2.4 非臨床試験の概括評価

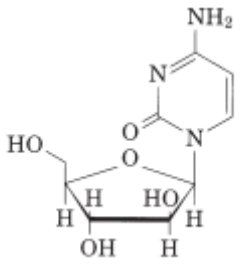
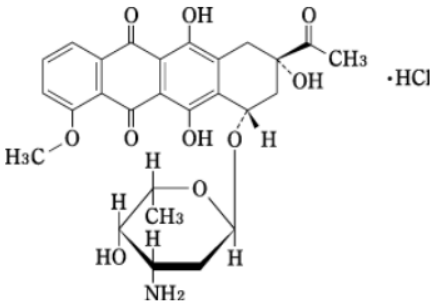
目次

2.4 非臨床試験の概括評価 1
2.4.1 非臨床試験計画概略 4
2.4.2 薬理試験 5
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 5
2.4.2.2 副次的薬理試験 6
2.4.2.3 安全性薬理試験 7
2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験 7
2.4.2.5 薬理総括 7
2.4.3 薬物動態試験 8
2.4.3.1 分析法 8
2.4.3.2 吸収 8
2.4.3.3 分布 9
2.4.3.4 代謝 9
2.4.3.5 排泄 9
2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用 10
2.4.3.7 その他の薬物動態試験 10
2.4.3.8 薬物動態総括 10
2.4.4 毒性試験 11
2.4.4.1 単回投与毒性試験 11
2.4.4.2 反復投与毒性試験 11
2.4.4.3 遺伝毒性試験 12
2.4.4.4 がん原性試験 12
2.4.4.5 生殖発生毒性試験 12
2.4.4.6 局所刺激性試験 12
2.4.4.7 その他の毒性試験 13
2.4.4.8 毒性総括 13
2.4.5 総括及び結論 14
2.4.6 参考文献一覧 15

略語一覧表

語句略語	語句略語内容
AAS	Atomic absorption spectrometry：原子吸光光度計
AML	Acute myeloid leukemia：急性骨髄性白血病
AraC	Cytarabine：シタラビン
AraU	1-β (beta)-D-arabinofuranosyluracil：アラビノフラノシルウラシル Uracil arabinoside：ウラシルアラビノシド
AUC_{last}	Area under the plasma concentration-time curve from time 0 to last：0 から最終採血ポイントまでの時間血漿中濃度曲線下面積
CL	Clearance：クリアランス
C_{max}	Maximum plasma concentration：最高血漿中濃度
DNR	Daunorubicin：ダウノルビシン
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
ICP-MS	Inductively coupled plasma mass spectrometry：誘導結合プラズマ質量分析装置
LC/FL	Liquid chromatography with fluorescence detection：蛍光検出器を搭載した液体クロマトグラフィー
LC/MS	Liquid chromatography/mass spectrometry：液体クロマトグラフィー質量分析装置
LC-MS/MS	Lquid chromatography tandem mass spectrometry：液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置
LC/UV	Liquid chromatography with ultraviolet detection：紫外吸光度検出器を搭載した液体クロマトグラフィー
LSC	Liquid scintillation counter：液体シンチレーションカウンター
NL	Non-liposome：非リポソーム化合物
PK	Pharmacokinetics：薬物動態
QWBA	Quantitative whole-body autoradiography：定量的全身オートラジオグラフィー
Radio-HPLC	Radio-high performance liquid chromatography：放射能検出器を接続した高速液体クロマトグラフィー

申請品（有効成分）の名称と構造式

NS-87 関連化合物の名称	由来
［一般的名称］シタラビン ［化合物名］1-β-D-Arabinofuranosylcytosine ［分子式］$C_9H_{13}N_3O_5$ ［分子量］243.22 ［化学構造式］ 	原薬
［一般的名称］ダウノルビシン塩酸塩 ［化合物名］(2S,4S)-2-Acetyl-4-(3-amino-2,3,6-trideoxy-α-L-lyxo-hexopyranosyloxy)-2,5,12-trihydroxy-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydrotetracene-6,11-dione monohydrochloride ［分子式］$C_{27}H_{29}NO_{10}$・HCl ［分子量］563.98 ［化学構造式］ 	原薬

2.4.1 非臨床試験計画概略

NS-87 は、シタラビン（AraC）及びダウノルビシン（DNR）を 5:1 のモル比で混合したリポソーム製剤である。

医薬品製造販売承認申請書添付資料の作成にあたり、Celator Pharmaceuticals 社（現 Jazz Pharmaceuticals 社）が実施/委託し米国での申請資料として用いた NS-87 の薬理試験、薬物動態試験及び毒性試験の試験成績を収集した。

