2.6.6 毒性試験の概要文

目　次

目　次 2
表 一 覧 2
略号一覧 3
1 まとめ 4
2 単回投与毒性試験 4
3 反復投与毒性試験 4
4 遺伝毒性試験 5
5 がん原性試験 5
6 生殖発生毒性試験 5
6.1 幼若動物を用いた毒性試験 5
6.1.1 幼若ラットを用いた経口投与毒性試験（用量設定試験，試験番号：1570143） 5
6.1.2 幼若ラットを用いた経口投与毒性試験（試験番号：1570144） 6
7 局所刺激性試験 10
8 その他の毒性試験 10
9 考察及び結論 11
10 参考文献 12

表 一 覧

Table 1-1 毒性試験プログラム 4
Table 6-1 幼若ラットを用いた経口投与毒性試験における TK パラメータ 10

略号一覧

略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
Acp	tartrate-resistant acid phosphatase	酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ
Atf	activating transcription factor	-
AUC 0-t	the area under the drug plasma concentration-time curve from time zero to time 't'	0 時間から投与後時間 t までの血漿中薬物濃度-時間曲線下面積
Chad	condroadherin	-
Cmax	maximal drug plasma concentration	最高血漿中薬物濃度
Col	collagen	コラーゲン
Csf	colony stimulating factor	コロニー刺激因子
CT	computed tomography	コンピュータ断層撮影
CTx	C-terminal telopeptides of type I collagen	I 型コラーゲン架橋 C-テロペプチド
Dlx	distalless homeobox	-
Fra	Fos-related antigen	-
GAP	growth associated protein	-
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
Gpr	G-protein-coupled receptor	G タンパク質共役型受容体
ICH	International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for human use	医薬品規制調和国際会議
JAK	janus associated kinase	Janus キナーゼ
M-CSF	macrophage colony stimulating factor	マクロファージコロニー刺激因子
MEST	mesoderm-specific transcription	-
MF	myelofibrosis	骨髄線維症
NR	not reported	報告せず
Opg	osteoprotegerin	オステオプロゲリン
PINP	procollagen type I N-terminal propeptide	I 型プロコラーゲン-N-プロペプチド
pQCT	peripheral quantitative computed tomography	末梢骨定量的コンピュータ断層撮影
Rabep	rabaptin, RAB GTPase binding effector protein	-
RANKL	receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand	-
STAT	signal transducer and activator of transcription	シグナル伝達兼転写活性化因子
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
Tnfrs	tumor necrosis factor (ligand) superfamily	腫瘍壊死因子（リガンド）スーパーファミリー
Tnmd	tenomodulin	テノモジュリン
Tyk	tyrosine kinase	チロシンキナーゼ
Ucma	upper zone of growth plate and cartilage matrix associated	-

1 まとめ

ルキソリチニブ（INC424）を小児に投与する際の安全性を担保する目的で幼若動物を用いた毒性試験（用量設定試験及び主試験）を実施した（Table 1-1）。主試験については，医薬品規制調和国際会議（ICH） M3 (R2)「医薬品の臨床試験のための非臨床安全性試験の実施時期についてのガイドライン」及びその他の安全性に関するガイドラインに従い，医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準拠して実施した。いずれの試験もノバルティス社が委託した受託試験機関で実施した。

Table 1-1 毒性試験プログラム

試験の種類	投与経路	動物種	被験物質
幼若ラットを用いた経口投与毒性試験（用量設定試験，GLP 非適用）	経口	ラット	ルキソリチニブ
幼若ラットを用いた経口投与毒性試験（GLP 適用）	経口	ラット	ルキソリチニブ

動物種として，成熟動物における毒性試験の供試動物であるラットを選択した。

ルキソリチニブを幼若ラット（生後 7 日，14 日又は 21 日）に 1.5～75 mg/kg/日の用量で反復経口投与した結果，成長抑制及び骨への影響が認められた。骨の変化は，投与開始齢がより低日齢（生後 7 日，ヒトで新生児に相当）であるほど重症であった。高日齢動物（生後 21 日，ヒトで 2～3 歳に相当）では高用量が投与されたにもかかわらず，低日齢動物と比較して変化は軽度であり回復性が認められた。これまでに実施した成熟ラット（投与開始齢：7 週齢，ヒトで 12 歳に相当）での毒性試験では骨の変化は認められておらず，また，成長抑制及び骨への影響以外は幼若ラットにおいても成熟ラットと同様の毒性プロファイルが認められた。このことから，ヒト 12 歳以上に相当する動物でのリスクは想定されないが，発達段階にある幼若期で特により低日齢動物でリスクが高いと考えられた。そのため，臨床使用において，低年齢の小児であるほどより薬物に対する影響を受けやすいと考えられる。骨成長に対する影響は投薬中止に伴い回復するものの，骨格発達の損失を完全に補うことはできない可能性がある。

なお，本概要文におけるルキソリチニブの用量は遊離塩基として表記した。ルキソリチニブリン酸塩としての用量への換算には，変換係数 1.32 を使用する。

2 単回投与毒性試験

記載事項なし

3 反復投与毒性試験

記載事項なし

4 遺伝毒性試験

記載事項なし

5 がん原性試験

記載事項なし

6 生殖発生毒性試験

6.1 幼若動物を用いた毒性試験

6.1.1 幼若ラットを用いた経口投与毒性試験（用量設定試験，試験番号：1570143）

本試験[Table 2.6.7.11-1570143]は，幼若動物を用いた毒性試験の用量設定を目的として GLP 非適用で実施した。

ルキソリチニブ（バッチ番号：1010004718）を 0.5%メチルセルロース溶液に懸濁し，幼若ラット（Sprague-Dawley，1 群雌雄各 12 例）に 0（対照），5，15，30，50 又は 75 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回経口投与した。また，1 群雌雄各 8 例のトキシコキネティクス（TK）サテライト群を設定して初回投与後の TK 測定を実施した。投与期間は生後 7 日から 41 日までとし，死亡の有無，一般状態観察，体重測定，X 線検査，病理検査［剖検，病理組織学的検査，及びマイクロコンピュータ断層撮影（CT）による骨検査］及び TK 測定（血漿，脳脊髄液及び脳組織中）を実施した。

30 mg/kg/日以上の群では，計 13 例が死亡又は切迫殺に至った。死亡例では投薬に関連したと考えられる骨折，仮骨又は骨端の変性／壊死が認められた。このことから，30 mg/kg/日以上の群は投与を中止し，早期に試験を終了させた。

30 mg/kg/日以上の群における一般状態の変化として，引き込み反射の消失，後肢の運動制限，又は後肢の硬化／浮腫が認められた。

体重測定では，30 mg/kg/日以上の群では試験中止までの期間に対照群と比較して 6～24%の減少がみられた。15 mg/kg/日以下の群では，投与終了までの期間に対照群と比較して 3～7%の減少がみられた。

X 線検査では，50 mg/kg/日以上の群の数例で後肢及び前肢に数箇所の骨折が認められた。30 mg/kg/日の群では長管骨（尺骨，脛骨及び腓骨）に骨透亮線像がみられ，投薬に関連した骨折と判断された。骨折のほとんどは完全骨折の横骨折であり仮骨形成は認められなかった。15 mg/kg/日群では脛骨に X 線不透過像が認められた。5 mg/kg/日群では所見は認められなかった。

15 mg/kg/日以下の群で実施したマイクロ CT による骨検査では，15 mg/kg/日の群の雌雄で皮質厚の増加，雄で骨伸長の軽微な遅延及び骨髄腔拡大の減少，脛骨の骨幹中央部分での皮質骨密度の増加がみられた。これらの検査では，30 mg/kg/日以上の群で認められた骨折の原因となる変化は観察されなかった。

