇も認められ、先に実施したイヌ試験と同様の所見がみられた。

ラット 13 週間反復経口投与試験では、20 mg/kg／日でリンパ腫が認められたことから、STD_{10} は求められなかった。イヌ 13 週間反復経口投与試験では、雌での HNSTD は30 mg/kg／日（本試験で評価した最高用量）であった。しかし、雄での HNSTD は、陰嚢病変による早期安楽殺のため、15 mg/kg／日であった。

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。

ラットの予備的な EFD 試験では、20 mg/kg／日群の母動物で体重増加抑制がみられ、60 mg/kg／日以上の群の母動物で体重及び摂餌量の低値が認められた。さらに、20 mg/kg／日群で着床後胚損失率が高値であり、60 mg/kg／日以上の群で全母動物において全胚・胎児死亡が認められた。20 mg/kg／日群の生存胎児では、内臓の異常は認められなかったが、骨格異常又は骨格変異が認められた。これらの内訳は、肋骨欠損、腰椎欠損、頸肋、肋骨短

小、胸椎体分離などであった。これらの所見はいずれも高頻度に認められた。以上の結果より、母動物の一般毒性及び生殖の NOAEL、並びに次世代の NOAEL は決定できなかった。この試験で確認された胎児致死及び催奇形性から、ICH S9「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン」[1] 及び「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン」に関する質疑応答集（Q&A）[2] に基づいて、バレメトスタットトシル酸塩のさらなる生殖発生毒性試験を実施する必要はないと判断した。

Balb/c 3T3 細胞を用いたニュートラルレッド取り込みアッセイを実施した結果、バレメトスタットトシル酸塩は光毒性を示さなかった。

その他、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、いくつかの探索的試験を実施した。バレメトスタットトシル酸塩を 20 mg/kg／日の用量で雄性ラットに 1、2、又は 3 ヵ月間投与し、各時点における胸腺及び末梢血の評価を行った。その結果、バレメトスタットトシル酸塩により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 細胞の増加及び胸腺中の cluster of differentiation（CD）3 陽性及び 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 細胞の分化異常も認められ、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。

次いで、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／日の用量で雄性ラットに 2 又は 3 ヵ月間投与した。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。しかし、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 CD4 及び CD8 共陽性（CD4 and CD8 double positive: DP）T 細胞における MYC、CD4 及び CD8 共陰性（CD4 and CD8 double negative: 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 細胞数、CD8 陽性 T 細胞数、CD8 及び T-cell receptor αβ（CD8 and T-cell receptor αβ: αβ）陽性 T 細胞数、DP T 細胞数、又は DN T 細胞数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。しかし、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。また、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／日の用量で雄性ラット（投与開始時 55 週齢）に 3 ヵ月間反復経口投与し、胸腺の病理組織学的検査及びリンパ球サブセット解析を実施した。その結果、胸腺のリンパ球サブセット解析では、20 mg/kg／日群で CD4 陽性 T 細胞数の減少及び CD8 陽性 T 細胞の相対数の増加が認められ、バレメトスタットトシル酸塩が加齢ラットの胸腺における T 細胞分化に影響することが示されたが、胸腺に投薬に起因する病理組織学的変化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、先に実施したラット 13 週間反復経口投与試験で認められたリンパ腫を加齢ラットには誘発しないことが示された。

2. 単回投与毒性試験

2.1 ラット

2.1.1 ラット拡張型単回経口投与毒性試験

資料番号 4.2.3.1-1

【方法】Crl:CD(SD)ラットを用いて、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毒性及びトキシコキネティクス（toxicokinetics: TK）プロファイルを評価し、2 週間の投与後期間を設定して遅発性の毒性又は認められた毒性の回復性を検討した。バレメトスタットトシル酸塩は 80%ポリエチレングリコール（polyethylene glycol: PEG）200 及び 20%注射用水に懸濁し、0（対照）、20、60、及び 200 mg/kg の用量（10 mL/kg の投与液量）でラットに単回経口投与した。毒性評価群には雌雄各 10 例／群を割り付け、さらに雌雄各 5 例／群を投与後観察群とした。さらに雌雄各 3 例／群を用いて、投与 1 日目にバレメトスタットの血漿中濃度を測定した。毒性評価群では、一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、血液学的検査、凝固系検査、血液化学的検査、器官重量測定、剖検、及び病理組織学的検査を実施した。

【結果】バレメトスタットの最高血漿中濃度（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、雌雄ともに用量比を上回って増加した。全体として、単回経口投与後のバレメトスタットの全身曝露量に明らかな性差は認められなかった。曝露データを表 2.6.6.2-1 に示す。

いずれの用量でもバレメトスタットトシル酸塩投与に起因する毒性は認められなかった。200 mg/kg では、胸腺皮質の軽微なリンパ球アポトーシスが認められたが、毒性変化ではないと判断した。したがって、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 1 日目における Cmax 及び AUClast の平均値は、それぞれ 2360 ng/mL 及び 18,600 ng·h/mL であった。

表 2.6.6.2-1　ラットにおけるバレメトスタットトシル酸塩の単回経口投与後のトキシコキネティクスパラメータ

用量 (mg/kg)	Cmax (ng/mL)[a]		Tmax (h)[b]		AUClast (ng·h/mL)[a]	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
20	62.1	90.2	2.00	4.00	252	452
60	385	736	8.00	2.00	2940	4180
200	1770	2940	8.00	8.00	13,800	23,400

AUClast: 定量可能な最終時点までの血漿中濃度－時間曲線下面積、Cmax: 最高血漿中濃度、Tmax: 最高血漿中濃度到達時間
n = 3.
a: 平均値で示す。
b: 中央値で示す。

2.2 イヌ

2.2.1 イヌ拡張型単回経口投与毒性試験

資料番号 4.2.3.1-2

【方法】ビーグルイヌを用いて、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毒性及び TK プロファイルを評価し、2 週間の投与後観察期間を設定して遅発性の毒性又は認められた毒性の回復性を検討した。バレメトスタットトシル酸塩は 80% PEG200 及び 20%注射用水に懸濁し、0（対照）、15、30、及び 60 mg/kg の用量（3 mL/kg の投与液量）で雌雄各 5 例／群のビーグルイヌに単回経口投与した。雌雄各 3 例／群を単回投与毒性評価群とし、残りの雌雄各 2 例／群を投与後観察群とした。本試験では、単回投与後の TK 評価、一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、血液学的検査、凝固系検査、血液化学的検査、血漿中ヒスタミン濃度測定、器官重量測定、剖検、及び病理組織学的検査を実施した。

【結果】バレメトスタットの Cmax 及び AUClast は、雌雄ともに用量の増加に伴って増加した。全体として、単回経口投与後のバレメトスタットの全身曝露量に明らかな性差は認められなかった。曝露データを表 2.6.6.2-2 に示す。

一般状態観察では、15 mg/kg 以上の群で投与後 1 時間以内に嘔吐がみられ、30 mg/kg 以上の群で投与後 1 時間以内に耳介、鼻口部、全身、眼、及び四肢の発赤又は腫脹が認められた。また、30 mg/kg 以上の群で投与 0.5 時間後又は 1 時間後に軽微～重度の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、ビーグルイヌにバレメトスタットトシル酸塩を 15、30、及び 60 mg/kg の用量で単回経口投与したとき、30 mg/kg 以上の群で一過性の一般状態変化及びヒスタミン濃度上昇が認められ、NOAEL は 15 mg/kg、概略の致死量は 60 mg/kg 超と判断した。15 mg/kg における Cmax 及び AUClast の平均値は、それぞれ 2250 ng/mL 及び 9030 ng·h/mL であった。

表 2.6.6.2-2 イヌにおけるバレメトスタットトシル酸塩の単回経口投与後のトキシコキネティクスパラメータ

用量 (mg/kg)	Cmax (ng/mL)[a]		Tmax (h)[b]		AUClast (ng·h/mL)[a]	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
15	2460	2030	1.00	1.00	10,200	7850
30	5800	5360	0.50	1.00	30,400	28,600
60	8360	9240	0.50	1.00	39,800	41,700

AUClast: 定量可能な最終時点までの血漿中濃度－時間曲線下面積、Cmax: 最高血漿中濃度、Tmax: 最高血漿中濃度到達時間
n = 5.
a: 平均値で示す。
b: 中央値で示す。

3. 反復投与毒性試験

3.1 ラット

3.1.1 ラット 14 日間反復経口投与毒性試験

資料番号 4.2.3.2-1

【方法】雄性 Crl:CD(SD)ラットを用いて、バレメトスタットトシル酸塩を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。バレメトスタットトシル酸塩を 0.5%メチルセルロース溶液に懸濁し、0（対照）、10、100、及び 1000 mg/kg／日の用量（10 mL/kg の投与液量）で（1 群 4 例）に 14 日間反復経口投与した。さらに、投与 1 及び 14 日目にバレメトスタットの血漿中濃度を測定した（2 例／群）。本試験では、一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、血液学的検査、血液化学的検査、器官重量測定、剖検、及び病理組織学的検査を実施した。

【結果】1000 mg/kg／日群で、投与 5 日目に投与に関連する死亡が 2 例認められた。そのうち 1 例では、活動性低下及び下腹部の汚れが認められた。1000 mg/kg／日群の全例で体重及び摂餌量の減少が認められ、生存例も状態悪化のため、投与 6 日目に剖検に供した。肉眼所見として、前胃及び腺胃の灰白色異常内容物及び拡張、並びに消化管の粘液貯留が認められた。また、投与 6 日目に状態悪化のために解剖した動物では、赤血球パラメータの増加、網赤血球数及び白血球パラメータの減少、並びに血液化学的検査値の変化が認められた。明らかな死因は不明であったが、異常内容物の蓄積による消化管運動の低下に起因する摂餌不全が関与していた可能性が考えられた。

血液学的検査では、10 mg/kg／日以上の群で白血球数減少、100 mg/kg／日群で赤血球パラメータの減少が認められた。10 及び 100 mg/kg／日群では、一般状態、体重、摂餌量、及び血液化学的検査値に毒性学的意義のある変化はみられなかった。

病理組織学的検査では、100 mg/kg／日群で、脾臓の動脈周囲リンパ鞘におけるリンパ球減少、並びに胸腺皮質におけるリンパ球減少と、これに伴う胸腺の小型化及び重量減少が認められた。また、100 mg/kg／日群で胸腺の組織球及び副腎の皮質細胞に空胞化がみられ、1 例で骨芽細胞の巣状増殖が認められた。1000 mg/kg／日群では、脳（脈絡叢上皮）、腎臓（集合管及び尿細管上皮）、肝臓（胆管、肝細胞、及びクッパー細胞）、肺（肺胞／気管上皮）、消化管（腺胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸）を含む複数の臓器で空胞化又は泡沫細胞浸潤が認められた。さらに、消化管、肝臓、精巣上体、ハーダー腺、腎臓、腸間膜リンパ節、前立腺、唾液腺、胸腺、副腎、及び膀胱を含む複数の臓器で、萎縮又は細胞壊死が認められた。また、上記の変化に加え、骨髄（造血減少、血栓形成、及び骨芽細胞の限局性増生）、脾臓（髄外造血減少、リンパ濾胞、辺縁帯、及び動脈周囲リンパ鞘のリンパ球減少）、腸間膜リンパ節（皮質及び傍皮質のリンパ球数減少）、及び胸腺（皮質リンパ球数の減少）を含むリンパ造血器で毒性変化が認められた。

バレメトスタットの Cmax 及び AUC24h は概ね用量の増加に伴って増加した。TK パラメータは反復投与後に増加する傾向が認められた。曝露データを表 2.6.6.3-1 に示す。

以上の結果より、バレメトスタットトシル酸塩を雄性ラットに反復経口投与したとき、

1000 mg/kg／日で体重及び摂餌量の減少とともに、死亡が認められたことから、MTD は 100 mg/kg／日と判断した。100 mg/kg／日の投与 14 日目における Cmax 及び AUC24h の平均値は、それぞれ 2000 ng/mL 及び 20,900 ng·h/mL であった。

表 2.6.6.3-1　ラットにおけるバレメトスタットトシル酸塩の 14 日間反復経口投与後のトキシコキネティクスパラメータ

用量 (mg/kg／日)	Cmax (ng/mL)		AUC24h (ng·h/mL)	
	投与 1 日目	投与 14 日目	投与 1 日目	投与 14 日目
10	47.5	94.0	261	582
100	1630	2000	13,800	20,900
1000	5290	ND	90,000	ND

データは平均値（n = 2）で示す。
AUC24h: 投与 24 時間後までの血漿中濃度－時間曲線下面積、Cmax: 最高血漿中濃度、ND: データなし

3.1.2　ラット 4 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

資料番号 4.2.3.2-2

【方法】雌雄の Crl:CD(SD)ラットを用いて、バレメトスタットトシル酸塩を 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（機能観察総合評価及び全身プレチスモグラフィー）を評価した。

バレメトスタットトシル酸塩を 80% PEG200 及び 20%注射用水で懸濁し、0（対照）、60、200、及び 600 mg/kg／日の用量（5 mL/kg の投与液量）でラットに 4 週間反復経口投与した。毒性評価群には雌雄各 10 例／群を割り付け、その他に、回復群（雌雄各 5 例／群）、TK 群（雌雄各 3 例／群）、及び血漿中ヒスタミン濃度測定群（雌雄各 3 例／群）を設定した。用量は、Crl:CD(SD)ラットを用いた 14 日間 DRF 試験の結果に基づき設定した。また、投与 1、10、及び 28 日目にバレメトスタットの血漿中濃度を測定した。

毒性評価群では、一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、眼科学的検査、血液学的検査、凝固系検査、血液化学的検査（サテライト動物を用いて投与 1、3、9、及び 28 日目に実施した血漿中ヒスタミン濃度測定を含む）、尿検査、器官重量測定、剖検、精子形成サイクルの評価、及び病理組織学的検査を実施した。

【結果】バレメトスタットトシル酸塩に関連する主な所見は、600 mg/kg／日群のうち、投与 7～11 日目に死亡又は早期解剖した個体で認められた。その他に 200 mg/kg／日群の TK 評価動物 1 例が死亡し、600 mg/kg／日群のヒスタミン濃度測定動物 1 例を状態悪化のため切迫屠殺した。ただし、これらの個体は TK 用サテライト動物又はヒスタミン測定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。なお、後述するように毒性評価群の 200 mg/kg／日では重篤な変化はみられていないことから、200 mg/kg／日群の TK 評価動物 1 例の死亡はバレメトスタットトシル酸塩の投与に起因する変化ではないと判断した。

毒性評価群では、600 mg/kg／日群の雌 1 例が、重度の一般状態悪化のため、7 日目に切

迫解剖された。600 mg/kg／日群のその他すべての動物で同様の一般状態悪化が認められ、雌でより強い症状がみられた。したがって、投与 10 又は 11 日目にこの用量の毒性評価群及び回復群を早期解剖し、TK 群及び血漿中ヒスタミン濃度測定群を早期屠殺した。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。早期解剖された 600 mg/kg／日群では、重度の一般状態変化（呼吸困難、円背位、重度の沈静、立毛、及び流涎）、並びに立ち上がり行動の減少及び自発運動の低下がみられ、重度の体重及び摂餌量減少が認められた。血液学的検査では、赤血球パラメータの増加、血小板数、及び網赤血球数の減少、リンパ球数及び単球数の減少と好中球数及び好酸球数の増加を伴う白血球数減少がみられた。凝固系検査ではプロトロンビン時間及び活性化部分トロンボプラスチン時間の延長、フィブリノゲンの減少（雄のみ）が認められた。血液化学的検査では、グルコース及び血中尿素窒素の増加、アルブミン（雌のみ）、総蛋白、及びカリウムの減少、コレステロール及びクレアチニンの増加（雄）、並びにクレアチンキナーゼ活性及びグルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性の上昇（雌）、無機リンの減少（雄）が認められた。器官重量測定では、副腎重量の増加が認められた。剖検では、腎臓で多巣性の皮質褪色巣が認められた。剖検及び病理組織学的検査では、胸腺の小型化及び萎縮、骨髄の細胞数減少、胃で限局性から多発性の暗色あるいは陥凹巣を伴う腺胃粘膜のびらん又は単核細胞性炎症、回腸、盲腸、又は結腸の拡張及び内容物変化を伴う炎症細胞浸潤増加、粘膜表層上皮細胞の軽微な変性、並びにパイエル板のリンパ球枯渇が認められた。また、脾臓で軽微なリンパ球性過形成又はリンパ球性委縮、腸間膜リンパ節及び顎下リンパ節の皮質萎縮、及び腎臓で多巣性の皮質褪色巣を伴う尿細管変性が認められた。

生存例では、一般状態観察で、60 mg/kg／日以上の群で立ち上がり行動の減少がみられ、200 mg/kg／日群では脱毛又は痂皮が認められた。また、200 mg/kg／日群の雄で一過性の体重増加量減少が認められた。血液学的検査では、60 mg/kg／日以上の群で網赤血球数の増加（雌のみ）又は複数の分画にわたる白血球数減少がみられ、200 mg/kg／日群では、赤血球パラメータの減少及び赤血球容積分布幅の増加が認められた。病理組織学的検査では、60 mg/kg／日以上の群で胸腺の小型化及び萎縮が認められた。また、精子形成サイクルには、投薬に起因する変化は認められなかった。

4 週間の回復期間後、生存例ではバレメトスタットトシル酸塩に関連する変化はすべて回復した。

バレメトスタットの Cmax 及び AUClast は概ね用量の増加に伴って増加した。投与 1 日目の全身曝露と比較して反復投与後の全身曝露に違いはなく、明らかな性差も認められなかった。曝露データを表 2.6.6.3-2 に示す。

以上の結果より、ラットに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 4 週間反復経口投与したとき、600 mg/kg／日群では重度の一般状態変化、並びに体重及び摂餌量の減少が認められたため、同群の動物を早期に解剖した。病理組織学的所見は 600 mg/kg／日群で骨髄、胸腺、リンパ節、消化管、及び腎臓にみられ、60 mg/kg／日以上の群で胸腺に認められたが、4 週間の回復期間後に完全に回復した。これらの結果に基づ

き、STD_{10}は 200 mg/kg／日より大と判断した。200 mg/kg／日の投与 28 日目における雌雄の Cmax 及び AUClast の平均値は、それぞれ 2900 ng/mL 及び 20,400 ng·h/mL であった。

表 2.6.6.3-2　ラットにおけるバレメトスタットトシル酸塩の 4 週間反復経口投与後のトキシコキネティクスパラメータ

用量 (mg/kg／日)	日	Cmax (ng/mL)[b]		Tmax (h)[c]		AUClast (ng·h/mL)[b]	
		雄	雌	雄	雌	雄	雌
60	1	322	671	4.00	2.00	2540	4500
	28	787	1160	8.00	2.00	6380	5680
200	1	2470	3270	4.00	2.00	21,900	22,700
	28	2480	3320	4.00	3.00	20,500	20,300
600	1	3130	3870	12.00	24.00	46,500	64,500
	10[a]	5130	7950	12.00	1.00	59,700	78,600

AUClast: 定量可能な最終時点までの血漿中濃度－時間曲線下面積、Cmax: 最高血漿中濃度、Tmax: 最高血漿中濃度到達時間
n = 3.
a: 早期解剖のため投与 10 日目に実施した。
b: 平均値で示す。
c: 中央値で示す。

3.1.3　ラット 13 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

資料番号 4.2.3.2-3

【方法】雌雄の Crl:CD(SD)ラットを用いて、バレメトスタットトシル酸塩を 13 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。

バレメトスタットトシル酸塩を 80% PEG200 及び 20%注射用水で懸濁し、0（対照）、20、60、又は 200 mg/kg／日の用量（5 mL/kg の投与液量）でラットに 13 週間反復経口投与した。毒性評価群には雌雄各 10 例／群を割り付け、その他に、回復群（雌雄 5 例／群）、TK 群（雌雄 3 例／群）を設定した。用量は、ラット 4 週間反復経口投与試験の結果に基づき設定した。また、投与 1、28、63、及び 90 日目にバレメトスタットの血漿中濃度を測定した。

毒性評価群では、一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、眼科学的検査、血液学的検査、凝固系検査、血液化学的検査、骨髄細胞検査、尿検査、器官重量測定、剖検、及び病理組織学的検査を実施した。すべての用量で、選択された動物について IHC 染色を実施した（IHC の結果は 8.1.1 で報告）。

【結果】200 mg/kg／日群の雄 8 例及び雌 2 例、並びに 20 mg/kg／日群の雄 1 例及び雌 3 例が、投与 60～99 日目の間に瀕死状態のため安楽殺された。200 mg/kg／日群の瀕死解剖例では、一般状態変化として主に呼吸困難、うずくまり、並びに鼻孔及び眼からの赤色排泄物が認められた。赤血球パラメータ、白血球数、及び血小板数の減少、並びに肝機能に関連した血液化学的検査値の増加が認められた。病理組織学的検査では、リンパ芽球の過形成、消化管の腺上皮での過形成性変化、及び胸骨、大腿骨、脛骨、又は頭蓋骨に過骨化が認められ

た。精巣及びリンパ細網組織を含む他の器官では、バレメトスタットトシル酸塩の薬理作用に基づく細胞分裂抑制による影響に起因すると考えられる病理組織学的所見が認められた。

20 mg/kg／日群の瀕死解剖例では、各動物での主要な所見は胸腺の腫大並びにリンパ腫であり、リンパ造血器官を含む多数の器官に種々の程度で腫瘍細胞が浸潤していた。投与期間中に認められた呼吸困難、うずくまり、及び蒼白は、主に腫大した胸腺に起因する変化と考えられた。その他の一般状態変化としては耳介、頭部、又は鼻口部の発赤が認められた。臨床検査パラメータの変化は、すべての分画で増加した白血球数を除いて、200 mg/kg／日群で観察されたものに類似していた。

バレメトスタットトシル酸塩に関連した所見は、すべての用量の生存動物でも認められた。一般状態観察では、60 mg/kg／日以上の群で、腫脹した鼻口部、顔面又は頭部の赤色化、及び耳介や鼻口部の発赤からなる一般状態変化が観察された。200 mg/kg／日群では、一過性の脱毛、立毛、及び口又は鼻孔からの排泄物が認められた。200 mg/kg／日群の雄で、摂餌量の減少を伴った体重増加量の減少がみられた。

血液学的検査では、200 mg/kg／日群で、貧血、白血球の減少（主にリンパ球数の減少のため）を含む血液学的変化がみられたが、この変化は骨髄細胞検査における高い骨髄球／赤芽球比に関連した変化であった。また、凝固系検査では、20 mg/kg／日以上の群の雄で、フィブリノゲンの減少がみられた。眼科学的検査では、200 mg/kg／日群で、脈絡膜びらん性貧血及び眼の血管腔の縮小が認められた。血液化学的検査では、60 mg/kg／日以上の群で、総蛋白の減少がみられた。

器官重量測定では、60 mg/kg／日以上の群の雄で副腎重量の増加、雌で脾臓重量の増加、両性で胸腺重量の減少がみられ、200 mg/kg／日群の雄で精巣重量の減少が認められた。

病理組織学的検査では、20 mg/kg／日で多くの臓器に浸潤した腫瘍細胞を伴うリンパ腫が認められた。60 mg/kg／日以上の群で骨髄の造血細胞の過形成、60 mg/kg／日以上の群の雄及び 200 mg/kg／日群の雌で肝細胞肥大、60 mg/kg／日以上の群の雄及びすべての用量の雌で胸骨、大腿骨、脛骨に皮質骨及び海綿骨における過骨化、200 mg/kg／日群で雌性生殖器の萎縮、雄性生殖器及び乳腺の変性／萎縮、精巣上体の管腔内精子の減少、並びに雄で副腎の空胞化、すべての用量で胸腺のリンパ芽球の過形成、胸腺及びリンパ節のリンパ球性萎縮、並びに脾臓の赤脾髄の萎縮が認められた。

4 週間の回復期間後、200 mg/kg／日群でみられたバレメトスタットトシル酸塩に関連する臨床所見は回復しなかった。病理組織学的所見は、両性の骨の過骨化を除く所見は回復又は回復傾向を示した。

バレメトスタットの平均 AUClast 値は、20 mg/kg／日から 200 mg/kg／日まで雌雄ともに用量比を上回って増加したが、投与 63 日目及び投与 90 日目において雄ラットでは、平均 AUClast 値は用量の増加に伴って増加した。平均 Cmax 値は、投与 1 日目の両性及び投与 28 日目の雄では用量比を上回って増加したが、概ね用量の増加に伴って増加した。すべての用量で雌雄ともに、投与 1 日目と反復投与後の平均 Cmax 及び AUClast 値に違いはなかった。また、性差も認められなかった。曝露データを表 2.6.6.3-3 に示す。

以上の結果より、ラットに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 13 週間反復経口投与したとき、20 及び 200 mg/kg／日群では早期安楽殺に至る重篤な一般状態変化が引き起こされ、20 mg/kg／日群で早期に安楽殺された動物にリンパ腫が認められた。また、200 mg/kg／日群でみられた所見は、主にバレメトスタットトシル酸塩の薬理作用に基づく細胞分裂抑制による影響に起因する所見と考えられた。この用量では、胸腺のリンパ芽球の過形成は早期安楽殺された動物と生存動物の両方でみられ、4 週間の回復期間後において臨床所見は残存したが、骨以外の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／日での悪性リンパ腫に基づいて、STD_{10} は求められなかった。

表 2.6.6.3-3　ラットにおけるバレメトスタットトシル酸塩の 13 週間反復経口投与後のトキシコキネティクスパラメータ

用量 (mg/kg／日)	日	Cmax (ng/mL)[b]		Tmax (h)[c]		AUClast (ng·h/mL)[b]	
		雄	雌	雄	雌	雄	雌
20	1	79.4	141	4.00	2.00	518	685
	28	109	180	4.00	2.00	820	977
	63	341	296	4.00	4.00	2470	1880
	90[a]	399	286	3.00	2.00	3380	2010
60	1	607	1020	4.00	4.00	4970	6000
	28	1050	850	4.00	2.00	6060	6690
	63	1340	1390	2.00	4.00	10,600	10,400
	90	1060	1770	4.00	2.00	8710	10,300
200	1	2440	3120	4.00	8.00	20,000	29,000
	28	4320	2670	4.00	8.00	32,300	26,700
	63	4580	4440	8.00	4.00	39,700	39,600
	90[a]	4180	3360	6.00	4.00	43,800	34,700

AUClast: 定量可能な最終時点までの血漿中濃度－時間曲線下面積、Cmax: 最高血漿中濃度、Tmax: 最高血漿中濃度到達時間
n = 3。
a: n = 2。
b: 平均値で示す。
c: 中央値で示す。

3.2　イヌ

3.2.1　イヌ 14 日間反復経口投与毒性試験

資料番号 4.2.3.2-4

【方法】雌雄ビーグルイヌを用いて、バレメトスタットトシル酸塩を 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。バレメトスタットトシル酸塩を 80% PEG200 及び 20%注射用水で懸濁し、0（対照）、30、100、及び 300 mg/kg／日の用量（3 mL/kg の投与液量）でビーグルイヌ（雌雄各 2 例／群）に 14 日間反復経口投与した。100 及び 300 mg/kg／日群で投与 1 日目に重篤な一般状態変化が認められたため、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、投与 6～19 日目まで投与した。

