目　次

目　次 2
表 一 覧 2
略号一覧 3
1 緒言 4
2 非臨床試験計画の概要 7
3 薬理試験 8
3.1 効力を裏付ける試験 8
4 薬物動態試験 8
5 毒性試験 8
5.1 単回投与毒性試験 8
5.2 反復投与毒性試験 9
5.3 遺伝毒性試験 9
5.4 がん原性試験 9
5.5 生殖発生毒性試験 9
5.6 幼若動物を用いた試験 9
5.6.1 ダブラフェニブ 10
5.6.2 トラメチニブ 13
5.6.3 曝露量の比較 16
6 不純物 17
7 安全性の総合評価 18
8 結論 20
9 参考文献 20

表 一 覧

Table 5-1 幼若ラットを用いた反復経口投与毒性試験 9
Table 5-2 幼若ラットの毒性試験と臨床用量における曝露量の比較：ダブラフェニブ 17
Table 5-3 幼若ラットの毒性試験と臨床用量における曝露量の比較：トラメチニブ 17

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）
ALK	anaplastic lymphoma kinase	—
ALT	alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST	aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
ATC	anaplastic thyroid cancer	甲状腺未分化癌
ATP	adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
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
BCR-ABL	breakpoint cluster region-Abelson	—
BRAF	B-Raf proto-oncogene serine/threonine kinase	—
BSA	body surface area	体表面積
Cmax	maximal drug plasma concentration	最高血漿中薬物濃度
ERK	extracellular signal-regulated kinase	—
FGFR	fibroblast growth factor receptor	線維芽細胞増殖因子受容体
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
HGG	high grade glioma	高グレード神経膠腫（WHO grade 3 又は 4 の神経膠腫）
IC50	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICH	international council for harmonization of technical requirements for pharmaceuticals for human use	医薬品規制調和国際会議
KIM-1	kidney injury molecule 1	腎障害分子 1
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	—
LGG	low grade glioma	低グレード神経膠腫（WHO grade 1 又は 2 の神経膠腫）
MAPK	mitogen-activated protein kinase	—
MEK	mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase	—
NAG	N-acetyl-β-D-glucosaminidase	N-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ
NGAL	neutrophil gelatinase-associated lipocalin	好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
NTRK	neurotrophic tyrosine receptor kinase	神経栄養因子チロシンキナーゼ受容体
PND	post-natal day	出生後
PTC	papillary thyroid cancer	甲状腺乳頭癌
ROS1	c-ros oncogene 1	—
RPA-1	renal papillary antigen 1	腎乳頭抗原 1
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
VEGF	vascular endothelial growth factor	血管内皮増殖因子

1 緒言

ダブラフェニブメシル酸塩（以下，ダブラフェニブ）は，BRAF の選択的阻害薬であり，アデノシン三リン酸（ATP）との競合阻害により，その作用を発揮する。本邦ではタフィンラー®の販売名で「BRAF 遺伝子変異を有する悪性黒色腫」及び「BRAF 遺伝子変異を有する切除不能な進行・再発の非小細胞肺癌」の効能・効果で承認を得ている。トラメチニブジメチルスルホキシド付加物（以下，トラメチニブ）は，MEK1/2（以下，MEK）の活性化及び同キナーゼ活性に対する選択的阻害薬である。本邦ではメキニスト®の販売名で「BRAF 遺伝子変異を有する悪性黒色腫」及び「BRAF 遺伝子変異を有する切除不能な進行・再発の非小細胞肺癌」の効能・効果でダブラフェニブとの併用において承認を得ている。今回，BRAF 遺伝子変異を有する固形腫瘍患者においてダブラフェニブ及びトラメチニブの併用による有効性及び安全性が確認されたことから，その治療薬としての効能・効果追加の製造販売承認事項一部変更承認申請を行う。

BRAF V600E がドライバー遺伝子であることの根拠

近年，がんゲノム医療において，特定の遺伝子変異に対してそれに対応するさまざまな分子標的治療薬が臨床使用されている。これらの特定の遺伝子変異の多くはドライバー遺伝子変異であり，対応する分子標的薬の高い治療効果が予測できるようになってきている。ドライバー遺伝子変異であることを示す要素として，形質転換能があること，発がん性が認められること，他のドライバー遺伝子と相互排他性があること，分子標的薬により臨床効果が示されること等が挙げられる。これまでに BCR-ABL 遺伝子変異，ALK 遺伝子変異，ROS1 遺伝子変異，NTRK 遺伝子変異等が臓器横断的なドライバーとして働くことが報告されている（Soda et al. 2007，Takeuchi et al. 2012，Cocco et al. 2018）。同様に，下記の知見を考慮すると，BRAF V600E 遺伝子変異は原発臓器を問わず BRAF V600E 遺伝子変異を有する固形がんにおけるドライバーとして働くと考える。

形質転換能：

- BRAF V600E 変異を有する遺伝子をマウス 3T3 線維芽細胞に遺伝子導入すると，BRAF 野生型遺伝子を導入した場合と比較して，形質転換する細胞が 130 倍増加した（Davies et al. 2002）。
- BRAF V600E 変異によって濾胞細胞の形質転換が誘導された（Caronia et al. 2011，Kojic et al. 2011）。
- 甲状腺癌では，甲状腺乳頭癌（PTC）と PTC 由来甲状腺未分化癌（ATC）の両方で BRAF V600E 遺伝子変異が確認されており，BRAF V600E 遺伝子変異は疾患発症のみならず PTC から ATC への進行に関与していることが推察された（Xing 2007）。
- BRAF 遺伝子変異を有する小児の低グレード神経膠腫（LGG）患者では，野生型 BRAF 遺伝子を有する患者よりも高グレード神経膠腫（HGG）へ悪性転化する患者が多く，LGG から

HGG への悪性転化の過程で BRAF 遺伝子変異が関与していることが推察された（Mistry et al. 2015）。

発がん性：

- 甲状腺組織特異的に BRAF V600E 変異を遺伝子導入したトランスジェニックマウスにおいて甲状腺の過形成及び PTC が誘導された（Knauf et al. 2005，Charles et al. 2011）。
- 肺胞上皮細胞で BRAF V600E 遺伝子をドキシサイクリン投与により強制発現させたトランスジェニックマウスにおいて 16 週後までに腺癌が発生した（Ji et al. 2007）。
- メラニン形成細胞で BRAF V600E を強制発現させたトランスジェニックマウスにおいてメラニン形成細胞の不死化が誘導され，悪性黒色腫が発生した（Dhomen et al. 2009）。

他のドライバー遺伝子との相互排他性：

- BRAF 遺伝子変異は，他のドライバー遺伝子と相互排他的な関係にあり，がんの発生又は進行に関与していることが，悪性黒色腫（Sensi et al. 2006），肺癌（Dearden et al. 2013），甲状腺癌（Xing 2005），胆道癌（Li et al. 2020），膵癌（Guan et al. 2018），大腸癌（Sahin et al. 2013，Smith et al. 2013），及び神経膠腫（Behling et al. 2019）といったそれぞれのがん種で臓器横断的に報告されている。

分子標的薬による臨床効果：

- これまでに臨床試験において BRAF V600E 遺伝子変異を有する悪性黒色腫，非小細胞肺癌，及び種々の希少癌において，複数の BRAF 阻害剤が単剤又は MEK 阻害剤との併用により顕著な有効性が示されている。代表的なバスケット試験としてダブラフェニブとトラメチニブ併用の ROAR 試験及び NCI-MATCH 試験（Arm H），ベムラフェニブ単剤の VE-BASKET 試験（Subbiah et al. 2019）等がある。