（1） 薬理試験

効力を裏付ける試験として、白血病細胞株 7 種類と固形がん細胞株 8 種類を用いた *in vitro* 試験及び白血病モデルマウスを用いた *in vivo* 試験を実施した。さらに、白血病モデルマウスにおける NS-87 の骨髄内分布について検討した。

安全性薬理については独立した安全性薬理試験としては実施せず、反復投与毒性試験に組み込んで NS-87 を静脈内投与したときのラット及びイヌの中枢神経系及び心血管系に及ぼす影響を評価した。呼吸器系については一般症状及び病理組織学的検査から評価した。いずれも医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）適用下で実施した。

副次的薬理試験、薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。

（2） 薬物動態試験

マウス、ラット及びイヌを用いて、NS-87 に含まれる AraC 及び DNR の薬物動態（吸収、分布、代謝、排泄）、並びに NS-87 に含まれるグルコン酸銅由来の銅の薬物動態（全血及び血漿中濃度、組織分布及び排泄）について評価した。投与経路は臨床投与経路と同じ静脈内とした。一連の評価には、非標識の AraC 及び DNR を用いて作製したリポソーム製剤（NS-87）、あるいはリポソーム製剤の ^{14}C 放射性標識体（AraC 又は DNR のいずれかを ^{14}C 放射性標識体として作製したリポソーム製剤：^{14}C-AraC-NS-87 又は ^{14}C-DNR-NS-87）を使用した。また、非標識の AraC 及び DNR の非リポソーム投与液（NL）、あるいは非リポソーム製剤の ^{14}C 放射性標識体（AraC 又は DNR のいずれかを ^{14}C 放射性標識体として作製した非リポソーム投与液：^{14}C-AraC-NL 又は ^{14}C-DNR-NL）も使用した。

（3） 毒性試験

ラット及びイヌを用いた単回投与及び反復投与毒性試験を実施した。イヌを用いた試験では NS-87 に含まれる銅による毒性発現についても評価した。なお、局所刺激性試験については独立した試験を実施せず、反復投与毒性試験の中で評価した。主要な試験はいずれも GLP を遵守して実施した。遺伝毒性試験、がん原性試験、生殖発生毒性試験及び幼若動物を用いた毒性試験は実施せず、本剤の有効成分であり、既承認薬である AraC 単剤又は DNR 単剤の既存の非臨床データや本剤の臨床データ等を用いて評価した。

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

一連の試験で用いた NS-87、リポソーム製剤、非リポソーム型混合物に含まれる AraC 及び DNR のモル比は、AraC:DNR で示した。*In vivo* 試験における生存延長作用は、生存数、生存期間の中央値及び生存期間延長率により評価した。

2.4.2.1.1 AraC と DNR の最適なモル比の検討（試験番号 FR051212TH, SR090905、資料番号 4.2.1.1-16, 4.2.1.1-17、評価資料）

白血病細胞株 7 種類と固形がん細胞株 8 種類に対し AraC と DNR を各モル比（1:10、1:5、1:1、5:1、10:1）で併用し細胞増殖抑制試験を実施した。その結果、75%有効濃度において相乗作用を示した細胞株の割合が、AraC と DNR のモル比 5:1 のときに最も大きくなり、モル比 5:1 が相乗的な細胞増殖抑制作用を示す最適なモル比であることが示唆された。

マウスリンパ球性白血病細胞株である P388 細胞を腹腔内移植した雌性 BDF-1 マウスに対し、NS-87 又は AraC と DNR のモル比が異なるリポソーム製剤を静脈内投与した試験において、NS-87 及びモル比 11.6:1 のリポソーム製剤投与群が最も強い生存延長作用を示した。このことから、AraC 及び DNR は 5:1 から 11.6:1 の比率でリポソーム製剤としたときに、最も強い生存延長作用を示すと考えられた。

2.4.2.1.2 NS-87 と非リポソーム型 AraC・DNR 混合物との比較（試験番号 SR050705, SR190805, SR250805, SR060905, SR160905、資料番号 4.2.1.1-18, 4.2.1.1-19, 4.2.1.1-20, 4.2.1.1-21, 4.2.1.1-22、評価資料）

P388 細胞を腹腔内に移植した雌性 BDF-1 マウスに対し、NS-87、非リポソーム型 AraC・DNR 混合物又は単剤を静脈内投与した試験において、NS-87 投与群は最も強い生存延長作用を示した。