本試験では、一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、血液学的検査、凝固系検査、血液化学的検査、血漿中ヒスタミン濃度測定、剖検、及び病理組織学的検査を実施した。また、投与 1、6、14、及び 17 日目にバレメトスタットの血漿中濃度を測定した。

【結果】一般状態観察では、100 又は 300 mg/kg／日群の単回投与後に嘔吐、沈静、振戦、横臥位、ふらつき歩行、四肢（耳介を含む）の発赤及び熱感、眼周囲の腫脹、呼吸困難を含む重篤な一般状態変化が観察され、100 mg/kg／日群の雄 1 例が状態悪化により早期解剖された。30 及び 60 mg/kg／日群で、14 日間の投与期間中、散発性かつ一過性に嘔吐、流涎、ふらつき歩行、振戦、及び四肢の発赤が認められた。300/60 mg/kg／日群では、雄に体重及び摂餌量の減少がみられた。

血液学的検査では、300/60 mg/kg／日群で雄に白血球数、好中球数、リンパ球数、及び好塩基球数の減少、並びに血小板数の減少がみられ、同群の雄 1 例でヘマトクリット、ヘモグロビン、及び赤血球数の減少が認められた。凝固系検査では、30 及び 300/60 mg/kg／日群で雄にフィブリノゲンの増加がみられ、100/15 及び 300/60 mg/kg／日群では、雌に活性化部分トロンボプラスチン時間の延長が認められた。30、100、及び 300 mg/kg／日群では、投与 1 日目に一過性の血漿中ヒスタミン濃度の上昇がみられた。

病理組織学的検査では、300/60 mg/kg／日群の雄で小腸の粘膜上皮萎縮、300/60 mg/kg／日群の雄の全例における骨髄抑制と、それに伴う血液学的検査値の変化（ヘマトクリット、ヘモグロビン、及び赤血球数の減少［雄 1 例］、並びに複数の分画にわたる白血球数減少及び血小板数減少［雄 2 例］）、すべての投与群で胸腺の萎縮が認められた。

単回投与後（投与 1 又は 6 日目）、バレメトスタットの Cmax 及び AUClast は、ほぼ用量の増加に応じて増加した。反復投与後では、Cmax は用量の増加に応じて増加したが、AUClast は用量比以上の割合で増加した。全体として、単回投与と反復投与の間又は雌雄の間に、全身曝露量の明らかな差は認められなかった。曝露データを表 2.6.6.3-4 に示す。

以上の結果より、バレメトスタットトシル酸塩を 100 及び 300 mg/kg／日の用量でビーグルイヌに単回経口投与した結果、重篤な一般状態変化又は死亡が認められた。4 日間の休薬期間を経て、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 14 日間反復経口投与したところ、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。100 mg/kg／日群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／日群の投与 14 日目における雌雄の 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。

表 2.6.6.3-4　イヌにおけるバレメトスタットトシル酸塩の 14 日間反復経口投与後のトキシコキネティクスパラメータ

用量 (mg/kg／日)	日	Cmax (ng/mL)[b]		Tmax (h)[c]		AUClast (ng·h/mL)[b]	
		雄	雌	雄	雌	雄	雌
15[a]	6	3570	3210	0.50	1.00	10,100	11,000
	19	3370	2360	0.50	2.50	6010	7890
30	1	7520	7380	1.00	1.00	31,400	36,500

用量 (mg/kg／日)	日	Cmax (ng/mL)[b]		Tmax (h)[c]		AUClast (ng·h/mL)[b]	
		雄	雌	雄	雌	雄	雌
	14	4870	6440	1.25	1.00	25,100	26,200
60	6	10,900	9830	0.75	0.50	57,000	69,100
	19	13,300	13,600	0.75	0.50	69,000	57,100
100	1	12,800	17,100	0.50	0.50	37,700[d]	73,400
300	1	10,200	13,400	0.50	0.50	98,300	66,700

AUClast: 定量可能な最終時点までの血漿中濃度－時間曲線下面積、Cmax: 最高血漿中濃度、Tmax: 最高血漿中濃度到達時間
100 及び 300 mg/kg／日を投与された動物は、4 日間の休薬した投与 6 日目から、より低い用量（それぞれ 15 及び 60 mg/kg／日）を 14 日間投与された。
n = 2.
a: n = 1（雄）
b: 平均値で示す。
c: 中央値で示す。
d: 1 例の投与 4 時間後までの血漿中濃度－時間曲線下面積

3.2.2　イヌ 4 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

資料番号 4.2.3.2-5

【方法】雌雄ビーグルイヌを用いて、バレメトスタットトシル酸塩を 4 週間反復経口投与したときの毒性及び TK プロファイルを検討し、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。バレメトスタットトシル酸塩を 80% PEG200 及び 20%注射用水で懸濁し、0（対照）、15、30、又は 60 mg/kg／日の用量（3 mL/kg の投与液量）でビーグルイヌ（雌雄各 3 例／群）に 4 週間反復経口投与した。また、バレメトスタットトシル酸塩の同用量を別の動物（雌雄 2 例／群）に投与し、観察された毒性の回復性を 4 週間の回復期間後に評価した。高用量（60 mg/kg／日）は、イヌ 14 日間 DRF 試験で得られた MTD に基づいて設定した。

本試験では、一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、眼科学的検査、血液学的検査、凝固系検査、血液化学的検査（血漿中ヒスタミン濃度を含む）、尿検査、心電図測定、器官重量測定、剖検、及び病理組織学的検査を実施した。また、投与 1、16、及び 28 日目にバレメトスタットの血漿中濃度を測定した。

【結果】バレメトスタットトシル酸塩に関連する主要な所見は、主に、投与 16、17、及び 28 日目に死亡又は早期解剖された 60 mg/kg／日群の個体で認められた。一般状態観察では、全身又は耳介の発赤又は腫脹、嘔吐、流涎、黒色便又は緑色便、並びに活動性低下が観察された。また。体重及び摂餌量の減少が認められた。血液学的検査及び凝固系検査では、網状赤血球数及び血小板数の減少、白血球数（ほぼすべての分画）の減少、並びにフィブリノゲンの増加が認められた。血液化学的検査では、血中尿素窒素、クレアチニン、無機リン、総ビリルビン、及びコレステロールの増加、カリウム、及びクロライドの減少が認められた。器官重量測定では、雄全例で副腎重量の増加及び雄 1 例で腎臓重量の増加が認められた。剖検及び病理組織学的検査では、消化管で病理組織学的所見（粘膜丈の減少、単核細胞浸潤の増加、粘膜上皮変性）を伴う胃、空腸、結腸、又は直腸の褪色又は変色巣、並びにパイエル板の萎縮（リンパ球枯渇）がみられた。さらに、骨髄で細胞数減少（すべての雄、死

亡した雌 1 例、及び早期解剖した雌 1 例)、顎下リンパ節で小型化及び委縮（雌 1 例)、腸間膜リンパ節のリンパ球性萎縮、胸腺の小型化（雌 1 例）及び中等度～重度の萎縮（全例)、並びに脾臓のリンパ球性萎縮が認められた。腎臓で皮質及び皮髄境界部におけるびまん性の尿細管変性（雄 2 例及び雌 1 例）がみられ、雄 1 例では、関連する腎機能検査値異常（血中尿素窒素、クレアチニン、及び無機リン）及び腎臓重量の増加を伴っていた。

生存例では、バレメトスタットトシル酸塩に関連する所見として、15 mg/kg／日群の雌 1 例で四肢の発赤、雄で嘔吐及び流涎（単発）がみられた。30 mg/kg／日以上の群では、全身又は耳介の発赤又は腫脹、嘔吐、流涎、黒色便又は緑色便、活動性低下が認められた。また、60 mg/kg／日群で体重減少（雌 1 例）及び摂餌量減少（すべての雌）がみられた。心電図検査では、30 mg/kg／日以上の群の雌で投与 4 週目に QTc 間隔の延長が認められた。

血液学的検査では、30 mg/kg／日以上の群で赤血球パラメータ及び血小板数の減少、全用量群の雄で好中球数増加を主徴とする軽度の白血球数増加、全用量群の雌ではリンパ球数減少を主徴とする白血球数減少が認められた。血液化学的検査では、15 mg/kg／日群の雄及び 30 mg/kg／日以上の群でトリグリセリド及びグルコースの増加がみられ、60 mg/kg／日群では、雌でカリウムの減少が認められた。また、30 mg/kg／日以上の群で投与 1 及び 3 日目に一過性のヒスタミン濃度の上昇が認められた。

病理組織学的検査では、30 mg/kg／日以上の群で胸腺の萎縮、30 mg/kg／日群の雌雄各 1 例で脾臓のリンパ球性萎縮、30 mg/kg／日以上の群の雌で腸間膜リンパ節のリンパ球性萎縮、30 mg/kg／日群の雌 1 例で胃に単核細胞性炎症が認められた。

4 週間の回復期間後、生存例ではバレメトスタットトシル酸塩に関連する変化はすべて回復した。

バレメトスタットの Cmax 及び AUClast は概ね用量の増加に伴って増加した。投与 1 日目の全身曝露と比較して反復投与後の全身曝露に違いはなく、明らかな性差も認められなかった。曝露データを表 2.6.6.3-5 に示す。

以上の結果より、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たため、すべての雄及び雌 1 例を早期に解剖した。病理組織学的所見は、60 mg/kg／日群の生存例 1 例及び途中死亡例の骨髄、リンパ器官、消化管、及び腎臓、並びに 30 mg/kg／日群のリンパ器官及び消化管で認められたが、4 週間の回復期間後に完全に回復した。30 mg/kg／日以上の群の雌で QTc 間隔の延長が認められたほか、30 mg/kg／日以上の群で血漿中ヒスタミン濃度の一過性かつタキフィラキシー性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、HNSTD は 30 mg/kg／日と判断した。30 mg/kg／日における雌雄の 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。

表 2.6.6.3-5　イヌにおけるバレメトスタットトシル酸塩の 4 週間反復経口投与後のトキシコキネティクスパラメータ

用量 (mg/kg／日)	日	Cmax (ng/mL)[a]		Tmax (h)[b]		AUClast (ng·h/mL)[a]	
		雄	雌	雄	雌	雄	雌
15	1	2420	1570	0.50	1.00	8810	5960
	28	2640	2770	1.00	1.00	8790	10,600
30	1	4210	4960	1.00	0.50	21,300	25,500
	28	7750	4650	1.00	0.50	32,600	32,200
60	1	12,500	9180	0.50	0.50	54,400	43,100
	28	7390[c,d]	11,100[e]	1.30[c,d]	0.50[e]	56,500[c,d]	67,500[e]

AUClast: 定量可能な最終時点までの血漿中濃度－時間曲線下面積、Cmax: 最高血漿中濃度、Tmax: 最高血漿中濃度到達時間
n = 3.
a: 平均値で示す。
b: 中央値で示す。
c: 投与 16 日目の値
d: n = 2.
e: n = 1.

3.2.3　イヌ 13 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

資料番号 4.2.3.2-6

【方法】雌雄ビーグルイヌを用いて、バレメトスタットトシル酸塩を 13 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。バレメトスタットトシル酸塩を 80% PEG200 及び 20%注射用水で懸濁し、0（対照）、7.5、15、又は 30 mg/kg／日の用量（3 mL/kg の投与液量）でビーグルイヌ（雌雄 4 例／群）に 13 週間反復経口投与した。また、バレメトスタットトシル酸塩を 15 又は 30 mg/kg／日の用量で別の動物（雌雄 2 例／群）に投与し、観察された毒性の回復性を 4 週間の回復期間後に評価した。用量は、イヌ 4 週間反復経口投与試験の結果に基づき設定した。

本試験では、一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、眼科学的検査、心電図測定、血液学的検査、凝固系検査、血液化学的検査（血漿中ヒスタミン濃度を含む）、尿検査、器官重量測定、剖検、及び病理組織学的検査を実施した。また、投与 1、28、50、及び 90 日目にバレメトスタットの血漿中濃度を測定した。

【結果】15 mg/kg／日を投与した雌 1 例が、投与 36 日目の投与直後に、呼吸不全を含む一般状態悪化のため早期安楽殺されたが、投与過誤によると思われ、バレメトスタットトシル酸塩による影響ではないと考えられた。

30 mg/kg／日を投与した雄 4 例が投与 51 日目に早期安楽殺され、バレメトスタットトシル酸塩に関連する所見が認められた。一般状態観察では、陰嚢皮膚の裂傷、結膜炎、流涎、及び投与 1～3 日目に四肢、眼、又は耳介の発赤及び浮腫が観察された。臨床検査及び尿検査では、赤血球パラメータの軽微な減少、単球実数を除くすべての分画での白血球の軽微な減少、アルブミン及び総蛋白の軽微な減少、及び尿ビリルビンの増加がみられ、尿潜血が認められた雄で尿クレアチニンの増加が認められた。また、精巣重量の減少及び副腎重量の増

加がみられた。剖検及び病理組織学的検査では、陰嚢皮膚の真皮血管周囲における多巣性の混合細胞性炎症、表皮の過形成及びびらん／潰瘍、及び真皮や皮下組織での多巣性の血管拡張が認められた。また、胸腺で皮質及び髄質のリンパ球性萎縮、並びにこれに関連する多巣性のリンパ芽球の過形成、顎下及び腸間膜リンパ節並びに GALT のリンパ球性萎縮、脾臓の赤脾髄で髄外造血の増加、骨髄で造血細胞の過形成、精巣で精上皮の変性／萎縮及び間細胞（ライディッヒ細胞）の肥大／過形成、精巣上体の管腔内精子の減少、雄 2 例の眼の結膜で上皮過形成及び扁平上皮化生を伴う混合細胞性炎症が認められた。なお、30 mg/kg／日群の残り 2 例は 51 日目以降投与されず、投与 84 日目に安楽殺された。

生存例では、バレメトスタットトシル酸塩に関連する所見として、15 mg/kg／日群の雌雄及び 30 mg/kg／日群の雌で流涎、結膜炎／眼瞼浮腫、及び足の開放創、30 mg/kg／日群の雌で嘔吐、下痢、及び外陰部の腫脹、7.5 mg/kg／日群の雄及び 15 mg/kg／日以上の群の雌で鼻口部、眼、皮膚、又は耳介の発赤が認められた。心電図検査では、バレメトスタットトシル酸塩の投与による変化は認められなかった。

血液学的検査及び凝固系検査では、15 mg/kg／日以上の群で赤血球パラメータの減少、30 mg/kg／日群では雌で単球実数を除くすべての分画での白血球数の減少、30 mg/kg／日群では雌でフィブリノゲンの増加が認められた。血液化学的検査では、投与期間終了時に 7.5 及び 15 mg/kg／日群の雄並びにすべての用量の雌で、総蛋白及びアルブミンの軽微な減少がみられた。また、30 mg/kg／日群で投与 1 及び 3 日目に一過性の血漿中ヒスタミン濃度の上昇が認められた。骨髄検査では、15 mg/kg／日群の雄 1 例及び雌 1 例、並びに 30 mg/kg／日群の雌 1 例で、赤芽球系細胞の増加及び顆粒球系細胞の減少による骨髄の骨髄球／赤芽球比の減少がみられた。15 mg/kg／日群の雄 1 例及び 30 mg/kg／日群の雌 1 例では、投与 12 週目の血液塗沫標本で幼若な大型赤血球及び正染性赤芽球も観察された。

器官重量測定では、7.5 及び 15 mg/kg／日群の雄で精巣重量の減少及び副腎重量の増加がみられ、すべての用量の雌で胸腺重量の減少が認められた。

剖検及び病理組織学的検査では、7.5 mg/kg／日以上の群で、胸腺皮質及び髄質のびまん性のリンパ球性萎縮並びに多巣性のリンパ芽球の過形成、顎下及び腸間膜リンパ節のリンパ球性萎縮、GALT（回腸）のリンパ球性萎縮、骨髄で造血細胞の過形成、脾臓で多巣性の髄外造血の増加、精巣で間細胞（ライディッヒ細胞）の多巣性の肥大／過形成を伴う精上皮のびまん性萎縮、並びに精巣上体の管腔内精子のびまん性減少、15 mg/kg／日以上の群の雌で肝臓に多巣性のクッパー細胞内の黄色色素沈着（Perl’s 染色［鉄］陽性）が認められた。皮膚でみられた変化として、7.5 mg/kg／日群の雄 1 例で陰茎包皮の血管周囲の混合細胞性炎症、15 mg/kg／日群の雄で陰嚢皮膚の血管周囲における多巣性の混合細胞性炎症、並びに雄 1 例で陰嚢皮膚表皮の変性／炎症、30 mg/kg／日群では、雌 2 例の眼周囲皮膚で血管周囲における混合細胞性炎症、うち雌 1 例で表皮の変性／炎症が認められた。また、眼でみられた変化として、15 mg/kg／日以上の群の雌で両側性の結膜赤変及び肥厚、両側性混合細胞炎症、並びに両側性黄色分泌物、30 mg/kg／日群の雌 1 例で角膜間質の片側性炎症が認められた。

バレメトスタットの Cmax 及び AUClast は概ね用量比より高い割合で増加したが、投与 28 日目における雄の Cmax 及び投与 90 日目における雌の Cmax は用量の増加に伴って増加した。投与 1 日目の全身曝露と比較して反復投与後の全身曝露に違いはなく、明らかな性差も認められなかった。曝露データを表 2.6.6.3-6 に示す

以上の結果より、バレメトスタットトシル酸塩を 30 mg/kg／日までの用量でイヌに 13 週間反復経口投与した結果、30 mg/kg／日群の雄において陰嚢皮膚に重度の変化が生じ、早期安楽殺に至った。7.5 mg/kg／日以上の群で、リンパ器官、造血組織、精巣、精巣上体、及び陰茎包皮に、15 mg/kg／日以上の群で陰嚢皮膚、眼の結膜及び顔面／眼周囲皮膚に病理組織学的所見が認められた。4 週間の回復期間後、30 mg/kg／日群のみで雌雄に認められた結膜炎を除いて、すべての臨床所見は回復した。また、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 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 値はそれぞれ 4100 ng/mL 及び 19,600 ng·h/mL）と判断した。

表 2.6.6.3-6　イヌにおけるバレメトスタットトシル酸塩の 13 週間反復経口投与後のトキシコキネティクスパラメータ

用量 (mg/kg／日)	日	Cmax (ng/mL)[b]		Tmax (h)[c]		AUClast (ng·h/mL)[b]	
		雄	雌	雄	雌	雄	雌
7.5[a]	1	911	777	0.75	0.75	2270	2320
	28	1030	580	1.00	1.00	2820	1650
	90	900	960	1.00	1.00	2490	2590
15	1	2150	2790	1.00	0.50	7790	8590
	28	2570	2030	1.00	1.00	8580	7370
	90	2150	2620	1.00	1.00	7360	8760
30	1	6160	5800	0.75	0.50	29,900	20,900
	28	5100	4300	0.75	1.00	27,800	18,000
	50	6220	4340	1.00	1.50	33,700	20,100
	90	NA	4100	NA	1.00	NA	19,600

AUClast: 定量可能な最終時点までの血漿中濃度－時間曲線下面積、Cmax: 最高血漿中濃度、Tmax: 最高血漿中濃度到達時間、NA: 該当するデータなし
n = 6.
a: n = 4.
b: 平均値で示す。
c: 中央値で示す。

4.　遺伝毒性試験

4.1　細菌を用いた復帰突然変異試験

資料番号 4.2.3.3.1-1

【方法】試験菌株としてネズミチフス菌及び大腸菌を用いて復帰突然変異試験を実施した。用量は、代謝活性化系の存在下又は非存在下にて最高用量で毒性を示す濃度（バレメトスタットトシル酸塩のフリー体であるバレメトスタットとして 39.1～5000 μg／プレート）

を設定した。

【結果】代謝活性化系の有無にかかわらず、バレメトスタットトシル酸塩処理群では、いずれの試験菌株でも復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。以上の結果から、本試験系ではバレメトスタットトシル酸塩は復帰突然変異を誘発しないと判断した。

4.2　チャイニーズハムスター肺由来細胞を用いた in vitro 小核試験

資料番号 4.2.3.3.1-2

【方法】チャイニーズハムスター肺由来細胞を用いた in vitro 小核試験を実施した。用量は、代謝活性化系の存在下又は非存在下にてバレメトスタットトシル酸塩の 0.025～0.4 mmol/L を設定した。

【結果】代謝活性化系存在下の 6 時間処理群では、小核を有する細胞の統計学的に有意な増加が認められた。以上の結果から、バレメトスタットトシル酸塩は in vitro で小核を誘発すると判断した。

4.3　ラット骨髄小核試験

資料番号 4.2.3.3.2-1

【方法】バレメトスタットトシル酸塩を 80% PEG200 及び 20%注射用水で懸濁し、0（対照）、100、300、1000、及び 2000 mg/kg の用量（20 mL/kg の投与液量）で雄ラットに単回経口投与した。

【結果】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。以上の結果から、バレメトスタットトシル酸塩は、ラット骨髄で小核を誘発しないと判断した。

4.4　ラット肝小核試験

資料番号 4.2.3.3.2-2

【方法】バレメトスタットトシル酸塩を 80% PEG200 及び 20%注射用水で懸濁し、0（対照）、100、300、1000、及び 2000 mg/kg の用量（20 mL/kg の投与液量）で雄ラットに部分肝切除の約 24 時間前及び約 24 時間後の 2 回投与し、肝小核試験を実施した。

【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は、ラット肝臓で小核を誘発しないと判断した。

5.　がん原性試験

ICH S9[1] に基づき、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　バレメトスタットトシル酸塩の経口投与によるラットの胚・胎児発生に関する予備試験

資料番号 4.2.3.5.2-1

【方法】バレメトスタットトシル酸塩を妊娠ラットの妊娠 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。バレメトスタットトシル酸塩を 80% PEG200 及び 20%注射用水で懸濁し、0（対照）、20、60、及び 200 mg/kg／日の用量（5 mL/kg の投与液量）で母動物（6 又は 7 例／群）に反復経口投与した。用量は、ラット 4 週間反復経口投与試験の結果に基づき設定した。

母動物では、一般状態観察、体重及び体重増加量、摂餌量、剖検、並びに黄体数及び着床数の評価を実施した。胎児では、生存胎児数、胚・胎児死亡数、胎児体重、性比の評価、並びに外表観察、内臓、及び骨格検査を実施した。

【結果】投与期間中、母動物の死亡は認められなかった。しかし、20 mg/kg／日群で体重増加抑制が認められ、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。母動物では、いずれの用量においても一般状態変化及び剖検所見は観察されなかった。

20 mg/kg／日群では着床後胚損失率の高値がみられ、60 mg/kg／日以上の群では母動物全例で全胚・胎児死亡がみられた。20 mg/kg／日群の生存胎児では、内臓異常は認められなかったが、骨格異常又は骨格変異（肋骨欠損、腰椎欠損、頸肋、肋骨短小、及び胸椎体分離など）が高頻度に認められた。一方、性比、胎児体重、胎盤及び外表の所見、並びに胸骨分節及び仙尾椎骨の骨化数に毒性学的意義のある変化はみられなかった。

以上の結果より、バレメトスタットトシル酸塩は全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。したがって、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。

7.　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、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い以下の変化がみられた。すなわち、7.5 mg/kg／日の雄で陰茎包皮に、15 mg/kg／日以上の群の雄で陰嚢皮膚に混合細胞性炎症がみられ、15 mg/kg／日群の雄 1 例で陰嚢皮膚表皮の変性／炎症が認められた。また、雌では眼に両側性の結膜赤変及び肥厚、両側性混合細胞炎症、並びに両側性黄色分泌物が認められた。30 mg/kg／日群では、雄で陰嚢皮膚の裂傷、表皮の過形成、びらん、又は潰瘍、並びに眼の結膜に上皮過形成及び扁平上皮化生を伴う混合細胞性炎症がみられ、雌では眼周囲皮膚に混合細胞性炎症及び表皮の変性／炎症、眼に及び角膜間質の片側性炎症が認められた。

8.　その他の毒性試験

8.1　毒性機序研究

8.1.1　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検索

資料番号 4.2.3.7.3-1

【方法】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（3.1.3）では、

20 mg/kg／日を投与されたラットで様々な臓器にリンパ腫がみられ、胸腺ではリンパ芽球過形成が観察された。リンパ腫と胸腺のリンパ芽球の免疫学的表現型を確認する目的で、ラット 13 週間反復投与試験で取得した未染色標本を用いて CD マーカーの IHC 染色を実施した。

【結果】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、ラット試験で観察されたリンパ腫は 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 及び 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 DN3、DN4、及び DP T 細胞から成り、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。

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

資料番号 4.2.3.7.3-2

【方法】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（3.1.3）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 80% PEG200 及び 20%注射用水で懸濁し、0（対照）又は 20 mg/kg／日の用量で 1 ヵ月（28 日）、2 ヵ月（56 日）、又は 3 ヵ月（84 日）間経口投与した雄性 Crl:CD（SD）ラット（各群 10、10、又は 20 例／群）について、一般状態観察、体重、血液学的検査、胸腺重量、剖検、病理組織学的検査、並びに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、胸腺についてトリメチル化されたヒストン H3 の 27 番目のリジン残基（trimethylated histone H3 lysine 27: H3K27me3）測定、クローナリティー解析、及び遺伝子発現解析を実施した。また、サテライト動物（3 例）を用いて投与 1 日目の TK も調べた。本試験の群構成を表 2.6.6.8-1 に示す。

表 2.6.6.8-1　バレメトスタットトシル酸塩の 3 ヵ月反復経口投与によるラット胸腺に対する探索毒性試験の群構成

群番号	剖検日	用量（mg/kg／日）	動物数	
			リンパ球サブセット解析用	病理学的検査及び遺伝子発現解析用
1	29 日目	0（対照群）	5	5
2	29 日目	20	5	5
3	57 日目	0（対照群）	5	5
4	57 日目	20	5	5
5	85 日目	0（対照群）	5	5
6	85 日目	20	10	10

【結果】投与に起因する死亡が投与 71 日目に 1 例で認められた。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。これらの動物では、剖検で胸腺、脾臓、及びリンパ節の腫大が観察された。病理組織学的検査では、リンパ腫が胸腺、脾臓、腸間膜リンパ節、又は顎下リンパ節で認められた。生存例では、2 例に胸腺重量の増加を伴う胸腺の腫大が認められた。病理組織学的検査では、2 ヵ月投与群の 1 例で胸腺の単細胞壊死及びリンパ芽球数の増加が認められ、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 2 ヵ月間以上の投与後に観察され、その発生率（4/19 例）は過去のラット 13 週間反復経口投与試験で観察された発生率と同等であった。

血液学的検査では、白血球数、リンパ球数、及び大型非染色球数の一過性の減少が投与 1 ヵ月後に認められ、中程度の好酸球数の増加が 1 ヵ月投与後、2 ヵ月投与後、及び 3 ヵ月投与後に認められた。また、白血球数、好酸球数、好中球数、リンパ球数、及び単球数の増加又は赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、網赤血球数、及び血小板数の減少が、リンパ腫が認められた 3 例で認められた。さらに、異常リンパ球及びアポトーシス様細胞が、リンパ腫が認められた 2 例でみられた。