剖検では，いずれの群においても肉眼的変化は認められなかった。30 mg/kg/日以下の群で実施した病理組織学検査では，30 mg/kg/日群において海綿骨の増加，骨端軟骨の変性及び壊死，骨端骨折，及び骨幹部に仮骨の形成を認め，投薬に関連した変化と判断された。骨端軟骨の変性及び壊死，骨折，及び骨幹部の仮骨は，X 線検査で骨折と判断された骨透亮線像と関連した変化，海綿骨の増加は上腕骨及び脛骨での X 線不透過像と関連した変化と考えられた。15 mg/kg/日群では海綿骨増加及び肩甲骨の骨端骨折が認められ，海綿骨増加は X 線不透過像と一致していた。

生後 7 日（すべての群），生後 25 日（50 及び 75 mg/kg/日群），生後 41～42 日（5 及び 15 mg/kg/日群）に TK 測定を実施した。いずれの群においても投与初日（生後 7 日）の投与後 0.5 時間から血漿中ルキソリチニブの定量が可能であった。5 及び 15 mg/kg/日群での血漿中曝露量（AUC 0-24h 及び Cmax）は投与初日（生後 7 日）では明らかな性差は認められなかったが，生後 41 日では雌の曝露量は雄に比べて 2 倍以上高かった。この曝露量の性差はラットを用いた反復経口投与毒性試験（4 週間反復：T06-08-03，26 週間反復：T07-10-06）の結果と一致するものであった（1.13.1-1-MF-2.6.6-3.3 項，1.13.1-1-MF-2.6.6-3.5 項）。5 mg/kg/日群の生後 7 日及び 41 日における雌雄の平均曝露量は，それぞれ雄で AUC 0-24h：729 及び 67.5 ng*h/mL（生後 7 日及び 41 日，以下略），Cmax：106 及び 36.6 ng/mL，雌で AUC 0-24h：673 及び 148 ng*h/mL，Cmax：104 及び 110 ng/mL であった。生後 7 日の投与後 0.5，2 及び 7 時間に採取した脳組織中のルキソリチニブ濃度（ng/g）は血漿中濃度（ng/mL）と同等であった。生後 25 及び 42 日に採取した脳脊髄液及び脳組織中ではルキソリチニブは定量されなかった。

以上，30 mg/kg/日以上の群では死亡又は瀕死状態のため切迫殺に至り，X 線検査及び病理組織学検査において骨の変化を認め，試験中止に至った。また，15 mg/kg/日群においても骨の変化が観察された。一方で，5 mg/kg/日群では骨の変化を含む毒性変化はみられなかったことから，無毒性量は 5 mg/kg/日と判断された。

6.1.2 幼若ラットを用いた経口投与毒性試験（試験番号：1570144）

本試験[Table 2.6.7.15-1570144]はルキソリチニブを幼若ラットに生後 7 日，14 日又は 21 日から 63 日（9 週齢）まで反復経口投与したときの毒性及びその後 12 週間の休薬による回復性を評価することを目的として GLP 適用で実施した。

ルキソリチニブ（バッチ番号：1010004718）を 0.5%メチルセルロース溶液に懸濁し，幼若ラット（Sprague-Dawley，1 群雌雄各 12 例）に 0（対照），1.5，5 又は 15 mg/kg/日の用量で生後 7～63 日まで，0（対照）又は 15 mg/kg/日の用量で生後 14～63 日まで，0（対照），5，15 又は 60 mg/kg/日の用量で生後 21～63 日までそれぞれ 1 日 1 回経口投与した。また，回復性試験群として 1 群雌雄各 12 例に同様に投与し，生後 64～147 日の期間休薬して 12 週間の休薬による回復性を評価した。受胎能検査群として 1 群雌雄各 20 例に 0（対照），5，15 又は 60 mg/kg/日の用量で生後 21～63 日まで投与した。回復期間中の 87～91 日から同群内同士での雌雄で交配を開始し，雌は妊娠 13 日，雄は交配 2～3 週間後に剖検した。さらに投薬による骨への影響を詳細に評価す

る機序検討群として 1 群雌雄各 8 例に 0（対照）又は 30 mg/kg/日の用量で生後 7～10 日まで投与し，生後 11 日に剖検した。

一般状態，体重，摂餌量，臨床検査（血液学的検査，血液生化学的検査，血液凝固検査及び尿検査），病理検査（剖検，器官重量測定及び病理組織学的検査）に加えて，身体発達評価，視覚機能検査，骨検査［X 線検査（第 1～6 腰椎，右大腿骨の骨長測定を含む），末梢骨定量的 CT（pQCT）による骨構造解析及び骨密度測定］，及び TK 測定を実施した。また，受胎能検査群では生殖能検査，機序検討群では骨代謝マーカー測定，遺伝子発現解析，及び骨の病理組織学的検査を実施した。

対照群の 2 例を含む 9 例が死亡又は切迫殺に至った。死因は敗血症 3 例，悪性リンパ腫 1 例，不明 5 例であった。特定の群における発生頻度の増加はみられず，これらの死因は偶発的なものと判断されたことから，いずれの個体の死亡も投薬に起因した死亡ではないと判断された。

投薬に関連した一般状態の変化は認められず，身体発達評価（開眼，膣開口及び包皮分離），視覚機能及び生殖能検査［性周期，交配所要日数，交尾率，受胎率，妊娠率，黄体数及び子宮パラメータ（着床数，吸収胚数及び死亡胎児数，生存胎児数，着床前及び着床後死亡率）］，血液生化学的検査，血液凝固検査及び尿検査において投薬による影響は認められなかった。

体重の変化として，生後 7～63 日投与の 5 mg/kg/日以上の群の雄及び 15 mg/kg/日群の雌，生後 14～63 日投与の 15 mg/kg/日群の雌雄，生後 21～63 日投与の 5 mg/kg/日以上の群の雄において軽度の体重増加抑制がみられた。より幼若な日齢から投与を開始した動物では早期から体重増加抑制が認められた。体重増加抑制は概ね回復期間終了まで持続的に認められ，摂餌量の減少を伴っていたが，生後 21～63 日投与の群では 15 mg/kg/日以下の用量で摂餌量への影響は認められず，また 60 mg/kg/日の雌では回復期間中に体重増加抑制及び摂餌量減少が認められた。

血液学的検査において，生後 7～63 日投与の 1.5 mg/kg/日以上の群の雄及び 5 mg/kg/日以上の群の雌，生後 14～63 日投与の 15 mg/kg/日群の雌雄，生後 21～63 日投与の 15 mg/kg/日以上の群の雄，並びに 5 及び 60 mg/kg/日の雌において，軽微から軽度のリンパ球数の減少がみられた。また，生後 14～63 日の 15 mg/kg/日群の雄及び生後 21～63 日投与の 15 mg/kg/日以上の群の雌雄で軽微な網状赤血球数の減少が認められた。いずれの変化も休薬により回復した。リンパ球数減少に関連する変化として，白血球数の減少，胸腺及び脾臓重量の減少，並びに骨髄及び脾臓における造血細胞密度の減少が，また，網状赤血球数の減少に関連する変化として病理検査において骨髄における造血細胞密度の減少及び脾臓における造血の減少が認められた。血液塗抹検査では投薬に関連した変化は認められなかった。

投与期間終了時（9 週齢）の X 線検査では，5 mg/kg/日以上の群の雄及び 15 mg/kg/日群の雌で大腿骨及び腰椎のサイズ（直径及び長さ）の減少がみられ，回復期間終了時点においても観察された。生後 7～63 日投与動物での変化は他の群と比較してより重度かつ広範囲にわたっており，変化の重篤度及び範囲は投与開始日齢がより幼若であるほど顕著になる傾向がみられた。また，用量依存性も認められた。骨のサイズ減少に関連して，pQCT（6 週齢及び 9 週齢）では骨量の減

