2.6.6 毒性試験の概要文

目次

2.6.6 毒性試験の概要文 1
2.6.6.1 まとめ 3
2.6.6.2 単回投与毒性試験 4
2.6.6.3 反復投与毒性試験 6
2.6.6.4 遺伝毒性試験 9
2.6.6.5 がん原性試験 9
2.6.6.6 生殖発生毒性試験 10
2.6.6.7 局所刺激性試験 14
2.6.6.8 その他の毒性試験 14
2.6.6.9 考察及び結論 15
2.6.6.10 図表 17
2.6.6.11 参考文献 17

略語一覧表

語句略語	語句略語内容
AraC	Cytarabine：シタラビン
AUC	Area under the plasma concentration-time curve：時間血漿中濃度曲線下面積
C_{max}	Maximum plasma concentration：最高血漿中濃度
DepoCyt	AraC のリポソーム製剤
DaunoXome	DNR のリポソーム製剤
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

2.6.6.1 まとめ

NS-87 は、シタラビン（AraC）とダウノルビシン（DNR）を 5:1 のモル比で配合したリポソーム製剤である。NS-87 の 1 unit は AraC 1mg と DNR 0.44 mg に対応する。毒性試験プログラムは、がん患者への NS-87 の使用に対する承認申請を裏付けるために計画され、ラット及びイヌを用いた単回持続静脈内投与毒性試験を行うと共に、寛解導入療法として 1 日おき 3 回投与した 14～28 日後に 2 回目の寛解導入療法もしくは地固め療法を行う臨床投与サイクルに準じた 2 サイクル持続静脈内投与による反復投与毒性試験を実施した。また、NS-87 はリポソーム内に DNR と複合体を形成したグルコン酸銅が含まれており、銅による毒性発現が懸念された。そのため、イヌを用いた試験において AraC 及び DNR を含まない銅含有リポソームを投与する群を設定した。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医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（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。

NS-87 の毒性試験一覧を表 2.6.6.1-1 に示す。

表 2.6.6.1-1 NS-87 の毒性試験プログラム一覧

試験の種類及び期間	投与経路	動物種	試験番号	GLP 適用
単回投与毒性試験				
単回投与／14 日間観察	持続静脈内投与	ラット	1004-3331	適
単回漸増投与（週 1 回、4 週間）	持続静脈内投与	イヌ	3004-3322	不適
単回投与／14 日間観察	持続静脈内投与	イヌ	1004-3342	適
反復投与毒性試験				
2 サイクル（3 回投与／サイクル）	持続静脈内投与	ラット	1005-0361	適
2 サイクル（3 回投与／サイクル）	持続静脈内投与	イヌ	1005-0372	適

局所刺激性試験は反復投与毒性試験の中で評価した。
投与は 1 時間かけて持続静脈内投与とした。
反復投与毒性試験では、1 日おきに 3 回の間歇投与としその後の 16 日間の休薬期間を含めて 1 サイクルを 21 日間とした。Day 1、3、5（1 サイクル目）並びに Day 22、24、26（2 サイクル目）に投与した（Day は初回投与からの日数）。

毒性試験の概要を以下に示す。

（1） 単回投与毒性試験

ラットを用いた単回持続静脈内投与試験では、NS-87 投与群で貧血、白血球数、リンパ球数、好酸球数の減少、好中球数、単球数及び網赤血球数の増加、並びに脾臓及び肝臓における髄外造血の増加が認められた。しかし、20 units/kg までの用量で一般状態及び体重に変化は認められなかったことから、概略の致死量は 20 units/kg 超と考えられた。

イヌ単回持続静脈内投与試験では、3 units/kg 以上の投与群で活動性低下、削痩、衰弱、摂餌量及び体重の減少などが認められ、3 units/kg 投与群の雌及び 6 units/kg 投与群の雌雄を瀕死期安楽殺処分したことから、概略の致死量は 3 units/kg と考えられた。なお、瀕死期安楽殺処分した動物において白血球数及び血小板数の減少が認められ、病理組織学的検査では、脾臓及び胸腺におけるリンパ球の減少及び萎縮、腸間膜リンパ節等におけるリンパ球の減少並びに消化管などの壊死及び出血が認められた。

（2） 反復投与毒性試験

ラットを用いた 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 投与群の大部分の動物及び 15 units/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した。血液学的検査では、NS-87 投与群で貧血、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系細胞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。