さらに，The Cancer Genome Atlas（TCGA）に登録されている 33 のがん種を含む約 10,000 の腫瘍サンプルを用いて，ドライバー遺伝子と変異の網羅的同定と解析が実施された結果，BRAF V600E 遺伝子変異は原発臓器を問わず固形がんにおけるドライバーとして働くことが確認されている（Bailey et al. 2018）。Bailey らが用いた 33 のがん種には，ROAR 試験で対象とされた甲状腺癌，胆道癌，神経膠腫等が含まれている。シークエンス解析による変異のクラスタリングと安定性を確認する試験，発現タンパクの構造解析，病原性及びタンパク質間相互作用を解析する *in silico* 試験，並びに培養細胞を用いたドライバー機能確認試験の結果から，それぞれのがん腫において BRAF V600E 変異がドライバー変異であると評価された。また，BRAF 変異が他のドライバー遺伝子変異と排他的であることも示された。

なお，適応から除外するがん種である大腸癌においても，コンディショナルノックインマウスを用いた BRAF V600E 変異遺伝子発現モデルにおいて粘膜過形成の誘導が認められており（Rad

2013），また BRAF V600E 遺伝子変異を認める大腸癌ではほとんどすべて KRAS 変異を認めず相互排他の関係にあると報告されている（Sahin et al. 2013，Smith et al. 2013）。このことから，BRAF V600E 遺伝子変異は他のがん種と同様に大腸癌においてもドライバー変異であると考えられ，がんの発生又は進行に対する BRAF V600E の役割については，がん種ごとに大きな違いがないことが推察される。

ダブラフェニブ及びトラメチニブの併用投与を支持する非臨床試験成績

BRAF と MEK は同一経路にあり，MEK は活性化された BRAF の基質であることから，両タンパク質をそれぞれ単独で阻害するよりも同時に阻害する方が，より優れた有効性が期待できる。これまでに複数のがん種においてダブラフェニブ及びトラメチニブの併用による MAPK 経路の BRAF 及び MEK の同時阻害により，強力かつ持続的な腫瘍増殖抑制効果が認められており，併用療法の妥当性が支持されている。さらに，下流の MEK1/2 を同時阻害することで，有効性だけでなく良好な安全性プロファイルを得ることにもつながると考えられる。本プロファイルを有するダブラフェニブ及びトラメチニブの併用療法は，これまでに悪性黒色腫，非小細胞肺癌及び ATC（本邦では未承認）における承認を取得しており，他の腫瘍に対する非臨床及び臨床データも蓄積されつつある。

ダブラフェニブ及びトラメチニブの併用投与を支持する非臨床試験成績について以下に記載する。

悪性黒色腫

In vitro 試験において，BRAF V600E 遺伝子変異を有するヒト悪性黒色腫由来 A375 細胞株に対し，ダブラフェニブとトラメチニブの併用は各々を単独で用いた場合に比較してより強い増殖抑制作用を示した。また，ダブラフェニブに対する耐性を獲得した A375 細胞株をダブラフェニブ及びトラメチニブの併用下で培養すると，検討したすべての耐性細胞において併用効果が認められた。*In vivo* 試験では，BRAF V600E 遺伝子変異を有する悪性黒色腫由来 A375 細胞株を用いたマウス異種移植モデルにおいて，ダブラフェニブ及びトラメチニブの各単独又は併用時の抗腫瘍効果を評価した。その結果，ダブラフェニブとトラメチニブの併用投与により，ダブラフェニブ及びトラメチニブの各単独投与時と比較して持続的かつ強力な腫瘍増殖抑制作用がみられ，生存期間の延長が認められた（1.13-1 既承認医薬品に係る資料）。

非小細胞肺癌

In vitro 試験において，BRAF V600E 遺伝子変異を有するヒト非小細胞肺癌由来 MV522 細胞株に対し，ダブラフェニブとトラメチニブの併用は各々を単独で用いた場合に比較してより強い増殖抑制作用を示し，その効果は相加的又は相乗的であった。また，ダブラフェニブ及びトラメチニブの併用において，MAPK 経路の MEK 及び ERK，その下流に位置する S6 のリン酸化を濃度

依存的に抑制し，ダブラフェニブ単独よりも顕著な細胞周期抑制因子 p27 の発現亢進及び細胞周期促進因子サイクリン D1 の発現低下を認めた（1.13-1 既承認医薬品に係る資料）。

神経膠腫

In vitro 試験において，BRAF V600E 遺伝子変異を有する神経膠腫由来 2341^{luc} 細胞株に対し，ダブラフェニブとトラメチニブの IC50 濃度での単独投与及び併用投与による増殖抑制作用及びアポトーシス促進活性を検討した結果，ダブラフェニブとトラメチニブの併用は各々を単独で用いた場合と比較して優れた効果を示した（Grossauer et al. 2016）。*In vivo* 試験では，ダブラフェニブとトラメチニブの併用時の抗腫瘍効果を評価した。その結果，ダブラフェニブとトラメチニブの併用投与により，ダブラフェニブ及びトラメチニブの単独投与時と比較して持続的かつ強力な腫瘍増殖抑制作用がみられ，生存期間の延長が認められた。また，併用投与により p-ERK レベル及び p-ERK 陽性細胞数の低下，細胞増殖マーカーである Ki67 陽性細胞の減少，及びアポトーシスのマーカーである切断型カスパーゼ 3 活性の増加がみられた（Grossauer et al. 2016）。

甲状腺癌

In vitro 試験において，BRAF 阻害剤であるベムラフェニブと選択的 MEK1/2 阻害剤であるセルメチニブを併用投与した結果，甲状腺癌由来の BCPAP 及び 8505C 細胞株のいずれにおいても，各薬剤を単独投与した場合と比較して細胞生存率が有意に低下し，アポトーシスが増加した。*In vivo* 試験では，甲状腺癌由来細胞株を用いたマウス異種移植モデルにおいて，ベムラフェニブとセルメチニブを併用投与したときの抗腫瘍効果を評価した。その結果，ベムラフェニブとセルメチニブの併用投与により，有意かつ相乗的な抗腫瘍効果が認められた（Song 2018）。また，甲状腺癌由来細胞株を用いた担癌マウスにおいて，BRAF 阻害剤 PLX4720 と MEK 阻害剤 PD0325901 を併用投与した結果，PLX4720 単独投与と比較して腫瘍退縮の増強及び生存期間の延長が認められた（McFadden et al. 2014）。

2 非臨床試験計画の概要

ダブラフェニブ及びトラメチニブに関する薬理試験，薬物動態試験，及び毒性試験の成績は，悪性黒色腫及び非小細胞肺癌承認申請時に既提出である（1.13-1 既承認医薬品に係る資料）。今回の効能・効果追加の一部変更承認申請に際しては，新たに得られた薬理試験として BRAF V600E 遺伝子変異陽性ヒト未分化甲状腺癌細胞に対する作用，及び毒性試験として幼若動物を用いた試験の結果を記載する。

幼若動物を用いた試験では，ダブラフェニブ及びトラメチニブを小児に投与する際の安全性を担保する目的で，忍容性及び用量設定試験，並びに 4 週間又は 6 週間の反復経口投与毒性試験（本試験）を実施した。また，ダブラフェニブの本試験で認められた毒性（性成熟への影響及び腎毒性）を精査するため，探索的試験を実施した。主な試験は，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」，ICH S9「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン」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。動物種は，幼若動物を用いた毒性試験で一般的に用いられ，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。投与経路は，予定臨床投与経路である経口投与とした。ダブラフェニブの市販製剤はダブラフェニブメシル酸塩であるが，幼若動物を用いた試験では，先に実施した生殖発生毒性試験と同剤形（GSK2118436A，遊離塩基型）を用いて評価した。トラメチニブの幼若動物試験では，市販製剤（トラメチニブジメチルスルホキシド付加物）を使用した。本概括評価では，いずれもダブラフェニブ及びトラメチニブと表記した。投与量及び濃度はすべて遊離塩基換算量で示した（トラメチニブ換算係数：1.127）。本申請に際し，新たに安全性確認を必要とする不純物はない。