マウス骨髄単球性白血病細胞株である WEHI-3B を腹腔内に移植した雌性 CD-1 ヌードマウスに対し、NS-87 又は非リポソーム型 AraC・DNR 混合物を静脈内投与した試験において、NS-87 投与群は最も強い生存延長作用を示した。一方、非リポソーム型 AraC・DNR 混合物を NS-87 と等用量で投与した群は、中程度の作用にとどまった。

ヒト急性リンパ芽球性白血病細胞株である CCRF-CEM 細胞を静脈内移植した雌性 SCID/Rag2M マウスに対し NS-87 又は非リポソーム型 AraC・DNR 混合物を静脈内投与した試験では、NS-87 と等用量の非リポソーム型 AraC・DNR 混合物投与群に比べ、NS-87 投与群はより強い生存延長作用を示した。また、非リポソーム型 AraC・DNR 混合物を NS-87 と等用量以上に増量した場合でも、生存延長作用は NS-87 投与群に及ばなかった。

ヒト急性前骨髄球性白血病細胞である HL-60B 細胞を静脈内移植した雌性 SCID/CB17SC-M マウスに対し、NS-87 又は非リポソーム型 AraC・DNR 混合物を投与した試験においても、非リポソーム型 AraC・DNR 混合物に比べ NS-87 はより強い生存延長作用を示した。

以上の結果より、NS-87 は、種々の白血病モデルマウスにおいて、非リポソーム型 AraC・DNR 混合物又は非リポソーム型単剤（AraC 又は DNR）と比較して最も強い生存延長作用を示した。

2.4.2.1.3 NS-87 と AraC 又は DNR の単剤リポソームとの比較（試験番号 SR250505, SR220705, SR221105, SR011205、資料番号 4.2.1.1-23, 4.2.1.1-24, 4.2.1.1-25, 4.2.1.1-26、評価資料）

P388 細胞を腹腔内に移植した雌性 BDF-1 マウスに対し、NS-87、AraC の単剤リポソーム又は DNR の単剤リポソームを静脈内投与した試験において、NS-87 と等用量の AraC 又は DNR の単剤リポソーム投与群に比べ、NS-87 投与群はより強い生存延長作用を示した。また、AraC と DNR の単剤リポソームをさらに増量しても、生存延長作用は NS-87 投与群に及ばなかった。薬剤の薬効をより厳正に評価するため、P388 細胞移植モデルマウスを用いた他の試験と比べて薬剤投与開始時期を 3 日間ずつ遅らせた試験においても同様の結果となった。

マウスリンパ性白血病細胞株である L1210 細胞を腹腔内に移植した雌性 BDF-1 マウス、又は WEHI-3B を腹腔内に移植した雌性 CD-1 ヌードマウスに対し NS-87、NS-87 と等用量の AraC の単剤リポソーム又は DNR の単剤リポソームを静脈内投与した試験においても、単剤リポソームの生存延長作用は中程度にとどまり、NS-87 投与群は最も強い生存延長作用を示した。

以上の結果より、NS-87 は、AraC 又は DNR の単剤リポソームと比較して、種々の白血病モデルマウスにおいて最も強い生存延長作用を示した。AraC や DNR の単剤リポソームの作用は中程度であるが、これらが 5:1 のモル比で組み合わされることにより、生存延長作用が最大限発揮されたと考えられた。

2.4.2.1.4 NS-87 の CCRF-CEM 細胞移植マウスにおける骨髄内分布（試験番号 SR150105、資料番号 4.2.1.1-27、評価資料）

CCRF-CEM 細胞を静脈内移植した雌性 Rag2-M マウスに対し、NS-87 又は非リポソーム型 AraC・DNR 混合物を投与し、骨髄内の薬物濃度を測定したところ、ほぼすべての測定時点において、NS-87 投与群は非リポソーム型 AraC・DNR 混合物投与群に比べて骨髄中 AraC 濃度及び DNR 濃度が上回っており、骨髄中の AraC と DNR のモル比は 24 時間後まで 5:1～2:1 付近を維持した。

また、CCRF-CEM 細胞移植モデルマウスに NS-87 を単回、静脈内投与後、マウスの大腿骨より CCRF-CEM 細胞と正常骨髄細胞を分離し、AraC 及び DNR の含有量を調べたところ、CCRF-CEM 細胞のほうがそれぞれ 9 倍以上及び 2 倍以上含有されることがわかった。