末梢血のリンパ球サブセット解析では、リンパ腫が認められた 3 例で未熟 T 細胞数（DN1～DN4 T 細胞）のほか、CD3 陽性 T 細胞数、DP T 細胞数、CD4 陽性 T 細胞数、CD8 陽性 T 細胞数、B 細胞数、又はナチュラルキラー細胞数の増加が認められた。

胸腺のリンパ球サブセット解析では、1 ヵ月投与後で CD3 陽性 T 細胞数、DP T 細胞数、CD4 陽性 T 細胞数、及び CD8 陽性 T 細胞数が減少し、2 ヵ月投与後で DN4 T 細胞数及び CD4 陽性 T 細胞数が減少した。しかし、3 ヵ月投与後ではリンパ球サブセットに有意な変化は認められなかった。2 ヵ月投与群で胸腺腫大を示すがリンパ腫がみられなかった 1 例では、DN3 T 細胞数、CD3 陽性 T 細胞数、及び CD8 陽性 T 細胞数の増加が観察され、リンパ腫が認められた 4 例では、CD3 陽性 T 細胞数、CD8 陽性 T 細胞数、又は DN1～4 T 細胞数の増加が認められた。これら 5 例では、CD3 陽性 T 細胞数及び CD8 陽性 T 細胞数の顕著な増加が認められた。

バレメトスタットトシル酸塩投与群の全例で H3K27me3 の減少が認められ、1 ヵ月投与後からバレメトスタットトシル酸塩の薬理活性が確認された。

クローナリティー解析では、バレメトスタットトシル酸塩を 3 ヵ月間投与したがリンパ腫が認められなかった動物では、対応する対照動物と比較して、T 細胞レセプターβ 遺伝子の再構成パターンに変化は認められなかった。しかし、リンパ腫が認められた全例では、遺伝子再構成パターンに明らかな変化が認められ、それらは個体ごとに異なっていた。このことから、本試験でみられたリンパ腫はモノクローナル性増殖ではないことが示唆された。

リンパ腫を示した全例について遺伝子発現解析を行った結果、癌遺伝子活性化関連遺伝子（*Myc*、*Bcl2* 等）の発現増加、癌抑制遺伝子（*E2f2*、*Tp63* 等）の発現減少、及び T 細胞分化関連遺伝子（*Cd4*、*Cd83*、*Cd28*、*Tfap4* 等）の発現変動が認められた。

投与 1 日目の TK 解析では、本試験におけるバレメトスタットの Cmax 及び AUC24h の平均値は先に実施されたラット 13 週間反復経口投与試験と同等であった。

以上の結果より、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は、末梢血中で未熟 T 細胞が増加し、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 細胞分化を示した。さらに、T 細胞分化の異常、癌遺伝子の活性化、癌抑制遺伝子の抑制、又は T 細胞分化の異常が、ラットにおけるリンパ腫発症に関係していることが示唆された。

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

資料番号 4.2.3.7.3-3

【方法】先に実施されたラット 13 週間反復経口投与試験（3.1.3）及びラット胸腺に対する探索毒性試験（8.1.2）でみられたリンパ腫の発生機序及びリンパ腫に至る変化の回復性を検討するため、バレメトスタットトシル酸塩を 0、20、又は 60 mg/kg／日の用量で雄性 Crl:CD(SD)ラット（各群 5、30、又は 10 例／群）に 3 ヵ月間反復経口投与し（投与開始日を Day 1 とする）、血液学的検査及び末梢血リンパ球サブセット解析を投与前並びに 1、2、及び 3 か月間投与後に実施した。また、2 及び 3 ヵ月間投与後に動物を解剖し、胸腺について重量測定、剖検、病理組織学的検査、及びリンパ球サブセット解析を実施するとともに、一部の動物の胸腺について遺伝子発現解析、whole genome sequence、enhancer of zeste homolog（EZH）1 及び EZH2 に対する western blot 解析、並びにクローナリティー解析を実施した。さらに、バレメトスタットトシル酸塩を 2 ヵ月間投与後 3 ヵ月間休薬させた動物について、リンパ腫発症に至る変化の回復性を評価した。本試験の群構成を表 2.6.6.8-2 に示す。

表 2.6.6.8-2　バレメトスタットトシル酸塩の 3 ヵ月反復経口投与によるラット胸腺に対する毒性試験の群構成

群番号	用量（mg/kg／日）	動物数	解剖日
1	0（対照群）	5	2 ヵ月間投与後
2	0（対照群）	5	2 ヵ月間投与＋3 ヵ月間回復後
3	0（対照群）	5	3 ヵ月間投与後
4	20	30	2 ヵ月間投与後
5	20	30	2 ヵ月間投与＋3 ヵ月間回復後
6	20	30	3 ヵ月間投与後
7	60	10	3 ヵ月間投与後

【結果】投与に起因する死亡は認められなかった。しかし、20 mg/kg／日群の回復動物を含む計 7 例で体重減少が認められたことから、Day 64（回復 1 日目）、Day 65（回復 2 日目）、Day 68、Day 75（回復 12 日目）、Day 83（回復 20 日目）、Day 96（回復 33 日目）、及び Day 111（回復 48 日目）に早期解剖された。

剖検では、20 mg/kg／日群で胸腺重量の増加を伴う胸腺の腫大又は脾臓及びリンパ節の腫

大が 2 ヵ月間投与後に 6 例で、3 ヵ月間投与後に 7 例で、並びに早期解剖された全例で認められた。病理組織学的検査では、これらの動物でリンパ腫が認められた。結果として、リンパ腫は 20 mg/kg／日群でのみ、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の頻度（20/90 例）で認められた。

血液学的検査では、20 及び 60 mg/kg／日群で白血球数、リンパ球数、又は大型非染色球数の減少、並びに好酸球数の増加が 1、2、又は 3 ヵ月間投与後に認められた。リンパ腫が認められた 20 例中 5 例では、剖検前の検査で WBC パラメータの増加が認められた。これらの動物では、異常リンパ球及びアポトーシス様細胞も認められた。

末梢血リンパ球サブセット解析では、20 及び 60 mg/kg／日群で CD3 陽性 T 細胞、CD4 陽性 T 細胞、DN T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、又は αβ 陽性 T 細胞の絶対数の減少が 1、2、及び 3 ヵ月間投与後に認められた。2 ヵ月又は 3 ヵ月間投与後にリンパ腫が認められた動物では、主に CD3 陽性 T 細胞数、CD4 陽性 T 細胞数、CD8 陽性 T 細胞数、又は αβ 陽性 T 細胞数の減少が認められたが、CD3 陽性 T 細胞数、DP T 細胞数、DN T 細胞数、CD8 陽性 T 細胞数、及び αβ 陽性 T 細胞数の増加が 2 例で認められた。早期解剖された動物では、CD3 陽性 T 細胞数、CD4 陽性 T 細胞数、CD8 陽性 T 細胞数、又は αβ 陽性 T 細胞数の減少が 4 例で認められた。一方、CD8 陽性 T 細胞数及び αβ 陽性 T 細胞数の増加が 2 例でみられ、DP T 細胞数又は DN T 細胞数の増加が 5 例で認められた。

胸腺のリンパ球サブセット解析では、いずれの群でもリンパ球サブセットの絶対数に明らかな変化は認められなかった。早期解剖された動物を含むリンパ腫が認められた動物では、主に CD3 陽性 T 細胞数、CD8 陽性 T 細胞数、αβ 陽性 T 細胞数、DP T 細胞数、又は DN T 細胞数の増加が認められた。

胸腺の DP T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を用いた whole genome sequence では、リンパ腫がみられたいずれの動物でも有意なゲノム突然変異、コピー数異常、及び投与に起因する構造変異は認められなかった。

胸腺の遺伝子発現解析では、camera gene set enrichment analysis（GSEA）及び single-sample GSEA の結果、リンパ腫が認められた動物において、2 ヵ月間投与後に DP T 細胞で MYC、DN T 細胞、及び Treg に関連する gene signature の発現増加が認められ、DP T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞でインターフェロンに関連する signature の発現減少が認められた。3 ヵ月間投与後では、DP T 細胞で MYC、E2F、及び Treg に関連する gene signature の発現増加が認められた。末梢血の CD3 陽性 T 細胞及び胸腺の DP T 細胞又は CD8 陽性 T 細胞間で遺伝子発現を比較した結果、末梢血の CD3 陽性 T 細胞における遺伝子発現は、2 ヵ月間又は 3 ヵ月間投与後の胸腺の DP T 細胞又は CD8 陽性 T 細胞におけるそれとの関連性は認められなかった。3 ヵ月間投与後にリンパ腫が認められた動物及び認められなかった動物について、2 ヵ月間及び 3 ヵ月間投与後に採取した末梢血 CD3 陽性 T 細胞における遺伝子発現の経時変化を調べた結果、いずれの時点でもリンパ腫が認められた動物及び認められなかった動物間で遺伝子発現に明らかな違いは認められなかった。

Western blot 解析では、いずれの動物でも EZH1 蛋白は検出されなかった。一方、DP T 細

胞又は CD8 陽性 T 細胞の EZH2 蛋白は検出され、20 mg/kg／日群でリンパ腫が認められなかった動物の EZH2 蛋白発現は、対照群、20 mg/kg／日群でリンパ腫が認められた動物、及び 60 mg/kg／日群の動物と比較して減少する傾向が認められた。

クローナリティー解析では、3 ヵ月投与後にリンパ腫が認められなかった動物の T 細胞レセプターβ 遺伝子の再構成パターンに、対照群の動物と比較して変化は認められなかった。しかし、リンパ腫が認められた動物では、遺伝子再構成パターンに明らかな変化が認められた。

以上の結果より、バレメトスタットトシル酸塩の 20 mg/kg／日を投与されたラットでは、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 細胞数、CD8 陽性 T 細胞数、αβ 陽性 T 細胞数、DP T 細胞数、又は DN T 細胞数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。60 mg/kg／日群ではいずれの動物でもリンパ腫は認められなかった。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 T 細胞では、リンパ腫発症に関わる経時的な変化を確認することはできなかった。さらに、本試験ではリンパ腫に至る変化の回復性を結論することはできなかった。

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

資料番号 4.2.3.7.3-4

【方法】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を 80% PEG200 及び 20%注射用水で懸濁し、0（対照）、10、又は 20 mg/kg／日の用量で雄性ラット（投与開始時 55 週齢、各群 20、30、又は 30 例／群）に 3 ヵ月間反復経口投与した。一般状態観察、体重、血液学的検査、胸腺重量、剖検、及び病理組織学的検査について評価した。さらに、TK プロファイルを確認するため、投与 1 日目及び 69 日目にバレメトスタットの血漿中濃度を測定した。

【結果】投与に起因する瀕死又は死亡は認められなかった。また、投与に起因する一般状態の変化はいずれの群でもみられず、明らかな体重の変化も認められなかった。血液学的検査では、10 及び 20 mg/kg／日群で好酸球数の増加がみられ、10 又は 20 mg/kg／日群では白血球数、好中球数、リンパ球数、及び大型非染色球数の減少が認められた。投与に起因する胸腺重量の変化及び胸腺の組織学的変化はいずれの動物でも認められなかった。胸腺のリンパ球サブセット解析では、20 mg/kg／日群で 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。

バレメトスタットの Cmax 及び AUC24h は用量比より高い割合で増加した。また、反復投与による TK パラメータへの明らかな影響は認められなかった。20 mg/kg／日群では、投与 69 日目に測定された加齢ラットの平均 AUC24h 値は、ラット 13 週間反復経口投与試験（3.1.3）の投与 63 日目で測定された値と比較すると、やや高値を示したが、平均 Cmax 値は概ね同程度であった。曝露データを表 2.6.6.8-3 に示す。

以上の結果より、バレメトスタットトシル酸塩の 10 又は 20 mg/kg／日を 3 ヵ月間反復経口投与された加齢ラットでは、胸腺における T 細胞分化への影響が認められた。しかし、先に実施したより若い週齢のラット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。

表 2.6.6.8-3　加齢ラットにおけるバレメトスタットトシル酸塩の 3 ヵ月反復経口投与後のトキシコキネティクスパラメータ

用量（mg/kg／日）	日	Cmax（ng/mL）	Tmax（h）	AUC24h（ng·hr/mL）
10	1	63.3	4.00	731
	69	83.4	4.00	806
20	1	203	7.00	2630
	69	270	7.00	3440

データは平均値（n = 3）で示す。
AUC24h: 投与 24 時間後までの血漿中濃度－時間曲線下面積、Cmax: 最高血漿中濃度、Tmax: 最高血漿中濃度到達時間

8.2　光毒性試験

資料番号 4.2.3.7.7-1

【方法】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濃度 0.781～100 µg/mL で 37°C、1 時間処理し、UVA を照射（5 J/cm^2）した。

【結果】バレメトスタットトシル酸塩の析出はみられなかった。100 µg/mL では、UVA 非照射及び照射の両条件でニュートラルレッドの取り込みがわずかに減少したが、それ以外の用量では毒性は認められなかった。IC_{50} 値を算出できなかったため、光毒性係数は算出不能であった。平均光作用（mean photo effect: MPE）値は−0.008（MPE が 0.1 未満：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。

9.　考察

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投与したとき、ラットでは、200 mg/kg の用量まで毒性は認められなかった。イヌにおける主な毒性は、30 mg/kg 以上の群で認められた一過性の血漿中ヒスタミン上昇及びそれに伴う一般状態変化であった。血漿中ヒスタミン上昇はバレメトスタットトシル酸塩投与後 1 時間以内に認められた。発赤及び腫脹は反復経口投与試験のイヌにおいても同様に認められ、バレメトスタットによるヒスタ

ミン遊離に関連する可能性が高いと考えられた。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において、バレメトスタットトシル酸塩は、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、死亡例が確認された。死亡前には、瀕死状態（重篤な一般状態悪化、並びに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の早期解剖例では、血液学的検査値の変化（汎血球減少）が認められた。生存例（主にラット）では、死亡例より軽度の毒性変化及び血球減少が認められた。イヌ DFR 試験の死亡例では、これらの変化は骨髄（骨髄系細胞及び赤芽球系細胞）の細胞数減少と相関していた。さらに、胸腺、脾臓、又はリンパ節でリンパ細網組織の萎縮が認められた。骨髄の細胞数減少は、有糸分裂阻害作用を有する抗悪性腫瘍薬で骨髄抑制の結果として高頻度にみられる所見である[3]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。これに対し、リンパ組織に認められた変化は、特に体重及び摂餌量の減少、血液化学的検査値の変化、並びに副腎皮質の肥大がみられたこと、及びそれらがラットでストレスに関連して高頻度にみられる所見であること[4]から考えると、ストレスに関連した可能性が推測された。

ラットでは、消化管に一連の病変が認められた。剖検では、異常内容物、並びに多発性の暗色巣あるいは陥凹巣が認められた。後者の所見は、主として粘膜層のびらん又は粘膜下層の単核細胞性炎症像であった。イヌの途中死亡例でも類似の病変（胃の単核細胞性炎症像、並びに小腸粘膜固有層の細胞浸潤及び粘膜変性など）が認められたが、発生機序は不明であった。イヌでは、これらの消化管病変は、死亡例より重篤度は低いものの生存例でも認められた。

早期解剖された雄ラットでは、剖検時に多発性の腎皮質褪色巣が認められた。この所見と関連する病理組織学的所見として、限局性から多発性の尿細管変性が認められた。この病変の原因は明らかでないが、一般状態の悪化に至った一因と考えられた。MTD を超える用量群では、イヌの生存例及び死亡例の両方で、皮質及び皮髄境界部にびまん性の尿細管変性が認められた。この病変の原因も不明であったが、一般状態の悪化に至った一因と考えられた。ただし、この病変は、生存例では回復期間終了後にはみられなかった。

ラット DRF 試験では、100 mg/kg／日群で胸腺及び副腎に空胞化が認められた。また、1000 mg/kg／日群では、脳、腎臓、肝臓、肺、消化管を含む複数の臓器で空胞化と泡沫細胞浸潤が認められた。これらの所見から、バレメトスタットトシル酸塩は PLD を誘発する可能性が示唆された。全身性の PLD は、陽イオン性両親媒性薬物の副作用として広く認識されている、リソソーム性のリン脂質貯蔵障害である[5]。PLD はあらゆる組織に発生する可能性があり、その分布パターン[6]はラット試験で得られた病理組織学的所見に一致すると考えられるが、確定診断には、電子顕微鏡による微細構造の検査が必要である。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エビデンスは得られていない[7]。

ラット DRF 試験及び 13 週間反復経口投与試験で骨に対する毒性変化が認められた。ラット DRF 試験では 100 及び 1000 mg/kg／日群のそれぞれ 1 例で軽度の骨芽細胞の巣状増殖が認められた。ラット 13 週間反復経口投与試験では、雄の 60 mg/kg／日以上及び雌のすべての用量（20 mg/kg／日以上）でびまん性の過骨化が認められた。早期に死亡したラットでは、200 mg/kg／日群の雌雄で胸骨に過骨化が認められ、皮質骨及び海綿骨双方に影響していた。また、同群の雄では大腿骨、脛骨、及び頭蓋骨にも認められた。この変化は、骨髄腔容積を減少させ、頭蓋骨及び大腿骨では骨の肥厚を誘発していた。生存例では、60 mg/kg／日以上の雄及びすべての用量の雌で胸骨、大腿骨、脛骨に皮質骨及び海綿骨双方に影響する過骨化が認められた。4 週間の回復後でも、この所見は 60 mg/kg／日以上で残存していた。

EZH2 阻害による骨形成に対する影響として、polycomb repressive complex 2-EZH2 複合体のエピジェネティックな阻害又は EZH2 の直接阻害により影響する可能性が示されている[8]。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った。EZH1 又は 2 阻害と過骨化との関係性についても不明であった。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[9]。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な EFD 試験でみられた骨格異常又は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否かは不明であった。

ラット 13 週間反復経口投与試験では、200 mg/kg／日群の早期死亡または正規解剖された雄において、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の減少を伴っていた。加えて、肉眼的な小型化を伴う前立腺及び精嚢腺の萎縮が認められた。また、雄では乳腺の小葉腺胞の萎縮が認められた。

200 mg/kg／日群の雄の生存例では、すべての動物で精巣の精上皮の変性又は萎縮が認められ、精巣上体の管腔内の精子数減少に関与していた。加えて、前立腺及び精嚢腺の萎縮も 1 例で認められた。また、すべての投与動物で乳腺の萎縮が認められた。

4 週間の回復期間後に、精巣における精上皮の消失は完全には回復せず、精巣上体の管腔内における精子数の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、乳腺の小葉腺胞の過形成を伴っていた。

4 週間の回復期間後に、雌では、子宮頸部及び子宮でのみ所見が認められ、子宮内の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、すべての用量で精巣毒性が認められた。精上皮のびまん性萎縮及びそれに関連した間細胞（ライディッヒ細胞）の多巣性の肥大／過形成、並びに精巣上体の管腔内精子のびまん性減少（無精子症）が認められた。

4 週間の回復期間後に、15 mg/kg／日群では、精上皮の萎縮が認められた。また、1 例ではセルトリ細胞で巨大核、多核化、及び核の大小不同が認められた。精巣上体では、生殖細胞の枯渇（無精子症）が認められた。

全身と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の変化であり、投与の延長により減弱傾向を示した。これらの所見は、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、ラット試験ではヒスタミン遊離はみられなかった。イヌでヒスタミン遊離がみられた原因は不明である。しかし、肥満細胞の薬剤感受性に種差があることは文献等でよく報告されており、イヌは、ヒト臨床用医薬品として販売が承認されている薬剤（ポリアミン系及びフルオロキノロン系化合物 [10,11] など）のヒスタミン遊離作用に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 [12]。しかし、これらのヒスタミン遊離刺激物質をヒトに臨床使用したとき、イヌでみられる症状変化は認められていない。ヒスタミン遊離は、化学構造に関連する直接作用によって引き起こされる可能性がある [10] が、in vitro でのヒスタミン遊離評価及び臨床データから、それらの薬剤の大半に対して、ヒトでの感受性はイヌより低いことが示されている。

イヌ 4 週間反復経口投与試験では、投与 4 週目の投与前及び投与約 1 時間後の心電図において、30 mg/kg／日以上の群の雌で投与に起因する QTc 間隔延長が認められた。回復期間の検査では、QTc 間隔延長は認められなかった。この結果は、テレメトリー装着イヌを用いて心血管系に対する影響を評価した試験（資料番号 4.2.1.3-2）で、60 mg/kg／日で軽度な QTc 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。しかし、各試験で重要かつ新たな所見が認められた。

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）群で認められた胸腺及び多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 細胞性であることが確認された。

このほかの動物では、20 mg/kg／日以上の群で、胸腺及びリンパ節でリンパ組織の萎縮が

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球毒性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、胸腺重量及びリンパ球分画数の変化も回復した。

本試験で採取した組織の未染色標本を用いて、CD マーカーの免疫学的表現型検査を免疫染色により実施した。リンパ腫細胞と同様、リンパ芽球の過形成がみられた胸腺皮質のリンパ球も、IHC 染色による評価で 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判断された。

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 0 又は 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。0、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。しかし 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 細胞数、CD8 陽性 T 細胞数、αβ 陽性 T 細胞、DP T 細胞数、又は DN T 細胞数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。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、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

までの用量を加齢ラット（投与開始時 55 週齢）に投与し、胸腺への影響を探索的に評価した。

血液学的検査でバレメトスタットトシル酸塩によるリンパ腫の機序を検討するために実施した探索的試験でみられた変化と同様の変化が認められた。白血球数、リンパ球数、及び大型未染色細胞数の減少を含むいくつかの変化は、ラット 13 週間反復経口投与試験において 20 mg/kg／日群では認められなかったが、より高い用量では認められた。バレメトスタットトシル酸塩は、加齢ラットでは、若いラットを用いた試験より低い用量でこれらの血液学的変化を誘発すると考えられた。

加齢ラットでは、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。バレメトスタットトシル酸塩によるリンパ腫の発生機序を調べるために実施した探索試験では、バレメトスタットトシル酸塩を 1 ヵ月投与したラットでは、胸腺の CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞の絶対数の減少が認められ、バレメトスタットトシル酸塩を 2 ヵ月間投与したラットでは、CD4 陽性 T 細胞の絶対数の減少が認められた。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。これらの結果は、年齢の高い患者に対するバレメトスタットトシル酸塩のリンパ腫発症リスクに知見を与えてくれるものである。

イヌ 13 週間反復経口投与試験では、30 mg/kg／日群の雄がバレメトスタットトシル酸塩に忍容性を示さず、投与 51 日目に 4 例が早期安楽殺に至った。その主な原因は、投与 49 日目以降に陰嚢皮膚に認められた裂傷であった。30 mg/kg／日群の残り 2 例には、投与 51 日目から回復期間を設け、投与 84 日目に安楽殺された。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／潰瘍が認められた。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が発生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[13,14]。この仮説の根拠は、皮膚所見が腹側の被毛の少ない皮膚（陰嚢及び陰茎包皮）に限局しており、一般状態変化として足蹠発赤もみられたこと、及び一般状態の経過、特に環境（すなわち床材）の変更及び副腎皮質ホルモンによる局所治療後に一般状態変化が改善したことにある。同様に、結膜炎及び眼窩周囲皮膚の皮膚炎がみられたことから、慢性的な化学刺激が示唆された。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。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。眼や耳介にも発赤が認められ、ヒスタミンに関連する可能性が高いと考えられた。ヒスタミン遊離とそれに矛盾しない一般状態変化は、先に実施したイヌ 4 週間反復経口投与試験でも認められた。イヌ 13 週間反復経口投与試験では、眼、耳介や四肢の発赤も認められ、血漿中ヒスタミン濃度上昇との関連が考えられた。さらに、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。アレルギー性結膜炎には、ヒスタミンが H_1 受容体の活性化を介して関与する。肥満細胞阻害作用の評価系である眼結膜誘発試験では、アレルギー保有者で抗原惹起後 5〜10 分以内に涙液中ヒスタミン濃度上昇が検出される [15]。

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。一方、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体重又は体重増加量の低値が認められた。胎児では、20 mg/kg／日群で着床後胚損失率が高値であり、60 及び 200 mg/kg／日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。母動物及び胎児の NOAEL は定められなかった。結果として、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。ICH S9「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン」[1] 及び「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン」に関する質疑応答集（Q&A）[2] に基づいて、バレメトスタットトシル酸塩のさらなる生殖発生毒性試験を実施する必要はないと考えられた。

以上より、上述した 4 週間までの毒性試験で観察されたバレメトスタットトシル酸塩の高用量投与時の安全性プロファイルを検討した結果、ラットにおける STD_{10} は 200 mg/kg／日より大、イヌにおける HNSTD は 30 mg/kg／日と判断した。ラットでは、200 mg/kg／日投与後の平均 Cmax 及び AUClast は、それぞれ 2900 ng/mL 及び 20,400 ng·h/mL であった。イヌでは、30 mg/kg／日投与後の平均 Cmax 及び AUClast は、それぞれ 6200 ng/mL 及び 32,400 ng·h/mL であった。さらに長期（13 週間）のイヌ毒性試験では、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、雌で 30 mg/kg／日（評価した最高用量）と判断した。雄では、15 mg/kg／日投与後の Cmax 及び AUClast の平均値は、それぞれ 2150 ng/mL 及び 7360 ng·h/mL であった。雌では、30 mg/kg／日投与後の Cmax 及び AUClast の平均値は、それぞれ 4100 ng/mL 及び 19,600 ng·h/mL であった。ラット 13 週間試験では、低用量でリンパ腫が認められたため、STD_{10} は求められなかった。

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。また、毒性が認められた組織又は臓器で認められた影響は概ね可逆性を示すことが判明した。

ラット 13 週間反復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、非ホジキンリンパ腫に対するコンピュータ断層撮影による、又は急性骨髄性又はリンパ球性白血病に対する骨髄評価などによる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。

10. 結論

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、さらにラットで骨、肝臓、及び雌性生殖器、イヌで陰嚢であった。病理組織学的なリンパ腫はラットでみられ、一般症状変化を伴うヒスタミン遊離はイヌで認められた。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。

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 2.6.6.10-1 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臓器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 2.6.6.10-1　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

11. 参考文献

1. ICH S9, “Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals” Step 4 version, 29 October 2009.
2. ICH S9, “Questions and Answers: Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals” Step 4 version, 27 April 2018.
3. Greaves P. Histopathology of Preclinical Toxicity Studies: interpretation and relevance in drug safety studies. 4th ed. Amsterdam: Elsevier B.V.; 2012. p. 106.
4. 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.
5. Halliwell WH. Cationic amphiphilic drug-induced phospholipidosis. Toxicol Pathol. 1997;25(1):53-60.
6. Nonoyama T, Fukuda R. Drug-induced phospholipidosis - pathological aspects and its prediction. J Toxicol Pathol. 2008;21(1):9-24.
7. Reasor MJ, Hastings KL, Ulrich RG. Drug-induced phospholipidosis: issues and future directions. Expert Opin Drug Saf. 2006;5(4):567-83.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Ginn PE et al. Skin and appendages. In: Maxie MG, ed. Jubb, Kennedy, and Palmer’s Pathology of Domestic Animals. 5th ed. Vol 1. Philadelphia, PA: Elsevier; 2007:611-3.
14. 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.
15. Leonardi A. Role of Histamine in Allergic Conjunctivitis. Acta Ophthalmol Scand. 2000;78:18–21.