イヌを用いた 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 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 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、2 units/kg 投与群は 1 サイクルで投与を終了した。血液学的検査では NS-87 投与群において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、病理解剖学的検査及び病理組織学的検査では、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。2 units/kg 群の生存動物を用いた回復性の評価では、上記の変化について回復傾向があることを確認した。

（3） 単回及び反復投与毒性試験における血中銅濃度による影響

ラット、イヌの単回投与毒性試験及び反復投与毒性試験において、NS-87 投与後 24 時間から 7～8 日目の時点で血中銅濃度の増加が認められたが、休薬期間終了時の採血時点でベースライン値に回復した。

イヌの単回投与毒性試験及び反復投与毒性試験において銅を含むリポソームのみを投与した群において、毒性は特に認められなかった。

（4） 局所刺激性試験

ラット及びイヌの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ことから、NS-87 は局所刺激性を示さないと考えられた。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

2.6.6.2.1 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（SD、1 群あたり雌雄各 5 例）に NS-87 を 0（対照群、生理食塩液）、5、10、15 及び 20 units/kg の用量で単回持続静脈内投与し、14 日間観察した後、剖検した。持続投与の速度は 20 mL/kg/hr とし、1 時間かけて静脈内に注入した。

いずれの投与群においても、死亡は認められなかった。また、投与後 14 日間の観察期間中、一般状態及び体重に変化は認められなかった。

観察期間終了後の血液学的検査の結果、15 units/kg 以上の投与群で貧血が認められたほか、白血球、リンパ球数及び好酸球数の減少並びに好中球数、単球及び網赤血球数の増加が用量依存的に認められた。また、血中銅濃度を測定した結果、投与用量に応じた血中銅濃度の増加が認められ

た。剖検の結果、20 units/kg 投与群で脾臓重量の増加が認められた。病理解剖学的検査では NS-87 に起因する変化は認められなかったが、病理組織学的検査の結果、脾臓及び肝臓における髄外造血の増加が認められ、NS-87 投与による血液中の血球数減少に対する応答が示唆された。概略の致死量は 20 units/kg 超と考えられた。

表 2.6.6.2.1-1 Design of Single-Toxicity Study in Rats (Study 1004-3331)

Group (n=5/sex/group)	NS-87 (units/kg)	Dose Level					
		AraC		DNR		Copper (mg/kg)	Lipid (mg/kg)
		(mg/kg)	(mg/m^2)	(mg/kg)	(mg/m^2)		
1	0	0	0	0	0	0	0
2	5	5	30	2.2	13.2	0.5	30.9
3	10	10	60	4.4	26.4	1.0	61.8
4	15	15	90	6.6	39.6	1.5	92.7
5	20	20	120	8.8	52.8	2.0	123.6

2.6.6.2.2 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）

雌のイヌ（Beagle、1 例）に NS-87 を 1、2、3 及び 4 units/kg の用量で、7 日間隔（Day 1, 8, 15 及び 22）で持続静脈内漸増投与し、最終投与から 7 日後までの一般状態観察、体重及び摂餌量を実施した。媒体は生理食塩液とした。持続投与の速度は 20 mL/kg/hr とし、1 時間かけて静脈内に注入した。

その結果、3 units/kg を投与した翌日に軽度の活動性低下及び脱水症状を示唆する皮膚の弾力低下、摂餌量の低値が認められたが、これらの変化は 2 日以内に消失したこと、4 units/kg 投与時には一般状態、体重、摂餌量に変化は認められなかったことから、これら変化は NS-87 投与と関連のない変化と考えられた。概略の致死量は 4 units/kg 超と考えられた。

表 2.6.6.2.2-1 Design of Single-Ascending Dose Range-Finding Study in Dogs (Study 3004-3322)

Study Day	NS-87 (units/kg)	Dose Level					
		AraC		DNR		Copper (mg/kg)	Lipid (mg/kg)
		(mg/kg)	(mg/m^2)	(mg/kg)	(mg/m^2)		
1	1	1	20	0.44	8.8	0.1	6.18
8	2	2	40	0.88	17.6	0.2	12.36
15	3	3	60	1.32	26.4	0.3	18.54
22	4	4	80	1.76	35.2	0.4	24.72

2.6.6.2.3 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（Beagle、1 群あたり雌雄各 1 例）に NS-87 を 0（対照群、生理食塩液）、0（銅含有リポソーム）、1.5、3 及び 6 units/kg の用量で単回持続静脈内投与し、14 日後に剖検した。媒体は生理食塩液とした。持続投与の速度は 20 mL/kg/hr とし、1 時間かけて静脈内に注入した。