以上の結果より、NS-87 はマウスの骨髄において AraC と DNR のモル比 5:1～2:1 付近を 24 時間にわたって維持し、正常細胞に比べて白血病細胞に多く取り込まれることがわかった。

2.4.2.2 副次的薬理試験

該当試験なし。

2.4.2.3 安全性薬理試験

（試験番号 1005-0361, 1005-0372、資料番号 4.2.3.2-1, 4.2.3.2-2、評価資料）

独立した安全性薬理試験は実施せず、ラットあるいはイヌを用いた反復投与毒性試験において中枢神経系及び心血管系、呼吸器系への影響を評価した。その結果、ラット中枢神経系に対しては 5 units/kg（AraC:DNR として 5:2.2 mg/kg）まで、イヌ心血管系に対しては 1 units/kg（AraC:DNR として 1:0.44 mg/kg）まで影響が認められず、より高用量については重篤な毒性発現により十分な評価が実施できなかった。ラット及びイヌの呼吸器系への直接作用は示唆されなかった。また、海外臨床試験において、NS-87 投与により AraC 及び DNR 単剤の既知の副作用以上の毒性は認められておらず、実臨床において中枢神経系及び心血管系、呼吸器系における新たな毒性発現の可能性は低いと考えられた。

また、ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験において NS-87 又は銅含有リポソーム投与により全血中銅濃度が一過性に上昇したが、銅による中枢神経系及び心血管系、呼吸器系への影響を示唆する変化は認められなかった。

2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験

該当試験なし。

2.4.2.5 薬理総括

NS-87 は、AraC と DNR が 5:1 のモル比で封入され、長時間にわたり血漿中においてこのモル比を維持できるリポソーム製剤である。NS-87 は極めて安定であり、臨床試験においても、NS-87 投与後 24 時間以内にリポソームから放出された AraC は数%に過ぎないことが示されている（CLTR0310-206 試験）。

効力を裏付ける試験では、上記の細胞やマウスを用いた非臨床薬理試験の結果により、次の薬理学的な特徴が明らかになった。

- AraC と DNR のモル比を 5:1 として併用することで *in vitro* 細胞増殖抑制試験において最大の相乗作用を示すことができ、*in vivo* 白血病モデルにおいても、AraC と DNR のモル比を 5:1 から 11.6:1 としたリポソーム製剤が最も強い生存延長作用を示した。
- 白血病モデルマウスにおいて、NS-87 は非リポソーム型 AraC・DNR 混合物や AraC 又は DNR の単剤リポソームと比べて最も強い生存延長作用を示した。
- NS-87 はマウスの血漿中（2.6.4.3.1.3 項参照）および骨髄において AraC と DNR の 5:1 付近のモル比を維持し、マウス白血病モデルの骨髄において正常細胞に比べて白血病細胞に多く取り込まれた。

安全性薬理の評価では、臨床使用にあたり特別に注意を要する作用は認められなかった。

以上の結果は、NS-87 の薬理作用の妥当性を科学的に裏付けるものであり、NS-87 は急性骨髄性白血病（AML）治療に貢献できるものと考えられた。

2.4.3 薬物動態試験

NS-87 は AraC 及び DNR を 5:1 のモル比で混合したリポソーム製剤である。このモル比は、効力を裏付ける試験において相乗的な細胞増殖抑制作用（*in vitro* 試験）及び生存延長作用（*in vivo* 試験）を示しており、効果的な抗腫瘍作用を示す理想的なモル比である。

2.4.3.1 分析法

AraC 又は DNR の ^{14}C 放射性標識体を投与したときの各種生体試料中放射能は液体シンチレーションカウンター（LSC）や定量的全身オートラジオグラフィー（QWBA）で測定した。各種代謝物プロファイルは、放射能検出器を接続した高速液体クロマトグラフィー（Radio-HPLC）で検討した。

AraC 及び DNR を投与したときの各種生体試料中の AraC、ウラシルアラビノシド（AraU）、DNR 及びダウノルビシノール濃度は液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置（LC-MS/MS）、紫外吸光度検出器を搭載した液体クロマトグラフィー（LC/UV）、蛍光検出器を搭載した液体クロマトグラフィー（LC/FL）及び液体クロマトグラフィー質量分析装置（LC/MS）を用いて測定した。各種生体試料中の銅濃度は、誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP-MS）及び原子吸光光度計（AAS）で測定した。

ほとんどの PK 試験の血漿中濃度データは、総 AraC 及び総 DNR（リポソーム内及びリポソーム外の合計）濃度で示し、一部の試験ではリポソーム外濃度を示している。