目次

1. 毒性試験： 一覧表 3
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 5
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 6
4. 毒性試験： 被験物質（バッチ毎）一覧 7
5. 単回投与毒性試験 8
6. 反復投与毒性試験： 重要な試験以外の試験 9
7. 反復投与毒性試験： 重要な試験 11
7.1 ラット 4 週間反復経口投与毒性試験 11
7.2 ラット 13 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 19
7.3 イヌ 4 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 36
7.4 イヌ 13 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 49
8. In Vitro 遺伝毒性試験 63
8.1 細菌を用いた復帰突然変異試験 63
8.2 哺乳類培養細胞を用いた in vitro 小核試験 66
9. In Vivo 遺伝毒性試験 68
9.1 ラット骨髄を用いた小核試験 68
9.2 ラット肝臓を用いた小核試験 69
10. がん原性試験 70
11. 生殖発生毒性試験： 重要な試験以外の試験 71
11.1 バレメトスタットトシル酸塩の経口投与によるラットの胚・胎児発生に関する予備試験 71
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 76
13. 生殖発生毒性試験： 胚・胎児発生に関する試験 77
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 78
15. 新生児を用いた試験 79
16. 局所刺激性試験 80
17. その他の毒性試験 81
17.1 毒性機序研究 81
17.1.1 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検索 81
17.1.2 バレメトスタットトシル酸塩の 3 ヵ月反復経口投与によるラット胸腺に対する探索毒性試験 82
17.1.3 バレメトスタットトシル酸塩の 3 ヵ月反復経口投与によるラット胸腺に対する毒性試験 83

17.1.4　バレメトスタットトシル酸塩の 3 ヵ月反復経口投与による加齢ラット胸腺に対する毒性試験.....84
17.2　光毒性試験.....85

1. 毒性試験： 一覧表

Overview						**Test Article: Valemetostat tosylate**		
Type of Study	**Species and Strain**	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**GLP Compliance**	**Testing Facility**	**Attachment Number**	**Location in CTD**
Single-Dose Toxicity	Rat Crl:CD(SD)	Oral gavage	1 day	0 (vehicle), 20, 60, 200[a]	Yes	[redacted], [redacted], Italy	4.2.3.1-1	4.2.3.1
Repeat-Dose Toxicity	Rat Crl:CD(SD)	Oral gavage	14 days	0 (vehicle), 10, 100[b],1000	No	Daiichi Sankyo, Tokyo, Japan	4.2.3.2-1	4.2.3.2
Repeat-Dose Toxicity	Rat Crl:CD(SD)	Oral gavage	4 weeks	0 (vehicle), 60, 200[c], 600	Yes	[redacted], [redacted], Italy	4.2.3.2-2	4.2.3.2
Repeat-Dose Toxicity	Rat Crl:CD(SD)	Oral gavage	13 weeks	0 (vehicle), 20, 60, 200	Yes	[redacted], [redacted], Italy	4.2.3.2-3	4.2.3.2
Single-Dose Toxicity	Dog beagle	Oral gavage	1 day	0 (vehicle), 15[a], 30, 60	Yes	[redacted], [redacted], Italy	4.2.3.1-2	4.2.3.1
Repeat-Dose Toxicity	Dog beagle	Oral gavage	14 days	0 (vehicle), 30, 100 (reduced to 15), 300 (reduced to 60[b])	No	[redacted], [redacted], Italy	4.2.3.2-4	4.2.3.2
Repeat-Dose Toxicity	Dog beagle	Oral gavage	4 weeks	0 (vehicle), 15, 30[d], 60	Yes	[redacted], [redacted], Italy	4.2.3.2-5	4.2.3.2
Repeat-Dose Toxicity	Dog beagle	Oral gavage	13 weeks	0 (vehicle), 7.5, 15[e], 30[f]	Yes	[redacted], [redacted], Italy	4.2.3.2-6	4.2.3.2
Genotoxicity Ames Test	Bacterial tester strains +/−S9	In vitro	–	39.1-5000 µg/plate	Yes	[redacted], Japan	4.2.3.3.1-1	4.2.3.3.1
Genotoxicity In vitro MN test	Chinese Hamster Lung Cells	In vitro	–	0.025 – 0.4 mmol/L	Yes	[redacted], Japan	4.2.3.3.1-2	4.2.3.3.1
Genotoxicity Rat Bone Marrow MN test	Rat Crl:CD(SD)	Oral gavage	Once	0 (vehicle), 100, 300, 1000, 2000	Yes	[redacted], Japan	4.2.3.3.2-1	4.2.3.3.2

Overview						Test Article: Valemetostat tosylate		
Type of Study	**Species and Strain**	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**GLP Compliance**	**Testing Facility**	**Attachment Number**	**Location in CTD**
Genotoxicity Rat Liver MN test	Rat Crl:CD(SD)	Oral gavage	Once before & once after partial hepatectomy	0 (vehicle), 100, 300, 1000, 2000	Yes	[redacted], Japan	4.2.3.3.2-2	4.2.3.3.2
Reproductive and Developmental Toxicity	Rat Crl:CD(SD)	Oral gavage	From Day 7 to Day 17 of pregnancy	0 (vehicle), 20, 60, 200	No	[redacted], Japan	4.2.3.5.2-1	4.2.3.5
Other Toxicity Studies - Mechanistic studies	Rat Crl:CD(SD)	Oral gavage	13 weeks	0 (vehicle), 20, 60, 200	No	Daiichi Sankyo, Tokyo, Japan	4.2.3.7.3-1	4.2.3.7.3
Other Toxicity Studies - Mechanistic studies	Rat Crl:CD(SD)	Oral gavage	4, 8, or 12 weeks	0 (vehicle), 20	No	Daiichi Sankyo, Tokyo, Japan	4.2.3.7.3-2	4.2.3.7.3
Other Toxicity Studies - Mechanistic studies	Rat Crl:CD(SD)	Oral gavage	8 or 12 weeks	0 (vehicle), 20, 60	No	Daiichi Sankyo, Tokyo, Japan	4.2.3.7.3-3	4.2.3.7.3
Other Toxicity Studies - Mechanistic studies	Rat Crl:CD(SD)	Oral gavage	12 weeks	0 (vehicle), 10, 20	No	Daiichi Sankyo, Tokyo, Japan	4.2.3.7.3-4	4.2.3.7.3
Other Toxicity Studies - Phototoxicity	Balb/c 3T3 Clone A31 mouse fibroblasts	Incubation in 96-well plate	1 hour pre-incubation, 50 min UVA irradiation exposure	0.781, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0, 100 µg/mL.	Yes	[redacted], Italy	4.2.3.7.7-1	4.2.3.7.7

GLP: Good Laboratory Practice; NM: Micronucleus; UVA: Ultraviolet light A.
[a]: No Observed Adverse Effect Level. [b]: Maximum Tolerated Dose. [c]: Severely Toxic Dose in 10% of animals. [d]: Highest Non-Severely Toxic Dose. [e]: Highest Non-Severely Toxic Dose of Male. [f]: Highest Non-Severely Toxic Dose of Female.

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: Valemetostat tosylate					
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Duration**	**Doses (mg/kg)**	**GLP Compliance**	**Attachment Number**	**Location in CTD**
Single-Dose Toxicity	Rat Crl:CD(SD)	Oral gavage	1 day	0 (vehicle), 20, 60, 200	Yes	4.2.3.1-1	4.2.3.1
Repeat-Dose Toxicity	Rat Crl:CD(SD)	Oral gavage	14 days	10, 100,1000	No	4.2.3.2-1	4.2.3.2
Repeat-Dose Toxicity	Rat Crl:CD(SD)	Oral gavage	4 weeks	0 (vehicle), 60, 200, 600	Yes	4.2.3.2-2	4.2.3.2
Repeat-Dose Toxicity	Rat Crl:CD(SD)	Oral gavage	13 weeks	0 (vehicle), 20, 60, 200	Yes	4.2.3.2-3	4.2.3.2
Single Dose Toxicity	Dog beagle	Oral gavage	1 day	0 (vehicle), 15, 30, 60	Yes	4.2.3.1-2	4.2.3.1
Repeat-Dose Toxicity	Dog beagle	Oral gavage	14 days	0 (vehicle), 30, 100 (reduced to 15), 300 (reduced to 60)	No	4.2.3.2-4	4.2.3.2
Repeat-Dose Toxicity	Dog beagle	Oral gavage	4 weeks	0 (vehicle), 15, 30, 60	Yes	4.2.3.2-5	4.2.3.2
Repeat-Dose Toxicity	Dog beagle	Oral gavage	13 weeks	0 (vehicle), 7.5, 15, 30	Yes	4.2.3.2-6	4.2.3.2

GLP: Good Laboratory Practice.

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: Valemetostat tosylate			
													Analyte: Valemetostat			
	Cmax (ng/mL)								AUClast (ng·h/mL)							
Species	Rats				Dogs				Rats				Dogs			
Daily Dose (mg/kg/day)	Male		Female		Male		Female		Male		Female		Male		Female	
	Day 1	Steady State [d]	Day 1	Steady State [d]	Day 1	Steady State [d]	Day 1	Steady State [d]	Day 1	Steady State [d]	Day 1	Steady State [d]	Day 1	Steady State [d]	Day 1	Steady State [d]
7.5	NA	NA	NA	NA	911 [f]	900 [f]	777 [f]	960 [f]	NA	NA	NA	NA	2270 [f]	2490 [f]	2320 [f]	2590 [f]
10	47.5 [a]	94.0 [a]	NA	NA	NA	NA	NA	NA	261 [a]	582 [a]	NA	NA	NA	NA	NA	NA
15	NA	NA	NA	NA	2150 [f]	2150 [f]	2790 [f]	2620 [f]	NA	NA	NA	NA	7790 [f]	7360 [f]	8590 [f]	8760 [f]
20	79.4 [b]	399 [b]	141 [b]	286 [b]	NA	NA	NA	NA	518 [b]	3380 [b]	685 [b]	2010 [b]	NA	NA	NA	NA
30	NA	NA	NA	NA	6160 [f]	6220 [f,h]	5800 [f]	4100 [f]	NA	NA	NA	NA	29,900 [f]	33,700 [f,h]	20,900 [f]	19,600 [f]
60	607 [b]	1060 [b]	1020 [b]	1770 [b]	12,500 [g]	7390 [g,i]	9180 [g]	11,100 [g,i]	4970 [b]	8710 [b]	6000 [b]	10,300 [b]	54,400 [g]	56,500 [g,i]	43,100 [g]	67,500 [g,i]
100	1630 [a]	2000 [a]	NA	NA	NA	NA	NA	NA	13,800 [a]	20,900 [a]	NA	NA	NA	NA	NA	NA
200	2440 [b]	4180 [b]	3120 [b]	3360 [b]	NA	NA	NA	NA	20,000 [b]	43,800 [b]	29,000 [b]	34,700 [b]	NA	NA	NA	NA
600	3130 [c]	5130 [c,e]	3870 [c]	7950 [c,e]	NA	NA	NA	NA	46,500 [c]	59,700 [c,e]	64,500 [c]	78,600 [c,e]	NA	NA	NA	NA
1000	5290 [a]	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA	90,000 [a]	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA

AUClast: area under the plasma concentration-time curve up to the last quantifiable time; Cmax: Maximum plasma concentration; NA: Not applicable; ND: No data.
[a]: 14-day repeated-dose toxicity study (4.2.3.2-1).
[b]: 13-week repeat-dose toxicity study (4.2.3.2-3).
[c]: 4-Week repeated dose toxicity study (4.2.3.2-2).
[d]: TK evaluation was conducted on the final dosing.
[e]: TK evaluation was conducted on Day 10 due to early termination.
[f]: 13-week repeated-dose toxicity study (4.2.3.2-6).
[g]: 4-Week repeated-dose toxicity study (4.2.3.2-5).
[h]: TK evaluation was conducted on Day 50.
[i]: TK evaluation was conducted on Day 16.

4. 毒性試験： 被験物質（バッチ毎）一覧

Drug Substance					**Test Article: Valemetostat tosylate**	
Batch No.	**Purity (%)**	**Organic Impurities (%) [a]**			**Attachment Number**	**Type of Study**
		Individual Max	Total	Enantiomer		
CALZ-1747-006	NA	NA	NA	NA	4.2.3.2-1	14-day rat repeated dose toxicity
1747-2G01	NA	NA	NA	NA	4.2.3.2-4	14-day dog repeated dose toxicity
WX101	98.3 w/w	0.16	0.93	0.49	4.2.3.1-1	Extended single dose rat toxicity
	98.3 w/w				4.2.3.1-2	Extended single dose dog toxicity
	98.1 w/w				4.2.3.2-2	4-week rat repeated dose toxicity
	98.1 w/w				4.2.3.2-5	4-week dog repeated dose toxicity
	98.1 w/w				4.2.3.7.7-1	Neutral red uptake phototoxicity
	98.3 w/w 98.1 w/w				4.2.3.3.1-1	Ames
	98.3 w/w 98.1 w/w				4.2.3.3.1-2	In vitro micronucleus
	98.3 w/w 98.1 w/w				4.2.3.3.2-1	Rat bone marrow micronucleus
	98.3 w/w 98.1 w/w				4.2.3.3.2-2	Rat liver micronucleus
WX102	99.0 w/w	0.12	0.76	0.31	4.2.3.2-3	13-week rat repeated dose toxicity
					4.2.3.2-6	13-week dog repeated dose toxicity
					4.2.3.5.2-1	Preliminary rat embryo-fetal development study
					4.2.3.7.3-2	Rat lymphoma mechanism study
					4.2.3.7.3-3	Rat lymphoma mechanism study
					4.2.3.7.3-4	Rat lymphoma mechanism study

a: Referred from 3.2.S.4.4. NA: not available.

5. 単回投与毒性試験

				Test Article: Valemetostat tosylate			
Species/Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**No Observed Adverse Effect Level (mg/kg)**	**Approximate Lethal Dose (mg/kg)**	**Noteworthy Findings**	**Attachment Number**
Rat/ Crl:CD (SD)	Oral gavage/80% PEG200 and 20% sterile water for injection	0 (vehicle), 20, 60, 200	Main study: 10 males and 10 females Extended observation (2-week post-dose): 5 males and 5 females	200	>200	200 mg/kg: at 24 hours post-dosing, a minimal increase in cortical lymphocyte apoptosis in the thymus, with males more affected than females in terms of incidence. These changes were not observed after a 2-week post-dose period.	4.2.3.1-1
Dog/ beagle	Oral gavage/80% PEG200 and 20% sterile water for injection	0 (vehicle), 15, 30, 60	5 males and 5 females	15	>60	≥30 mg/kg: red and/or swollen pinnae, muzzle, whole body, eyes and extremities within 1 hour after dosing. A minimal to marked increase in plasma histamine concentration at 0.5 or 1 hour after dosing. ≥15 mg/kg: emesis within one hour after dosing.	4.2.3.1-2

PEG: polyethylene glycol

6. 反復投与毒性試験： 重要な試験以外の試験

		Nonpivotal Studies			Test Article: Valemetostat tosylate		
Species/Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Duration of Dosing (days)**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. Per Group**	**MTD (mg/kg)**	**Noteworthy Findings**	**Attachment Number**
Rat/ Crl:CD (SD)	Oral gavage/0.5% methylcellulose solution	14	0 (vehicle control), 10, 100, 1000	4 males	100	1000 mg/kg: two deaths; decreased body weight and food consumption; increased RBC; decreased reticulocytes and WBC; remainder of group necropsied on Day 6 Macroscopic findings: grayish-white abnormal contents, distention in forestomach and glandular stomach and/or the intestinal tract containing mucous Microscopic findings: vacuolation and/or infiltration of foam cells in various organs including brain, kidney, liver, lung, and gastrointestinal tract; atrophy and necrosis in various organs, and changes in lymphohematopoietic organs; focal proliferation of osteoblasts in femoral bone marrow 100 mg/kg: decreased WBC; decreased RBC parameters; decreased numbers of lymphocytes in splenic periarterial lymphatic sheath, and in thymic cortex; decreased thymus size and weight; vacuolation in thymus and adrenals; focal proliferation of osteoblasts in femoral bone marrow 10 mg/kg: decreased WBC	4.2.3.2-1

		Nonpivotal Studies			Test Article: Valemetostat tosylate		
Species/Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Duration of Dosing (days)**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. Per Group**	**MTD (mg/kg)**	**Noteworthy Findings**	**Attachment Number**
Dog/ beagle	Oral gavage/80% PEG200 and 20% sterile water for injection	14	0 (vehicle), 30, 100 (reduced to 15), 300 (reduced to 60)	2 males, 2 females	60	300 and 100 mg/kg – single dose: severe clinical signs; transient increases in histamine levels 300/60 mg/kg: sporadic and transient clinical signs including emesis, salivation, unsteady gait, tremors, red extremities; transient increase in histamine levels after one day only; decreased body weight, reduced food intake; decreased WBC counts and reduced platelet counts in males; decreased RBC parameters in one male; increased fibrinogen in males; increased APTT in females; atrophy of the small intestine epithelium; thymic atrophy; bone marrow suppression in males 100/15 mg/kg: transient increase in histamine levels after one day only; increased APTT in females; thymic atrophy 30 mg/kg: sporadic and transient clinical signs including emesis, salivation, unsteady gait, tremors and red extremities; transient increase in histamine levels at all doses after one day only; increased fibrinogen in males; thymic atrophy	4.2.3.2-4

PEG: polyethylene glycol

7. 反復投与毒性試験： 重要な試験

7.1 ラット 4 週間反復経口投与毒性試験

Report Title: DS-3201b: Four Week Oral Repeat Dose Toxicity Study in Crl:CD(SD) Rat with a 4 Week Recovery Period								**Test Article: Valemetostat tosylate**
Species/Strain: Rats/Crl:CD(SD)		**Duration of Dosing: 4 weeks**						**Attachment Number. 4.2.3.2-2**
Initial Age: Approximately 8 weeks		**Duration of Postdose: 4 weeks**						
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]		**Method of Administration: Oral**						
		Vehicle/Formulation: 80% v/v PEG200 and 20% v/v sterile water for injection/Suspension						**GLP Compliance: Yes**
Special Features: animals given 600 mg/kg/day were euthanized moribund or found dead on Days 7, 8, 10, or 11. Animals given 0, 60, or 200 mg/kg/day: 10 main animals/sex/group were euthanized on Day 28 (males) or Day 29 (females), 3 TK animals/sex/group and 3 histamine animals/sex/group were euthanized on Day 29; the remaining 5 animals/sex/group were euthanized after approximately 4 weeks of recovery period.								
Severely Toxic Dose in 10% of the animals (STD_{10}): ≥200 mg/kg/day								
Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		60		200		600	
Number of Animals	M:	F:	M:	F:	M:	F:	M:	F:
Toxicology (main)	10	10	10	10	10	10	10	10
Toxicology (recovery)	5	5	5	5	5	5	5	5
Toxicokinetics	3	3	3	3	3	3	3	3
Histamine	3	3	3	3	3	3	3	3
Toxicokinetics:								
Cmax (ng/mL)								
Day 1	NE	NE	322	671	2470	3270	3130	3870
Day 28 [a]	NE	NE	787	1160	2480	3320	5130	7950
Tmax (h) [b]								
Day 1	NE	NE	4.00	2.00	4.00	2.00	12.00	24.00
Day 28 [a]	NE	NE	8.00	2.00	4.00	3.00	12.00	1.00
AUClast (ng·h/mL)								
Day 1	NE	NE	2540	4500	21,900	22,700	46,500	64,500
Day 28 [a]	NE	NE	6380	5680	20,500	20,300	59,700	78,600

Data are shown as mean value.
AUClast: area under the plasma concentration-time curve up to the last quantifiable time; GLP: Good Laboratory Practice; NE: Not examined; PEG: polyethylene glycol.
[a]: TK evaluation was conducted at 600 mg/kg/day on Day 10 due to early termination. b: Median. (Continued)

							Attachment Number. 4.2.3.2-2	
Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		60		200		600	
Number of Animals	M:21	F:21	M:21	F:21	M:21	F:21	M:21	F:21
Noteworthy Findings								
Early terminated: **Day 7 (toxicology)** **Day 8 (histamine)** **Day 10 (toxicology)** **(histamine)** **Day 11 (toxicology)** **(TK)**	0	0	0	0	0	0	 10 3 5 3	 1 1 9 2 3 3
Found dead **Day 11 (toxicology)** **Day 21 (TK)**	0	0	0	0	0	 1	0	 2
Early terminated								
Body Weight (% difference Day 11 versus Day 1; mean value)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	−22%	−16%
Food Consumption (% difference Week 1 versus pretreatment)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	−43%	−48%
Clinical Observations	In early terminated animals, severe clinical signs, mainly characterized by labored breathing, dyspnea, hunched posture, extreme subdued behavior, piloerection, and moderate salivation, were observed starting from Day 7.							
Functional Observation Battery (FOB)	In early terminated animals, a statistically significant decrease in rearing activity associated with a reduction in spontaneous locomotor activity was observed at 8 hours after treatment only.							
Whole Body Plethysmography (WBP)	-							
Histamine	-							

-: No noteworthy findings.
NA: not applicable.

(Continued)

							Attachment Number. 4.2.3.2-2	
Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		60		200		600	
Number of Animals	M:10	F:10	M:0	F:0	M:0	F:0	M:15	F:13
Hematology (Days 7, 10, and 11) [a]								
Reticulocytes ($\times 10^9$/L)	202.42	158.58	NA	NA	NA	NA	−87%	−87%
Platelets ($\times 10^9$/L)	1165.2	1215.1	NA	NA	NA	NA	−42%	−48%
Hematocrit (L/L)	0.450	0.424	NA	NA	NA	NA	+7%	+11%
Hemoglobin (g/L)	150.0	144.1	NA	NA	NA	NA	+7%	+12%
Red Blood Cells ($\times 10^{12}$/L)	8.267	7.917	NA	NA	NA	NA	−2%	+6%
Mean Cell Volume (fL)	54.50	53.59	NA	NA	NA	NA	+10%	+5%
Mean Cell Hemoglobin (pg)	18.16	18.20	NA	NA	NA	NA	+10%	+5%
White Blood Cells ($\times 10^9$/L)	8.702	3.613	NA	NA	NA	NA	−63%	−10%
Neutrophils ($\times 10^9$/L)	0.857	0.334	NA	NA	NA	NA	+51%	4.2
Lymphocytes ($\times 10^9$/L)	7.606	3.188	NA	NA	NA	NA	−77%	−46%
Monocyte ($\times 10^9$/L)	0.124	0.051	NA	NA	NA	NA	−77%	−53%
Eosinophils ($\times 10^9$/L)	0.065	0.025	NA	NA	NA	NA	+67%	4.5
Coagulation (Days 7, 10, and 11) [a]								
Prothrombin Time (PT) (seconds)	15.32	15.30	NA	NA	NA	NA	+19%	+16%
Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) (seconds)	17.68	17.89	NA	NA	NA	NA	+15%	+17%
Fibrinogen (mg/dL)	293.9	223.0	NA	NA	NA	NA	−11%	+8%
Clinical Chemistry (Days 7, 10, and 11) [a]								
Glucose (mmol/L)	6.319	5.664	NA	NA	NA	NA	+40%	+49%
Albumin (g/L)	37.5	40.8	NA	NA	NA	NA	−7%	−13%
Glutamate Dehydrogenase (U/L)	6.35	13.75	NA	NA	NA	NA	+18%	2.9
Total Protein(g/L)	58.5	61.9	NA	NA	NA	NA	−12%	−13%
Blood Urea Nitrogen (mmol/L)	5.57	5.83	NA	NA	NA	NA	+54%	+72%
Potassium (mmol/L)	5.349	4.721	NA	NA	NA	NA	−18%	−11%
Creatinine (µmol/L)	35.4	42.3	NA	NA	NA	NA	+7%	−10%
Phosphorus Inorganic (mmol/L)	3.056	2.663	NA	NA	NA	NA	−12%	−7%
Total Cholesterol (mmol/L)	1.377	1.979	NA	NA	NA	NA	+66%	+5%
Creatine Kinase (U/L)	452.2	295.8	NA	NA	NA	NA	−25%	+78%

NA: Not applicable.
[a]: For test item treated groups, the percentage or X-fold (of mean values among Day 7, Day 10, and Day 11 for females and between Day 10 and Day 11 for males) against the correspondent vehicle (Week 5) value is reported. (Continued)

			Attachment Number. 4.2.3.2-2					
Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		60		200		600	
Number of Animals	M:10	F:10	M:0	F:0	M:0	F:0	M:15	F:15
Organ Weights [a] (No. examined)	(10)	(10)	(0)	(0)	(0)	(0)	(15)	(12)
Day 10								
Adrenal (absolute) (g-fold vs control)	0.0824	0.0978	NA	NA	NA	NA	+43%	+15%
Adrenal (relative to BW, %-fold vs control)	0.0205	0.0418	NA	NA	NA	NA	2.2	+57%
Day 11								
Adrenal (absolute) (%-fold vs control)	0.0824	0.0978	NA	NA	NA	NA	+70%	+28%
Adrenal (relative to BW, %-fold vs control)	0.0205	0.0418	NA	NA	NA	NA	2.9	+76%
Gross Pathology								
Stomach								
Dark and depressed area in glandular mucosa, multifocal, 1-3 mm	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	3
Depressed area in glandular mucosa, focal, 1-3 mm	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2	1
Contents, firm	NA	NA	NA	NA	NA	NA	11	8
Distension	NA	NA	NA	NA	NA	NA	12	7
Duodenum								
Contents, fluid	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3	0
Distension	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3	0
Jejunum								
Contents, fluid	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3	0
Distension	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3	0
Ileum								
Contents, fluid	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3	0
Distension	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3	0
Cecum								
Contents, fluid	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3	0
Contents, soft	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3	1
Distension	NA	NA	NA	NA	NA	NA	6	1
Colon								
Contents, fluid	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3	0
Distension	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3	0

NA: Not applicable.
[a]: For test item treated groups, the percentage or X-fold against the correspondent vehicle (Week 5) value is reported.