少及び骨構造の変化が認められ，一部の動物において骨密度の変化（概ね増加）を伴っていた。これらの動物では体重増加抑制がみられたことから，成長速度及び骨成長の抑制が示唆された。投与期間終了時において，15 mg/kg/日以上の群の雌雄の脛骨骨幹中央部に X 線不透過像として検出される横断線が認められ，投薬に関連する可能性が示唆されたが，病理組織学的所見を伴わない軽微な変化であったことから毒性学的意義は不明であった。投薬に関連した骨の変化は一部を除き，概ね 12 週間の回復期間後に部分的，又は完全に回復した。回復性が認められなかった変化は，生後 14～63 日の 15 mg/kg/日群又は 21～63 日投与の 60 mg/kg/日群の雌の腰椎長，生後 21～63 日投与の 60 mg/kg/日群の雄での大腿骨及び腰椎長，並びに生後 7～63 日投与の 5 mg/kg/日以上の群の雄及び 15 mg/kg/日群の雌の脛骨近位骨端の pQCT パラメータであった。このうち，生後 14～63 日又は 21～63 日投与の 15 mg/kg/日の雌又は 60 mg/kg/日の雌雄では，回復性試験終了時の平均体重の減少を伴っていた。

生後 7～63 日投与の，5 mg/kg/日以上の群の雌雄の脾臓，15 mg/kg/日群の雌雄の胸腺及び 15 mg/kg/日群の雄の副腎で重量減少がみられた。病理組織学的変化として，15 mg/kg/日群の雌で骨髄に軽微な造血細胞密度の低下が認められ，投薬に関連した変化と判断された。これらの変化は休薬により回復性が認められた。

生後 14～63 日投与の 15 mg/kg/日群の雌では，脾臓重量の減少が認められ，病理組織学的変化として脾臓の赤脾髄に軽微な細胞密度の低下が認められた。これらの変化は回復性が認められた。

生後 21～63 日投与のすべての群の雌雄で脾臓重量の減少，15 mg/kg/日以上の群の雄及び 60 mg/kg/日群の雌で副腎重量の減少，並びに 60 mg/kg/日群の雄及び 15 mg/kg/日以上の群の雌で胸腺重量の減少がみられた。脾臓及び副腎重量の減少に関連して，病理組織学的変化として 60 mg/kg/日群の雌雄で赤脾髄に軽微から軽度の細胞密度の低下，15 mg/kg/日以上の群の雄で副腎皮質に軽微な萎縮が認められた。また，60 mg/kg/日群の雌の骨髄に軽微から軽度の造血細胞密度の低下が認められた。これらの変化は回復性が認められた。

機序検討群（30 mg/kg/日を生後 7～10 日に投与）における骨の評価では，生後 11 日に実施した骨代謝マーカー測定において雌雄ともに骨形成マーカーである血清中 I 型プロコラーゲン-N-プロペプチド（PINP）が顕著に減少したが，骨吸収マーカーである血清中 I 型コラーゲン架橋 C-テロペプチド（CTx）への影響は認められなかった。右前肢及び右後肢の病理検査では，主として大腿骨及び上腕骨の近位側並びに脛骨の遠位側骨端において，骨端軟骨及び一次海綿骨に軽微な限局性の変性及び壊死が認められ，骨成長抑制に起因した変化と考えられた。上腕骨及び大腿骨を用いた遺伝子発現解析では，上腕骨の骨及び軟骨において，破骨細胞関連遺伝子のアップレギュレーション及び間葉系幹細胞関連遺伝子のダウンレギュレーションが認められた。アップレギュレーションした破骨細胞関連遺伝子には，代表的なマーカーである酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ 5（*Acp 5*）及び *cathepsin K* のほか，リソソームマーカーである *lysosomal H+ transporting ATPase* 及び *cathepsin Z*，並びに破骨細胞分化に関わる *Gpr68*（Yang et al. 2006）であり，ダウンレギュレーションした間葉系幹細胞関連遺伝子は，mesoderm-specific transcription［*MEST*，マウ

スにおいて間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化段階早期にアップレギュレーションすることが確認されている（Lin et al. 2014）］，growth associated protein 43（*GAP43*），テノモジュリン（*Tnmd*）及びコラーゲン類（*Col6α6* 及び *Col14α1*）であった。また，上腕骨の骨及び軟骨で，成熟軟骨芽細胞／軟骨細胞関連遺伝子マーカーで発現プロファイルが類似し共発現がみられる遺伝子［condroadherin（*Chad*），upper zone of growth plate and cartilage matrix associated（*Ucma*）及びコラーゲン類（*Col10α1*，*Col2α1* 及び *Col9α3*）］について解析した結果，これらの遺伝子発現には個体間差がみられ，対照群と投与群との比較では投薬に関連した明らかな影響は認められなかった。なお，投与群の 1 例においてこれらの遺伝子発現が最も低下したが，対照群での最も低下した動物と比べるとその低下した程度はわずかであった。大腿骨骨髄において，骨吸収関連遺伝子として RANKL / *Tnfsf11* の軽微な発現上昇（対照群と比較して 1.3 倍の上昇）がみられたが，オステオプロゲリン（Opg）/ *Tnfrsf11b*，マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）/ *Csf1*，及び RANKL / *Tnfsf11*：Opg / *Tnfrsf11b* 比では投薬に関連した明らかな影響は認められなかった。RANKL 及び Opg は骨芽細胞に発現し，RANKL は破骨細胞の分化及び活性化を誘導，Opg は抑制することで骨吸収を制御している（Hofbauer et al. 2000，Boyle et al. 2003，Ross 2013）。M-CSF は破骨前駆細胞に作用して，増殖，分化及び生存を調節する他，破骨細胞の細胞骨格を再構築して効率的な骨吸収に寄与すると考えられている（Ross 2013）。また，大腿骨骨髄での骨芽細胞関連遺伝子［アルカリフォスファターゼ *Alpl*，I 型コラーゲン（*Col1a1*，*Col1a2*）］，骨形成関連遺伝子（activating transcription factor-4 *Atf4*，distalless homeobox *Dlx*，Fos-related antigen Fra / *Rabep2*）及び JAK-STAT 経路の主な骨恒常性関連遺伝子（*Tyk2*，*Stat3*，*Stat5b*）に投薬の影響はみられなかった。上腕骨又は大腿骨の骨髄において分化段階早期の T 細胞及び B 細胞並びに細胞分裂を示す遺伝子のダウンレギュレーションが認められた。これは JAK 阻害剤の薬理作用に基づいた変化であった。また，大腿骨骨髄で単球及びマクロファージを示す遺伝子のアップレギュレーションが認められた。

TK 測定の結果，血漿中曝露量は初回投与及び投与終了時のいずれにおいても概ね用量依存的に増加した（Table 6-1）。生後 7～63 日及び 14～63 日投与の各群で，投与終了時の曝露量は，初回投与後と比べ概ね減少した。生後 21～63 日投与群での投与終了時の曝露量は，雌では初回投与と同程度であり，雄では初回投与と比べて低く，1 / 10～1 / 42 倍であった。

Table 6-1 幼若ラットを用いた経口投与毒性試験における TK パラメータ

投与開始	投与量（mg/kg/日）		1.5		5		15		60	
			雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
生後 7 日	生後 7 日	Cmax	41.5	42.7	292	189	623	714	-	-
		AUC 0-24h	171	158	811	785	2520	3010	-	-
	生後 63 日	Cmax	4.64	39.3	17.2	138	103	336	-	-
		AUC 0-24h	NR	44.7	NR	136	187	483	-	-
生後 14 日	生後 14 日	Cmax	-	-	-	-	351	494	-	-
		AUC 0-24h	-	-	-	-	1920	2370	-	-
	生後 63 日	Cmax	-	-	-	-	112	457	-	-
		AUC 0-24h	-	-	-	-	88.3	560	-	-
生後 21 日	生後 21 日	Cmax	-	-	129	117	787	423	1150	2520
		AUC 0-24h	-	-	373	276	1340	1140	10000	7960
	生後 63 日	Cmax	-	-	24.8	103	84.7	368	166	1320
		AUC 0-24h	-	-	36.4	151	133	697	237	8630