2.4.3.2 吸収

2.4.3.2.1 血漿中動態：単回（試験番号 CT832, 1005-0361, 1005-0372, SR051206PT, SR060111, 10ARD002、資料番号 4.2.2.2-1, 4.2.3.2-1, 4.2.3.2-2, 4.2.2.2-2, 4.2.2.2-3, 4.2.2.2-4、評価資料）

マウス、ラット及びイヌに NS-87 を単回静脈内投与後の総 AraC 及び総 DNR は、いずれの動物種においても 1 相性に消失した。また、NL に比較して、NS-87 単回静脈内投与後の総 AraC 及び総 DNR の半減期は長く、クリアランスは低く、分布容積は小さかったことから、NS-87 投与後の方が体内からの消失が遅く血中滞留性が向上していること、及び組織に分布しにくくほとんどが血管内に存在していることが示された。マウスに NS-87 を単回静脈内投与後の総 AraC：総 DNR のモル比は、投与後 24 時間まで理想のモル比である 5:1 に近い値を示した。ラットに NS-87 を単回静脈内投与後の AraC 及び DNR の総薬物濃度とリポソーム内薬物濃度の推移は類似しており、総薬物に対するリポソーム内薬物の C_{max} 及び AUC_{last} の割合はいずれも 98.6%～99.9%であった。

2.4.3.2.2 血漿中動態：反復（試験番号 1005-0361, 1005-0372、資料番号 4.2.3.2-1, 4.2.3.2-2、評価資料）

ラット及びイヌに NS-87 を反復静脈内投与した後の総 AraC 及び総 DNR の血漿中濃度は投与量に応じた増加を示し、明確な性差は認められなかった。また、反復投与による蓄積も認められなかった。

2.4.3.3 分布

2.4.3.3.1 ラット組織分布（試験番号 13687, 14628、資料番号 4.2.2.3-1, 4.2.2.3-2、評価資料）

ラットにリポソーム製剤又は非リポソーム製剤の ^{14}C 放射性標識体を単回静脈内投与した後の組織分布を比較したところ、リポソーム製剤の方が多くの組織で最高放射能濃度に到達するまでの時間が遅く、半減期が長かった。また、リポソーム製剤投与後では血管内に多く分布している傾向が認められた。

2.4.3.3.2 マウス骨髄分布（試験番号 CT832、資料番号 4.2.2.2-1、評価資料）

マウスに NS-87 及び NL を単回静脈内投与した後の骨髄中の AraC 及び DNR 濃度は NS-87 投与後の方が高く、骨髄に長時間滞留していた。また、NS-87 投与後の骨髄中の AraC:DNR のモル比は投与後 24 時間まで 2:1～6:1 で緩やかに推移し、血漿と同様に薬理効果として理想のモル比（5:1）付近で維持されていた。

2.4.3.4 代謝

2.4.3.4.1 代謝：*In vitro* 及び *In vivo*（試験番号 13692、資料番号 4.2.2.4-1、評価資料）

NS-87 を用いた *in vitro* 代謝試験は実施していないが、AraC は主に血漿や肝臓に高発現しているシチジンデアミナーゼにより AraU に代謝され [1]、DNR は小腸、大腸及び肝臓等、体内の様々な組織に発現するアルドーケト還元酵素とカルボニル還元酵素により、主として活性代謝物であるダウノルビシノールに代謝されることが報告されている [2, 3, 4]。

NS-87 を用いた *in vivo* 代謝試験として、ラットにリポソーム製剤又は非リポソーム製剤の ^{14}C 放射性標識体を単回静脈内投与した。AraC 及び DNR の血漿中代謝物プロファイルを比較したところ、質的には大きな差は認められなかったが、いずれの薬物もリポソーム製剤投与後の方が、全体に対する未変化体の血漿中放射能濃度の AUC の割合が高かったことから、リポソーム内に封入されていることによって代謝反応が起こりにくくなっていることが示唆された。また、胆管カニュレーションしたラットにリポソーム製剤の ^{14}C 放射性標識体を単回静脈内投与した際の尿、糞及び胆汁中の放射能を分析したところ、投与放射能に対する割合は未変化体である AraC 及び DNR が最も高かった。

2.4.3.4.2 推定代謝経路及び種間比較（試験番号 13692、資料番号 4.2.2.4-1、評価資料）

ラットで認められた主代謝物は、NS-87 投与時のイヌやヒトでも認められた。したがって、NS-87 投与時においても AraC から AraU への代謝及び DNR からダウノルビシノールへの代謝がいずれの動物種でも主代謝経路であると考えられた。