(Continued)

							Attachment Number. 4.2.3.2-2	
Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		60		200		600	
Number of Animals	M:10	F:10	M:0	F:0	M:0	F:0	M:15	F:15
Gross Pathology								
Thymus								
Reduced size	NA	NA	NA	NA	NA	NA	14	12
Kidneys								
Area, pale, cortex, multifocal	NA	NA	NA	NA	NA	NA	5	0
Histopathology								
Bone marrow								
Sternal: hypocellularity	NA	NA	NA	NA	NA	NA	14/2.3[a]	15/2.4
Femoral: hypocellularity	NA	NA	NA	NA	NA	NA	14/2.6	15/2.4
Thymus								
Atrophy	NA	NA	NA	NA	NA	NA	15/4.0	15/4.0
Spleen								
Lymphoid hyperplasia	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2/1.0	1/1.0
Lymphoid atrophy	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1/4.0	6/2.2
Mesenteric lymph node								
Cortical atrophy	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2/2.0	5/1.8
Mandibular lymph								
Cortical atrophy	NA	NA	NA	NA	NA	NA	7/2.0	7/1.7
Stomach								
Erosion, glandular	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2/2.0	2/2.0
Inflammation	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3/1.0	1/2.0
Ileum								
Inflammation/degeneration	NA	NA	NA	NA	NA	NA	9/1.0	6/1.0
Peyer's patches (ileum)								
lymphoid depletion	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1/2.0	0
Cecum								
Inflammation/degeneration	NA	NA	NA	NA	NA	NA	13/1.8	9/1.4
Regenerative hyperplasia	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2/1.5	1/1.0
Colon								
Inflammation	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1/1.0	0

NA: Not applicable. [a]: Incidence and mean severity of lesions (histological grade: 1, minimal; 2, slight; 3, moderate; 4, marked; 5, massive) are shown. (Continued)

				Attachment Number. 4.2.3.2-2				
Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		60		200		600	
Histopathology								
Kidneys								
Tubular degeneration	NA	NA	NA	NA	NA	NA	7/2.1 [a]	0
Terminal Kill animals								
Number of Animals	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:-	F:-
Clinical Observations	In scheduled sacrificed animals, hair loss and/or scabs in 3 males (left shoulder or dorsal neck) and hair loss on both cheeks in 1 female given 200 mg/kg/day were observed starting from Day 15 in males or Day 24 in the female to the end of dosing period, with the exception of two males for which they were observed up to Day 31							
Functional Observation Battery (FOB)	A statistically significant decrease in rearing activity in all dose groups was observed at 8 hours after treatment							
Whole Body Plethysmography (WBP)	-							
Body Weight	A transient decrease in body weight was observed during Week 1 in males given 200 mg/kg/day (6% control)							
Body Weight gain	A transient decrease in body weight gain was observed during Week 1 in males given 200 mg/kg/day (35% control)							
Food Consumption	-							
Ophthalmoscopy (Week 4)	-							
Hematology (Week 5) [b]								
Hematocrit (L/L)	0.450	0.424	−2%	−5%**	−5%**	−9%**	NA	NA
Hemoglobin (g/L)	150.0	144.1	−4%**	−6%**	−7%**	−11%**	NA	NA
Red Blood Cells($\times 10^{12}$/L)	8.267	7.917	−4%	−6%*	−9%**	−11%**	NA	NA
Red Cell Distribution Width (%)	11.11	10.55	+3%	+9%**	+23%**	+32%**	NA	NA
Reticulocytes ($\times 10^9$/L)	202.42	158.58	−4%	+23%	−2%	+40%*	NA	NA
White Blood Cells ($\times 10^9$/L)	8.702	3.613	−47%**	−23%*	−62%**	−47%**	NA	NA
Neutrophils ($\times 10^9$/L)	0.857	0.334	−34%**	−41%**	−43%**	−43%**	NA	NA
Lymphocytes ($\times 10^9$/L)	7.606	3.188	−49%**	−21%	−65%**	−48%**	NA	NA

NA: Not applicable, -: No noteworthy findings.
* $P<0.05$ ** $P<0.01$
[a]: Incidence and mean severity of lesions (histological grade: 1, minimal; 2, slight; 3, moderate; 4, marked; 5, massive) are shown.
[b]: For test item treated groups, the percentage or X-fold against the correspondent vehicle (Week 5) value is reported. (Continued)

					Attachment Number. 4.2.3.2-2			
Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		60		200		600	
Number of Animals	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:-	F:-
Coagulation (Week 5)	-							
Clinical Chemistry (Week 5)	-							
Histamine	-							
Urinalysis (Week 5)	-							
Organ Weight (Week 5)	-							
Gross Pathology **Thymus** **Reduced in size**	0	0	2	1	5	4	NA	NA
Histopathology **Thymus** **Atrophy**	0	0	7/1.3 [a]	10/2.0	8/2.1	9/1.4	NA	NA

-: No noteworthy findings.
NA: Not applicable.
[a]: Incidence and mean severity of lesions (histological grade: 1, minimal; 2, slight; 3, moderate; 4, marked; 5, massive) are shown.

(Continued)

					Attachment Number. 4.2.3.2-2			
Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		60		200		600	
Recovery								
Number of Animals	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5	M:-	F:-
Clinical Observations	-							
Body Weight	-							
Body Weight Gain	-							
Food Consumption	-							
Hematology (Week 9) [a]								
Hematocrit (L/L)	0.424	0.438	+4%	0	−1%	+2%	NA	NA
Hemoglobin (g/L)	138.8	145.8	+3%	−1%	−1%	+1%	NA	NA
Red Blood Cells ($\times 10^{12}$/L)	7.938	8.114	+3%	+1%	−3%	−2%	NA	NA
Red Cell Distribution Width (%)	12.96	11.34	−1%	+1%	−4%	+1%	NA	NA
Reticulocytes ($\times 10^{9}$/L)	236.14	174.32	−3%	−9%	−21%	+12%	NA	NA
White Blood Cells ($\times 10^{9}$/L)	3.626	2.330	+59%	+32%	+8%	+30%	NA	NA
Neutrophils ($\times 10^{9}$/L)	0.496	0.240	+38%	+53%	+11%	+88%	NA	NA
Lymphocytes ($\times 10^{9}$/L)	3.028	2.048	+62%	+28%	+9%	+22%	NA	NA
Coagulation (Week 9)	-							
Clinical Chemistry (Week 9)	-							
Organ Weight (Week 9)	-							
Gross Pathology (Week 9)	-							
Histopathology (Week 9)	-							

-: No noteworthy findings.
NA: not applicable.
[a]: For test item treated groups, the percentage or X-fold against the correspondent vehicle (Week 9) value is reported.

7.2 ラット 13 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

Report Title: DS-3201b: 13 Week Oral Repeat Dose Toxicity Study in Crl:CD(SD) Rat with a 4 Week Recovery Period							**Test Article: Valemetostat tosylate**	
Species/Strain: Rats/Crl:CD(SD)			**Duration of Dosing: 13 weeks**				**Attachment Number. 4.2.3.2-3**	
Initial Age: 8 weeks age			**Duration of Postdose: 4 weeks**				**Location in CTD: 4.2.3.2**	
Date of First Dose: [redacted]			**Method of Administration: Oral**				**GLP Compliance: Yes**	
			Vehicle/Formulation: 80% v/v PEG200 and 20% v/v sterile water for injection/Suspension					
Special Features: Post dose recovery period (4 weeks) was set for 5 animals for each group/sex.								
Severely Toxic Dose in 10% of the animals (STD_{10}): lower than 20 mg/kg								
Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		20		60		200	
No. of Animals	M:3	F:3	M:3[a]	F:3[b]	M:3	F:3	M:3[b]	F:3
Toxicokinetics								
Cmax (ng/mL)								
Day 1	NE	NE	79.4	141	607	1020	2440	3120
Day 28	NE	NE	109	180	1050	850	4320	2670
Day 63	NE	NE	341	296	1340	1390	4580	4440
Day 90	NE	NE	399	286	1060	1770	4180	3360
Tmax (h) [c]								
Day 1	NE	NE	4.00	2.00	4.00	4.00	4.00	8.00
Day 28	NE	NE	4.00	2.00	4.00	2.00	4.00	8.00
Day 63	NE	NE	4.00	4.00	2.00	4.00	8.00	4.00
Day 90	NE	NE	3.00	2.00	4.00	2.00	6.00	4.00
AUClast (ng·h/mL)								
Day 1	NE	NE	518	685	4970	6000	20,000	29,000
Day 28	NE	NE	820	977	6060	6690	32,300	26,700
Day 63	NE	NE	2470	1880	10,600	10,400	39,700	39,600
Day 90	NE	NE	3380	2010	8710	10,300	43,800	34,700

Data are shown as mean value.
AUClast: area under the plasma concentration-time curve up to the last quantifiable time; GLP: Good Laboratory Practice; NE: Not examined; PEG: polyethylene glycol.
[a]: N = 1 for Day 90.
[b]: N = 2 for Day 90.
[c]: Median.

(Continued)

							Attachment Number. 4.2.3.2-3		
Dose (mg/kg/day)		0 (Control)		20		60		200	
No. of Animals		M:15	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15
Noteworthy Findings									
No. Died or Sacrificed Moribund		0	0	1	3	0	0	8	2
Clinical Observations									
Laboured breathing		0	0	1	3	0	0	4	1
Hunched posture		0	0	1	2	0	0	12	13
Red discharge from nostril		0	0	2	1	1	0	5	4
Red discharge from eye		0	0	1	0	1	1	1	3
Red discharge from mouth		0	0	0	0	0	0	3	1
Swollen muzzle		0	0	0	0	3	0	13	7
Red face or head		0	0	0	0	0	0	5	3
Reddened pinnas and/or muzzle		0	1	2	0	5	2	14	14
Transient hair loss		2	2	2	1	2	3	13	14
Piloerection		0	0	0	1	1	0	15	14
Body Weight (Δ%)[a]	**Day 90**	550.87 g	305.83 g	+3	+4	−4	+5	−15**	+2
Body Weight Gain (Δ%)[a]	**Day 90**	216.53 g	87.19 g	+6	+5	−9	+12	−38	+4
Food Consumption (Δ%)[a]	**Day 90**	28.2 g/5d	17.0 g/5d	−7	+14	−7	+29	−17	+2
Ophthalmology									
Choroid diffuse anemia	**Week 13**	0	0	NE	NE	0	0	0	8
Decreased vascular calibre	**Week 13**	0	0	NE	NE	0	0	0	8
Urinalysis		-	-	-	-	-	-	-	-

-: No noteworthy findings, NE: Not examined.
Statistics (vs Control): **$P < 0.01$ (Dunnett or non-parametric Dunnett test); Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).
[a]: Δ%: For the control group, group means are shown. For the treated groups, percent differences from the control are shown.

(Continued)

						Attachment Number. 4.2.3.2-3		
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		20		60		200	
No. of Animals	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15
Hematology (No. examined)	(3)	(2)	(0)	(0)	(0)	(3)	(2)	(8)
RBC (10^{12}/L) Day 91 or 92	8.130	7.380	NA	NA	NA	7.320	6.350**	4.176*
HCT (L/L) Day 91 or 92	0.437	0.395	NA	NA	NA	0.397	0.385*	0.254*
HB (g/L) Day 91 or 92	144.3	138.5	NA	NA	NA	135.0	122.0**	80.4*
WBC (10^9/L) Day 91 or 92	8.587	2.490	NA	NA	NA	2.510	2.985	1.789*
LYM (10^9/L) Day 91 or 92	7.273	2.065	NA	NA	NA	1.883	2.190*	1.213**
PLT (10^9/L) Day 91 or 92	1058.7	954.5	NA	NA	NA	753.0	864.0	961.9
Coagulation (No. examined)	(10)	(9)	(6)	(9)	(10)	(10)	(4)	(8)
FIB (mg/dL) Day 91 or 92	288.8	186.1	248.3*	184.4	237.4**	168.1	204.8**	172.0
Blood Chemistry (No. examined)	(10)	(10)	(8)	(9)	(10)	(10)	(4)	(8)
TP (g/L) Day 91 or 92	62.91	65.43	58.03**	63.43	56.78**	60.90**	54.65**	57.33**
Necropsy (No. examined)	(10)	(9)	(9)	(9)	(10)	(10)	(4)	(8)
Testes: Reduced size	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Thymus: Reduced size	0	0	0	1	0	7	1	5
Organ Weight (No. examined)	(10)	(10)	(8)	(9)	(10)	(10)	(6)	(8)
Adrenal								
Absolute Weight (Δ%) [a]	0.0571 g	0.0687 g	+16	−1	+27*	−3	+57**	+1
Relative Weight (Δ%) [a, b]	0.0104%	0.0243%	+15	−4	+36**	−3	+94**	+6
Spleen								
Absolute Weight (Δ%) [a]	0.7786 g	0.4983 g	+8	+12	+17	+21**	−2	+24*
Relative Weight (Δ%) [a, b]	0.142%	0.178%	+5	+8	+23*	+20**	+18*	+31**
Testes								
Absolute Weight (Δ%) [a]	3.8131 g	NA	+1	NA	−7	NA	−53*	NA
Relative Weight (Δ%) [a, b]	0.697%	NA	−3	NA	−1	NA	−43**	NA
Thymus								
Absolute Weight (Δ%) [a]	0.3491 g	0.3086 g	−16	−8*	−38**	−53**	−57**	−67**
Relative Weight (Δ%) [a, b]	0.062%	0.110%	−19*	−15**	−34**	−54**	−47**	−65**

Statistics (vs Control): *$P < 0.05$, **$P < 0.01$ (Dunnett or modified Steel test); Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).
NA: Not applicable.
[a]: Δ%: For the control group, group means are shown. For the treated groups, percent differences from the control are shown.
[b]: Relative weight to body weight.

(Continued)

							Attachment Number. 4.2.3.2-3	
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		20		60		200	
No. of Animals	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10
Histopathology (No. examined)	(10)	(10)	(9)	(9)	(10)	(10)	(4)	(8)
Adrenal								
Vacuolation, macrovesicular; zona reticularis; zona fasciculata; multifocal	0	0	0	0	0	0	2	0
minimal							1	
moderate							1	
Bone marrow								
Hyperplasia; haematopoietic cell; diffuse	0	0	0	0	6	5	4	6
minimal					1	3	0	0
mild					3	2	2	2
moderate					2	0	1	4
marked					0	0	1	0
Lymphoma	0	0	1	0	0	0	0	0
Caecum								
Dilation; glands; multifocal	0	0	0	0	0	0	1	1
mild							1	1
Hyperplasia; glands; epithelium; diffuse	0	0	0	0	0	0	3	7
minimal							2	2
mild							1	3
moderate							0	1
marked							0	1
Hyperplasia; atypical; glands; epithelium; diffuse	0	0	0	0	0	0	1	0
marked							1	
Inflammation; mixed cells; mucosa; multifocal	0	0	0	0	0	1	2	2
minimal						1		
mild							2	2
Cervix								
Atrophy; diffuse	NA	0	NA	0	NA	0	NA	2 [a]
moderate								2

NA: Not applicable. [a]: n = 7.

(Continued)

							Attachment Number. 4.2.3.2-3	
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		20		60		200	
No. of Animals	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10
Histopathology (No. examined)	(10)	(10)	(9)	(9)	(10)	(10)	(4)	(8)
Cervix								
Mucification; epithelium; diffuse	NA	0	NA	0	NA	0	NA	1 [a]
mild								1
Colon								
Hyperplasia; glands; epithelium; diffuse	0	0	0	0	0	0	4	2
minimal							3	1
mild							0	1
moderate							1	0
Inflammation; mixed cells; mucosa; diffuse	0	0	0	0	0	0	1	0
mild							1	
Epididymides								
Reduced sperm; lumen; diffuse	0	NA	0	NA	0	NA	4	NA
very marked							4	
Femur , femoro-tibial joint								
Hyperostosis; diffuse	0	0	0	0	6	5	4	4
minimal					6	5	3	3
mild					0	0	1	1
Heart								
Lymphoma	0	0	1	0	0	0	0	0
Ileum								
Lymphoma	0	0	1	0	0	0	0	0
Jejunum								
Lymphoma	0	0	1	0	0	0	0	0
Liver								
Hypertrophy; hepatocellular; centrilobular; multifocal	0	0	0	0	3	0	2	2
minimal					3		0	2
mild					0		2	0

NA: Not applicable. [a]: n = 7.

(Continued)

							Attachment Number. 4.2.3.2-3	
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		20		60		200	
No. of Animals	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10
Histopathology (No. examined)	(10)	(10)	(9)	(9)	(10)	(10)	(4)	(8)
Liver								
Pigment; green; canaliculus; hepatocyte; multifocal	0	0	0	0	1	0	0	3
minimal					1			2
mild					0			1
Lymphoma	0	0	1	0	0	0	0	0
Lung								
Lymphoma	0	0	1	0	0	0	0	0
Lymph nodes, mandibular								
Atrophy; lymphoid; diffuse	0	0	0	0	0	0	2	2
minimal							1	0
mild							1	1
moderate							0	1
Lymphoma	0	0	3	0	0	0	0	0
Lymph nodes, mesenteric								
Atrophy; lymphoid; diffuse	0	0	0	0	0	4	4	5
minimal						4	2	0
mild						0	1	2
moderate						0	1	3
Lymphoma	0	0	2	0	0	0	0	0
Mammary gland								
Atrophy; lobuloalveolar; diffuse	0 [a]	0	0 [b]	0 [c]	0	0	3 [d]	0
mild							3	
Ovaries								
Atrophy; diffuse	NA	0	NA	0	NA	0	NA	2
moderate								2
Prostate								
Atrophy; acinar; diffuse	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
minimal							1	

NA: Not applicable. [a]: n = 9. [b]: n = 7. [c]: n = 0. [d]: n = 3.

(Continued)

							Attachment Number. 4.2.3.2-3	
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		20		60		200	
No. of Animals	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10
Histopathology (No. examined)	(10)	(10)	(9)	(9)	(10)	(10)	(4)	(8)
Seminal vesicle								
Atrophy; diffuse	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
minimal							1	
Spleen								
Extramedullary haematopoiesis; increased; red pulp; diffuse	0	0	0	0	0	0	3	0
minimal							1	
mild							2	
Pigment; increased; red pulp; yellow; diffuse	0	0	3	4	6	2	3	7
minimal			3	4	5	0	0	0
mild			0	0	1	2	1	6
moderate			0	0	0	0	1	1
marked			0	0	0	0	1	0
Atrophy; red pulp; erythrocyte; diffuse	0	0	0	0	1	0	3	1
mild					1		1	1
moderate					0		2	0
Lymphoma	0	0	1	0	0	0	0	0
Sternum, bone marrow								
Hyperostosis; diffuse	0	0	0	2	10	10	3	8
minimal				2	6	2	0	0
mild				0	4	7	2	4
moderate				0	0	1	1	4
Testes								
Degeneration/atrophy; seminiferous epithelium; diffuse	0	NA	0	NA	0	NA	4	NA
mild							2	
moderate							1	
marked							1	

NA: Not applicable.

(Continued)

							Attachment Number. 4.2.3.2-3	
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		20		60		200	
No. of Animals	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10
Histopathology (No. examined)	(10)	(10)	(9)	(9)	(10)	(10)	(4)	(8)
Thymus								
Atrophy; lymphocyte; diffuse	0	0	6	4	9 [a]	9	3 [b]	8
minimal			5	4	1	0	0	0
mild			1	0	1	6	0	0
moderate			0	0	7	1	0	0
marked			0	0	0	2	0	0
very marked			0	0	0	0	3	8
Hyperplasia; lymphoblast; diffuse	0	0	5	2	3 [a]	5	3 [b]	8
minimal			4	1	3	5	0	3
mild			1	1	0	0	2	4
moderate			0	0	0	0	1	1
Lymphoma	0	0	3	2	0 [a]	0	0 [b]	0
Uterus								
Atrophy; diffuse	NA	0	NA	0	NA	0	NA	2 [c]
moderate								2
Vagina								
Atrophy; diffuse	NA	0	NA	0	NA	0	NA	2 [c]
moderate								2
Mucification; epithelium; diffuse	NA	0	NA	0	NA	0	NA	1 [c]
mild								1

NA: Not applicable. [a]: n = 9. [b]: n = 3. [c]: n = 7.

(Continued)

						Attachment Number. 4.2.3.2-3		
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		20		60		200	
No. of Animals	M:5	F:5	M:5	F:3	M:5	F:5	M:3	F:5
Noteworthy Findings in Recovery Period								
Dead or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations								
Swollen muzzle	0	0	0	0	0	0	1	0
Reddened pinnas and/or muzzle	0	0	0	0	0	0	2	0
Transient hair loss	0	0	0	0	0	0	1	2
Body Weight (Δ%) [a] Day 119	545.70 g	294.04 g	+5	+9	+1	+11	−15	+1
Body Weight Gain (Δ%) [a] Day 119	30.98 g	6.12 g	+63	+254	+71	-53	+73	+68
Food Consumption (Δ%) [a] Day 118	28.8 g/5d	19.0 g/5d	0	+12	−2	−1	−20	+2
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood Chemistry								
ALT (U/L)	29.16	22.68	271.62	23.37	38.14	28.52	21.70	20.88
AST (U/L)	136.38	129.50	331.42	92.53	106.08	105.70	96.33	95.64
ALP (U/L)	63.56	31.96	220.86	23.00	56.24	26.82	53.17	24.28
TBIL (µmol/L)	1.510	1.698	10.908	1.957	2.022	1.958	1.390	1.434
GLDH (U/L)	9.240	12.596	482.920*	15.933	27.560	29.046	8.707	10.476
Necropsy (No. examined)	(5)	(5)	(5)	(3)	(5)	(5)	(3)	(5)
Testes: Reduced size	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Organ Weight								
Testes								
Absolute Weight (Δ%) [a]	3.8484 g	NA	+6	NA	−12	NA	−53**	NA
Relative Weight (Δ%) [a, b]	0.670%	NA	0	NA	−14*	NA	−48**	NA

-: No noteworthy findings.
Statistics (vs Control): *$P < 0.05$, **$P < 0.01$ (Dunnett or modified Steel test); Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).
NA, not applicable.
[a]: Δ%: For the control group, group means are shown. For the treated groups, percent differences from the control are shown.
[b]: Relative weight to body weight.

(Continued)

					Attachment Number. 4.2.3.2-3			
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		20		60		200	
No. of Animals	M:5	F:5	M:5	F:3	M:5	F:5	M:3	F:5
Noteworthy Findings in Recovery Period								
Histopathology								
Bone marrow								
Hyperplasia; haematopoietic cell; diffuse	0	0	0	0	3	0	3	0
minimal					2		3	
mild					1		0	
Caecum								
Hyperplasia; glands; epithelium; diffuse	0	0	0	0	0	0	3	5
minimal							1	3
mild							2	2
Cervix								
Degeneration; epithelium; multifocal	NA	0	NA	0	NA	0	NA	3
minimal								1
mild								2
Inflammatory cell infiltrate; neutrophilic; mucosa; multifocal	NA	0	NA	0	NA	0	NA	3
minimal								1
mild								2
Mucification; epithelium; diffuse	NA	0	NA	0	NA	0	NA	1
minimal								1
Epididymides								
Reduced sperm; lumen; diffuse	0	NA	0	NA	0	NA	3	NA
very marked							3	
Vacuolation; epithelium; body; multifocal	0	NA	0	NA	0	NA	2	NA
minimal							2	
Femur, femoro-tibial joint								
Hyperostosis; diffuse	0	0	0	0 [a]	2	3	3	4
minimal					2	2	3	3
mild					0	1	0	1

NA: Not applicable. [a]: n = 2.

(Continued)

					Attachment Number. 4.2.3.2-3			
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		20		60		200	
No. of Animals	M:5	F:5	M:5	F:3	M:5	F:5	M:3	F:5
Noteworthy Findings in Recovery Period								
Histopathology								
Ileum								
Hyperplasia; crypt; epithelium; diffuse	0	0	0	0	0	0	1	0
mild							1	
Liver								
Pigment; green; canaliculus; hepatocyte; multifocal	0	0	0	0	0	0	0	4
minimal								4
Spleen								
Pigment; increased; red pulp; yellow; diffuse	0	0	1	0	4	4	3	4
minimal			1		2	1	0	2
mild			0		2	3	2	2
moderate			0		0	0	1	0
Sternum, bone marrow								
Hyperostosis; diffuse	0	0	0	0	1	5	3	5
minimal					1	3	1	3
mild					0	2	2	2
Testes								
Depletion; germinal epithelium; multifocal	0	NA	0	NA	0	NA	3	NA
mild							3	
Uterus								
Atrophy; diffuse	NA	0	NA	0	NA	0	NA	4
mild								4

NA: Not applicable.

(Continued)

					Attachment Number. 4.2.3.2-3			
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		20		60		200	
No. of Animals	M:0	F:0	M:1	F:3	M:0	F:0	M:8	F:2
Noteworthy Findings in Dead or Moribund Animals								
Necropsy								
Abdominal cavity [a]								
Fluid-filled	NA	NA	NA	1	NA	NA	NA	NA
Bone marrow [b]								
Reduced size	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2	NA
Femur								
Thickening; hard; diffuse	NA	NA	0	0	NA	NA	2	0
Liver								
Increased size; diffuse	NA	NA	1	0	NA	NA	0	0
Lymph node, mandibular								
Increased size; diffuse	NA	NA	1	3	NA	NA	0	0
Lymph node, mesenteric								
Increased size; diffuse	NA	NA	1	3	NA	NA	0	0
Ovaries								
Reduced size; left	NA	NA	NA	0	NA	NA	NA	1
Prostate								
Reduced size	NA	NA	0	NA	NA	NA	1	NA
Seminal vesicle								
Reduced size	NA	NA	0	NA	NA	NA	2	NA
Spleen								
Increased size; diffuse	NA	NA	1	3	NA	NA	0	0
Testes								
Flaccid	NA	NA	0	NA	NA	NA	4	NA
Reduced size	NA	NA	0	NA	NA	NA	3	NA
Thymus								
Increased size	NA	NA	1	2	NA	NA	0	0
Increased size; diffuse	NA	NA	0	1	NA	NA	0	0
Reduced size	NA	NA	0	0	NA	NA	7	2

NA: Not applicable. [a]: only 1 female at 20 mg/kg/day was examined. [b]: only 2 males at 200 mg/kg/day were examined.

(Continued)

							Attachment Number. 4.2.3.2-3	
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		20		60		200	
No. of Animals	M:0	F:0	M:1	F:3	M:0	F:0	M:8	F:2
Noteworthy Findings in Dead or Moribund Animals								
Histopathology								
Adrenal								
Vacuolation, macrovesicular; zona reticularis; zona fasciculata; multifocal	NA	NA	0	0	NA	NA	6	0
minimal							3	
mild							3	
Bone marrow								
Hyperplasia; haematopoietic cell; diffuse	NA	NA	0	0	NA	NA	4	0 [a]
mild							2	
moderate							2	
Lymphoma	NA	NA	1	3	NA	NA	0	0 [a]
Brain								
Lymphoma; meninges	NA	NA	0	1	NA	NA	0	0
Caecum								
Dilation; glands; multifocal	NA	NA	0	0	NA	NA	0	1
minimal								1
Colon								
Hyperplasia; glands; epithelium; diffuse	NA	NA	0	0	NA	NA	6	1
minimal							2	1
mild							2	0
moderate							2	0
Epididymides								
Reduced sperm; lumen; diffuse	NA	NA	0	NA	NA	NA	8	NA
very marked							8	
Femur, femoro-tibial joint								
Hyperostosis; diffuse	NA	NA	0	0	NA	NA	5	0 [a]
minimal							2	
mild							2	
moderate							1	

NA: Not applicable. [a]: n = 1. (Continued)

					Attachment Number. 4.2.3.2-3			
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		20		60		200	
No. of Animals	M:0	F:0	M:1	F:3	M:0	F:0	M:8	F:2
Noteworthy Findings in Dead or Moribund Animals								
Histopathology								
Femur, femoro-tibial joint								
Lymphoma	NA	NA	0	2	NA	NA	0	0 [a]
Heart								
Lymphoma	NA	NA	1	3	NA	NA	0	0
Ileum								
Lymphoma	NA	NA	1	3	NA	NA	0	0
Jejunum								
Lymphoma	NA	NA	1	2	NA	NA	0	0
Kidneys								
Lymphoma	NA	NA	1	3	NA	NA	0	0
Liver								
Hypertrophy; hepatocellular; centrilobular; multifocal	NA	NA	0	0	NA	NA	5	1
minimal							3	1
mild							1	0
moderate							1	0
Pigment; green; canaliculus; hepatocyte; multifocal	NA	NA	0	0	NA	NA	3	0
minimal							2	
mild							1	
Lymphoma	NA	NA	1	3	NA	NA	0	0
Lung								
Infiltration; mixed cells; localized	NA	NA	0	0	NA	NA	1	0
mild							1	
Infiltration; mixed cells; septa; alveolus; focal	NA	NA	0	0	NA	NA	1	0
minimal							1	
Inflammatory cell infiltrate; lymphohistocytic; septa; alveolus; focal	NA	NA	0	0	NA	NA	1	1
minimal							1	1

NA: Not applicable. [a]: n = 1.