投与 2 日以降後に 6 units/kg 投与群で摂餌量の減少が認められた。投与 5 日以降後に 3 units/kg 以上の投与群で活動性低下、嘔吐、皮膚の蒼白化、淡色な液状便、緑色便、暗色便、赤色液体が混じった便、赤色な液状便、軟便、暗色便、粘液様黄色/赤色/白色内容物及び赤色な液体の混じる便、低体温、流涎、鼻、口腔、肛門由来の赤い液体、振戦、脱水、削痩、衰弱、咳、ラッセル音、流涎、

摂餌量及び体重の減少、歯肉の蒼白化が認められ、3 units/kg 投与群の雌及び 6 units/kg 投与群の雌雄を瀕死期安楽殺処分した。瀕死期安楽殺処分した動物の血液学的検査の結果、白血球数及び血小板数の減少が認められ、血液生化学検査ではリンの減少及びビリルビンの増加が認められた。瀕死期安楽殺処分に至ったイヌの病理解剖学的検査では消化管粘膜の変色（暗赤色又は黒色）が認められた。病理組織学的所見として脾臓及び胸腺におけるリンパ球の減少及び萎縮、腸間膜リンパ節等におけるリンパ球細胞の減少並びに消化管などの壊死及び出血が認められた。観察期間終了時点まで生存していた 3 units/kg 投与群の雄では、血液学的検査、血液生化学検査、尿検査、又は病理解剖学的検査所見に変化は認められなかったが、病理組織学的所見として脾臓におけるリンパ球の減少及び萎縮が認められた。銅含有リポソーム投与群及び 1.5 units/kg 投与群では一般状態、血液学的検査、血液生化学検査、尿検査、病理解剖学的検査又は病理組織学的検査において被験物質投与と関連した変化は認められなかった。血中銅濃度測定の結果、投与後約 24 時間の全血中銅濃度は、全ての NS-87 投与群で用量依存的に上昇したが、投与 7～14 日後までに投与前値まで回復した。本試験における概略の致死量は 3 units/kg と考えられた。

表 2.6.6.2.3-1 Design of Single-Dose Toxicity Study in Dogs (Study 1004-3342)

Group (n=1/sex/ group)	Treatment	NS-87 (units/kg)	Dose Level					
			AraC		DNR		Copper [a]	Lipid
			(mg/kg)	(mg/m^2)	(mg/kg)	(mg/m^2)	(mg/kg)	(mg/kg)
1	Control (0.9% NaCl)	0	0	0	0	0	0	0
2	Vehicle (Copper-containing Liposomes)	0	0	0	0	0	0.264	37.08
3	Low Dose	1.5	1.5	30	0.66	13.2	0.198	9.27
4	Mid Dose	3.0	3.0	60	1.32	26.4	0.396	18.54
5	High Dose	6.0	6.0	120	2.64	52.8	0.792	37.08

a：実測値を示す

2.6.6.3 反復投与毒性試験

2.6.6.3.1 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（SD、1 群あたり雌雄各 10 例）に NS-87 を持続静脈内投与により 2 サイクル反復投与した。1 サイクルは 21 日間、1 日おきに 3 回の間歇投与とし、Day 1、3、5（1 サイクル目）並びに Day 22、24、26（2 サイクル目）に 0（対照群、生理食塩液）、5、10 及び 15 units/kg の用量で投与した（Day は初回投与日からの日数を示す）。最終投与の 8 日後に解剖した。対照群及び 15 units/kg 投与群には回復群として 5 例設定した。投与は 1 時間かけて行い、投与速度は約 20 mL/kg/hr とした。

投与期間中、10 units/kg 以上の投与群において、活動性の低下、体温の低下、呼吸の異常、正向反射の低下などの一般状態の異常が認められ、10 units/kg 投与群の大部分の動物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。15 units/kg 投与群においては、死亡及び瀕死期安楽殺処分に至る一般状態悪化が発現したために、Day3 又は 5 の投与から投与量を 15 units/kg から 10 units/kg に減量したものの、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。また、5 units/kg 以上の投与群の雄では体重の増加抑制又は減少が、5 units/kg 以上の投与群の雄及び 10 units/kg 以上の投与群の雌では摂餌量の減少が認められた。