2.4.3.5 排泄

（試験番号 14629, 13700、資料番号 4.2.2.5-1, 4.2.2.5-2、評価資料）

胆管カニュレーションしたラットにリポソーム製剤又は非リポソーム製剤の ^{14}C 放射性標識体を単回静脈内投与した後の主排泄経路はリポソームの有無による相違はなく、AraC では尿中排泄、

DNR では胆汁排泄を介した糞中排泄であった。AraC の尿中排泄速度及び DNR の胆汁排泄速度を比較したところ、いずれもリポソーム製剤の方が遅かった。

2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用

該当試験なし。

2.4.3.7 その他の薬物動態試験

2.4.3.7.1 ラット及びイヌ全血中での銅濃度測定（試験番号 1004-3331, 1004-3342, 1005-0361, 1005-0372、資料番号 4.2.3.1-1, 4.2.3.1-3, 4.2.3.2-1, 4.2.3.2-2、評価資料）

ラット及びイヌに NS-87 を単回静脈内投与後の全血中銅濃度は、ベースライン値と比較して投与量依存的に増加し、反復投与後において、最終投与後数日～数週間でベースライン値に近づいた。

2.4.3.7.2 ラットにおける銅の分布及び排泄（試験番号 NC003CT1130FR、資料番号 4.2.2.7-1、評価資料）

ラットに NS-87 を単回静脈内投与後の組織中の銅は、肝臓で最も高い蓄積が認められ、次いで脾臓、腎臓、心臓の順であった。また、肝臓、脾臓及び腎臓中銅濃度は、全血と同様に投与後一過性に上昇したが、1～2 週間後にはコントロール（生理食塩液投与）群と同程度となった。投与 12 日目の尿糞中への総排泄量は 83%であり、体内残存量（血漿及び組織）の 2%と比較して高かった。

2.4.3.8 薬物動態総括

マウス、ラット及びイヌを用いて NS-87 の吸収、分布、代謝及び排泄について検討した。一部の試験では、NL を用いてリポソームによる体内動態の変化も確認した。

吸収及び分布について、NS-87 は NL と比較して、AraC、DNR のいずれも血漿中及び組織中からの消失が緩やかであり、組織に分布しにくくほとんどが血管内に分布していることが示された。リポソーム内の AraC と DNR は、そのほとんど（99%以上）が投与後もリポソーム内に封入されており、血漿中及び骨髄中では 24 時間まで理想のモル比である 5:1 に近い値を示した。

代謝及び排泄について、NS-87 と NL の代謝及び排泄速度に違いが認められたものの、代謝物プロファイル、代謝経路及び排泄経路など質的にはほとんど差はなく、AraC の主代謝物は AraU で主に未変化体として尿に排泄され、DNR の主代謝物はダウノルビシノールで ^{14}C 放射性標識体は主に胆汁に排泄された。

リポソーム内に含まれるグルコン酸銅由来の銅について、全血、血漿及び組織中銅濃度は投与後一過性に上昇するが、数日～数週間後には減少し、そのほとんどが尿糞中に排泄され、銅の蓄積はほとんど認められなかった。

2.4.4 毒性試験

NS-87 の毒性評価のために、単回投与毒性試験及び反復投与毒性試験を実施した。遺伝毒性試験、がん原性試験及び生殖発生毒性試験は実施しなかったが、本剤の有効成分であり、既承認薬である AraC 単剤又は DNR 単剤の既存の非臨床データや本剤の臨床データ等を用いて評価した。

2.4.4.1 単回投与毒性試験

2.4.4.1.1 NS-87 のラットを用いた単回持続静脈内投与毒性試験（試験番号 1004-3331、資料番号 4.2.3.1-1、評価資料）

ラットにおける NS-87 の単回持続静脈内投与毒性試験では、投与 14 日後の剖検時に、15 units/kg（AraC:DNR として 15:6.6 mg/kg）以上の投与群において、貧血並びに脾臓及び肝臓における髄外造血の増加等、血液学的検査及び病理組織学的検査で用量依存的な毒性所見が認められた。全血中銅濃度がわずかかつ一過性に上昇したが、毒性学的意義はないと考えられた。

2.4.4.1.2 NS-87 のビーグル犬を用いた単回持続静脈内漸増投与毒性試験（試験番号 3004-3322、資料番号 4.2.3.1-2、参考資料）

イヌにおける用量漸増持続静脈内投与試験では、4 units/kg 投与群（AraC:DNR として 4:1.76 mg/kg）まで NS-87 の投与と関連する変化は認められなかった。