(Continued)

							Attachment Number. 4.2.3.2-3	
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		20		60		200	
No. of Animals	M:0	F:0	M:1	F:3	M:0	F:0	M:8	F:2
Noteworthy Findings in Dead or Moribund Animals								
Histopathology								
Lung								
Thrombus; vascular; septa; focal	NA	NA	0	0	NA	NA	1	0
minimal							1	
Thrombus; vascular; septa; localized	NA	NA	0	0	NA	NA	1	0
mild							1	
Lymphoma	NA	NA	1	3	NA	NA	0	0
Lymph node, mandibular								
Atrophy; lymphoid; diffuse	NA	NA	0	0	NA	NA	1 [a]	2
minimal							1	2
Lymphoma	NA	NA	1	3	NA	NA	0 [a]	0
Lymph node, mesenteric								
Atrophy; lymphoid; diffuse	NA	NA	0	0	NA	NA	5	2
minimal							3	1
mild							3	1
moderate							1	0
Lymphoma	NA	NA	1	3	NA	NA	0	0
Mammary gland								
Atrophy; lobuloalveolar; diffuse	NA	NA	0	0	NA	NA	5	0
mild							5	
Ovaries								
Atrophy; diffuse	NA	NA	NA	0	NA	NA	NA	1
mild								1
Lymphoma	NA	NA	NA	2	NA	NA	NA	0
Prostate								
Atrophy; acinar; diffuse	NA	NA	0	NA	NA	NA	6	NA
minimal							1	
mild							5	

NA: Not applicable. [a]: n = 7.

(Continued)

							Attachment Number. 4.2.3.2-3	
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		20		60		200	
No. of Animals	M:0	F:0	M:1	F:3	M:0	F:0	M:8	F:2
Noteworthy Findings in Dead or Moribund Animals								
Histopathology								
Pituitary								
Lymphoma	NA	NA	0	1	NA	NA	0	0
Salivary gland, parotid								
Lymphoma	NA	NA	0	1	NA	NA	0	0
Seminal vesicle								
Atrophy; diffuse	NA	NA	0	NA	NA	NA	5	NA
minimal							1	
mild							4	
Skull [a]								
Hyperostosis; diffuse	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3	NA
mild							3	
Spleen								
Extramedullary haematopoiesis; increased; red pulp; diffuse	NA	NA	0	0	NA	NA	2	0
minimal							1	
mild							1	
Pigment; increased; red pulp; yellow; diffuse	NA	NA	0	0	NA	NA	8	2
minimal							1	0
mild							4	1
moderate							3	1
Atrophy; red pulp; erythrocyte; diffuse	NA	NA	0	0	NA	NA	5	2
mild							1	2
moderate							2	0
marked							2	0
Lymphoma	NA	NA	1	3	NA	NA	0	0

NA: Not applicable. [a]: only 3 males at 200 mg/kg/day were examined.

(Continued)

							Attachment Number. 4.2.3.2-3	
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		20		60		200	
No. of Animals	M:0	F:0	M:1	F:3	M:0	F:0	M:8	F:2
Noteworthy Findings in Dead or Moribund Animals								
Histopathology								
Sternum, bone marrow								
Hyperostosis; diffuse	NA	NA	0	0	NA	NA	8	2
minimal							2	0
mild							5	0
moderate							0	1
marked							1	1
Lymphoma	NA	NA	1	3	NA	NA	0	0
Testes								
Degeneration/atrophy; seminiferous epithelium; diffuse	NA	NA	0	NA	NA	NA	8	NA
mild							1	
moderate							6	
marked							1	
Thymus								
Atrophy; lymphocyte; diffuse	NA	NA	0	0	NA	NA	6 [a]	2
very marked							6	2
Hyperplasia; lymphoblast; diffuse	NA	NA	0	0	NA	NA	6 [a]	2
minimal							1	1
mild							4	1
moderate							1	0
Lymphoma	NA	NA	1	3	NA	NA	0 [a]	0
Uterus								
Atrophy; diffuse	NA	NA	NA	0	NA	NA	NA	1
mild								1
Vagina								
Atrophy; diffuse	NA	NA	NA	0	NA	NA	NA	1
mild								1

NA: Not applicable. [a]: n = 6.

7.3 イヌ 4 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

Report Title: DS-3201b: Four Week Oral Repeat Dose Toxicity Study in Beagle Dog with a 4 Week of Recovery Period							**Test Article: Valemetostat tosylate**	
Species/Strain: Dog/Beagle		**Duration of Dosing: 4 weeks**					**Attachment Number: 4.2.3.2-5**	
Initial Age: 8 to 9 months age		**Duration of Postdose: 4 weeks**					**Location in CTD: 4.2.3.2**	
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]		**Method of Administration: oral**						
		Vehicle/Formulation: 80% v/v PEG200 and 20% v/v sterile water for injection/Suspension					**GLP Compliance: Yes**	
Special Features:								
HNSTD (Highest Non-Severely Toxic Dose): at least 30 mg/kg/day								
Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		15		30		60	
Number of Animals **Toxicology (main)** **Assigned to Treatment-Free period**	M: 3 2	F: 3 2	M: 3 2	F: 3 2	M: 3 2	F: 3 2	M: 3 2	F: 3 2
Toxicokinetics								
Cmax (ng/mL)								
Day 1	NE	NE	2420	1570	4210	4960	12,500	9180
Day 28	NE	NE	2640	2770	7750	4650	7390 [b,c]	11,100 [b,d]
Tmax (h)[a]								
Day 1	NE	NE	0.50	1.00	1.00	0.50	0.50	0.50
Day 28	NE	NE	1.00	1.00	1.00	0.50	1.30 [b,c]	0.50 [b,d]
AUClast (ng·h/mL)								
Day 1	NE	NE	8810	5960	21,300	25,500	54,400	43,100
Day 28	NE	NE	8790	10,600	32,600	32,200	56,500 [b,c]	67,500 [b,d]

Data are shown as mean value.
AUClast: area under the plasma concentration-time curve up to the last quantifiable time; GLP: Good Laboratory Practice; NE: Not examined; PEG: polyethylene glycol.
[a]: Median.
[b]: Data obtained on Day 16.
[c]: N = 2.
[d]: N = 1.

(Continued)

						Attachment Number: 4.2.3.2-5		
Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		15		30		60	
Number of Animals	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5
Noteworthy Findings:								
Found dead Day 28	0	0	0	0	0	0	1	1
Moribund-sacrifice Day 16	0	0	0	0	0	0	1	1
Interim-sacrifice Day 17	0	0	0	0	0	0	4	0
Interim Deaths Evaluation								
Clinical signs	Reddening or swollen of the whole body and/or of the pinna was observed in all animals, prematurely euthanized, starting from Day 1 or Day 2 and present only during the first week of treatment. The severity of this finding, likely related to the histamine release, decreased as dosing progressed. Vomit in the cage was observed throughout the treatment period and salivation, before dosing, was observed starting from Day 3 to the end of the dosing period in the majority of these animals. Black and/or green faeces was also observed on Days 16 and 17. In addition, subdued behavior was observed during week 2 in some animals in few occasions.							
Food Consumption	A decrease in mean food consumption was observed in males starting from the second week of treatment with a maximum reduction of 80% by Day 15. In females, a mean decrease was also observed sporadically starting during week 2 with a maximum reduction of 79% on Day 23.							
Ophthalmoscopy	NA							
Electrocardiography	NA							
Urinalysis	NA							

NA: Not applicable.

(Continued)

Individual data of interim dead or moribund animals					Attachment Number: 4.2.3.2-5		
Animal No./sex	164/M	175/M	176/M	178/M	179/M	195/F	197/F
Body Weight (kg)							
Day −7	8.8	7.5	7.2	9.5	8.1	6.1	8.1
Day 16	ND	ND	6.1	ND	ND	4.8	ND
Day 17 (Day 22 for Female No. 197)	8.2	6.3	ND	8.0	6.7	ND	7.5
Hematology							
Absolute Reticulocyte ($\times 10^9$/L)							
Day −8	20.5	47.3	26.0	28.7	29.7	38.2	39.2
Day 16	ND	ND	14.2	ND	ND	7.2	ND
Day 17	8.9	4.7	ND	10.0	5.1	ND	ND
Day 22	ND	ND	ND	ND	ND	ND	30.7
Platelet ($\times 10^9$/L)							
Day −8	264	283	277	246	218	297	302
Day 16	ND	ND	128	ND	ND	230	ND
Day 17	76	165	ND	235	65	ND	ND
Day 22	ND	ND	ND	ND	ND	ND	80
White Blood Cells ($\times 10^9$/L)							
Day −8	11.81	11.75	11.55	9.24	10.25	9.78	10.70
Day 16	ND	ND	2.67	ND	ND	1.30	ND
Day 17	3.48	1.22	ND	2.34	2.99	ND	ND
Day 22	ND	ND	ND	ND	ND	ND	7.61
Absolute Neutrophil ($\times 10^9$/L)							
Day −8	7.38	7.56	8.16	5.72	6.19	6.18	6.78
Day 16	ND	ND	1.70	ND	ND	0.14	ND
Day 17	1.66	0.11	ND	0.99	1.91	ND	ND
Day 22	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4.95
Absolute Lymphocytes ($\times 10^9$/L)							
Day −8	2.45	3.02	2.26	2.50	2.76	2.78	3.08
Day 16	ND	ND	0.76	ND	ND	0.99	ND
Day 17	1.31	0.95	ND	1.03	0.79	ND	ND
Day 22	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.81

ND: No data.

(Continued)

Individual data of interim dead or moribund animals					Attachment Number: 4.2.3.2-5		
Animal No./sex	164/M	175/M	176/M	178/M	179/M	195/F	197/F
Absolute Monocytes ($\times 10^9$/L)							
Day −8	0.53	0.57	0.62	0.59	0.48	0.50	0.40
Day 16	ND	ND	0.12	ND	ND	0.06	ND
Day 17	0.13	0.08	ND	0.13	0.07	ND	ND
Day 22	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.41
Absolute Eosinophils ($\times 10^9$/L)							
Day −8	1.35	0.42	0.43	0.34	0.62	0.21	0.31
Day 16	ND	ND	0.09	ND	ND	0.10	ND
Day 17	0.37	0.07	ND	0.18	0.21	ND	ND
Day 22	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.44
Absolute Basophils ($\times 10^9$/L)							
Day −8	0.09	0.15	0.06	0.07	0.15	0.10	0.10
Day 16	ND	ND	0.00	ND	ND	0.00	ND
Day 17	0.01	0.00	ND	0.01	0.00	ND	ND
Day 22	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.01
Large Unstained Cells ($\times 10^9$/L)							
Day −8	0.02	0.03	0.02	0.02	0.05	0.01	0.02
Day 16	ND	ND	0.00	ND	ND	0.00	ND
Day 17	0.00	0.01	ND	0.00	0.00	ND	ND
Day 22	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.00
Coagulation							
Fibrinogen (mg/dL)							
Day −8	312	275	229	200	271	237	186
Day 16	ND	ND	299	ND	ND	502	ND
Day 17	383	659	ND	472	369	ND	ND
Day 22	ND	ND	ND	ND	ND	ND	227
Clinical Chemistry							
Blood Urea Nitrogen (mmol/L)							
Day −8	3.9	5.0	4.7	3.6	4.5	5.2	4.1
Day 16	ND	ND	42.9	ND	ND	5.5	ND
Day 17	5.9	4.4	ND	9.1	12.8	ND	ND
Day 22	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3.3

ND: No data.

(Continued)

Individual data of interim dead or moribund animals					Attachment Number: 4.2.3.2-5		
Animal No./sex	164/M	175/M	176/M	178/M	179/M	195/F	197/F
Creatinine (µmol/L)							
Day −8	60	61	51	62	63	60	59
Day 16	ND	ND	315	ND	ND	49	ND
Day 17	64	48	ND	64	63	ND	ND
Day 22	ND	ND	ND	ND	ND	ND	72
Phosphorus Inorganic (mmol/L)							
Day −8	1.80	1.56	1.81	1.58	1.93	1.78	2.06
Day 16	ND	ND	3.86	ND	ND	1.56	ND
Day 17	1.98	1.69	ND	1.90	1.70	ND	ND
Day 22	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.82
Total Bilirubin (µmol/L)							
Day −8	0.9	1.0	0.7	1.0	0.7	1.9	1.8
Day 16	ND	ND	1.3	ND	ND	4.3	ND
Day 17	0.6	1.3	ND	4.6	2.5	ND	ND
Day 22	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.6
Cholesterol (mmol/L)							
Day −8	3.24	3.90	2.25	2.95	2.93	2.27	2.74
Day 16	ND	ND	4.37	ND	ND	4.55	ND
Day 17	4.90	4.06	ND	3.63	5.57	ND	ND
Day 22	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3.48
Potassium (mmol/L)							
Day −8	4.74	4.62	4.31	4.26	4.87	4.80	4.57
Day 16	ND	ND	3.76	ND	ND	3.61	ND
Day 17	4.04	4.33	ND	5.30	4.12	ND	ND
Day 22	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4.17
Chloride (mmol/L)							
Day −8	114	111	113	113	113	113	114
Day 16	ND	ND	90	ND	ND	98	ND
Day 17	117	112	ND	109	102	ND	ND
Day 22	ND	ND	ND	ND	ND	ND	118

ND: No data.

(Continued)

Individual data of interim dead or moribund animals									**Attachment Number: 4.2.3.2-5**
Organ Weight[a]									
Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	0 (Control)	60						
	Male	Female	Animal No./sex						
	Mean value	Mean value	164/M	175/M	176/M	178/M	179/M	195/F	197/F
Kidney (absolute value, g)	40.1433	31.2833	+14.9%	+12.4%	+43.5%	+12.6%	+7.2%	+3.6%	NA
Kidney (relative to body weight; %)	0.487	0.503	+6.8%	+25.3%	+58.1%	−1.4%	+6.8%	+7.4%	NA
Kidney (relative to brain weight; %)	53.17	46.13	+30.0%	+23.4%	+59.3%	+15.9%	+5.1%	+8.8%	NA
Adrenals (absolute value, g)	1.1133	1.1600	+22.2%	+29.3%	+17.7%	+30.2%	+24.9%	−0.9%	NA
Adrenals (relative to body weight; %)	0.0137	0.0183	+9.5%	+38.7%	+24.1%	+9.5%	+24.1%	+3.8%	NA
Adrenals (relative to brain weight; %)	1.473	1.717	+38.5%	+42.6%	+31.0%	+34.4%	+22.2%	+3.7%	NA

NA: Not applicable.
[a]: For test item treated groups, the percentage against the correspondent vehicle value is reported.

(Continued)

					Attachment Number: 4.2.3.2-5		
Animal No./sex	164/M	175/M	176/M	178/M	179/M	195/F	197/F
Necropsy							
Stomach							
Discoloration or discolored areas	-	-	-	-	-	-	Present
Jejunum							
Discoloration or discolored areas	-	-	-	-	-	-	Present
Colon							
Discoloration or discolored areas	Present	Present	-	Present	Present	Present	Present
Rectum							
Discoloration or discolored areas	Present	Present	-	-	-	-	-
Mandibular lymph node							
Reduced size	-	-	-	-	-	-	Present
Thymus							
Reduced size	-	-	-	-	Present	-	-
Histopathology							
Bone marrow, sternal							
Hypocellularity	-	Slight	Marked	Minimal	Slight	Minimal	Moderate
Thymus							
Atrophy	NP	Moderate	Marked	Marked	Marked	Moderate	Marked
Spleen							
Lymphoid atrophy	-	-	-	Slight	Slight	-	Slight
Mesenteric lymph nodes							
Lymphoid atrophy	-	Slight	-	Slight	Slight	-	Slight
Duodenum							
Reduced mucosal height	-	Minimal	Slight	NP	Minimal	Minimal	Slight
Increased mononuclear infiltration	-	Minimal	-	NP	-	Minimal	Minimal
Mucosal degeneration	-	-	-	NP	Slight	-	Slight
Jejunum							
Reduced mucosal height	-	Slight	Minimal	Minimal	Minimal	Minimal	Slight
Mucosal degeneration	-	-	-	-	Minimal	-	Slight
Increased mononuclear infiltration	-	-	-	-	-	Minimal	Minimal

-: No noteworthy finding. NP: the corresponding tissue was not present.

(Continued)

					Attachment Number: 4.2.3.2-5		
Animal No./sex	164/M	175/M	176/M	178/M	179/M	195/F	197/F
Ileum							
Reduced mucosal height	-	Slight	Slight	Slight	Minimal	Slight	Slight
Increased mononuclear infiltration	-	Minimal	Minimal	Slight	-	Minimal	Minimal
Mucosal degeneration	-	-	Slight	Minimal	-	-	Slight
Peyer's patches (ileum)							
Atrophy	-	Minimal	Slight	Slight	Minimal	Minimal	Slight
Cecum							
Reduced mucosal height	-	Minimal	Minimal	Minimal	-	Minimal	Minimal
Increased mononuclear infiltration	-	Minimal	Minimal	Minimal	-	-	Minimal
Mucosal degeneration	-	-	Minimal	Minimal	-	-	Minimal
Colon							
Reduced mucosal height	-	Slight	Minimal	Slight	-	Minimal	Slight
Increased mononuclear infiltration	-	Minimal	Minimal	Minimal	-	-	Minimal
Mucosal degeneration	-	Slight	Minimal	Slight	-	-	Slight
Rectum							
Reduced mucosal height	-	Slight	-	-	-	-	-
Mucosal degeneration	-	Slight	-	-	-	-	-
Kidney							
Tubular degeneration	-	-	Marked	-	Moderate	-	Marked

-: No noteworthy finding.

(Continued)

							Attachment Number: 4.2.3.2-5	
Terminal Sacrifice Evaluation								
Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		15		30		60	
Number of Animals	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5	M:0	F:3
Clinical Signs	Reddening or swollen of the whole body and/or of the pinna, emesis, salivation, black and/or green faeces and reduced activity at ≥ 30 mg/kg/day. At 15 mg/kg/day, single incidences of red extremities, emesis or salivation.							
Body Weight	A decrease in body weight of 15% pre-treatment was observed in one female given 60 mg/kg/day (No. 196) during the last week of treatment.							
Food Consumption	A decrease in food consumption (up to 79% vs. predose) was observed in females given test item at 60 mg/kg/day, starting from the third week of treatment to the end of dosing period.							
Ophthalmoscopy	-							
Electrocardiography	Increase in QTc on Week 4 only in females at ≥30 mg/kg/day							
Haematology								
Number of Animals **Day −8** **Day 22**	M: 5 5	F: 5 5	M: 5 5	F: 5 5	M: 5 5	F: 5 5	M: 5 0	F: 5 4
Red blood cells ($\times 10^{12}$/L) **Day −8** **Day 22**	 6.320 5.954	 6.490 6.494	 6.314 5.934	 6.928 6.076	 6.694 5.862	 6.820 5.836*	NA	 7.106 6.523
Haemoglobin (g/L) **Day −8** **Day 22**	 143.8 135.6	 148.2 149.4	 142.4 134.0	 152.8 134.8*	 149.2 131.2	 156.4 133.0*	NA	 161.8 147.5
Haematocrit (L/L) **Day −8** **Day 22**	 0.434 0.406	 0.442 0.446	 0.436 0.400	 0.456 0.402*	 0.448 0.386	 0.464 0.396*	NA	 0.488 0.440
Platelet ($\times 10^{9}$/L) **Day −8** **Day 22**	 245.2 249.2	 267.6 261.8	 226.8 277.2	 236.6 266.2	 256.8 200.8	 220.2 175.0**	NA	 270.2 116.3**
White Blood Cells ($\times 10^{9}$/L) **Day −8** **Day 22**	 10.450 10.950	 11.838 10.128	 10.476 12.976	 11.416 11.596	 9.564 11.116	 9.720 9.426	NA	 10.084 8.680

Data are shown as mean value.
NA: Not applicable.
* $P<0.05$; ** $P<0.01$

(Continued)

					Attachment Number: 4.2.3.2-5			
Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		15		30		60	
Number of Animals	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5	M:0	F:3
Haematology								
Absolute Neutrophil ($\times 10^9$/L)								
Day −8	6.196	8.264	6.158	7.396	5.652	5.720	NA	6.024
Day 22	7.412	6.546	9.334	8.054	7.916	6.590		5.470
Absolute Monocytes ($\times 10^9$/L)								
Day −8	0.516	0.612	0.710	0.494	0.492	0.472	NA	0.458
Day 22	0.584	0.502	1.298*	0.876*	0.824	0.580		0.965
Absolute Eosinophils ($\times 10^9$/L)								
Day −8	0.764	0.196	0.616	0.240	0.360	0.346	NA	0.358
Day 22	0.354	0.228	0.546	0.446**	0.416	0.422*		0.428*
Absolute Lymphocytes ($\times 10^9$/L)								
Day −8	2.836	2.658	2.826	3.144	2.922	3.022	NA	3.066
Day 22	2.490	2.738	1.768*	2.174	1.942	1.818*		1.800*
Coagulation	-	-	-	-	-	-	NA	-
Clinical Chemistry								
Triglycerides (mmol/L)								
Day −8	0.332	0.364	0.384	0.300	0.400	0.314	NA	0.402
Day 22	0.236	0.354	0.474	0.284	0.532	0.550		0.730**
Glucose (mmol/L)								
Day −8	4.730	4.312	4.616	5.064	4.830	4.678*	NA	4.384
Day 22	4.888	4.278	5.314	5.122**	5.748	4.786		5.055*
Potassium (mmol/L)								
Day −8	4.550	4.358	4.576	4.456	4.408	4.582	NA	4.494
Day 22	4.362	4.374	4.552	4.288	4.510	4.316		3.943
Urinalysis	-							

Data are shown as mean value.
NA: Not applicable.
-: No noteworthy finding.
* $P<0.05$; ** $P<0.01$

(Continued)

						Attachment Number: 4.2.3.2-5		
Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		15		30		60	
Number of Animals	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5	M:0	F:3
Histamine Analysis	Mild to marked increase in histamine plasma concentration was observed in male and female animals at 30 and 60 mg/kg/day (up to 68X pre-dose) at 0.5 or 1 hour after dosing on Day 1. On Day 3, the increases at 30 and 60 mg/kg/day were lower than on Day 1 with maximum increases of 25X vs. pre-dose. On Day 28, there were no elevations in histamine levels at any dose over the 24 hour post-dose sampling period.							
Organ Weight	-							
Gross Pathology								
Number of Animals	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:0	F:1
Jejunum **Discolored area**	-	-	Present (1/3)[a]	-	-	-	NA	-
Histopathology								
Thymus **Atrophy**	Minimal (1/3)	Minimal (1/3)	Minimal (1/3) Moderate (1/3)	Minimal (2/3) Slight (1/3)	Slight (1/3) Moderate (2/3)	Slight (1/3) Moderate (2/3)	NA	Moderate (1/1)
Spleen **Lymphoid atrophy**	-	-	-	Minimal (1/3)	Minimal (1/3)	Minimal (1/3)	NA	-
Mesenteric lymph nodes **Lymphoid atrophy**	-	-	-	-	-	Minimal (1/3) Slight (1/3)	NA	-
Stomach **Mononuclear cell inflammation**	-	-	-	-	-	Slight (1/3)	NA	-

NA: Not applicable. -: No noteworthy finding. [a]: Number of animals with the change/total number of animals examined.

(Continued)

					Attachment Number: 4.2.3.2-5			
Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		15		30		60	
Recovery Period								
Number of Animals	M:2	F:2	M:2	F:2	M:2	F:2	M:0	F:2
Clinical Signs	-							
Body Weight	-							
Food Consumption	-							
Electrocardiography	-							
Haematology								
Number of Animals	M:	F:	M:	F:	M:	F:	M:	F:
Day −8	5	5	5	5	5	5	5	5
Day 56 (females), Day 57 (males)	2	2	2	2	2	2	0	2
Red blood cells ($\times 10^{12}$/L)								
Day −8	6.320	6.490	6.314	6.928	6.694	6.820	NA	7.106
Day 56 (females), Day 57 (males)	6.225	5.205	6.470	6.305	6.235	5.590	NA	5.935
Haemoglobin (g/L)								
Day −8	143.8	148.2	142.4	152.8	149.2	156.4	NA	161.8
Day 56 (females), Day 57 (males)	143.5	124.0	146.5	139.0	137.5	127.5	NA	128.5
Haematocrit (L/L)								
Day −8	0.434	0.442	0.436	0.456	0.448	0.464	NA	0.488
Day 56 (females), Day 57 (males)	0.440	0.370	0.450	0.425	0.425	0.390	NA	0.400
Platelet ($\times 10^{9}$/L)								
Day −8	245.2	267.6	226.8	236.6	256.8	220.2	NA	270.2
Day 56 (females), Day 57 (males)	294.5	269.0	302.0	295.0	252.0	243.5	NA	261.0
White Blood Cells ($\times 10^{9}$/L)								
Day −8	10.450	11.838	10.476	11.416	9.564	9.720	NA	10.084
Day 56 (females), Day 57 (males)	9.990	9.315	12.560	12.160	10.860	10.370	NA	13.260
Absolute Neutrophil ($\times 10^{9}$/L)								
Day −8	6.196	8.264	6.158	7.396	5.652	5.720	NA	6.024
Day 56 (females), Day 57 (males)	6.130	5.935	8.030	7.505	7.535	6.230	NA	8.660

Data are shown as mean value.
-: No noteworthy finding.
NA: Not applicable.

(Continued)

					Attachment Number: 4.2.3.2-5			
Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		15		30		60	
Recovery Period								
Number of Animals	M:2	F:2	M:2	F:2	M:2	F:2	M:0	F:2
Absolute Monocytes ($\times 10^9$/L)								
Day −8	0.516	0.612	0.710	0.494	0.492	0.472	NA	0.458
Day 56 (females), Day 57 (males)	0.695	0.505	0.775	0.460	0.485	0.700	NA	0.760
Absolute Eosinophils ($\times 10^9$/L)								
Day −8	0.764	0.196	0.616	0.240	0.360	0.346	NA	0.358
Day 56 (females), Day 57 (males)	0.450	0.255	0.825	0.475	0.265	0.430	NA	0.315
Absolute Lymphocytes ($\times 10^9$/L)								
Day −8	2.836	2.658	2.826	3.144	2.922	3.022	NA	3.066
Day 56 (females), Day 57 (males)	2.610	2.550	2.780	3.620	2.460	2.920	NA	3.355
Clinical Chemistry								
Triglycerides (mmol/L)								
Day −8	0.332	0.364	0.384	0.300	0.400	0.314	NA	0.402
Day 56 (females), Day 57 (males)	0.225	0.575	0.490	0.365	0.380	0.290	NA	0.390
Glucose (mmol/L)								
Day −8	4.730	4.312	4.616	5.064	4.830	4.678	NA	4.384
Day 56 (females), Day 57 (males)	4.755	4.840	4.970	3.925	5.135	4.200	NA	4.240
Potassium (mmol/L)								
Day −8	4.550	4.358	4.576	4.456	4.408	4.582	NA	4.494
Day 56 (females), Day 57 (males)	4.460	4.520	4.630	4.465	4.440	4.465	NA	4.005
Gross Pathology	-							
Histopathology	-							

Data are shown as mean value.
NA: Not applicable.
-: No noteworthy findings.