3 薬理試験

本申請資料では BRAF V600E 遺伝子変異陽性ヒト未分化甲状腺癌細胞に対するダブラフェニブ及びトラメチニブの薬理試験結果の概説を記載する。

3.1 効力を裏付ける試験

ダブラフェニブ及びトラメチニブは，いずれも単独でヒト未分化甲状腺癌細胞株である 8505C 及び 8305C に対して増殖抑制作用を示した。ダブラフェニブ及びトラメチニブの併用時には，より強い増殖抑制作用が認められた。ヒト未分化甲状腺癌細胞株 B-CPAP に対しては，ダブラフェニブにより増殖抑制作用がみられた一方で，トラメチニブによる増殖抑制作用は認められず，ダブラフェニブ及びトラメチニブの併用による増殖抑制作用の増大はみられなかった。

ダブラフェニブ及びトラメチニブは，いずれも単独で 8505C 及び 8305C に対して，MAPK 経路の ERK のリン酸化を抑制した。ダブラフェニブ及びトラメチニブの併用時には，より持続的なリン酸化抑制作用が認められた。特に 8305C に対しては，併用によりアポトーシス誘導の指標である完全長 PARP の減少がみられた。また，ダブラフェニブ及びトラメチニブの併用により，B-CPAP に対して各々を単独で用いた場合と比較して ERK のリン酸化を抑制したが，完全長 PARP 発現における併用効果はみられなかった[Table 2.6.3.1-RD-2017-00062]。

4 薬物動態試験

該当資料なし。

5 毒性試験

5.1 単回投与毒性試験

該当資料なし。

5.2 反復投与毒性試験

該当資料なし。

5.3 遺伝毒性試験

該当資料なし。

5.4 がん原性試験

該当資料なし。

5.5 生殖発生毒性試験

該当資料なし。

5.6 幼若動物を用いた試験

ダブラフェニブ及びトラメチニブを小児に投与する際の安全性を担保する目的で，幼若ラットを用いた忍容性及び用量設定試験（GLP 非適用），並びに 4 週間又は 6 週間反復経口投与毒性試験（本試験，GLP 適用）を実施した。また，ダブラフェニブの本試験で認められた毒性（性成熟への影響及び腎毒性）を精査するため，探索的試験を実施した（Table 5-1）。

Table 5-1 幼若ラットを用いた反復経口投与毒性試験

試験の種類		投与期間	用量（mg/kg/日）	動物数／群	試験番号
ダブラフェニブ					
忍容性及び用量設定	忍容性	2 週間 PND 7～21	1, 100, 1000	雄 12 雌 12	2011N121500
	用量設定	4 週間 PND 7～35	0, 10, 50, 10/100[a], 50/300[a]	雄 10 雌 10	
	用量設定	2 週間 PND 22～35	0, 100, 300	雄 10 雌 10	
本試験		4 週間 + 6 週間休薬 PND 7～35	0, 1/3[a], 10/20[a], 0/20[a], 0/200[a]	雄 30 雌 30	2012N148838
探索的試験	性成熟への影響	4 週間 PND 7～35	0, 10/20[a]	雌 36	2014N204291
	腎毒性	1 週間又は 4 週間 PND 7～13, 14～21, 22～27, 28～35, 7～35	0, 10/20[b]	雄 10	2013N164523
トラメチニブ					
忍容性及び用量設定	忍容性	2 週間 PND 7～21	0.04/0.02[c], 0.13/0.06[c], 0.43/0.21[c], 1.3/0.64[c], 4.3/2.1[c]	雄 18 雌 18	2012N146940
	用量設定	4 週間 PND 7～35	0, 0.01, 0.02, 0.05	雄 10 雌 10	
	用量設定	4 週間 PND 7～35	0, 0.05/0.08[a], 0.05/0.17[a], 0/0.08[a], 0/0.17[a]	雄 10 雌 10	

試験の種類	投与期間	用量（mg/kg/日）	動物数／群	試験番号
本試験	6 週間 + 6 週間休薬 PND 7～45	0, 0.0125/0.08[d], 0.025/0.17[d], 0.05/0.35[d]	雄 20 雌 30	2013N165537

Sources: Table 2.6.7.15.1 A-2011N121500, Table 2.6.7.15.2 A-2012N148838, Table 2.6.7.15.1 A-2014N204291, Table 2.6.7.15.1 A-2013N164523, Table 2.6.7.15.1 B-2012N146940, Table 2.6.7.15.2 B-2013N165537

PND: post-natal day

a = 生後 7～21 日の投与量／生後 22～35 日の投与量。

b = 生後 7～21 日の投与量／生後 22～35 日の投与量。同程度の曝露量を維持するため，幼若ラットの週齢に応じて用量を漸増した。群間で投与期間の週齢が異なるため，1 用量のみを投与した群も存在する。群間で同程度の曝露量を維持することを目的としていることから，ダブラフェニブ投与群はいずれも 10/20 mg/kg/日とのみ表記した。

c = 投与直前に測定した体重から体表面積（BSA）を算出した。BSA（m^2）=10.5 ×（g 単位の体重）$^{2/3}$/10^4（Harkness and Wagner. 1977）。mg/m^2 で投与したが，用量を mg/kg/日で表記した。mg/m^2 から mg/kg への換算は近似値であり，換算係数 4.6 を用いた（Freireich et al. 1966）。

d = 生後 7～21 日の投与量/生後 22～45 日の投与量。

5.6.1 ダブラフェニブ

ダブラフェニブの小児における安全性を検討するため，幼若ラットを用いた経口投与毒性試験［忍容性及び用量設定試験（GLP 非適用），4 週間反復経口投与毒性試験及び 6 週間回復性試験（本試験，GLP 適用），並びに探索的試験（GLP 非適用）］を実施した。

忍容性及び用量設定試験は，幼若ラットにダブラフェニブを反復経口投与したときの忍容性を確認し，幼若ラットを用いた反復経口投与毒性試験（本試験，GLP 適用）の用量設定の根拠となる情報を得ることを目的として GLP 非適用で実施した[2.6.6-7.1.1 項]。その結果，1000 mg/kg/日群（生後 7 日投与開始）では死亡が認められたため，生後 14 日までに投与を中止した。100 mg/kg/日群（生後 7～21 日投与）では体重増加量の減少及び一般状態の変化が認められた。50 mg/kg/日群（生後 7～35 日投与）及び 50/300 mg/kg/日群（生後 7～21 日の投与量／生後 22～35 日の投与量）では死亡，体重増加量の減少及び一般状態の変化が認められた。10 mg/kg/日群（生後 7～35 日投与）及び 10/100 mg/kg/日群（生後 7～21 日の投与量／生後 22～35 日の投与量）では，主に投与開始後 2 週間に体重増加量の減少及び一般状態の変化が認められた。1 mg/kg/日群（生後 7～21 日投与）での忍容性は概ね良好であった。生後 22～35 日の投与では，100 mg/kg/日以上の群で用量依存的な体重増加量の減少が認められた。

以上より，生後 7 日から 50 mg/kg/日以上の用量を投与したとき，死亡，体重減少，及び一般状態の悪化（脱水，削痩，冷感，努力性呼吸，及び自発運動低下）がみられ，忍容性は認められなかった。一方，生後 22 日から投与を開始した場合，100 及び 300 mg/kg/日群でも忍容性が認められ，体重増加量の減少が認められたのみであった。生後 21 日齢より前の日齢では 50 mg/kg/日以上の用量で忍容性が認められなかったことから，幼若ラットを用いた 4 週間反復経口投与毒性試験及び 6 週間回復性試験での生後 7～35 日齢における高用量として 10/20 mg/kg/日（生後 7～21 日の投与量／生後 22～35 日の投与量）を選択した。用量設定試験で曝露量の減少が認められたため，投与期間を通して一定の曝露量を確保する目的で，生後 22～35 日の投与量を 20 mg/kg/