2.4.4.1.3 NS-87 のビーグル犬を用いた単回持続静脈内投与毒性試験（試験番号 1004-3342、資料番号 4.2.3.1-3、評価資料）

イヌにおける単回持続静脈内投与毒性試験では、高用量群 2 群［3 及び 6 units/kg 投与群（AraC:DNR として 3:1.32 及び 6:2.64 mg/kg）］の動物を瀕死期安楽殺処分した。これらの動物では一般状態の悪化並びにリンパ系組織におけるリンパ球減少が認められた。血中銅濃度が用量依存的に上昇したが、銅による毒性が発現することなく投与 14 日後までに投与前値付近まで回復した。

2.4.4.2 反復投与毒性試験

2.4.4.2.1 NS-87 のラットを用いた 2 サイクル持続静脈内投与毒性試験（試験番号 1005-0361、資料番号 4.2.3.2-1、評価資料）

ラットを用い、1 日おきの 3 回間歇投与を 1 サイクルとし、1 サイクル目の最終投与から 17 日後に 2 サイクル目の投与を実施し、最終投与の 8 日後に解剖する 2 サイクル持続静脈内投与毒性試験の結果、活動性の低下、体温の低下、呼吸の異常、正向反射の低下、摂餌量及び体重の減少などが認められ、10 units/kg（AraC:DNR として 10:4.4 mg/kg）投与群の大部分の動物及び 15 units/kg（AraC:DNR として 15:6.6 mg/kg）投与群の全例が投与期間終了までに死亡又は瀕死期安楽殺処分となった。血液学的検査では、5 units/kg（AraC:DNR として 5:2.2 mg/kg）以上で貧血、血小板数及び白血球数の減少が認められ、病理解剖学的検査及び病理組織学的検査では 10 units/kg 以上の投与群で重度の骨髄造血細胞の減少、脾臓、胸腺及び全身のリンパ節のリンパ球の減少及び萎縮が認められ、15 units/kg 投与群では小腸粘膜及び大腸の腺上皮で壊死が認められた。

2.4.4.2.2 NS-87 のビーグル犬を用いた 2 サイクル持続静脈内投与毒性試験及び 28 日間回復性試験（試験番号 1005-0372、資料番号 4.2.3.2-2、評価資料）

イヌを用い、1 日おきの 3 回間歇投与を 1 サイクルとし、1 サイクル目の最終投与から 17 日後に 2 サイクル目の投与を実施し、最終投与の 8 日後に解剖する 2 サイクル持続静脈内投与毒性試験の結果、1 サイクル目の投与終了後、2 units/kg（AraC:DNR として 2:0.88 mg/kg）以上の投与群で活動性低下、嘔吐、衰弱等の変化が認められ、2 units/kg 投与群の雌雄各 1 例及び 3 units/kg（AraC:DNR として 3:1.32 mg/kg）投与群の全例が死亡又は瀕死期安楽殺処分した。そのため、これらの投与群は 1 サイクルで投与を終了した。死亡又は瀕死期安楽殺処分した動物において骨髄における造血細胞の減少、胸腺及び脾臓におけるリンパ球の減少及び萎縮、腸管膜リンパ節等のリンパ組織の萎縮並びに小腸粘膜及び大腸の腺上皮の壊死が認められた。生存例において、血液学的検査では NS-87 投与群で白血球数及び血小板数の減少並びに赤血球分布幅及びヘモグロビン分布幅の増加が認められた。2 units/kg 群の生存動物を用いた回復性の評価では、死亡又は瀕死期安楽殺処分した動物において認められた変化について回復傾向があることを確認した。

2.4.4.3 遺伝毒性試験

NS-87 について、遺伝毒性試験は実施していない。

AraC 及び DNR はいずれも遺伝子突然変異誘発性及び染色体異常誘発性を示しており、NS-87 も遺伝毒性を有すると考えられた。

2.4.4.4 がん原性試験

NS-87 のがん原性試験は実施していない。

AraC では報告されていないものの、DNR ではヒトや動物での発がん性が認められている。このことから、NS-87 についてもがん原性を示すものと考えられた。

2.4.4.5 生殖発生毒性試験

NS-87 の生殖発生毒性試験は実施していない。

AraC 及び DNR はいずれも遺伝毒性を示す（2.4.4.3 項参照）ほか、AraC では催奇形性、発達遅滞作用、DNR では胚死亡率の増加、催奇形性及び精子形成障害作用が認められている。そのため、NS-87 は生殖発生毒性を誘発すると考えられた。