Source：Table 2.6.7.15-1570144

単位：Cmax（ng/mL），AUC 0-24h（ng*h/mL）

-：投与群を設定していないため測定せず

NR（not reported）：濃度を定量できた血漿サンプルが 3 未満であったため，データは得られていない

以上，幼若ラットを用いた経口投与毒性試験において，ルキソリチニブを 1.5，5 及び 15 mg/kg/ 日の用量で生後 7～63 日，15 mg/kg/日で生後 14～63 日，並びに 5，15 及び 60 mg/kg/日で生後 21～63 日に経口投与したとき，5 mg/kg/日以上の群で摂餌量の減少，体重増加抑制，骨のサイズ（直径及び長さ）の減少が認められた。骨のサイズ減少に関連した変化として，骨量の減少及び骨の構造変化が認められ，一部の動物において骨密度の変化（概ね増加）を伴っていた。骨の変化は投与開始齢がより幼若であるほど著しく，低日齢動物においてより重症で広範にわたる変化が認められた。高日齢動物では高用量が投与されたものの，その毒性変化は軽度で低日齢動物と類似しており，回復傾向が認められた。機序検討群の遺伝子発現解析では骨吸収マーカー，骨芽細胞／骨形成関連遺伝子の変化が認められなかったこと，生後 63 日まで反復経口投与した群では動物の成長及び骨格発達の経過に伴い変化の程度及び範囲が低下していたことから，本薬の骨代謝に対する直接作用はないものと考えられる。

7 局所刺激性試験

記載事項なし

8 その他の毒性試験

記載事項なし

9 考察及び結論

ルキソリチニブを小児に投与する際の安全性を担保することを目的に幼若ラットを用いた経口投与毒性試験［用量設定試験（GLP 非適用）及び主試験（GLP 適用）］を実施した。ルキソリチニブを幼若ラット（生後 7 日，14 日又は 21 日）に 1.5～75 mg/kg/日の用量で反復経口投与した結果，体重増加量減少，摂餌量減少及び骨への影響が認められた。骨の変化は，体重増加量及び摂餌量の低下に関連して認められていることから，成長遅延に伴う骨形成の低下を示唆するものと考えられた。TK 測定の結果から，生後 7 日から投与を開始した群では 30 mg/kg/日以上で骨折が認められ，曝露量（非結合型 AUC 0-24h）は 1200 ng*h/mL 以上であった。また，生後 7 日投与開始の 5 mg/kg/日群，生後 14 日投与開始の 15 mg/kg/日群で骨成長抑制が認められ，曝露量（非結合型 AUC 0-24h）は 140 ng*h/mL 以上であった。骨の変化は，投与開始齢がより低日齢（生後 7 日，ヒト新生児に相当）であるほど重症であった。高日齢動物（生後 21 日，ヒト 2～3 歳に相当）では高用量が投与されたにもかかわらず，低日齢動物と比較して変化は軽度であり回復性が認められた。これまでに実施したラット（投与開始齢：7 週齢，ヒトで 12 歳に相当）での毒性試験では骨の変化は認められておらず，また，成長抑制及び骨への影響以外は幼若ラットにおいても成熟ラットと同様の毒性プロファイルが認められた。

以上から，ルキソリチニブの幼若ラットにおける毒性を評価した結果，骨成長に対する影響が認められた。骨成長に対する影響は骨格発達段階及び曝露量に基づいて予想することができ，ヒト 12 歳以上に相当する動物でのリスクは想定されないが，発達段階にある幼若期で特により低日齢動物でリスクが高いと考えられた。そのため，臨床使用においてもより低年齢の小児であるほどリスクが高いと考えられる。骨成長に及ぼす影響は可逆的と考えられるが，骨形成完了前及び成長途中に生じた発育遅延は，投与終了後の骨成長により十分に補填されない可能性がある。したがって，特に 1 歳未満の小児への投与に際しては，成長に及ぼす潜在的影響と期待される効果を考慮して判断する必要がある。

以上，本項に記載した毒性試験成績から，12 歳以上の小児及び成人を対象とした造血幹細胞移植後の移植片対宿主病の治療薬として，添付文書に規定した用法及び用量での本薬の使用を支持するものと考えられた。

10 参考文献

[Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL (2003)] Osteoclast differentiation and activation. Nature; 423(6937):337-42.

[Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, et al. (2000)] The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. J Bone Miner Res; 15(1):2-12.

[Lin X, Wu L, Zhang Z, et al. (2014)] MiR-335-5p promotes chondrogenesis in mouse mesenchymal stem cells and is regulated through two positive feedback loops. J Bone Miner Res; 29(7):1575-85.

[Ross FP (2013)] Osteoclast biology and bone resorption. In: Rosen CJ (ed). Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. 8th ed. Ames[Iowa]:John Wiley & Sons Inc, p. 25-33.

[Yang M, Mailhot G, Birnbaum MJ, et al. (2006)] Expression of and role for ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 (OGR1) during osteoclastogenesis. J Biol Chem; 281(33):23598-605.

2.6.7 毒性試験概要表

目　次

目　次 2
略号一覧 3
2.6.7.1 毒性試験一覧 4
2.6.7.2 トキシコキネティクス: トキシコキネティクス試験一覧表 5
2.6.7.3 トキシコキネティクス試験成績一覧表 6
2.6.7.4 毒性試験に用いた原薬／不純物 7
2.6.7.5 単回投与毒性試験 8
2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 8
2.6.7.7 反復投与毒性試験 8
2.6.7.8 *In vitro* 遺伝毒性試験 8
2.6.7.9 *In vivo* 遺伝毒性試験 8
2.6.7.10 がん原性試験 8
2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 9
2.6.7.12 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 10
2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 10
2.6.7.14 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 10
2.6.7.15 幼若動物を用いた毒性試験 11
2.6.7.16 局所刺激性試験 28
2.6.7.17 その他の毒性試験 28

略号一覧

略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
AUC0-t	area under the drug plasma concentration-time curve from time zero to time ‘t’	0 時間から投与後時間 t までの血漿中薬物濃度-時間曲線下面積
BMC	bone mineral content	骨塩量
BMD	bone mineral density	骨密度
BQL	below the quantitation limit	定量限界未満
Cmax	maximal drug plasma concentration	最高血漿中薬物濃度
cPs	centipoise	センチポイズ
[redacted]	[redacted]	-
CTD	Common Technical Document	国際共通化資料
F	female	雌
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
M	male	雄
NA	not applicable	該当なし
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
NR	not reported	報告せず
PINP	procollagen type I N-terminal propeptide	I 型プロコラーゲン-N-プロペプチド
pp	post-partum	生後
pQCT	peripheral quantitative computed tomography	末梢骨定量的コンピュータ断層撮影
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
w/v (%)	weight per volume (%)	質量体積（パーセント）

2.6.7.1 毒性試験一覧

Study type	Species and strain	Method of administration	Duration of dosing	Doses (mg/kg)	GLP compliance	Testing facility	Study number	TK collected	Location in CTD
Reproductive and development toxicity:									
Juvenile development (dose range finding)	Rat/Crl:CD (SD)	Oral, gavage	Day 7 to day 41 post-partum; Day 7 to day 25 post-partum for the 3 last groups	0, 5, 15, 30, 50, 75 NOAEL: 5	No	[redacted], Canada	[1570143]	yes	4.2.3.5.4-1
Juvenile development	Rat/Crl:CD (SD)	Oral, gavage	Day 7 to day 63 post-partum	0, 1.5, 5, 15	Yes	[redacted], Canada	[1570144]	yes	4.2.3.5.4-2
			Day 14 to day 63 post-partum	0, 15					
			Day 21 to day 63 post-partum	0, 5, 15, 60					
			Day 7 to day 10 post-partum	0, 30					

[redacted] = [redacted]