日に漸増した。曝露量の減少は，幼若動物の成長によって胆汁排泄経路が成熟し，本薬がより効率的に排泄されたためと考えられる（Gao et al. 2004）。なお，成熟ラットでは主要な排泄経路は糞中排泄であるため，同様の曝露量減少は認められていない（Bershas et al. 2013）。用量反応性を評価するため，低用量は 1/3 mg/kg/日を選択した。また，生後 22～35 日齢における高用量として 200 mg/kg/日を選択した。これは，用量設定試験（生後 22～35 日投与）で 300 mg/kg/日までの用量で体重増加量の減少が認められたこと，及び同用量で成熟ラットを用いた過去の試験成績が得られていることから選択した。生後 22～35 日齢範囲内での用量反応性を評価するため，低用量として 20 mg/kg/日を選択した。

幼若ラットを用いた 4 週間反復経口投与毒性試験及び 6 週間回復性試験（GLP 適用）では，ダブラフェニブの主な毒性として，成長（体重，摂餌量，骨長），性成熟（膣開口），腎臓，精巣，胃，及び胸腺への影響が認められた[2.6.6-7.1.2 項]。腎臓への影響により，本試験における無毒性量（NOAEL）は求められなかった。本試験の各用量における曝露量と臨床用量における曝露量（150 mg を 1 日 2 回投与）との比較を 5.6.3 項に示す。成熟動物を用いた毒性試験で認められなかった幼若ラットでの毒性は，成長抑制，膣開口の早期化，及び腎臓への影響であった。以下に認められた主な毒性について考察を示す。

成長抑制（体重増加量の減少，骨長の短縮）

投与期間中，すべての用量で体重増加量及び摂餌量の減少が認められ，10/20 mg/kg/日群の雌雄及び 0/200 mg/kg/日群の雄では骨長（脛骨／大腿骨）の短縮が認められた。10/20 mg/kg/日群の雄では，6 週間の休薬期間終了後も骨への影響が認められ，完全な回復性は認められなかった。本薬投与により体重増加抑制と相関して骨長の短縮が観察されたことから，幼若動物での成長への影響が示唆された。体重及び摂餌量に対する影響は成熟動物でも認められており，B-raf 変異マウス及び B-raf 欠損キメラマウスでは，胎児体重の減少又は出生後の発育遅延が報告されている（Galabova-Kovacs et al. 2006）。

性成熟（膣開口）

性成熟の指標として膣開口を評価したところ，10/20，0/20，及び 0/200 mg/kg/日群の雌で，膣開口の早期化が認められた。雄で亀頭包皮分離への影響は認められなかった。本変化について検討するため幼若雌ラットを用いた探索的試験を実施したところ[2.6.6-7.1.3 項]，投薬群では膣開口が対照群と比較して約 4 日早く認められ，外陰部皮膚の肥厚と一致して膣遠位部の上皮過形成及び角化の限局的な亢進が認められた。本変化に関連した性周期の早期発現は認められなかった。したがって，膣開口の早期化は，ダブラフェニブの薬理作用に関連した上皮組織への既知の影響（角化亢進）によるものであり，局所組織での発現によって膣開口が早まったものと考えられた。探索的試験で性周期への影響は認められなかったことから，ダブラフェニブが性成熟に及ぼす影響はないと考えられた。ダブラフェニブは性成熟に影響を及ぼさないこと，及びヒトでは膣開口

は出生前に完了することから，本変化はヒトにおいて重要な安全性リスクにならないと考えられた。

腎臓への影響

すべての投薬群で腎臓の病理組織学的変化（嚢胞形成，好塩基性尿細管，二次的な尿細管拡張を伴う尿細管沈着物，間質性線維症／炎症，及び限局性腎盂移行上皮過形成）が認められ，血液生化学的検査では可逆的な尿素及びクレアチニンの増加が認められた。腎毒性は，ダブラフェニブを単剤投与又はトラメチニブと併用投与した成熟動物では認められていない。発現頻度及び重症度は，離乳前から投与を開始した 10/20 mg/kg/日群で高かったことから，用量及び投与期間依存的な作用が示された。一部の腎臓所見では回復性が認められたが，すべての投薬群で 6 週間の休薬期間後も尿細管沈着物が認められ，10/20 mg/kg/日群では尿細管好塩基性化／拡張及び腎盂拡張も認められた。本試験でみられた腎臓の変化は，尿細管内沈着物による二次的な閉塞性障害を示唆するものと考えられた。

腎毒性に対して感受性のある年齢範囲を特定するとともに，腎尿細管沈着物の特性を明らかにする目的で，探索的毒性試験を実施した[2.6.6-7.1.4 項]。尿中腎乳頭抗原 1（RPA-1），クラスタリン，好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン（NGAL），腎障害分子 1（KIM-1），N-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ（NAG），アルブミン，総タンパク，及び血清尿素の増加が主に生後 7 日（離乳前）から投与を開始した群で認められ，生後 22 日（離乳後）から投与を開始した群では顕著な影響はみられなかった。また，腎尿細管沈着物は，主にカルシウム，リン酸，カリウム，及び脂質等からなる混合物であることが確認され，ダブラフェニブ及びその代謝物は含まれていなかったことから，尿細管での沈着物形成機序とダブラフェニブ及びその代謝物との間の直接的な関連性は不明であった。腎ホモジネートの定量分析では，生後 7～13 日に投与された動物でダブラフェニブ及びその代謝物の濃度が最も高く，これは本試験（GLP 適用試験）で組織採取時（生後 14 日）に測定した全身曝露量と概ね一致していた。生後 22 日以降での評価群では，いずれの曝露量も著しく減少しており，多くが定量限界未満であった。化学物質投与が腎臓の発達に与える影響は，発達初期で大きく，発達後期で小さいことが報告されている（Cappon and Hurtt 2010）。したがって，本変化は若齢動物おいてより重篤となる可能性が考えられた。以上より，ラット及びヒトでの腎機能の発達及び成熟過程を比較した場合，1 歳未満のヒト乳児では尿細管傷害が生じるリスクが高いと考えられた。

精巣，胃，及び胸腺への影響

休薬期間終了時に，10/20 及び 0/200 mg/kg/日群で精上皮の変性／萎縮及び精細管拡張が主に片側性に認められ，精巣上体の精子減少を伴っていた。一部の動物で認められた変化は体液貯留による圧迫に続発したものと考えられた。精巣上体で認められた精子減少は精巣の変性／萎縮による二次的変化と考えられた。

胃では 10/20，0/20，及び 0/200 mg/kg/日群で非腺胃部粘膜の可逆的な過形成／過角化，胸腺ではすべての投薬群でリンパ球のアポトーシス及び胸腺重量の減少が認められたが，いずれも回復性が認められた。

上記の変化はいずれも成熟動物でも認められており，ダブラフェニブの薬理作用に関連した変化と考えられた。

5.6.2 トラメチニブ

トラメチニブの小児における安全性を検討するため，幼若ラットを用いた経口投与毒性試験［忍容性及び用量設定試験（GLP 非適用）及び 6 週間反復経口投与毒性試験及び 6 週間回復性試験（本試験，GLP 適用）］を実施した。

忍容性及び用量設定試験は，忍容性の確認（試験 1）及び幼若ラットを用いた毒性試験（本試験，GLP 適用）の用量設定の根拠となる情報を得ること（試験 2 及び試験 3）を目的として，GLP 非適用で実施した[2.6.6-7.2.1 項]。結果について，以下に要約を示す。

- 試験 1（忍容性試験）：0.13/0.06 mg/kg/日以上の群で本薬投与に関連した死亡，一般状態の悪化，体重増加抑制，及び体重減少が認められた。
- 試験 2（初回用量設定）：0.05 mg/kg/日群で一般状態の悪化及び体重増加抑制が認められた。生後 13 日から 21 日にかけて曝露量が減少したため，試験 3 では用量漸増を実施した。
- 試験 3（用量設定）：0.05 mg/kg/日以上の群で死亡，体重増加量の減少が認められた。