7.4 イヌ 13 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

Report Title: DS-3201b: 13 Week Oral Repeat Dose Toxicity Study in Beagle Dog with a 4 Week of Recovery Period							**Test Article: Valemetostat tosylate**	
Species/Strain: Dog/Beagle			**Duration of Dosing: 13 weeks**				**Attachment Number: 4.2.3.2-6**	
Initial Age: 9 to 10 months age			**Duration of Postdose: 4 weeks**				**Location in CTD: 4.2.3.2**	
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]			**Method of Administration: Oral**				**GLP Compliance: Yes**	
			Vehicle/Formulation: 80% v/v PEG200 and 20% v/v sterile water for injection/Suspension					
Special Features: Post dose recovery period (4 weeks) was set for 2 animals for 15 and 30 mg/kg group/sex.								
Highest Non-Severely Toxic Dose of the animals (HNSTD): 15 mg/kg/day in male and 30 mg/kg/day in female								
Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		7.5		15		30	
No. of Animals	M:4	F:4	M:4	F:4	M:6	F:6	M:6	F:6
Toxicokinetics								
Cmax (ng/mL)								
Day 1	NE	NE	911	777	2150	2790	6160	5800
Day 28	NE	NE	1030	580	2570	2030	5100	4300
Day 50	NE	NE	NE	NE	NE	NE	6220	4340
Day 90	NE	NE	900	960	2150	2620 [b]	NE	4100
Tmax (h) [a]								
Day 1	NE	NE	0.75	0.75	1.00	0.50	0.75	0.50
Day 28	NE	NE	1.00	1.00	1.00	1.00	0.75	1.00
Day 50	NE	NE	NE	NE	NE	NE	1.00	1.50
Day 90	NE	NE	1.00	1.00	1.00	1.00 [b]	NE	1.00
AUClast (ng·h/mL)								
Day 1	NE	NE	2270	2320	7790	8590	29,900	20,900
Day 28	NE	NE	2820	1650	8580	7370	27,800	18,000
Day 50	NE	NE	NE	NE	NE	NE	33,700	20,100
Day 90	NE	NE	2490	2590	7360	8760 [b]	NE	19,600

Data are shown as mean value.
AUClast: area under the plasma concentration-time curve up to the last quantifiable time; GLP: Good Laboratory Practice; NE: Not examined; PEG: polyethylene glycol.
[a]: Median.
[b]: N = 5.

(Continued)

								Attachment Number: 4.2.3.2-6
Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		7.5		15		30	
No. of Animals	M:4	F:4	M:4	F:4	M:6	F:6	M:6	F:6
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	1	0	0
Clinical Observations								
Breathing-laboured	0	0	0	0	0	1	0	0
Faeces loose/watery	4	3	0	4	6	6	6	6
Swollen, Urogenital area	0	0	0	0	0	0	0	2
Swollen, Pinna	0	0	0	0	0	0	2	1
Swollen, Around eye	0	0	0	0	0	0	1	3
Swollen, Eyelids	0	0	0	0	0	0	0	5
Swollen, Paw	0	0	0	0	0	0	3	0
Swollen, Vulva	NA	0	NA	0	NA	0	NA	4
Wound: wet/Open, Paw	0	0	0	0	2	0	0	1
Wound: wet/Open, Lip	0	0	0	0	0	0	1	0
Wound: wet/Open, Under eye	0	0	0	0	0	0	0	1
Scab, Paw	0	0	0	0	1	0	0	1
Scab, Scrotum	0	NA	0	NA	2	NA	2	NA
Scab, Neck	0	0	0	0	0	0	0	1
Scab, Cheek	0	0	0	0	0	0	0	1
Salivating	0	0	0	0	3	0	6	6
Skin-reddening, Abdomen	0	0	0	0	0	0	1	0
Skin-reddening, Pinna	0	0	0	0	0	0	5	5
Skin-reddening, Around eye	0	0	0	0	0	0	0	5
Skin-reddening, Muzzle	0	0	1	0	0	1	1	5
Skin-reddening, Limbs	0	0	0	0	0	0	0	4
Skin-reddening, Paw	0	0	0	0	0	0	3	2
Skin-reddening, Gums	0	0	0	0	0	0	1	0

NA: Not applicable.

(Continued)

									Attachment Number: 4.2.3.2-6
Dose (mg/kg/day)		0 (Control)		7.5		15		30	
No. of Animals		M:4	F:4	M:4	F:4	M:6	F:6	M:6	F:6
Clinical Observations									
Skin-laceration, Paw		0	0	0	0	0	0	1	0
Skin-laceration, Scrotum		0	NA	0	NA	2	NA	6	NA
Vomiting, brown		0	0	0	0	0	1	0	0
Conjunctivitis, Eye		0	0	0	0	0	5	6	6
Body Weight (Δ%) [a]	**Day 89 or 90**	8.88 kg	6.83 kg	+6	0	−1	+3	8.65 kg [b]	−2
Food Consumption (Δ%) [a]	**Day 92**	270.0 g	111.3 g	+30	−4	−60	+214	192.7 g [c]	+183
Ophthalmoscopy		-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography		-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	**Day 82 to 85**								
HCT (L/L)		0.428	0.413	0.413	0.415	0.372	0.410	0.352 [b]	0.333
HB (g/L)		149.0	141.8	139.3	142.0	122.2	137.6	115.0 [b]	106.7
RBC (10^{12}/L)		6.125	6.025	5.925	6.060	5.378	5.822	4.898 [b]	4.587
WBC (10^9/L)		7.865	8.743	8.445	10.410	10.583	10.120	8.327 [b]	7.322
NEU (10^9/L)		4.573	5.270	5.380	6.968	7.010	6.628	5.042 [b]	4.368
LYM (10^9/L)		2.450	2.610	1.883	2.228	2.085	1.858	1.798 [b]	1.683
MON (10^9/L)		0.435	0.380	0.643	0.608	1.045	1.150	1.245 [b]	1.038
EOS (10^9/L)		0.290	0.313	0.475	0.535	0.378	0.406	0.198 [b]	0.182
BAS (10^9/L)		0.098	0.130	0.058	0.065	0.053	0.064	0.025 [b]	0.040
LUC (10^9/L)		0.028	0.038	0.008	0.008	0.010	0.012	0.015 [b]	0.012
Coagulation	**Day 82 to 85**								
FIB (mg/dL)		191.3	187.8	199.5	170.5	247.2	190.4	336.2 [b]	234.0
Blood Chemistry	**Day 82 to 85**								
ALB (g/L)		31.50	31.93	30.23	32.00	29.97	30.80	28.37 [b]	31.23
TP (g/L)		51.43	50.85	50.73	50.55	49.73	49.80	50.03 [b]	48.82

Data are shown as mean value.
-: No noteworthy findings. NA: Not applicable.
[a]: Δ%: For the control group, group means are shown. For the treated groups, percent differences from the control are shown.
[b]: Data on Day 51.
[c]: Data on Day 50.

(Continued)

								Attachment Number: 4.2.3.2-6
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		7.5		15		30	
No. of Animals	M:4	F:4	M:4	F:4	M:6	F:6	M:6	F:6
Urinalysis Day 82 to 85								
UCRE (µmol/L)	6167.0	5005.5	4088.0	5542.5	6276.6	5922.7	20,412.7 [c]	4521.0
UBIL (positive/examined)	0/4	0/4	0/3	0/4	0/5	0/3	1/2	0/4
Histamine Analysis (ng/mL) 0.5h after Day 1	0.7855	0.7393	0.7863	0.7725	1.0538	1.0723	11.3860	14.0355
Bone marrow analysis								
Myeloid/erythroid precursor cell ratio	2.547 [d]	2.095 [e]	NC	NC	1.762 [f]	1.206 [g]	NC	1.062 [h]
Blood smear Week 12								
Immature macrocytic erythrocytes	NC	NC	NC	NC	P [f]	NC	NC	P [h]
Metarubricytes	NC	NC	NC	NC	P [f]	NC	NC	P [h]
Necropsy (No. examined)	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)	(3)	(0)	(4)
Eye								
Discharge; yellow; conjunctiva; bilateral	0	0	0	0	0	0	NA	3
Discoloration; red; conjunctiva; bilateral	0	0	0	0	0	1	NA	1
Thickening; bilateral; conjunctiva	0	0	0	0	0	2	NA	4
Skin								
Hair loss; face; localized	0	0	0	0	0	0	NA	2
Thickening; prepuce	0	NA	1	NA	0	NA	NA	NA
Organ Weight (No. examined)	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)	(3)	(0)	(4)
Adrenal								
Absolute Weight (Δ%) [a]	1.2625 g	1.4925 g	+25	−10	+23	+12	NA	+10
Relative Weight (Δ%) [a, b]	0.0143%	0.0218%	+14	−11	+21	+2	NA	+18
Testes								
Absolute Weight (Δ%) [a]	11.61 g	NA	−47**	NA	−51**	NA	NA	NA
Relative Weight (Δ%) [a, b]	0.133%	NA	−49**	NA	−51**	NA	NA	NA
Thymus								
Absolute Weight (Δ%) [a]	3.5225 g	7.0475 g	−9	−53**	−36	−67**	NA	−80**
Relative Weight (Δ%) [a, b]	0.038%	0.103%	−8	−56**	−34	−68**	NA	−78**

Data are shown as mean value. NA: Not applicable. NC: Not conducted. P: Present.
Statistics (vs Control): **P* < 0.05, ***P* < 0.01 (Dunnett or non-parametric Dunnett test); Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).
[a]: Δ%: For the control group, group means are shown. For the treated groups, percent differences from the control are shown.
[b]: Relative weight to body weight. [c]: Data on Day 51. [d]: No. 151. [e]: No. 172. [f]: No. 160. [g]: No. 181. [h]: No. 186. (Continued)

							Attachment Number: 4.2.3.2-6	
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		7.5		15		30	
No. of Animals	M:4	F:4	M:4	F:4	M:6	F:6	M:6	F:6
Histopathology (No. examined)	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)	(3)	(0)	(4)
Epididymides								
Reduced sperm; lumen; diffuse	0	NA	4	NA	4	NA	NA	NA
very marked			4		4			
Eyes								
Inflammation; lymphoplasmacytic; cornea; stroma; unilateral; diffuse	0	0	0	0	0	0	NA	1
minimal								1
Inflammation; mixed cells; conjunctiva; bilateral; diffuse	0	0	0	0	0	1	NA	4
minimal						1		0
mild						0		4
Ileum								
Atrophy; lymphoid; GALT	0	1	4	4	4	3	NA	4
minimal		0	0	2	0	0		0
mild		0	3	2	1	2		0
moderate		1	1	0	2	1		2
marked		0	0	0	1	0		2
Liver								
Pigment; yellow; Kupffer cell; multifocal	0	0	0	0	0	1	NA	3
mild						0		3
moderate						1		0
Lymph node, mandibular								
Atrophy; lymphoid; diffuse	0	0	3	2	4	3	NA	4
minimal			1	1	1	3		0
mild			2	1	2	0		2
moderate			0	0	1	0		2

NA: Not applicable.

(Continued)

								Attachment Number: 4.2.3.2-6
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		7.5		15		30	
No. of Animals	M:4	F:4	M:4	F:4	M:6	F:6	M:6	F:6
Histopathology (No. examined)	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)	(3)	(0)	(4)
Lymph node, mesenteric;								
Atrophy; lymphoid; diffuse	0	0	3	2	4	3	NA	4
minimal			0	1	0	1		0
mild			2	0	2	2		1
moderate			1	1	2	0		3
Skin, face/periorbital [a]								
Hyperplasia; epidermis; diffuse	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2
mild								1
moderate								1
Inflammation; mixed cells; perivascular; dermis; multifocal	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2
minimal								2
Pigment; brown; epidermis; dermis; increased; diffuse	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2
mild								2
Degeneration/inflammation; epidermis; multifocal	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1
minimal								1
Skin, prepuce [b]								
Hyperplasia; epidermis; diffuse	NA	NA	1	NA	NA	NA	NA	NA
moderate			1					
Spleen								
Extramedullary haematopoiesis; increased; red pulp; multifocal	0	0	1	1	2	1	NA	3
minimal			0	0	1	1		1
mild			1	1	1	0		1
moderate			0	0	0	0		1
Sternum, bone marrow								
Hyperplasia; haematopoietic cell; diffuse	0	0	2	1	3	1	NA	4
minimal			1	0	0	1		0
mild			0	1	2	0		2
moderate			1	0	1	0		2

NA: Not applicable. [a]: only 2 females at 30 mg/kg/day was examined. [b]: only 1 male at 7.5 mg/kg/day was examined.

(Continued)

							Attachment Number: 4.2.3.2-6	
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		7.5		15		30	
No. of Animals	M:4	F:4	M:4	F:4	M:6	F:6	M:6	F:6
Histopathology (No. examined)	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)	(3)	(0)	(4)
Testes								
Atrophy; germinal epithelium; diffuse	0	NA	4	NA	4	NA	NA	NA
marked			3		2			
very marked			1		2			
Hypertrophy/hyperplasia; interstitial cell; multifocal	0	NA	4	NA	4	NA	NA	NA
minimal			3		1			
mild			1		3			
Thymus								
Atrophy; lymphoid; diffuse	4	3	4	4	4	3	NA	4
minimal	4	3	0	1	0	0		0
mild	0	0	1	2	1	0		0
moderate	0	0	1	0	0	0		0
marked	0	0	2	1	2	3		2
very marked	0	0	0	0	1	0		2
Hyperplasia; lymphoblast; multifocal	0	0	4	0	1	3	NA	3
minimal			0		1	1		1
mild			4		0	2		0
moderate			0		0	0		2
Scrotum								
Inflammation; mixed cells; perivascular; dermis; multifocal	2	NA	2	NA	4	NA	NA	NA
minimal	2		2		2			
mild	0		0		2			
Hyperplasia; epidermis; diffuse	2	NA	2	NA	4	NA	NA	NA
minimal	2		2		2			
mild	0		0		2			
Pigment; brown; epidermis; dermis; increased; diffuse	0	NA	0	NA	2	NA	NA	NA
mild					2			
Degeneration/inflammation; epidermis; multifocal	0	NA	0	NA	1	NA	NA	NA
mild					1			

NA: Not applicable.

(Continued)

									Attachment Number: 4.2.3.2-6
Daily Dose (mg/kg/day)		0 (Control)		7.5		15		30	
No. of Animals		M:0	F:0	M:0	F:0	M:2	F:2	M:2	F:2
Noteworthy Findings in Recovery Period									
Dead or Sacrificed Moribund						0	0	0	0
Clinical Observations									
Conjunctivitis, Eye		NA	NA	NA	NA	0	0	0	2
Hair loss, Around both eyes		NA	NA	NA	NA	0	0	0	2
Body Weight (kg)	**Day 119 or 120**	NA	NA	NA	NA	8.20	6.30	9.50 [a]	7.10
Food Consumption (g)	**Day 118 or 119**	NA	NA	NA	NA	224.0	247.0	350.0 [b]	350.0
Hematology		NA	NA	NA	NA	-	-	-	-
Coagulation		NA	NA	NA	NA	-	-	-	-
Blood Chemistry		NA	NA	NA	NA	-	-	-	-
Necropsy									
Eye									
Discharge; yellow; conjunctiva; bilateral		NA	NA	NA	NA	0	0	1	2
Discolouration; red; conjunctiva; bilateral		NA	NA	NA	NA	0	0	1	0
Testes									
Reduced size		NA	NA	NA	NA	1	NA	0	NA
Organ Weight									
Adrenal									
Absolute Weight (g)		NA	NA	NA	NA	1.7500	1.7000	1.5200 [a]	1.4950
Relative Weight (%) [c]		NA	NA	NA	NA	0.0210	0.0255	0.0160 [a]	0.0205
Testes									
Absolute Weight (g)		NA	NA	NA	NA	5.4800	NA	8.1050 [a]	NA
Relative Weight (%) [c]		NA	NA	NA	NA	0.065	NA	0.090 [a]	NA

Data are shown as mean value. -: No noteworthy findings. NA: Not applicable.
[a]: Data on Day 84.
[b]: Data on Day 83.
[c]: Relative weight to body weight.

(Continued)

								Attachment Number: 4.2.3.2-6
Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		7.5		15		30	
No. of Animals	M:0	F:0	M:0	F:0	M:2	F:2	M:2	F:2
Noteworthy Findings in Recovery Period								
Histopathology								
Epididymides								
Reduced sperm; lumen; diffuse	NA	NA	NA	NA	2	NA	2	NA
very marked					2		2	
Eyes								
Inflammation; mixed cells; conjunctiva; bilateral; diffuse	NA	NA	NA	NA	0	0	0	1
minimal								1
Inflammation; mixed cells; conjunctiva; unilateral; diffuse	NA	NA	NA	NA	0	0	1	0
minimal							1	
Ileum								
Atrophy; lymphoid; GALT	NA	NA	NA	NA	2	1	1	1
minimal					1	1	1	1
mild					1	0	0	0
Lymph node, mesenteric								
Atrophy; lymphoid; diffuse	NA	NA	NA	NA	1	1	1	1
minimal					1	1	1	1
Sternum, bone marrow								
Hyperplasia; haematopoietic cell; diffuse	NA	NA	NA	NA	0	1	0	1
minimal						1		0
mild						0		1
Testes								
Atrophy; germinal epithelium; diffuse	NA	NA	NA	NA	2	NA	1	NA
marked					1		1	
very marked					1		0	
Atrophy; germinal epithelium; multifocal	NA	NA	NA	NA	0	NA	2	NA
moderate							1	
very marked							1	

NA: Not applicable.

(Continued)

								Attachment Number: 4.2.3.2-6
Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		7.5		15		30	
No. of Animals	M:0	F:0	M:0	F:0	M:2	F:2	M:2	F:2
Noteworthy Findings in Recovery Period								
Histopathology								
Testes								
Hyperplasia; atypical; sertoli cell; multifocal	NA	NA	NA	NA	1	NA	0	NA
moderate					1			
Hypertrophy/hyperplasia; interstitial cell; multifocal	NA	NA	NA	NA	2	NA	2	NA
minimal					0		2	
mild					2		0	
Thymus;								
Atrophy; lymphoid; diffuse	NA	NA	NA	NA	2	2	1	1
minimal					2	2	1	1
Scrotum								
Inflammation; mixed cells; perivascular; dermis; multifocal	NA	NA	NA	NA	2	NA	2	NA
minimal					2		2	
Hyperplasia; epidermis; diffuse	NA	NA	NA	NA	2	NA	2	NA
minimal					1		0	
mild					1		1	
moderate					0		1	
Pigment; brown; epidermis; dermis; increased; diffuse	NA	NA	NA	NA	2	NA	2	NA
mild					2		1	
moderate					0		1	

NA: Not applicable.

(Continued)

								Attachment Number: 4.2.3.2-6
Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		7.5		15		30	
No. of Animals	M:0	F:0	M:0	F:0	M:0	F:1	M:4	F:0
Noteworthy Findings in Early Terminated Animals								
Organ Weight								
Adrenal								
Absolute Weight (g)	NA	NA	NA	NA	NA	1.6000 [b]	1.4775 [c]	NA
Relative Weight (%) [a]	NA	NA	NA	NA	NA	0.0190 [b]	0.0168 [c]	NA
Testes								
Absolute Weight (g)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	7.4625 [c]	NA
Relative Weight (%) [a]	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.085 [c]	NA
Necropsy								
Scrotum								
Hair loss; focal	NA	NA	NA	NA	NA	NA	4	NA
Crust; focal	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3	NA
Histopathology								
Epididymides								
Inflammation; mixed cells; perivascular; multifocal	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	NA
moderate							1	
Inflammation; necrotizing; vascular; multifocal	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	NA
moderate							1	
Reduced sperm; lumen; diffuse	NA	NA	NA	NA	NA	NA	4	NA
very marked							4	
Eyes								
Inflammation; mixed cells; conjunctiva; bilateral; diffuse	NA	NA	NA	NA	NA	0	1	NA
moderate							1	
Inflammation; mixed cells; conjunctiva; unilateral; diffuse	NA	NA	NA	NA	NA	0	1	NA
minimal							1	
Ileum								
Atrophy; lymphoid; galt	NA	NA	NA	NA	NA	1	4	NA
moderate						1	1	
marked						0	3	

NA: Not applicable. [a]: Relative weight to body weight. [b]: Data on Day 36. [c]: Data on Day 51. (Continued)

							Attachment Number: 4.2.3.2-6	
Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		7.5		15		30	
No. of Animals	M:0	F:0	M:0	F:0	M:0	F:1	M:4	F:0
Noteworthy Findings in Early Terminated Animals								
Histopathology								
Lymph node, mandibular								
Atrophy; lymphoid; diffuse	NA	NA	NA	NA	NA	1	4	NA
minimal						1	0	
mild						0	1	
moderate						0	3	
Lymph node, mesenteric								
Atrophy; lymphoid; diffuse	NA	NA	NA	NA	NA	1	4	NA
mild						1	1	
moderate						0	3	
Spleen								
Extramedullary haematopoiesis; increased; red pulp; multifocal	NA	NA	NA	NA	NA	0	4	NA
minimal							2	
mild							2	
Sternum, bone marrow								
Hyperplasia; haematopoietic cell; diffuse	NA	NA	NA	NA	NA	0	2	NA
minimal							1	
mild							1	
Testes								
Atrophy; germinal epithelium; diffuse	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2	NA
marked							1	
very marked							1	
Degeneration/atrophy; germinal epithelium; diffuse	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2	NA
moderate							2	
Hypertrophy/hyperplasia; interstitial cell; multifocal	NA	NA	NA	NA	NA	NA	4	NA
minimal							2	
mild							2	

NA: Not applicable.

(Continued)

							Attachment Number: 4.2.3.2-6	
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		7.5		15		30	
No. of Animals	M:0	F:0	M:0	F:0	M:0	F:1	M:4	F:0
Noteworthy Findings in Early Terminated Animals								
Histopathology								
Thymus								
Atrophy; lymphoid; diffuse	NA	NA	NA	NA	NA	1	4	NA
mild						1	0	
marked						0	3	
very marked						0	1	
Hyperplasia; lymphoblast; multifocal	NA	NA	NA	NA	NA	0	3	NA
minimal							1	
moderate							2	
Scrotum								
Inflammation; mixed cells; perivascular; dermis; multifocal	NA	NA	NA	NA	NA	NA	4	NA
mild							1	
moderate							2	
marked							1	
Erosion/ulcer; epidermis; multifocal	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3	NA
moderate							2	
marked							1	
Hyperplasia; epidermis; diffuse	NA	NA	NA	NA	NA	NA	4	NA
moderate							3	
marked							1	
Pigment; brown; epidermis; dermis; increased; diffuse	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2	NA
mild							1	
moderate							1	
Dilation; vascular; subcutis; multifocal	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	NA
mild							1	
Dilation; vascular; dermis/subcutis; multifocal	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2	NA
minimal							1	
mild							1	

NA: Not applicable.

(Continued)

								Attachment Number: 4.2.3.2-6
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)		7.5		15		30	
No. of Animals	M:0	F:0	M:0	F:0	M:0	F:1	M:4	F:0
Noteworthy Findings in Early Terminated Animals								
Histopathology								
Scrotum								
Degeneration/inflammation; epidermis; multifocal	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3	NA
moderate							3	

NA: Not applicable.

8. In Vitro 遺伝毒性試験

8.1 細菌を用いた復帰突然変異試験

Report Title: Bacterial Reverse Mutation Study of DS-3201b		**Test Article: Valemetostat tosylate**
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells	**No. of Independent Assays: 2**	**Attachment Number: 4.2.3.3.1-1**
Strains: *S. typhimurium* and *E. coli*	**No. of Replicate Cultures: 2 (3 for vehicle control)**	**Location in CTD: 4.2.3.3.1**
Metabolizing System: PB/BNF induced rat liver S9, 7.1%		
Vehicle of Test Article: Dimethyl sulfoxide	**Vehicle of Positive Controls: Water for injection and dimethyl sulfoxide**	**GLP Compliance: Yes**
Treatment: Preincubation method		**Date of Treatment: [redacted], 20[redacted] and [redacted], 20[redacted]**
Special Features: Dose levels are described as valemetostat, the free form of valemetostat tosylate		
Cytotoxic Effects: Cytotoxic effects were observed at higher doses.		
Genotoxic Effects: None		

Metabolic Activation	Test Article	Dose (µg/plate)	Assay #1 No. of Revertants/plate (Mean)				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
Without Activation	Vehicle control	0	111	9	36	20	12
	Test article	9.77	102	7	40	14	11
		19.5	119	10	33	16	10
		39.1	109	12	38	14	11
		78.1	114	9	30	17	13
		156	95	11	46	8	14
		313	100	7	26	15	17
		625	94 [a]	10 [a]	32	16	12
		1250	90 [a]	13 [a]	36	11 [a]	12 [a]
		2500	69 [a]	4 [a]	23 [a]	15 [a]	11 [a]
		5000	0 [a, b]	0 [a, b]	17 [a, b]	11 [a, b]	0 [a, b]
	Positive control [c]		400 *	374 *	121 *	448 *	236 *

Assay #1: Dose range-finding test, PB/BNF: Phenobarbital/5,6-benzoflavone.
Judgment (vs Vehicle control) *: The value is two times or more higher than that in the vehicle control.
[a]: Cytotoxic effects were observed, [b]: Precipitation was observed, [c]: TA100: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2, 0.01 µg/plate); TA1535: Sodium azide (0.5 µg/plate); WP2*uvrA*: AF-2 (0.01 µg/plate); TA98: AF-2 (0.1 µg/plate); TA1537: 9-Aminoacridine hydrochloride monohydrate (80 µg/plate).

(Continued)

			Attachment Number: 4.2.3.3.1-1				
Metabolic Activation	Test Article	Dose (µg/plate)	Assay #1 No. of Revertants/plate (Mean)				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
With Activation	Vehicle control	0	106	12	39	22	21
	Test article	9.77	123	11	36	20	19
		19.5	100	10	37	20	17
		39.1	107	13	41	20	21
		78.1	107	8	48	21	17
		156	94	13	43	21	15
		313	112	12	42	24	15
		625	106	11	38	22	16
		1250	93 [a]	13 [a]	37	19	17 [a]
		2500	87 [a]	3 [a]	26 [a]	29 [a]	10 [a]
		5000	0 [a, b]	0 [a, b]	13 [a, b]	8 [a, b]	0 [a, b]
	Positive control [c]		861 *	197 *	856 *	252 *	143 *

Assay #1: Dose range-finding test.
Judgment (vs Vehicle control) *: The value is two times or more higher than that in the vehicle control.
[a]: Cytotoxic effects were observed, [b]: Precipitation was observed, [c]: TA100: 2-Aminoanthracene (2-AA, 1 µg/plate); TA1535: 2-AA (2 µg/plate); WP2*uvrA*: 2-AA (10 µg/plate); TA98: 2-AA (0.5 µg/plate); TA1537: 2-AA (2 µg/plate).