2.6.7.2 トキシコキネティクス: トキシコキネティクス試験一覧表

Study type	Species	Strain	Method of administration	Doses (mg/kg)	GLP compliance	Study number	Location in CTD
Reproductive and development toxicity:							
Juvenile development (dose range finding)	Rat	Crl:CD(SD)	Oral, gavage	5, 15, 30, 50, 75	No	[1570143]	4.2.3.5.4-1
Juvenile development	Rat	Crl:CD(SD)	Oral, gavage	day 7 to day 63 pp: 1.5, 5, 15 day 14 to day 63 pp: 15 day 21 to day 63 pp: 5, 15, 60	Yes	[1570144]	4.2.3.5.4-2

pp = post-partrum

2.6.7.3 トキシコキネティクス試験成績一覧表

Daily dose (mg/kg)	Start dose day (post-partum)	Study day (post-partum)	Rats male	female	Study number	Location in CTD
AUC0-24h(hr*ng/mL)						
5	day 7	day 7	729	673	[1570143]	4.2.3.5.4-1
		day 41	67.5	148		
15		day 7	1560	2810		
		day 41	149	528		
30		day 7	7950	5510		
50		day 7	19500	17800		
75		day 7	15800	13700		
5	day 21	day 21	373	276	[1570144]	4.2.3.5.4-2
15			1340	1140		
60			10000	7960		
5		day 63	36.4	151		
15			133	697		
60			237	8630		
1.5	day 7	day 7	171	158		
5			811	785		
15			2520	3010		
1.5		day 63	NR	44.7		
5			NR	136		
15			187	483		
15	day 14	day 14	1920	2370		
15		day 63	88.3	560		

NR = not reported (less than 3 quantifiable concentrations of test item at separate time points)

2.6.7.4 毒性試験に用いた原薬／不純物

Batch no.	Purity (%)	Impurities	Study type	Study number	Location in CTD
1010004718	100	[redacted] < [redacted] % [redacted] < [redacted] % INCB018423[(S) enantiomer] [redacted] % Total (specified + unspecified + INCB08423) [redacted] %	Reproductive and development toxicity	[1570143]	4.2.3.5.4-1
1010004718	100	[redacted] < [redacted] % [redacted] < [redacted] % INCB018423[(S) enantiomer] [redacted] % Total (specified + unspecified + INCB08423) [redacted] %	Reproductive and development toxicity	[1570144]	4.2.3.5.4-2

2.6.7.5 単回投与毒性試験

記載事項なし

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

記載事項なし

2.6.7.7 反復投与毒性試験

記載事項なし

2.6.7.8 *In vitro* 遺伝毒性試験

記載事項なし

2.6.7.9 *In vivo* 遺伝毒性試験

記載事項なし

2.6.7.10 がん原性試験

記載事項なし

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

Non-pivotal studies - A Dose Range Finding Oral Gavage Study in the Juvenile Sprague-Dawley Rat

Species/ strain	Method of administration (vehicle/ formulation)	Dosing period	Doses (mg/kg)	No. per group	Noteworthy findings	Testing facility	Study number	Location in CTD
Rat / Crl:CD(SD)	Oral gavage / 0.5% methylcellulose (w/v) type 400 cPs in purified water	Day 7 pp to day 41 pp	0, 5, 15, 30, 50, 75	12 M 12 F	≥ 30 mg/kg/day: clinical signs, radiographic bone changes and diaphyseal/physeal fractures and/or bone degeneration/necrosis observed histopathologically that led to the euthanasia and early termination of dosing 15 mg/kg/day: minimal reduction in bone elongation (male rats) and a decrease in marrow cavity expansion (male rats) and an increase in cortical thickness (both sexes).	[redacted], Canada	[1570143]	4.2.3.5.4-1

pp = post-partum, M = male, F = female, [redacted] = [redacted]

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

記載事項なし

2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

記載事項なし

2.6.7.14 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

記載事項なし

2.6.7.15 幼若動物を用いた毒性試験

Report title: An Oral Gavage Toxicity Study with a 12-Week Recovery Period in the Juvenile Sprague-Dawley Rat

Study no.: [1570144]

Species/strain: Rat / Sprague-Dawley

Duration of dosing: 4, 43, 50 or 57 days

Location in CTD: 2.4.3.5.4-2

Initial age: Day 7, 14 or 21 pp

Duration of postdose: 12 weeks

Vehicle/formulation: 0.5% methylcellulose (w/v) type 400 cPs in purified water

Date of first dose: [redacted] 20[redacted]

Method of administration: Daily oral gavage

GLP compliance: yes

Special features: Radiographic evaluation, *in vivo* peripheral quantitative computed tomography (pQCT), toxicokinetics

No-Observed-Effect Level: not determined

2.6.7.15 幼若動物を用いた毒性試験（続き）：Daily dosing from Days 7 to 63 post-partum: Group 1 to 4

Daily dose (mg/kg/day)	0 (Control – Group 1)		1.5 (Group 2)		5 (Group 3)		15 (Group 4)	
Number of animals	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12
Noteworthy findings								
Toxicokinetics:								
Day 7 pp								
$AUC_{(0-24)}$ (hr·ng/mL)	BQL	BQL	171	158	811	785	2520	3010
C_{max}(ng/mL)	BQL	BQL	41.5	42.7	292	189	623	714
Day 63 pp								
$AUC_{(0-24)}$ (hr·ng/mL)	BQL	BQL	NR	44.7	NR	136	187	483
C_{max}(ng/mL)	BQL	BQL	4.64	39.3	17.2	138	103	336
Died or sacrificed moribund [a]	0	0	1	0	1	0	1	1
Body weight [b] (g) (Day 63 pp)	431.5	261.7	-3	-1	-8	-2	-18 C	-12 a
Food consumption [bc] (g/animal/day)	35.8	23.2	+2	+1	-6	-3	-13	-12
Eye opening	-	-	-	-	-	-	-	-
Visual function	-	-	-	-	-	-	-	-
Preputial separation	-	NA	-	NA	-	NA	-	NA
Vaginal opening	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-
Hematology [b]								
White Blood Cell count (10^9/L)	11.577	6.274	-27	-1	-29	-23	-35	-27 A
Absolute Lymphocyte count (10^9/L)	9.348	5.456	-24	-4	-25	-25	-42 B	-30 A

M = male, F = female, BQL = below the quantitation limit, NR = not reported (less than 3 quantifiable concentrations), pp = post-partum, NA = not applicable.

[a] Cause of death/euthanasia unrelated to INC424.

[b] At the end of the dosing period. Control values are group mean absolute values. Treated group values are the % change from control absolute means in the direction indicated. If present, statistical significance is shown as A – P ≤ 0.05, B – p ≤ 0.01, C – P ≤ 0.001 (Dunnett); a – P ≤ 0.05, b – p ≤ 0.01, c - P ≤ 0.001 (Dunn).

[c] Post-partum day 59 to 63.

2.6.7.15 幼若動物を用いた毒性試験（続き）:Daily dosing from Days 7 to 63 post-partum: Group 1 to 4

Daily dose (mg/kg/day):	0 (Control – Group 1)		1.5 (Group 2)		5 (Group 3)		15 (Group 4)	
Number of animals:	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12
Bone densitometry – *in vivo* [a]								
pQCT- proximal tibia								
Metaphysis								
Total area (mm^2)								
Week 6	16.738	14.642	+2	-3	-7	-2	-12 A	-11
Week 9	22.911	15.162	-1	-4	-11 A	-5	-20 C	-12
Total BMC (mg/mm)								
Week 6	5.458	5.084	+4	-4	-6	-2	-11	-5
Week 9	8.416	7.127	0	-4	-8	-3	-15 B	-6
Trabecular area (mm^2)								
Week 6	10.367	9.368	0	-3	-7	-2	-14 A	-15 A
Week 9	13.613	8.822	0	-6	-13 A	-8	-22 C	-19 A
Trabecular BMC (mg/mm)								
Week 6	1.999	2.149	+5	-6	-8	-3	-15	-13
Week 9	2.413	2.384	+4	-8	-6	-7	-21 A	-14
Cortical/subcortical area (mm^2)								
Week 6	6.371	5.273	+4	-2	-5	-2	-8	-2
Week 9	9.298	6.343	-2	-2	-9 A	-2	-17 C	-2
Cortical/subcortical BMC (mg/mm)								
Week 6	3.459	2.935	+3	-2	-6	-2	-8	0
Week 9	6.003	4.742	-2	-2	-9 A	-2	-13 C	-1