以上より，本試験（GLP 適用）では，生後 7～21 日の高用量群として体重増加量の減少が予想され忍容性が認められなかった 0.05 mg/kg/日を選択した。用量設定試験で曝露量の減少が認められたことから，投与期間を通して一貫した曝露量を維持するため，生後 22～45 日の投与量は用量を漸増し，0.35 mg/kg/日とした。用量反応性を評価するため，中用量群に 0.025/0.17 mg/kg/日及び低用量群に 0.0125/0.08 mg/kg/日を選択した。

幼若ラットを用いた 6 週間反復経口投与毒性試験及び 6 週間回復性試験では，トラメチニブの主な毒性変化として，成長抑制（体重減少及び大腿骨長の短縮），性成熟，及びリンの恒常性への影響（リン高値），並びに心臓重量の増加が認められた。また，認められた主な病理組織学的変化は，骨の変化（一次海綿骨の壊死及び骨吸収促進，骨端肥厚及び変性），複数臓器（主に胃，眼，腎臓，肝臓，副腎，胸腺，顎下リンパ節，大動脈，鼻腔／副鼻腔，空腸，気管，膀胱）の鉱質沈着又は変性，雌性生殖器の変化（性成熟及び乳腺発達の遅延，黄体数減少，及び卵巣重量減少），皮膚の炎症であった。休薬期間終了時には，骨の病理組織学的変化及び複数組織の鉱質沈着を除き，大部分の変化は回復した。本試験では，すべての投薬群で骨の病理組織学変化及び胃の鉱質沈着が認められたことから，NOAEL は求められなかった。本試験の各用量における曝露量と臨床用量（2 mg を 1 日 1 回投与）における曝露量との比較を 5.6.3 項に示す。複数組織（角膜を除く）の鉱質沈着，並びに骨，皮膚，及び雌性生殖器の所見は，成熟ラットでも認められて

いるトラメチニブの薬理作用に起因した変化である。以下に認められた主な変化の毒性学的意義を示した。

成長抑制（体重減少及び大腿骨長の短縮）

成長抑制の変化として，すべての投薬群の雄で大腿骨長の短縮，0.025/0.17 mg/kg/日以上群の雄で摂餌量の減少，体重減少，及び体重増加量の減少が認められた。0.025/0.17 mg/kg/日以上の群の雌で体重増加量の減少，0.05/0.35 mg/kg/日群の雌で体重減少及び大腿骨長の短縮が認められた。体重増加量の減少は離乳後及び投与終了時（生後 45 日）で最も顕著であった。大腿骨長の短縮は休薬期間後も認められ，回復性は示されなかった。病理組織学的検査では，すべての投薬群で骨の変化（大腿骨，脛骨，又は胸骨における一次海綿骨の壊死及び骨吸収促進，骨端肥厚及び変性，軟骨細胞の残存，並びに骨端部及び関節の拡大）が認められた。

骨への影響は，MEK1/2 シグナル伝達系の上流に位置する線維芽細胞増殖因子受容体（FGFR）チロシンキナーゼ阻害薬を投与したラット（Brown et al. 2005），並びに FGFR-3 欠損マウスにおいても同様に観察されている（Deng et al. 1996）。本薬投与に関連した骨の変化は薬理作用（MEK 阻害）に関連した変化と考えられ，成熟ラットを用いた毒性試験でも認められている。

リンの恒常性への影響，複数器官における鉱質沈着又は変性

0.0125/0.08 mg/kg/日以上の群で複数臓器に鉱質沈着又は変性が認められ（主に胃，眼，腎臓，肝臓，副腎，胸腺，顎下リンパ節，大動脈，鼻腔／副鼻腔，空腸，気管，膀胱），血清リンの用量依存的な増加を伴っていた。

これらの病理組織学的変化及び血清リンの増加は，成熟ラットにおいても同様に観察されている。また，MEK 阻害薬及び MEK1/2 シグナル伝達系の上流に位置する FGFR チロシンキナーゼ阻害薬を投与したラットでも，血清リン高値及び複数器官での鉱質沈着（血管，心筋，大動脈，胃，及び腎臓）が観察されていることから（Brown et al. 2005），当該変化は薬理作用に関連したものと考えられた。

角膜の鉱質沈着／ジストロフィー

眼科学的検査では，0.025/0.17 mg/kg/日以上の群で角膜ジストロフィーの発現頻度の増加が認められ，病理組織学的検査でみられた角膜の鉱質沈着と関連していた。0.05/0.35 mg/kg/日群では，眼で角膜の炎症及び前眼領域の滲出液（雌のみ）が認められた。これらの変化は成熟ラットでは認められていない。

マウスにおける角膜の鉱質沈着は，血清リンの増加との関連性が知られている（Mittl et al. 1970）。また，SD ラットでは，カルシウム染色陽性かつ点状混濁を伴う石灰化性角膜症が自然発生性に高頻度に認められることが知られている。ラットの正常な角膜では高濃度のカルシウムが存在するため，わずかな濃度の変化であってもカルシウムが沈着する（Bellhorn et al. 1988）。また，幼若の SD ラット（3～6 週齢）では，角膜結晶は高頻度（雄 75%，雌 57%）に認められる

ことが報告されていることから（Kuno et al. 1991），幼若ラットの角膜は鉱質沈着に対して感受性が高いと考えられた。

雄性生殖器の変化

0.05/0.35 mg/kg/日群の雄で性成熟の指標（亀頭包皮分離）の遅延がみられたが，体重増加量の減少による二次的変化と考えられた（Beck et al. 2006）。

雌性生殖器の変化

0.05/0.35 mg/kg/日群の雌で，性成熟の遅延（膣開口），黄体数の減少，子宮粘膜上皮の肥厚，及び 0.025/0.17 mg/kg/日以上の群の雌で乳腺発達の遅延が認められた。器官重量では，すべての投薬群の雌で卵巣重量の減少が認められた。いずれの変化も休薬期間後に回復性が示され，雌の性周期への影響は認められなかった（休薬期間中のみ評価）。これら雌性生殖器の変化は，本薬を投与した雌の成熟ラットでも同様に観察されている。

高用量群の雌の体重は対照群と比べて増加したことから，雄とは異なり，雌の性成熟の遅延は，体重増加量の減少によるものではなく，本薬の薬理作用に関連した変化と考えられた。子宮粘膜上皮の軽微な肥厚は，性周期にみられる自然発生する変化であり，卵巣重量の減少及び黄体数の減少を考慮すると，これらの所見は性周期に対するトラメチニブの一過性の影響と考えられた。0.025/0.17 mg/kg/日以上の雌で，投与期間終了時（生後 45 日）に顕著な乳腺終末部の発現頻度の増加が認められ，乳腺発達の遅延が示唆された。通常，出生後に発生した乳腺終末部は，生後 21 日にピークに達し，その後，生後 63 日までに急速に減少する（Russo and Russo 1978，Fenton et al. 2002）。乳腺発達の遅延は，本薬投与に関連した雌の性成熟の遅延に起因した変化と考えられた。性周期は休薬期間の約 20 日以降に評価されており，黄体数の減少及び子宮粘膜上皮の肥厚は回復性が示されたため，評価期間中の性周期には影響が示されなかった可能性がある。

卵胞は，卵子，顆粒膜細胞，及び莢膜細胞から構成されており，相互コミュニケーションにより，卵胞の発育・発達は制御されている。MEK-ERK シグナル伝達経路の阻害は，顆粒膜細胞の生存性低下／アポトーシス誘導，並びに卵胞刺激ホルモンの放出を抑制するフォリスタチン及び排卵を促す遺伝子の転写活性を低下させる可能性が示唆されている（Shiota et al. 2003，Kihara et al. 2006，Sriraman et al. 2008）。さらに，MEK シグナル伝達系の上流に位置する血管内皮増殖因子（VEGF）は，卵胞形成，黄体形成，及び黄体機能に重要な役割を果たす（Ferrara et al. 1998）。これらのことから，トラメチニブの雌性生殖器（主に卵巣）への影響は標的分子である MEK の阻害に関連しているものと考えられた。