(Continued)

			Attachment Number: 4.2.3.3.1-1				
Metabolic Activation	Test Article	Dose (μg/plate)	Assay #2 No. of Revertants/plate (Mean)				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
Without Activation	Vehicle control	0	128	8	37	16	14
	Test article	39.1	128	7	NE	NE	NE
		78.1	135	11	NE	16	14
		156	113	9	45	20	15
		313	110	8	38	16	12
		625	100 [a]	3 [a]	37	18	15
		1250	80 [a]	4 [a]	33	16 [a]	9 [a]
		2500	NE	NE	22 [a]	11 [a]	9 [a]
		5000	NE	NE	20 [a, b]	NE	NE
	Positive control [c]		457 *	382 *	123 *	517 *	206 *
With Activation	Vehicle control	0	122	9	39	24	18
	Test article	78.1	139	7	NE	NE	14
		156	124	9	38	23	16
		313	124	8	46	29	19
		625	91	7	37	24	14
		1250	93 [a]	7 [a]	35	27	14 [a]
		2500	97 [a]	1 [a]	27	30 [a]	8 [a]
		5000	NE	NE	12 [a, b]	19 [a, b]	NE
	Positive control [d]		925 *	189 *	892 *	246 *	144 *

Assay #2: Main test, NE: Not examined.
Judgment (vs Vehicle control) *: The value is two times or more higher than that in the vehicle control.
[a]: Cytotoxic effects were observed, [b]: Precipitation was observed, [c]: TA100: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2, 0.01 μg/plate); TA1535: Sodium azide (0.5 μg/plate); WP2*uvrA*: AF-2 (0.01 μg/plate); TA98: AF-2 (0.1 μg/plate); TA1537: 9-Aminoacridine hydrochloride monohydrate (80 μg/plate), [d]: TA100: 2-Aminoanthracene (2-AA, 1 μg/plate); TA1535: 2-AA (2 μg/plate); WP2*uvrA*: 2-AA (10 μg/plate); TA98: 2-AA (0.5 μg/plate); TA1537: 2-AA (2 μg/plate).

8.2 哺乳類培養細胞を用いた in vitro 小核試験

Report Title: In Vitro Micronucleus Study of DS-3201b with CHL Cells					Test Article: Valemetostat tosylate
Test for Induction of: In vitro micronucleus	**No. of Independent Assays: 1**				**Attachment Number: 4.2.3.3.1-2**
Strains: Chinese Hamster Lung (CHL) cells	**No. of Replicate Cultures: 2**				**Location in CTD: 4.1.3.3.1**
Metabolizing System: PB/BNF induced rat liver S9, 5%	**No. of Cells Analyzed/Culture: 1000**				
Vehicle of Test Article: Dimethyl sulfoxide	**Vehicle of Positive Controls: Physiological saline**				**GLP Compliance: Yes**
Treatment: Short treatment for 6 h with and without S9; continuous treatment for 26 h without S9					**Date of Treatment: [redacted], 20[redacted]**
Special Features: None					
Cytotoxic Effects: Cytotoxic effect was observed in all treatment conditions.					
Genotoxic Effects: Micronucleus induction was observed in the short treatment with S9.					
Treatment Time (h)	Metabolic Activation	Test Article	Dose (mmol/L)	Relative Cell No. (%)	Incidence of Micronucleated Cells (%)
6	Without metabolic activation	Vehicle control	0	100.0	1.15
		Test article	0.3	67.6	1.70
			0.35	57.8	1.50
			0.4	50.1	1.75
		Positive control [a]	0.05	NE	7.15 *

PB/BNF: Phenobarbital/5,6-benzoflavone, NE: Not examined.
Statistics (vs Vehicle control): *: P<0.05 (Fisher's exact test).
[a]: Mitomycin C (unit of dose: μg/mL)

(Continued)

				Attachment Number: 4.2.3.3.1-2	
Treatment Time (h)	Metabolic Activation	Test Article	Dose (mmol/L)	Relative Cell No. (%)	Incidence of Micronucleated Cells (%)
6	With metabolic activation	Vehicle control	0	100.0	1.25
		Test article	0.025	101.1	1.05
			0.05	94.0	0.95
			0.1	85.9	1.75
			0.125	75.7	2.35 *
			0.15	58.0	2.90 *
			0.175	45.4	3.70 *
		Positive control [a]	5	NE	4.20 *
26	Without metabolic activation	Vehicle control	0	100.0	1.25
		Test article	0.125	75.3	0.80
			0.15	67.3	0.90
			0.175	51.4	1.00
		Positive control [b]	0.06	NE	2.80 *
			0.07	NE	4.30 *

NE: Not examined.
Statistics (vs Vehicle control): *: $P < 0.05$ (Fisher's exact test).
Dose-dependent increase was detected using Cochran-Armitage test in the short treatment with S9 ($P < 0.05$).
[a]: Cyclophosphamide monohydrate (unit of dose: μg/mL), [b]: Colchicine (unit of dose: μg/mL).

9. In Vivo 遺伝毒性試験

9.1 ラット骨髄を用いた小核試験

Report Title: Micronucleus Study in Bone Marrow of Rats Treated Orally with DS-3201b		**Test Article: Valemetostat tosylate**
Test for Induction of: Micronucleated immature erythrocytes in bone marrow	**Treatment Schedule: Single administration**	**Attachment Number: 4.2.3.3.2-1**
Species/Strain: Rats/Crl:CD(SD)	**Sampling Time: 24 and 48 h after administration**	**Location in CTD: 4.2.3.3.2**
Age: 8 weeks old	**Method of Administration: Gavage**	
Cells Evaluated: Immature erythrocytes (IMEs) in bone marrow	**Vehicle/Formulation: 80% Polyethylene glycol 200 and 20% water for injection/Suspension or solution**	**GLP Compliance: Yes**
No. of Cells Analyzed/Animal: 4000		**Date of Dosing: [redacted], 20[redacted]**
Special Features: The negative control (water for injection) was set to confirm that the vehicle did not have a genotoxic potential to induce micronuclei in the bone marrow.		
Toxic/Cytotoxic Effects: In the 48 h group, a statistically significant lower mean body weight was noted in the highest dose (2000 mg/kg) group compared to the vehicle control group. In both the 24 and 48 h groups, statistically significant decreases in IMEs-ratio were detected in the 300, 1000 and 2000 mg/kg groups compared to the vehicle control group.		
Genotoxic Effects: None		
Evidence of Exposure: The exposure of valemetostat to rats was confirmed in the 4-week repeat oral dose toxicity study in Crl:CD(SD) rats with a 4-week recovery period (4.2.3.2-2).		

Test Article	Dose (mg/kg)	24 h			48 h		
		No. of Animals	IMEs (%) Mean ± S.D.	MNIMEs (%) Mean ± S.D.	No. of Animals	IMEs (%) Mean ± S.D.	MNIMEs (%) Mean ± S.D.
Negative control [a]	0	M:6	66.1 ± 2.6	0.146 ± 0.019	M:6	65.3 ± 2.1	0.150 ± 0.035
Vehicle control [b]	0	M:6	66.3 ± 3.5	0.138 ± 0.034	M:6	65.1 ± 2.2	0.142 ± 0.047
Test article	100 [c]	M:6	64.6 ± 1.6	0.142 ± 0.020	M:6	64.3 ± 1.6	0.150 ± 0.045
	300 [c]	M:6	62.2 ± 2.7 *	0.150 ± 0.035	M:6	60.5 ± 2.7 *	0.138 ± 0.047
	1000 [c]	M:6	61.3 ± 2.3 *	0.146 ± 0.029	M:6	58.4 ± 3.3 *	0.133 ± 0.030
	2000 [c]	M:6	57.1 ± 2.7 *	0.138 ± 0.026	M:6	57.5 ± 4.0 *	0.138 ± 0.038
Positive control [d]	20	M:6	47.9 ± 4.6 ##	4.683 ± 0.678 $$	NE	NE	NE

IMEs: Immature erythrocytes, MNIMEs: Micronucleated IMEs, NE: Not examined.
Statistics (vs Vehicle control): * $P < 0.05$ (Williams' test) Statistics (vs Negative control): ## $P < 0.01$ (Student's t-test), $$ $P < 0.01$ (Fisher's exact test).
[a]: Water for injection.
[b]: 80% polyethylene glycol 200 - 20% water for injection.
[c]: As valemetostat (free form of valemetostat tosylate).
[d]: Cyclophosphamide monohydrate.

9.2 ラット肝臓を用いた小核試験

Report Title: Micronucleus Study of DS-3201b in Rat Liver		**Test Article: Valemetostat tosylate**
Test for Induction of: Micronucleated hepatocytes	**Treatment Schedule: Twice dosing on the days before and after partial hepatectomy (PH)**	**Attachment Number: 4.2.3.3.2-2**
Species/Strain: Rats/Crl:CD(SD)	**Sampling Time: 3 days after the second administration**	**Location in CTD: 4.2.3.3.2**
Age: 8 weeks old	**Method of Administration: Gavage**	**GLP Compliance: Yes**
Cells Evaluated: Hepatocytes	**Vehicle/Formulation: 80% Polyethylene glycol 200 and 20% water for injection/Suspension or solution**	**Date of Dosing:** **Dose range finding test: [redacted] & [redacted], 20[redacted]** **Main study: [redacted] & [redacted], 20[redacted]**
No. of Cells Analyzed/Animal: 4000		
Special Features: PH was performed one day after the first dosing of valemetostat tosylate.		**Date of PH:** **Dose range finding test: [redacted], 20[redacted]** **Main study: [redacted], 20[redacted]**
Toxic/Cytotoxic Effects: One of three animals each at 1000 and 2000 mg/kg died in the dose range finding test. In the main study, one of six animals at 1000 mg/kg died on Day 4. Statistically significant lower mean body weight and liver weight were noted at 1000 mg/kg compared to the vehicle control group.		
Genotoxic Effects: None		
Evidence of Exposure: The exposure of valemetostat to rats was confirmed in the 4-week repeat oral dose toxicity study in Crl:CD(SD) rat with a 4-week recovery period (4.2.3.3.2-2).		

Test Article	Dose (mg/kg)	No. of Animals [a]	MNHEPs (%) Mean ± S.D.	Classification of hepatocytes (%)			Mitotic index (%) [b] Mean ± S.D.
				Mononucleus Mean ± S.D.	Binuclei Mean ± S.D.	Multinuclei Mean ± S.D.	
Negative control [c]	0	M:5/6	0.405 ± 0.033	96.905 ± 0.309	3.095 ± 0.309	0.000 ± 0.000	0.324 ± 0.039
Vehicle control [d]	0	M:5/6	0.415 ± 0.038	96.800 ± 0.155	3.200 ± 0.155	0.000 ± 0.000	0.349 ± 0.080
Test article	100 [e]	M:5/6	0.415 ± 0.022	96.605 ± 0.361	3.395 ± 0.361	0.000 ± 0.000	0.324 ± 0.039
	300 [e]	M:5/6	0.395 ± 0.037	96.645 ± 0.434	3.350 ± 0.436	0.005 ± 0.011	0.314 ± 0.054
	1000 [e]	M:5/6 [f]	0.405 ± 0.027	96.700 ± 0.411	3.295 ± 0.401	0.005 ± 0.011	0.279 ± 0.075
Positive control [g]	25	M:3/4	2.292 ± 0.645 *	95.950 ± 0.175	3.950 ± 0.152	0.100 ± 0.025	0.530 ± 0.076

MNHEPs: Micronucleated hepatocytes.
Statistics (vs Negative control): * $P < 0.01$ (Fisher's exact test).
[a]: No. of animals; evaluated/treated.
[b]: [Number of M-phase cells/(4000 hepatocytes + number of M-phase cells)] × 100.
[c]: Water for injection.
[d]: 80% polyethylene glycol 200 - 20% water for injection.
[e]: As valemetostat (free form of valemetostat tosylate).
[f]: One animal was found dead on Day 4.
[g]: Diethylnitrosamine.

10. がん原性試験

実施しなかった。

11. 生殖発生毒性試験： 重要な試験以外の試験

11.1 バレメトスタットトシル酸塩の経口投与によるラットの胚・胎児発生に関する予備試験

Report Title: Preliminary Study for Effects of DS-3201b Administered Orally on Embryo-Fetal Development in Rats		**Test Article: Valemetostat tosylate**
Design similar to ICH 4.1.3: Yes	**Duration of Dosing: Days 7 to 17 of Pregnancy**	**Attachment Number: 4.2.3.5.2-1**
Species/Strain: Rats/Crl:CD(SD)	**Day of Mating: Day 0 of Pregnancy**	**Location in CTD: 4.2.3.5.2**
Initial Age: 11 to 12 weeks age	**Day of C-Section: Day 20 of Pregnancy**	**GLP Compliance: Non-GLP**
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration: Gavage**	
	Vehicle/Formulation: 80% v/v PEG200 and 20% v/v water for injection/Suspension	
Special Features: Dose levels are described as valemetostat, the free form of valemetostat tosylate (Conversion factor: 0.7392).		
No Observed Adverse Effect Level: F_0 Female General Toxicity: Less than 20 mg/kg/day F_0 Female Reproduction: Less than 20 mg/kg/day F_1 Litters: Less than 20 mg/kg/day		

Daily Dose (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**20**	**60**	**200**
Dams				
No. Pregnant	7	7	7	6
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
No. Prematurely Delivered	0	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-
Necropsy Observations	-	-	-	-
Body Weight (Δ%) [a, b]: Day 18 of Pregnancy	395.1 g	−4	−21**	−24**
Body Weight (Δ%) [b, c]: Day 20 of Pregnancy	426.0 g	−6	−29**	−31**
Body Weight Gain (Days 7 to 18 of Pregnancy, Δ%) [b]	89.3 g	−19*	−88**	−113**
Body Weight Gain (Days 7 to 20 of Pregnancy, Δ%) [b]	120.1 g	−22	−100**	−115**
Food Consumption (Δ%) [b]: Days 16 to 17 of Pregnancy	27.7 g	−10	−23**	−40**
Food Consumption (Δ%) [b]: Days 18 to 19 of Pregnancy	28.6 g	−7	−37**	−31**

GLP: Good Laboratory Practice; PEG: polyethylene glycol.
-: No noteworthy findings, Statistics (vs Control): *$P < 0.05$, **$P < 0.01$ (Dunnett test). [a]: At end of dosing period.
[b]: Δ%: For the control group, group means are shown. For the treated groups, percent differences from the control are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).
[c]: At necropsy.

(Continued)

				Attachment Number: 4.2.3.5.2-1
Daily Dose (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**20**	**60**	**200**
Dams				
No. Pregnant	7	7	7	6
No. Litters Evaluated	7	7	7	6
No. with Total Resorption of Litter	0	0	7	6
Mean No. Corpora Lutea	15.3	15.3	15.0	14.5
Mean No. Implantations	14.6	14.7	14.7	13.5
Mean % Preimplantation Loss	4.9	3.7	2.0	7.7
Placental Findings	-	-	NA	NA
Litters				
No. Litters Evaluated	7	7	7	6
No. Live Fetuses (Mean)	97 (13.9)	88 (12.6)	0 (0.0**)	0 (0.0**)
No. Resorptions (Mean)	5 (0.7)	12 (1.7)	103 (14.7)	81 (13.5)
No. Dead Fetuses (Mean)	0 (0.0)	3 (0.4)	0 (0.0)	0 (0.0)
No. Litters with Dead Fetuses	0	3	0	0
Mean % Postimplantation Loss	5.0	14.4	100.0**	100.0**
Mean Fetal Body Weight (Δ%) [a]: Male	3.87 g	−1	NA	NA
Mean Fetal Body Weight (Δ%) [a]: Female	3.54 g	−8	NA	NA
Fetal Sex Ratios (% males)	0.484	0.549	NA	NA

-: No noteworthy findings.
NA: Not applicable.
Statistics (vs Control): *$P < 0.05$, **$P < 0.01$ (Dunnett test).
[a]: Δ%: For the control group, group means are shown. For the treated groups, percent differences from the control are shown.
Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

(Continued)

				Attachment Number: 4.2.3.5.2-1
Daily Dose (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**20**	**60**	**200**
Litters				
No. Litters Evaluated	7	7	NA	NA
External Observation				
No. Fetuses Examined	97	88		
Anomalies				
No. Fetuses (%)	1 (1.01)	0 (0.00)		
No. Litters (%)	1 (14.29)	0 (0.00)		
Anasarca				
No. Fetuses (%)	1 (1.01)	0 (0.00)		
No. Litters (%)	1 (14.29)	0 (0.00)		
Visceral Observation				
No. Fetuses Examined	47	42		
Anomalies				
No. Fetuses (%)	0 (0.00)	0 (0.00)		
No. Litters (%)	0 (0.00)	0 (0.00)		
Variations				
No. Fetuses (%)	1 (2.04)	3 (8.10)		
No. Litters (%)	1 (14.29)	3 (42.86)		
Dilated renal pelvis				
No. Fetuses (%)	0 (0.00)	2 (5.71)		
No. Litters (%)	0 (0.00)	2 (28.57)		
Convoluted ureter				
No. Fetuses (%)	0 (0.00)	1 (2.86)		
No. Litters (%)	0 (0.00)	1 (14.29)		
Dilated ureter				
No. Fetuses (%)	1 (2.04)	2 (5.24)		
No. Litters (%)	1 (14.29)	2 (28.57)		

NA: Not applicable.

(Continued)

				Attachment Number: 4.2.3.5.2-1
Daily Dose (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**20**	**60**	**200**
Litters				
No. Litters Evaluated	7	7	NA	NA
Skeletal Observation				
No. Fetuses Examined	50	46		
Anomalies				
No. Fetuses (%)	0 (0.00)	13 (26.64#)		
No. Litters (%)	0 (0.00)	4 (57.14)		
Absent rib				
No. Fetuses (%)	0 (0.00)	8 (15.57)		
No. Litters (%)	0 (0.00)	3 (42.86)		
Absent thoracic vertebra				
No. Fetuses (%)	0 (0.00)	1 (1.79)		
No. Litters (%)	0 (0.00)	1 (14.29)		
Absent lumbar vertebra				
No. Fetuses (%)	0 (0.00)	8 (16.69)		
No. Litters (%)	0 (0.00)	3 (42.86)		
Variations				
No. Fetuses (%)	4 (7.40)	46 (100.00##)		
No. Litters (%)	3 (42.86)	7 (100.00)		
Cervical rib				
No. Fetuses (%)	0 (0.00)	43 (94.04##)		
No. Litters (%)	0 (0.00)	7 (100.00)		
Full supernumerary rib				
No. Fetuses (%)	1 (1.79)	0 (0.00)		
No. Litters (%)	1 (14.29)	0 (0.00)		
Short rib				
No. Fetuses (%)	0 (0.00)	32 (70.93##)		
No. Litters (%)	0 (0.00)	6 (85.71)		

NA: Not applicable.
Statistics (vs Control): #$P < 0.05$, ##$P < 0.01$ (Aspin-Welch's t-test).

(Continued)

				Attachment Number: 4.2.3.5.2-1
Daily Dose (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**20**	**60**	**200**
Litters				
No. Litters Evaluated	7	7	NA	NA
Skeletal Observation				
No. Fetuses Examined	50	46		
Variations				
Short supernumerary rib				
No. Fetuses (%)	2 (3.83)	0 (0.00)		
No. Litters (%)	2 (28.57)	0 (0.00)		
Dumbbell ossification of thoracic centrum				
No. Fetuses (%)	1 (1.79)	0 (0.00)		
No. Litters (%)	1 (14.29)	0 (0.00)		
Splitting of thoracic centrum				
No. Fetuses (%)	1 (1.79)	4 (8.26)		
No. Litters (%)	1 (14.29)	3 (42.86)		
Ossifications				
No. Sternebrae	5.29	4.91		
No. Sacral and caudal vertebrae	7.57	8.37@		

NA: Not applicable.
Statistics (vs Control): @$P < 0.05$ (Student's t-test).

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

実施しなかった。

13. 生殖発生毒性試験： 胚・胎児発生に関する試験

実施しなかった。

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

実施しなかった。

15. 新生児を用いた試験

実施しなかった。

16. 局所刺激性試験

投与経路が経口投与であるため、実施しなかった。

17. その他の毒性試験

17.1 毒性機序研究

17.1.1 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検索

				Test Article: Valemetostat tosylate		
Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Attachment Number**
Rats/Crl: CD(SD)	Gavage (80% PEG200 and 20% sterile water for injection/Suspention)	13 weeks	0, 20, 60, 200	2 to 4/group	Lymphoma samples of repeated dose toxicity study in rats for 13 weeks (4.2.3.2-3) were immunohistochemistry stained. As a result, lymphoma cells in the thymus, kidney, spleen, lymph nodes, liver and lung were positive for CD3 ε and CD8 α (T lymphocyte markers) but negative for CD79 α (a B lymphocyte marker). Hence, the lymphoma was concluded to be a T-cell lymphoma. In the specimens observed with hyperplastic lymphoblasts, the lymphocytes in the cortex of the thymus were positive for CD3 ε and CD8 α, but the frequency of the CD3 ε positive cells was higher than that of the CD8 α positive cells in the 200 mg/kg group. The results of this study and CD3 and CD8 expression pattern of T lymphocytes in the thymic cortex suggested that the hyperplastic lymphoblasts consisted of double negative (DN)3, DN4 and double positive thymocytes, and monoclonal proliferation was not noted in the lymphoblasts.	**4.2.3.7.3-1**

CD: Cluster of differentiation; PEG: Polyethylene glycol.

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

				Test Article: Valemetostat tosylate		
Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Attachment Number**
Rats/Crl: CD(SD)	Gavage (80% PEG200 and 20% sterile water for injection/Solution)	4, 8, or 12 Weeks	0, 20	M:10 in groups examined 1 and 2 months after the initiation of dosing M:20 in a group examined 3 months after the initiation of dosing	Animals with lymphoma: Death in 1 animal on Day 71; prematurely sacrifice due to moribundity or decreased body weight in 2 animals on Days 65 and 71; enlargement of the thymus, spleen, and lymph node in gross pathology; lymphoma in the thymus, spleen, mesenteric lymph node, and/or submandibular lymph node in histopathology. Lymphoma in the thymus and spleen of 1 surviving animal with enlargement of the thymus and spleen and increased thymus weight on Day 85. Increased WBC, EOS, NEUT, LYMP, and MONO and/or decreased RBC, Hb, Ht, Ret, and PLT in 3 animals; abnormal lymphocyte and apoptotic-like cells in peripheral blood of 2 animals; increases in immature CD4 and CD8 double negative (DN) 1 to 4 T cells as well as increases in CD3 positive (CD3+) T cells, CD8 single positive (CD8+) T cells, CD4 and CD8 double positive (DP) T cells, B cells, and/or NK cells in peripheral blood of 3 animals; increases in lymphocytes, T cell subsets (CD3+, CD8+ T cells, and/or DN1 to 4 T cells), B cells, and/or NK cells in the thymus of 4 animals; decreased values of the H3K27me3 in the thymus in 4 animals; apparent changes in the gene rearrangement patterns of TCRβ gene in 4 animals; up- or down-regulation of oncogene activation-related genes, tumor suppressor genes, and T-cell differentiation-related genes in the thymus of 4 animals.	**4.2.3.7.3-2**

CD: Cluster of differentiation; EOS; Eosinophil; Hb: Hemoglobin; Ht: Hematocrit; H3K27me3: trimethylated histone H3 lysine 27; LYMP; Lymphocyte; MONO; Monocyte; NEUT; Neutrophil; NK: Natural killer; PEG: Polyethylene glycol; PLT: platelet; RBC; Red blood cell; Ret: Reticulocyte; TCR: T cell receptor; WBC: white blood cell.

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

				Test Article: Valemetostat tosylate		
Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Attachment Number**
Rats/Crl: CD(SD)	Gavage (80% PEG200 and 20% sterile water for injection/Suspention)	8 or 12 Weeks	0, 20, 60	M:30 at 20 mg/kg in groups examined 2 or 3 months after the initiation of dosing M:30 at 20 mg/kg in a group examined after 2-month dosing, followed by 3-month recovery period M:10 at 60 mg/kg in a group examined 3 months after the initiation of dosing	Lymphoma was observed in animals at only 20 mg/kg. Animals with lymphoma: Prematurely sacrifice in 7 animals due to decreased body weight; enlargement of the thymus, spleen, and/or lymph node in gross pathology; lymphoma in 20 animals noted during dosing and recovery periods in histopathology; increased WBC parameters, and abnormal lymphocyte and apoptotic-like cells in peripheral blood of 5 animals; decreases in absolute number of CD3 positive (CD3+) T cells, CD4 positive (CD4+) T cells, CD8 positive (CD8+) T cells, and CD8 positive and/or T-cell receptor α and β positive (αβ+) T cells in 4 animals, increases in absolute number of CD8+ and αβ+ T cells in 2 animals, and increases in absolute number of CD4 and CD8 double positive (DP) T cells and/or CD4 and CD8 double negative (DN) T cells in 5 animals in peripheral blood; increases in absolute number of CD3+, CD8+, αβ+, DP, and/or DN T cells in the thymus; up-regulations of gene signatures regarding MYC, thymocyte DN, and regulatory T cells (Treg) in DP T cells in the thymus, and down-regulation of interferon gene signatures in DP and CD8+ T cells in the thymus after 2 months dosing; up-regulations of gene signatures regarding MYC, E2F, and Treg in DP T cells in the thymus after 3 months dosing; apparent changes in the gene rearrangement patterns of T-cell receptor β gene in the thymus.	4.2.3.7.3-3

CD: Cluster of differentiation; PEG: Polyethylene glycol; WBC: white blood cell.

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

				Test Article: Valemetostat tosylate		
Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Attachment Number**
Rats/Crl: CD(SD) (55 weeks old at the initiation of dosing)	Gavage (80% PEG200 and 20% sterile water for injection/Suspention)	12 Weeks	0, 10, 20	M:20 at 0 mg/kg M:30 at 10 and 20 mg/kg	≥10 mg/kg: Increased EOS, deceased LUC and NEUT 20 mg/kg: Decreased WBC and LYMP; decreased absolute and relative CD4 positive T cells, increased relative CD8 positive T cells in the thymus.	**4.2.3.7.3-4**

CD: Cluster of differentiation; EOS; Eosinophil; LYMP; Lymphocyte; LUC: Large unstained cell; NEUT; Neutrophil; PEG: Polyethylene glycol; WBC: white blood cell.

17.2 光毒性試験

				Test Article: Valemetostat tosylate		
Species/Strain	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Attachment Number**
Balb/c 3T3 Clone A31 mouse fibroblasts	In vitro study	1 hour pre-incubation, 50 min UVA irradiation (5 J/cm^2)	0.781, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0, 100 µg/mL	6 wells /experimental point	Slight reduction in neutral red uptake was observed at 100 µg/mL, in the absence and presence of UVA. No toxicity was observed at the remaining concentrations tested in the absence or presence of UVA light. The PIF value was not calculated, and the MPE value was −0.008. Chlorpromazine, positive control, induced an acceptable positive response (PIF of 49.5). The results obtained were predictive of no phototoxic potential.	**4.2.3.7.7-1**

Ultraviolet light A; PIF: Photo irritation factor; MPE: Mean photo effect