2.6.7.15 幼若動物を用いた毒性試験（続き）:Daily dosing from Days 7 to 63 post-partum: Group 1 to 4

Daily dose (mg/kg/day):	0 (Control – Group 1)		1.5 (Group 2)		5 (Group 3)		15 (Group 4)	
Number of animals:	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12
Bone densitometry – *in vivo* [a]								
pQCT- proximal tibia								
Diaphysis								
Total area (mm^2)								
Week 6	4.153	3.982	+2	-8	-6	-4	-10	-10
Week 9	6.436	5.280	+1	-4	-7	-2	-13 B	-8
Cortical area (mm^2)								
Week 6	-	-	-	-	-	-	-	-
Week 9	4.835	-	+3	-	-5	-	-9 A	-
Cortical BMC (mg/mm)								
Week 6	-	-	-	-	-	-	-	-
Week 9	5.488	-	+3	-	-5	-	-9 A	-
Cortical BMD (mg/mm^3)								
Week 6	-	989.83	-	+1	-	+3	-	+4 A
Week 9	-	1120.88	-	0	-	+1	-	+2 A
Periosteal circumference (mm)								
Week 6	-	-	-	-	-	-	-	-
Week 9	8.9866	-	+1	-	-4	-	-7 B	-
Endosteal circumference (mm)								
Week 6	3.9940	4.0754	+1	-8	-5	-7	-12 B	-15 C
Week 9	4.4644	4.1232	-1	-4	-7	-4	-13 B	-13 A
Radiology [b]								
Number evaluated	12	12	11	12	11	12	11	11
Tibia								
Radio-opaque lines, Left and/or Right mid diaphysis	0	0	0	0	1	0	3	1

2.6.7.15 幼若動物を用いた毒性試験（続き）:Daily dosing from Days 7 to 63 post-partum: Group 1 to 4

Daily dose (mg/kg/day):	0 (Control – Group 1)		1.5 (Group 2)		5 (Group 3)		15 (Group 4)	
Number of animals:	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12
Noteworthy findings:								
Bone measurements [a] (mm)								
Lumbar spine	46.853	42.867	-1	-3	-3	0	-6 B	-5
Right femur	34.305	31.285	-1	-1	-2	+1	-4 A	-4
Organ weights [a] (%)								
Adrenal glands								
Absolute mean (g)	0.05715	0.06750	-12	-4	-13	-4	-32 c	-19 A
Relative to body weight (%)	0.01493	0.02906	-8	-6	-9	-1	-15	-9
Relative to brain weight (%)	2.82064	3.51563	-13	-3	-13	-1	-27 c	-15 A
Spleen								
Absolute mean (g)	0.9028	0.5534	-10	0	-27 b	-15	-37 c	-18 A
Relative to body weight (%)	0.2379	0.2388	-6	-2	-24 C	-12	-22 B	-9
Relative to brain weight (%)	44.8005	28.8208	-11	+1	-27 C	-12	-34 C	-14
Thymus								
Absolute mean (g)	0.7243	0.5310	-6	+19	-2	-4	-33 c	-17
Relative to body weight (%)	0.1903	0.2288	-3	+15	0	0	-16	-7
Relative to brain weight (%)	35.9097	27.6675	-7	+21	-3	-1	-28 b	-13
Histopathology [b]								
Bone marrow								
Decreased cellularity; hematopoietic								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	4
Spleen								
Decreased cellularity; red pulp								
Minimal	0	2	0	0	0	0	3	2

2.6.7.15 幼若動物を用いた毒性試験（続き）:Daily dosing from Days 7 to 63 post-partum: Group 1 to 4

Daily dose (mg/kg/day):	0 (Control – Group 1)		1.5 (Group 2)		5 (Group 3)		15 (Group 4)	
Number of animals:	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12
Postdose evaluation (end of recovery)								
Number evaluated	12	12	11	12	11	12	11	11
Body weight [c] (g) (Day 147 pp)	758.2	399.0	+3	-3	-9	-4	-8	-14
Food consumption [cd] (g/animal/day)	34.8	21.2	+2	+9	-10	+5	-8	+1
Bone densitometry – *in vivo* [c]								
pQCT- proximal tibia								
Metaphysis								
Total area (mm^2)	23.556	12.531	-	-	-8	-	-14A	-10
Total BMC (mg/mm)	13.586	9.743	-	-	-8	-	-15B	-
Trabecular area (mm^2)	10.948	3.829	-	-	-9	-	-12	-21
Trabecular BMC (mg/mm)	2.137	1.164	-	-	-10	-	-21	-21
Cortical/subcortical area (mm^2)	12.608	8.703	-	-	-7	-	-15B	-
Cortical/subcortical BMC (mg/mm)	11.452	8.578	-	-	-8	-	-13C	-
Diaphysis								
Total area (mm^2)	10.267	6.523	-	-	-6	-	-9	-
Cortical area (mm^2)	8.040	5.238	-	-	-5	-	-7	-
Cortical BMC (mg/mm)	9.908	6.484	-	-	-5	-	-7	-
Periosteal circumference (mm)	11.3470	9.0345	-	-	-3	-	-5	-
Endosteal circumference (mm)	5.2660	3.9586	-	-	-7	-	-10	-

- = no noteworthy findings.

[a] Control values are group mean absolute values. Treated group values are the % change from control absolute means in the direction indicated. If present, statistical significance is shown as A – P ≤ 0.05, B – p ≤ 0.01, C – P ≤ 0.001 (Dunnett); a – P ≤ 0.05, b – p ≤ 0.01, c - P ≤ 0.001 (Dunn).

[b] Incidence is presented.

[c] At the end of the recovery period. Control values are group mean absolute values. Treated group values are the % change from control absolute means in the direction indicated. If present, statistical significance is shown as A – P ≤ 0.05, B – p ≤ 0.01, C – P ≤ 0.001 (Dunnett); a – P ≤ 0.05, b – p ≤ 0.01, c - P ≤ 0.001 (Dunn).

[d] From post-partum day 143 to 147.

2.6.7.15 幼若動物を用いた毒性試験（続き）：Daily dosing from Days 14 to 63 post-partum: Group 5 and 6

Daily dose (mg/kg/day):	0 (Control – Group 5)		15 (Group 6)	
Number of animals:	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12
Noteworthy findings:				
Toxicokinetics:				
Day 14 pp				
$AUC_{(0-24)}$ (hr·ng/mL)	BQL	BQL	1920	2370
C_{max}(ng/mL)	BQL	BQL	351	494
Day 63 pp				
$AUC_{(0-24)}$ (hr·ng/mL)	BQL	BQL	88.3	560
C_{max} (ng/mL)	BQL	BQL	112	457
Died or sacrificed moribund [a]	0	0	1	0
Body weight [b] (g) (Day 63 pp)	467.9	283.0	-10 E	-8 D
Food consumption [bc] (g/animal/day)	39.8	24.5	-13	-7
Visual function	-	-	-	-
Vaginal opening	NA	-	NA	-
Preputial separation	-	NA	-	NA
Hematology [b]				
White Blood Cell count (10^9/L)	9.566	6.075	-37 E	-26 E
Absolute Lymphocyte count (10^9/L)	8.202	5.227	-40 E	-26 D
Absolute Reticulocyte count (10^9/L)	225.55	166.05	-17 E	-4
Bone densitometry – *in vivo* [b]				
pQCT- proximal tibia				
Metaphysis				
Total area (mm^2)				
Week 6	18.016	15.326	-13 E	-7
Week 9	23.018	14.859	-10 D	-4

2.6.7.15 幼若動物を用いた毒性試験（続き）：Daily dosing from Days 14 to 63 post-partum: Group 5 and 6