皮膚への影響

0.025/0.17 mg/kg/日以上の群では，皮膚の表皮肥厚，潰瘍形成，びらん，及び炎症が認められ，いずれも軽微から中等度であり，休薬期間後に回復性が示された。これらの病理組織学的変化は，

一般状態観察での痂皮と関連しており，成熟ラットでも認められている。本薬投与の皮膚の変化は，薬理作用である MEK の阻害に関連した変化と考えられた。

心臓重量の増加

0.05/0.35 mg/kg/日群では，投与期間及び休薬期間終了時ともに心臓重量の増加が認められた。当該変化は成熟ラットでは認められていない。一般に，ラットの出生後の心臓の発生は，生後 4 日頃に心筋細胞の過形成から肥大に変化する（Li et al. 1996）。本試験では生後 7 日から投与を開始したことから，心臓重量の増加は，心筋細胞の増殖による影響の可能性は低く，病理組織学的変化も伴っていなかった。

肝臓への影響

0.025/0.17 mg/kg/日以上の群で肝臓の肝細胞壊死，類洞内皮細胞の活性，並びに関連したアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）及びアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）の増加が認められた。すべての投薬群で可逆的かつ用量依存的な肝臓重量の減少がみられたが，関連する病理組織学的変化は認められなかった。成熟ラットでも，AST 及び ALT の高値を伴う肝細胞壊死が観察されている。肝臓に対する影響は，MEK の阻害に関連した変化と考えられた。

その他の変化

その他の器官重量の変化（0.025/0.17 mg/kg/日群以上：胸腺重量の減少，すべての投薬群：脾臓重量の減少，0.025/0.17 mg/kg/日以上の雌：副腎重量の増加），剖検所見（0.025/0.17 mg/kg/日群以上：リンパ節の拡大，0.05/0.35 mg/kg/日群：前立腺／精嚢の小型化）が認められた。ラットに飼料制限すると体重減少に伴うストレスに関連した精嚢及び前立腺の変化が認められていることから（Rehm et al. 2008），当該変化もストレスに関連した変化と考えられた。

5.6.3 曝露量の比較

ダブラフェニブの幼若ラットを用いた毒性試験（本試験）では，腎毒性により NOAEL は求められなかった。本試験の各用量における曝露量と，臨床用量（150 mg を 1 日 2 回）での曝露量との比較を Table 5-2 に示す。ダブラフェニブの国内第 I 相試験（BRF116056 試験）において，日本人の BRAF V600 変異陽性の固形癌患者に 150 mg/回を 1 日 2 回 21 日間反復経口投与した際の日本人成人の臨床曝露量 AUC0-24h は 11.8 μg·h/mL，Cmax は 2.08 μg/mL であった。幼若動物で検討した最低用量（1/3 mg/kg/日）での生後 35 日のダブラフェニブの AUC0-t は 2.03 μg·h/mL，Cmax は 0.585 μg/mL であり（いずれも雌雄平均値），日本人成人の臨床曝露量と比較して，それぞれ 0.17 倍及び 0.28 倍であった。

トラメチニブの幼若ラットを用いた毒性試験（本試験）では，骨及び胃での変化により NOAEL は求められなかった。本試験の各用量における曝露量と臨床用量（2 mg を 1 日 1 回）における曝露量との比較を Table 5-3 に示す。トラメチニブの国内第 I 相試験（MEK114784 試験）

では，日本人の進行固形癌患者に本薬 2 mg を 1 日 1 回で 15 日間反復経口投与した際の AUC0-24h は 375 ng·h/mL ， Cmax は 25.5 ng/mL であった。幼若動物で検討した最低用量（0.0125/0.08 mg/kg/ 日）での生後 45 日のトラメチニブの AUC0-t は 107 ng·h/mL ，Cmax は 7.91 ng/mL であり（いずれも雌雄平均値），日本人成人の臨床曝露量のそれぞれ 0.29 倍及び 0.31 倍であった。

Table 5-2　　幼若ラットの毒性試験と臨床用量における曝露量の比較：ダブラフェニブ

動物種	投与期間	性	用量 (mg/kg/日)	AUC0-t (µg·h/mL)	Cmax (µg/mL)	曝露量比 [a]	
						AUC 比	Cmax 比
幼若ラット	生後 35 日 [b]	雄	1/3	2.14	0.591	0.18	0.28
		雌	1/3	1.92	0.579	0.16	0.28
		雄	10/20	7.11	1.45	0.60	0.70
		雌	10/20	6.21	1.28	0.53	0.62
		雄	0/20	7.40	1.47	0.63	0.71
		雌	0/20	7.89	1.63	0.67	0.78
		雄	0/200	11.0	1.93	0.93	0.93
		雌	0/200	15.9	2.27	1.35	1.09

Source: Table 2.6.7.15.2 A-2012N148838

a = 国内第 I 相試験（BRF116056 試験）の PK データ（AUC0-24h: 11.8 ng·h/mL，Cmax: 2.08 ng/mL）と比較。

b = 1/3 及び 10/20 mg/kg/日群では生後 35 日は投与 29 日，0/20 及び 0/200 mg/kg/日群では生後 35 日は投与 14 日に該当する。

Table 5-3　　幼若ラットの毒性試験と臨床用量における曝露量の比較：トラメチニブ

動物種	投与期間	性	用量 (mg/kg/日)	AUC0-t (ng·h/mL)	Cmax (ng/mL)	曝露量比 [a,]	
						AUC 比	Cmax 比
幼若ラット	生後 45 日	雄	0.0125/0.08	82.2	6.65	0.22	0.26
		雌	0.0125/0.08	131	9.16	0.35	0.36
		雄	0.025/0.17	219	16.1	0.58	0.63
		雌	0.025/0.17	392	27.0	1.05	1.06
		雄	0.05/0.35	725	58.4	1.93	2.29
		雌	0.05/0.35	480	40.7	1.28	1.60

Source: Table 2.6.7.15.2 B-2013N165537

a = 国内第 I 相試験（MEK114784 試験）の PK データ（AUC0-24h: 375 ng·h/mL，Cmax: 25.5 ng/mL）と比較。

6　　不純物

該当資料なし。

7 安全性の総合評価

ダブラフェニブ及びトラメチニブを小児に投与する際の安全性を確認することを目的として，幼若ラットを用いた経口投与毒性試験を実施した。

ダブラフェニブ

ダブラフェニブを幼若ラットに生後 7～35 日まで 4 週間反復経口投与した結果，本薬投与により成長抑制及び膣開口の早期化が認められ，腎臓，精巣，胃，及び胸腺に病理組織学的変化が認められた。成熟動物を対象とした試験ではみられなかった幼若ラットの毒性として，成長に対する影響，膣開口の早期化，及び部分的に可逆的な腎臓に対する影響が認められた。

成長への影響に関連した所見として，すべての投薬群で体重増加量及び摂餌量の減少が認められ，体重増加抑制と相関して，10/20 及び 0/200 mg/kg/日群では骨長の短縮（大腿骨／脛骨）が観察された。これらの変化は部分的又は完全な回復性が認められた。体重及び摂餌量に対する影響は，成熟ラットでも同様に認められている。

膣開口の早期化が 10/20，0/20，及び 0/200 mg/kg/日群の雌で認められたが，生殖器に病理組織学的変化は認められず，雄の性成熟に影響は認められなかった。探索的試験の結果，膣開口と関連して膣遠位部の上皮過形成及び角化の限局的な増加が認められたものの，性周期への影響は認められなかった。したがって，本変化はダブラフェニブの薬理作用に関連した角化亢進が局所的に発現したものであり，性周期との関連は認められなかったことから，本薬が性成熟に及ぼす影響はないと考えられた。性成熟への影響が認められていないこと及びヒトでは膣開口が出生前に完了することから，本変化はヒトでの重要な安全性リスクにならないと考えられた。