幼若動物を用いた毒性試験は実施していない。有効成分である AraC、DNR 及び本剤の成人及び小児患者における十分な安全性情報、成獣及び幼若動物で認められた毒性情報、想定される発達器官に対する影響等の情報を考慮した結果、試験の実施は不要と判断した。

2.4.4.6 局所刺激性試験

NS-87 の局所刺激性試験は実施していない。

ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験において投与部位に局所反応及び病理組織学的所見は認められなかった。DNR は既知の発疱薬であり、血管外漏出が生じた場合には局所組織傷害及

び壊死を引き起こす可能性があるが、NS-87 のリポソーム内に内包される DNR は静脈内投与後、血中でほとんどリポソームから放出されずに骨髄に移行し、骨髄内で主に白血病細胞に取り込まれた後にリポソームから放出されるため、DNR と局所組織との相互作用が阻止され、局所組織傷害を引き起こすリスクは低いと考えられた。

2.4.4.7 その他の毒性試験

NS-87 について、光毒性試験は実施していない。

AraC と DNR について、これらの注射薬について現在まで光線過敏反応の副作用は報告されていないこと、NS-87 の臨床試験において光毒性を示唆する変化が認められなかったことから、NS-87 の光毒性リスクは低いと考えられた。

2.4.4.8 毒性総括

NS-87 の単回投与毒性試験及び反復投与毒性試験から､NS-87 の主要な毒性は血液毒性であり、NS-87 の毒性プロファイルが単剤である AraC 及び DNR の安全性プロファイルと概ね一致することが示された。また、NS-87 に含有される銅による毒性は認められなかった。AraC 及び DNR に関するデータを踏まえると、NS-87 は遺伝毒性、がん原性、及び生殖発生毒性を示すと考えられた。以上のことから、NS-87 において、AraC 及び DNR で報告されているもの以外の予期しない毒性及び新規の毒性は認められず、ヒトにおいて考えられる副作用としては血液毒性が考えられた。

2.4.5 総括及び結論

NS-87 は AraC 及び DNR を 5:1 のモル比でリポソーム内に封入したリポソーム製剤であり、AML に対する治療薬として開発された。AraC 及び DNR は AML の標準的な寛解導入療法として併用療法（7+3 療法）で広く用いられている。

一連の非臨床試験の結果より、NS-87 は以下の特徴を有することが明らかとなった。

- AraC と DNR のモル比 5:1 は、*in vitro* 試験及び *in vivo* 試験において最も高い抗腫瘍効果を示す理想のモル比であった。
- リポソーム内に封入された AraC 及び DNR は、投与後は血中でほとんど放出されずリポソームのまま体内を循環し、血漿中半減期はそれぞれ単剤を投与した時に比べて延長した。
- 投与後 24 時間にわたって投与時の AraC と DNR のモル比（5:1）を維持したまま骨髄へ移行し、骨髄では正常細胞に比べて白血病細胞に多く取りこまれた。
- 安全性薬理の評価（中枢神経系及び心血管系、呼吸器系）について、臨床使用にあたり特別に注意を要する影響は認められなかった。
- 主要な毒性は血液毒性であり、AraC 及び DNR 単剤投与時の安全性プロファイルと概ね一致した。
- リポソーム内に含まれるグルコン酸銅由来の銅について、銅に伴う毒性は認められず、また、蓄積もほとんどなかった。

以上の結果より、リポソームを用いて AraC 及び DNR を理想のモル比である 5:1 で配合した NS-87 は、それぞれ単剤投与時に比べて消失が遅延し、標的である骨髄での高い抗腫瘍効果が期待できることから、AML 治療に貢献できるものと考えられた。

2.4.6 参考文献一覧

1. Serdjebi C, Milano G, Ciccolini J. Role of cytidine deaminase in toxicity and efficacy of nucleosidic analogs. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2015;11:665-72. ＜資料番号 5.4-29＞

2. Bachur NR, Huffman DH. Daunorubicin metabolism: estimation of daunorubicin reductase. Br J Pharmacol. 1971;43:828-33. ＜資料番号 5.4-30＞

3. ダウノマイシン静注用 20mg 添付文書（2021 年 2 月改訂版） ＜資料番号 5.4-31＞

4. Barski OA, Tipparaju SM, Bhatnagar A. The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification. Drug Metab Rev. 2008;40:553-624. ＜資料番号 5.4-32＞