Daily dose (mg/kg/day):	0 (Control – Group 5)		15 (Group 6)	
Number of animals:	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12
Bone densitometry – *in vivo* [d]				
pQCT- proximal tibia				
Metaphysis				
Total BMC (mg/mm)				
Week 6	6.090	5.518	-10 D	-6
Week 9	8.810	7.428	-6	-4
Total BMD (mg/mm^3)				
Week 6	337.63	-	+3	-
Week 9	382.21	-	+5 D	-
Trabecular area (mm^2)				
Week 6	11.125	9.632	-16 E	-8
Week 9	13.542	8.145	-13 D	-5
Trabecular BMC (mg/mm)				
Week 6	2.423	2.353	-24 F	-9
Week 9	2.568	2.368	-12	-7
Trabecular BMD (mg/mm^3)				
Week 6	217.73	-	-10 D	-
Week 9	188.16	-	+2	-
Cortical/subcortical BMD (mg/mm^3)				
Week 6	531.97	-	+7 e	-
Week 9	660.62	-	+1	-

2.6.7.15 幼若動物を用いた毒性試験（続き）：Daily dosing from Days 14 to 63 post-partum: Group 5 and 6

Daily dose (mg/kg/day):	0 (Control – Group 5)		15 (Group 6)	
Number of animals:	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12
Bone densitometry – *in vivo* [d]				
pQCT- proximal tibia				
Diaphysis				
Total area (mm^2)				
Week 6	4.456	-	-7	-
Week 9	6.785	-	-10	-
Cortical area (mm^2)				
Week 6	-	-	-	-
Week 9	4.996	-	-7	-
Cortical BMC (mg/mm)				
Week 6	-	-	-	-
Week 9	5.665	-	-6	-
Cortical BMD (mg/mm^3)				
Week 6	998.66	-	+2 E	-
Week 9	-	-	-	-
Periosteal circumference (mm)				
Week 6	-	-	-	-
Week 9	9.2175	-	-5 D	-
Endosteal circumference (mm)				
Week 6	4.2847	-	-8 d	-
Week 9	4.7101	-	-10 D	-
Radiology [e]				
Number evaluated	12	12	11	12
Tibia				
Radio-opaque lines, Left and/or Right mid diaphysis	0	0	1	8

2.6.7.15 幼若動物を用いた毒性試験（続き）：Daily dosing from Days 14 to 63 post-partum: Group 5 and 6

Daily dose (mg/kg/day):	0 (Control – Group 5)		15 (Group 6)	
Number of animals:	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12
Bone measurements [e] (mm)				
Lumbar spine	47.078	43.589	-2	-5 F
Right femur	34.432	31.900	-1	-2 D
Organ weights [e] (g)				
Adrenal glands				
Absolute mean (g)	0.06328	0.07284	-18 D	-10
Relative to body weight (%)	0.01442	0.02722	-7	0
Relative to brain weight (%)	2.99090	3.72465	-16 D	-7
Spleen				
Absolute mean (g)	0.9595	0.6428	-34 F	-30 F
Relative to body weight (%)	0.2179	0.2430	-25 F	-22 F
Relative to brain weight (%)	45.4458	32.9446	-32 F	-28 F
Thymus				
Absolute mean (g)	0.7836	0.6675	-15	-20 d
Relative to body weight (%)	0.1791	0.2485	-4	-10
Relative to brain weight (%)	37.1653	34.1252	-13	-18 D
Histopathology [e]				
Spleen				
Decreased cellularity; red pulp				
Minimal	-	0	-	6
Postdose evaluation (end of recovery)				
Number evaluated	12	12	11	12
Body weight [df] (g) (Day 147 pp)	763.5	401.2	-4	-14 E
Food consumption [eg] (g/animal/day)	33.0	22.4	+3	-12
Bone measurements [e] (mm)				
Lumbar spine	56.928	48.475	-1	-4

2.6.7.15 幼若動物を用いた毒性試験（続き）：Daily dosing from Days 14 to 63 post-partum: Group 5 and 6

Daily dose (mg/kg/day):	0 (Control – Group 5)		15 (Group 6)	
Number of animals:	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12
Right femur	41.344	36.038	1	-3D
Bone densitometry – *in vivo*[dg]				
Diaphysis				
Total area (mm^2)	10.683	6.353	-8	-
Cortical BMD (mg/mm^3)	1230.31	1232.93	1D	-
Endosteal circumference (mm)	5.5760	3.8520	-8	-

BQL = below the quantitation limit, pp = post-partum, - = no noteworthy findings.

[a] Cause of death/euthanasia unrelated to INC424.

[b] At the end of dosing period. Control values are group mean absolute values. Treated group values are the % change from control absolute means in the direction indicated. If present, statistical significance is show as D – P ≤0 .05, E – P ≤ 0.01, F – P ≤ 0.001 (t-test); d – P ≤ 0.05, e – P ≤ 0.01, f - P ≤0.001 (Wilcoxon).

[c] Post-partum day 59 to 63.

[d] Control values are group mean absolute values. Treated group values are the % change from control absolute means in the direction indicated. If present, statistical significance is show as D – P ≤0 .05, E – P ≤ 0.01, F – P ≤ 0.001 (t-test); d – P ≤ 0.05, e – P ≤ 0.01, f - P ≤0.001 (Wilcoxon).

[e] Incidence is presented.

[f] At the end of the recovery period, from post-partum day 143 to 147.

[g] At the end of the recovery period.

2.6.7.15 幼若動物を用いた毒性試験（続き）：Daily dosing from Days 21 to 63 post-partum: Group 7 to 10

Daily dose (mg/kg/day):	0 (Control – Group 7)		5 (Group 8)		15 (Group 9)		60 (Group 10)	
Number of animals:	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12
Toxicokinetics:								
Day 21 pp								
$AUC_{(0-24)}$ (hr·ng/mL)	BQL	BQL	373	276	1340	1140	10000	7960
C_{max} (ng/mL)	BQL	BQL	129	117	787	423	1150	2520
Day 63 pp								
$AUC_{(0-24)}$ (hr·ng/mL)	BQL	BQL	36.4	151	133	697	237	8630
C_{max} (ng/mL)	BQL	BQL	24.8	103	84.7	368	166	1320
Died or sacrificed moribund [a]	0	2	0	0	0	0	1	1
Body weight [b] (g) (Day 63 pp)	464.3	278.4	-6	-3	-6	-3	-17 C	-5
Food consumption [bc] (g/animal/day)	38.0	23.7	-9	-4	-9	-9	-2	-4
Preputial separation	-	NA	-	NA	-	NA	-	NA
Vaginal opening	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-
Reproductive and fertility assessments	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology								
White Blood Cell count (10^9/L)	8.710	5.734	-14	-23	-33 C	-11	-55 C	-43 B
Absolute Lymphocyte count (10^9/L)	7.242	4.981	-13	-28	-34 C	-12	-60 C	-49 B
Absolute Reticulocyte count (10^9/L)	232.60	150.50	-11	+4	-15 A	-15	-24 C	-19
Bone densitometry – *in vivo* [b]								
pQCT- proximal tibia								
Metaphysis								
Total area (mm^2)								
Week 6	17.858	15.069	-4	-5	-4	-6	-15 B	-14 B
Week 9	23.178	14.937	-7	-6	-10 A	-6	-24 C	-10
Total BMC (mg/mm)								
Week 6	5.958	5.435	-2	-7	-3	-5	-9	-7
Week 9	8.559	7.204	0	-2	-5	-1	-13	-2

2.6.7.15 幼若動物を用いた毒性試験（続き）：Daily dosing from Days 21 to 63 post-partum: Group 7 to 10