用量依存的な腎臓の変化（嚢胞形成，好塩基性尿細管，二次的な尿細管拡張を伴う尿細管沈着物，間質性線維症／炎症，及び限局性腎盂移行上皮過形成）は，尿細管内沈着物による二次的な閉塞性障害を示唆するものと考えられ，すべての投薬群で回復傾向が認められた。腎毒性はダブラフェニブを単剤投与又はトラメチニブと併用投与した成熟動物では認められていない。探索的試験の結果，尿細管沈着物は主にカルシウム，リン酸，カリウム，及び脂質等の成分からなる混合物であることが確認された。この沈着物にダブラフェニブ関連物質は含まれていなかった。腎臓所見の発現頻度及び重症度は，離乳後に投与したラットと比較して，離乳前の投与で高かった。以上より，22 日齢未満のラットで比較的強い腎毒性が認められたことから，腎臓の発達及び成熟に動物種差はあるものの，ヒト乳児で尿細管障害が生じるリスクはより高いと考えられた。

精巣毒性は休薬期間終了時のみに認められ，10/20 及び 0/200 mg/kg/日群の雄で精巣上体の精子減少を伴う精上皮の変性／萎縮及び精細管拡張が認められた。その他，胃では 10/20，0/20，及び 0/200 mg/kg/日群で非腺胃部粘膜の可逆的な過形成／過角化，胸腺ではすべての投薬群でリンパ球のアポトーシス及び胸腺重量の減少が認められたが，いずれも回復性が認められた。腎臓を除き，これらの変化は成熟動物でも認められており，ダブラフェニブの薬理作用に関連した変化と考えられた。

腎臓への影響（尿細管沈着物）により，幼若ラットに対する NOAEL は求められなかった。幼若動物で検討した最低用量（1/3 mg/kg/ 日）での生後 35 日のダブラフェニブの AUC0-t は 2.03 μg·h/mL，Cmax は 0.585 μg/mL であり（いずれも雌雄平均値），日本人成人の臨床曝露量と比較して，それぞれ 0.17 倍及び 0.28 倍であった（5.6.3 項）。

トラメチニブ

トラメチニブを幼若ラットに生後 7～45 日まで 6 週間反復経口投与した結果，本薬投与により成長抑制（体重減少及び大腿骨長の短縮），性成熟，及びリンの恒常性への影響（リン高値），並びに心臓重量の増加が認められた。主な病理組織学的変化は，骨の変化，複数臓器の鉱質沈着又は変性，雌性生殖器の変化（性成熟及び乳腺発達の遅延，黄体数減少，及び卵巣重量減少），並びに皮膚の炎症であった。眼の病理組織学的変化（角膜鉱質沈着／ジストロフィー）及び心臓重量の増加を除き，成熟ラットにおいても同様の変化が認められている。休薬期間終了時では，骨の病理組織学的変化及び複数組織の鉱質沈着を除き，大部分の変化は回復した。認められた毒性変化は，トラメチニブの標的分子である MEK 阻害に起因した変化，又はそれに関連した二次的変化と考えられた。本試験ではすべての投薬群で骨の病理組織学変化及び胃の鉱質沈着が認められたことから，NOAEL は求められなかった。

幼若ラットでは成長抑制が認められ，骨の変化は，成熟ラットと比較して幼若ラットで発現頻度及び重篤度が高かった。骨端軟骨板が閉鎖（骨成長が完了）した成人患者とは異なり，小児患者では，MEK 阻害作用による骨への影響が強く発現する可能性が考えられた。また，成熟ラットと同様に卵巣の変化が認められ，性成熟及び乳腺発達の遅延が示された。雌性生殖器の変化は休薬期間後に回復性を示し，性周期への影響は認められなかった。性成熟が未発達な小児では，性腺の成熟及び発達に対する影響が懸念されるものの，投薬中止により回復可能と考えられた。幼若ラットで認められた眼の影響は，リンの恒常性変化による二次的変化と考えられた。眼の角膜ジストロフィー及び鉱質沈着は，幼若ラット（生後 7 日に投与開始）及び若齢ラット（6 週齢に試験開始）を用いた 14 日間反復投与毒性試験ともに認められているが，より成熟したラットでは認められていない。成人を対象とした第 I 相試験（MEK111054 試験）では，ラットに比べて高曝露量にもかかわらず，血清リンの影響は報告されなかったことから，ラットはリンの恒常性変化に対して高感受性であり，本変化がヒトで生じる可能性は低いと考えられた。幼若ラットでは心臓重量の増加（回復性なし）が認められたが，関連した病理組織学的変化（心筋細胞の増殖）は伴っておらず，成長抑制（体重減少及び大腿骨長の短縮）との関連も否定できないため，その作用機序は不明であった。

幼若ラットを用いた反復投与毒性試験のトキシコキネティクス（TK）では，生後 7～45 日の投与例においてトラメチニブ曝露量の減少傾向がみられたが，生後 22～35 日の投与例では曝露量の減少は認められなかった（[2.6.6-7.2.1 項]：用量設定試験 3 を参照）。生後 7～21 日に投与開始すると曝露量の減少が示されたことから，生後 22 日未満の幼若ラットにおけるトラメチニブ

の薬物動態は，成熟ラットと異なる可能性がある。曝露量減少の要因として，個体差が大きいこと，定常状態に達しなかった可能性，並びに幼若ラットにおけるトラメチニブの吸収，代謝，又はクリアランスに対する影響等が考えられるが，その詳細は不明であった。幼若動物で検討した最低用量（0.0125/0.08 mg/kg/日）での生後 45 日のトラメチニブの AUC0-t（雌雄平均値）は 107 ng·h/mL，Cmax（雌雄平均値）は 7.91 ng/mL であり，日本人成人の臨床曝露量のそれぞれ 0.29 倍及び 0.31 倍であった（5.6.3 項）。

8 結論

ダブラフェニブとトラメチニブを併用し，MAPK 経路の BRAF 及び MEK を同時に阻害することで，未分化甲状腺癌に対して優れた効果を示すと考えられ，BRAF 遺伝子変異を有するその他の固形腫瘍においても抗腫瘍効果を示すことが期待される。また，幼若動物におけるダブラフェニブ及びトラメチニブの毒性については一連の非臨床試験でその特徴が十分に明らかにされた。ダブラフェニブ投与により，幼若ラットでは日齢に依存した腎毒性が認められたことから，ヒト乳児では腎障害のリスクがより高いと考えられた。また，トラメチニブが小児に投与された場合，骨端板閉鎖前の小児に対する骨への影響が成人と比較して強く発現する可能性が考えられ，性成熟が未達な小児では，性腺の成熟及び発達に対する影響が懸念された。

9 参考文献

[Bailey MH, Tokheim C, Porta-Pardo E, et al. (2018)] Comprehensive characterization of cancer driver genes and mutations. Cell; 173:371-85.

Beck MJ, Padgett EL, Bowman CJ, et al. (2006) Nonclinical Juvenile Toxicity Testing. in Developmental and Reproductive Toxicology: A practical approach. New York:Taylor and Francis, p. 263-327. (Available upon request)

[Behling F and Schittenhelm J (2019)] Oncogenic BRAF alterations and their role in brain tumors. Cancers; 11(6):794.

[Bellhorn RW, Korte GE, Abrutyn D (1988)] Spontaneous corneal degeneration in the rat. Lab Anim Sci; 38(1):46-50.