Daily dose (mg/kg/day):	0 (Control – Group 7)		5 (Group 8)		15 (Group 9)		60 (Group 10)	
Number of animals:	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12
Bone densitometry – *in vivo* [b]								
pQCT- proximal tibia								
Metaphysis								
Total BMD (mg/mm^3)								
Week 6	333.29	360.58	+2	-3	+1	+1	+7 A	+8 A
Week 9	369.31	482.93	+8 B	+3	+6	+5	+15 C	+9 A
Trabecular area (mm^2)								
Week 6	10.969	9.453	-6	-3	-5	-5	-19 C	-19 C
Week 9	13.981	8.420	-12 A	-8	-14 B	-11	-33 C	-19 B
Trabecular BMC (mg/mm)								
Week 6	2.226	2.312	-4	-7	-1	-5	-12	-14
Week 9	2.539	2.363	-5	-6	-7	-7	-23 A	-10
Trabecular BMD (mg/mm^3)								
Week 6	203.00	244.00	+2	-4	+5	0	+9	+6
Week 9	180.69	281.82	+9	+1	+8	+6	+16	+11
Cortical/subcortical area (mm^2)								
Week 6	6.886	5.615	-1	-8	-2	-7	-8	-5
Week 9	9.197	6.518	0	-3	-4	+2	-10	+2
Cortical/subcortical BMC (mg/mm)								
Week 6	3.731	3.123	-1	-7	-4	-5	-7	-1
Week 9	6.017	4.841	+2	0	-4	+2	-8	+2

2.6.7.15 幼若動物を用いた毒性試験（続き）：Daily dosing from Days 21 to 63 post-partum: Group 7 to 10

Daily dose (mg/kg/day):	0 (Control – Group 7)		5 (Group 8)		15 (Group 9)		60 (Group 10)	
Number of animals:	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12
Bone densitometry – *in vivo* [b]								
pQCT- proximal tibia								
Diaphysis								
Total area (mm^2)								
Week 9	6.668	5.360	-2	-2	-4	-1	-15 C	-8
Cortical Area (mm^2)								
Week 9	5.029	3.923	-4	0	-7	+2	-14 C	-6
Cortical BMC (mg/mm)								
Week 9	5.708	4.392	-4	0	-6	+3	-13 C	-6
Cortical Thickness (mm^2)								
Week 9	0.7356	-	-3	-	-6 A	-	-7 B	-
Periosteal circumference (mm)								
Week 9	9.1498	8.2008	-1	-1	-2	-1	-8 C	-4
Endosteal circumference (mm)								
Week 9	4.5278	-	+1	-	+2	-	-9 A	-
Radiology [d]								
Number evaluated	12	12	12	12	12	12	12	11
Tibia								
Radio-opaque lines, Left and/or Right mid diaphysis	0	0	0	0	2	2	0	3
Bone measurements [b] (mm)								
Lumbar spine	47.361	43.148	-2	-2	-3	-2	-8 C	-6 C
Right femur	34.127	31.868	-1	-3 A	-1	-1	-6 C	-6 C

2.6.7.15 幼若動物を用いた毒性試験（続き）：Daily dosing from Days 21 to 63 post-partum: Group 7 to 10

Daily dose (mg/kg/day):	0 (Control – Group 7)		5 (Group 8)		15 (Group 9)		60 (Group 10)	
Number of animals:	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12
Organ weights [b] (%)								
Adrenal glands								
Absolute mean (g)	0.06575	0.07513	-15 A	+7	-21 B	-6	-28 C	-15 B
Relative to body weight (%)	0.01448	0.02845	-2	+10	-14	-3	-11	-11
Relative to brain weight (%)	3.16440	3.79486	-16 A	+8	-20 B	-6	-26 C	-13 A
Spleen								
Absolute mean (g)	0.9878	0.6497	-21	-18 C	-36 c	-29 C	-55 c	-45 C
Relative to body weight (%)	0.2283	0.2438	-15 B	-13 A	-32 C	-24 C	-47 C	-42 C
Relative to brain weight (%)	47.4726	32.7165	-22	-17 C	-35 c	-29 C	-54 c	-44 C
Thymus								
Absolute mean (g)	0.7954	0.6603	-18	-5	-18	-19 A	-48 c	-38 C
Relative to body weight (%)	0.1791	0.2544	-9	-3	-10	-21 B	-37 C	-37 C
Relative to brain weight (%)	38.2770	33.1675	-20	-3	-17	-19 A	-47 c	-37 C
Histopathology [d]								
Adrenal gland								
Atrophy; cortical								
Minimal	0	0	0	0	2	0	5	0
Bone marrow								
Decreased cellularity; hematopoietic								
Minimal	0	0	0	0	0	0	7	7
Mild	0	0	0	0	0	0	0	4
Spleen								
Decreased cellularity; red pulp								
Minimal	0	0	0	0	0	0	6	9
Mild	0	0	0	0	0	0	1	0

2.6.7.15 幼若動物を用いた毒性試験（続き）：Daily dosing from Days 21 to 63 post-partum: Group 7 to 10

Daily dose (mg/kg/day):	0 (Control – Group 7)		5 (Group 8)		15 (Group 9)		60 (Group 10)	
Number of animals:	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12
Postdose evaluation (end of recovery)								
Number evaluated	12	12	12	12	12	12	11	11
Body weight [b] (g) (Day 147 pp)	769.3	403.9	-5	-8	-3	-5	-14	-16
Food consumption [be] (g/animal/day)	34.2	20.8	-8	-3	0	+2	-13	-4
Bone measurements[b] (mm)								
Lumbar spine	57.153	48.953	-1	-2	-1	-2	-5A	-5
Right femur	41.492	36.083	-1	-1	0	+1	-4a	-2
Bone densitometry – *in vivo* [b]								
Metaphysis								
Total area (mm^2)	23.306	12.098	-	-	-	-	-10	-7
Total BMC (mg/mm)	13.580	9.765	-	-	-	-	-13A	-10A
Trabecular area (mm^2)	11.021	3.376	-	-	-	-20	-9	-
Trabecular BMC (mg/mm)	2.202	1.054	-	-	-	-20	-14	-10
Cortical/subcortical area (mm^2)	12.285	8.723	-	-	-	-	-10	-9
Cortical/subcortical BMC (mg/mm)	11.378	8.712	-	-	-	-	-13B	-10
Diaphysis								
Total area (mm^2)	9.935	6.545	-	-	-	-	-7	-
Cortical area (mm^2)	8.088	5.367	-	-	-	-	-8B	-
Cortical BMC (mg/mm)	10.063	6.618	-	-	-	-	-9B	-
Cortical thickness (mg/mm)	1.0137	0.8336	-	-	-	-	-6A	-
Periosteal circumference (mm)	11.1671	9.0618	-	-	-	-	-	-

BQL = below the quantitation limit, pp = post-partum, - = no noteworthy findings.

[a] Cause of death/euthanasia unrelated to INC424.

[b] At the end of dosing period. Control values are group mean absolute values. Treated group values are the % change from control absolute means in the direction indicated. If present, statistical significance is show as A – $p \leq 0.05$, B – $p \leq 0.01$, C – $p \leq 0.001$ (Dunnett); a – $p \leq 0.05$, b – $p \leq 0.01$, c - $p \leq 0.001$ (Dunn).

[c] From post-partum day 59 to 63. [d] Incidence is presented. [e] from post-partum day 143 to 147.

2.6.7.15 幼若動物を用いた毒性試験（続き）：Daily dosing from Days 7 to 10 post-partum: Group 11 and 12

Daily dose (mg/kg/day):	0 (Control – Group 11)		30 (Group 12)	
Number of animals:	M: 8	F: 8	M: 8	F: 8
Noteworthy findings:				
Biochemical markers of bone turnover				
PINP (ng/mL)	190.030	166.036	-76A	-64A
Histopathology [a]				
Forelimb				
Degeneration/necrosis; physis/primary spongiosa				
Minimal	0	0	2	2
Hindlimb				
Degeneration/necrosis; physis/primary spongiosa				
Minimal	0	0	4	4

- = no noteworthy findings, pp = post-partum.
[a] Incidence is presented.
A –p ≤ 0.001(Wilcoxon).

2.6.7.16 局所刺激性試験

記載事項なし

2.6.7.17 その他の毒性試験

記載事項なし