[Bershas DA, Ouellet D, Mamaril-Fishman DB, et al. (2013)] Metabolism and disposition of oral dabrafenib in cancer patients: proposed participation of aryl nitrogen in carbon-carbon bond cleavage via decarboxylation following enzymatic oxidation. Drug Metab Dispos; Dec;41(12):2215-24.

[Brown AP, Courtney CL, King LM, et al. (2005)] Cartilage dysplasia and tissue mineralization in the rat following administration of a FGF receptor tyrosine kinase inhibitor. Toxicol Pathol; 33(4):449-55.

Cappon GD and Hurtt ME. (2010) Developmental Toxicity of the Kidney in Reproductive Toxicology: Target Organ Series. 3 rd ed. 2010. RW Kapp & RW Tyl (eds.) Informa Healthcare New York. (Available upon request)

[Caronia LM, Phay JE, Shah MH (2011)] Role of BRAF in thyroid oncogenesis. Clin Cancer Res; 17(24):7511-7.

[Charles RP, Iezza G, Amendola E, et al. (2011)] Mutationally activated BRAF^{V600E} elicits papillary thyroid cancer in the adult mouse. Cancer Res; 71(11):3863-71.

[Cocco E, Scaltriti M, Drilon A. (2018)] *NTRK* fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. Nat Rev Clin Oncol; 15(12):731-47.

[Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. (2002)] Mutations of the *BRAF* gene in human cancer. Nature; 417:949-54.

[Dearden S, Stevens J, Wu YL, et al. (2013)] Mutation incidence and coincidence in non small-cell lung cancer: meta-analyses by ethnicity and histology (mutMap).Ann Oncol; 24:2371-6.

[Deng C, Wynshaw-Boris A, Zhou F, et al. (1996)] Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. Cell; 84(6):911-21.

[Dhomen N, Reis-Filho JS, Dias SR, et al. (2009)] Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. Cancer Cell; 15(4):294-303.

[Fenton SE, Hamm JT, Birnbaum LS, et al. (2002)] Persistent abnormalities in the rat mammary gland following gestational and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Toxicol Sci; 67(1):63-74.

[Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, et al. (1998)] Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. Nat Med; 4(3):336-40.

[Freireich EJ, Gehan EA, Rall DP, et al. (1966)] Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man. Cancer Chemother Rep; 50(4):219-44.

[Galabova-Kovacs G, Matzen D, Piazzolla D, et al. (2006)] Essential role of B-Raf in ERK activation during extraembryonic development. Proc Natl Acad Sci USA; 103(5):1325-30.

[Gao B, St Pierre MV, Stieger B, et al. (2004)] Differential expression of bile salt and organic anion transporters in developing rat liver. J Hepatol; 41(2):201-8.

[Grossauer S, Koeck K, Murphy NE, et al. (2016)] Concurrent MEK targeted therapy prevents MAPK pathway reactivation during BRAF^{V600E} targeted inhibition in a novel syngeneic murine glioma model. Oncotarget; 7(46):75839-53.

[Guan M, Bender RJ, Pishvaian MJ, et al. (2018)] Molecular and clinical characterization of BRAF mutations in pancreatic ductal adenocarcinomas (PDACs). J Clin Oncol; 36(4 suppl):214

Harkness JE and Wagner JE. (1977) The Biology and Medicine of Rabbits and Rodents. 3rd ed;Philadelphia:Lea and Febiger. (Available upon request)

[Ji H, Wang Z, Perera SA, et al. (2007)] Mutations in BRAF and KRAS converge on activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in lung cancer mouse models. Cancer Res; 67(10):4933-9.

[Kihara S, Yamamoto H, Ohba T, et al. (2006)] Activation of follistatin promoter by GnRH in LβT2 gonadotroph cells. Endocr J; 53(2):225-35.

[Knauf JA, Ma X, Smith EP, et al. (2005)] Targeted expression of BRAF^{V600E} in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation. Cancer Res; 65(10):4238-45.

[Kojic SL, Strugnell SS, Wiseman SM (2011)] Anaplastic thyroid cancer: a comprehensive review of novel therapy. Expert Rev Anticancer Ther; 11(3):387-402.

[Kuno H, Usui T, Eydelloth RS, et al. (1991)] Spontaneous ophthalmic lesions in young Sprague-Dawley rats. J Vet Med Sci; 53(4):607-14.

[Li F, Wang X, Capasso JM, et al. (1996)] Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. J Mol Cell Cardiol; 28(8):1737-46.

[Li W, Cui Y, Yin F, et al. (2020)] BRAF mutation in Chinese biliary tract cancer patients. J Clin Oncol; 38(15 suppl):e16678

[McFadden DG, Vernon A, Santiago PM, et al. (2014)] p53 constrains progression to anaplastic thyroid carcinoma in a *Braf*-mutant mouse model of papillary thyroid cancer. Proc Natl Acad Sci USA; 111(16):E1600-9.

[Mistry M, Zhukova N, Merico D, et al. (2015)] *BRAF* mutation and *CDKN2A* deletion define a clinically distinct subgroup of childhood secondary high-grade glioma. J Clin Oncol; 33(9):1015-22.

[Mittl R, Galin MA, Opperman W, et al. (1970)] Corneal calcification in spontaneously daibetic mice. Invest Ophthalmol; 9(2):137-45.

[Rad R, Cadiñanos J, Rad L, et al. (2013)] A genetic progression model of $Braf^{V600E}$-induced intestinal tumorigenesis reveals targets for therapeutic intervention. Cancer Cell; 24(1):15-29.

[Rehm S, White TE, Zahalka EA, et al. (2008)] Effects of food restriction on testis and accessory sex glands in maturing rats. Toxicol Pathol; 36(5):687-94.

Russo IH and Russo J (1978) Developmental stage of the rat mammary gland as determinant of its susceptibility to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. J Natl Cancer Inst; 61(6):1439-49. (Available upon request)

[Sahin IH, Kazmi SMA, Yorio JT, et al. (2013)] Rare though not mutually exclusive: a report of three cases of concomitant KRAS and BRAF mutation and a review of the literature. J Cancer; 4(4):320-2.

[Sensi M, Nicolini G, Petti C, et al. (2006)] Mutually exclusive $NRAS^{Q61R}$ and $BRAF^{V600E}$ mutations at the single-cell level in the same human melanoma. Oncogene; 25(24):3357-64.

[Shiota M, Sugai N, Tamura M, et al. (2003)] Correlation of mitogen-activated protein kinase activities with cell survival and apoptosis in porcine granulosa cells. Zoolog Sci; 20(2):193-201.

[Smith CG, Fisher D, Claes B, et al. (2013)] Somatic profiling of the epidermal growth factor receptor pathway in tumors from patients with advanced colorectal cancer, treated with chemotherapy ± cetuximab. Clin Cancer Res; 19(15):4104-13.

[Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. (2007)] Identification of the transforming *EML4-ALK* fusion gene in non-small-cell lung cancer. Nature; 448(7153):561-6.

[Song H, Zhang J, Ning L, et al, (2018)] The MEK1/2 inhibitor AZD6244 sensitizes BRAF-mutant thyroid cancer to vemurafenib. Med Sci Monit.; 24:3002-10.

[Sriraman V, Modi SR, Bodenburg Y, et al. (2008)] Identification of ERK and JNK as signaling mediators on protein kinase C activation in cultured granulosa cells. Mol Cell Endocrinol; 294(1-2):52-60.

[Subbiah V, Gervais R, Riely G, et al. (2019)] Efficacy of vemurafenib in patients with non-small-cell lung cancer with *BRAF* V600 mutation: an open-label, single-arm cohort of the histology-independent VE-BASKET study. JCO Precis Oncol; 3:PO.18.00266.

[Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, et al. (2012)] RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. Nat Med; 18(3):378-81.

[Xing M (2005)] *BRAF* mutation in thyroid cancer. Endocr Relat Cancer; 12(2):245-62.

[Xing M (2007)] *BRAF* mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. Endocr Rev; 28(7):742-62.