血液学的検査の結果、5 units/kg 以上の投与群でリンパ球数及び好酸球数の減少を伴う白血球数の減少、貧血及び血小板数の減少などの変化が認められた。

器官重量測定の結果、5 unis/kg 以上の投与群において前立腺、胸腺及び脾臓の重量減少と副腎の重量増加が認められた。

病理解剖学的検査の結果、5 unis/kg 以上の投与群において胸腺の小型化が、10 unis/kg 以上の投与群において脾臓の小型化が認められた。

病理組織学的検査の結果、10 units/kg 以上の投与群では重度の骨髄造血細胞の減少、脾臓及び胸腺のリンパ球の減少及び萎縮、並びに全身のリンパ節のリンパ球の減少及び萎縮が認められた。また、15 units/kg 投与群の死亡又は瀕死期安楽殺処分した動物では、小腸粘膜における陰窩上皮の壊死及び大腸における腺上皮の壊死も認められた。

5 units/kg 投与群の死亡については、外科的なカテーテルの留置に関連したものであり、NS-87 投与に関連したものではないと考えられた。

15 units/kg 投与群において 28 日間の回復群に割り当てられたラットは、すべて死亡又は瀕死期安楽殺処分に至ったため、本試験では NS-87 の毒性の可逆性を実証することはできなかった。

血液中の銅濃度を測定した結果、用量依存的な銅濃度の増加が認められた。

血漿中 AraC 及び DNR 濃度について、Day 1 及び Day 5 の各投与日において C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は用量に依存して増加した。反復投与による蓄積性は認められなかった。

以上のことから、本試験における無毒性量は雌雄ともに 5 units/kg 未満であると判断した。

表 2.6.6.3.1-1 Design of 2-Cycle Toxicity Study in Rats (Study 1005-0361)

Group/ Treatment	No. of Rats/Sex		NS-87 (units/kg)	Dose Level					
				AraC		DNR		Copper (mg/kg)	Lipid (mg/kg)
	Main (Recovery)	TK		(mg/kg)	(mg/m^2)	(mg/kg)	(mg/m^2)		
1/Control (0.9% NaCl)	10 (5)	0	0	0	0	0	0	0	0
2/Low Dose	10	9	5	5	30	2.2	13.2	0.5	30.9
3/Mid Dose	10	9	10	10	60	4.4	26.4	1.0	61.8
4/High Dose	10 (5)	0	15/10*	15/10*	90/60*	6.6/4.4*	39.6/26.4*	1.5/1.0*	92.7/61.8*

*死亡及び瀕死期安楽殺処分に至る一般状態悪化が発現したために、Day3 又は 5 の投与から投与量を 15 units/kg から 10 units/kg に減量した

2.6.6.3.2 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（Beagle、1 群あたり雌雄各 3 例）に NS-87 を持続静脈内投与により 2 サイクル反復投与した。1 サイクルは 1 日おきに 3 回間歇投与とし、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 日後に解剖した。NS-87 の投与用量は、0（対照群、生理食塩液）、0（銅含有リポソーム）、1、2、3 units/kg とし、さらに非リポソーム型 AraC・DNR 混合物（2 mg/kg AraC＋0.88 mg/kg DNR、NS-87 の 2 units/kg 相当の用量）で設定した。対照群並びに 2 及び 3 unis/kg 投与群には回復群として各 2 例ずつ設定した。投与速度は 20 mL/kg/hr とした。2 units/kg 投与群では 1 サイクル投与後に死亡が認められたため、2 サイクル目の投与を実施せずに生存動物を回復群として割り付け直した。3 units/kg 投与群では 1 サイクル投与後に死亡が認められ、生存動物は安楽死処置したため、2 サイクル目の投与は実施しなかった。

1 サイクル投与後、2 units/kg 以上の投与群及び非リポソーム型 AraC・DNR 混合物投与群で活動性低下、嘔吐、脱水、体重及び摂餌量低下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 投与群の全例が死亡又は安楽死処置となった。

血液学的検査の結果、1 unit/kg 投与群及び非リポソーム型 AraC・DNR 混合物投与群において白血球減少、血小板数の減少が認められた。2 units/kg 投与群は 1 サイクルのみ投与し、赤血球分布幅の増加及びヘモグロビン分布幅の増加が認められたが、回復期間終了時には対照群と同程度の値であった。

病理解剖学的検査及び病理組織学的検査の結果、2 units/kg 以上の投与群の死亡又は瀕死期安楽死処置した動物では、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の陰窩上皮及び大腸の腺上皮における壊死が認められた。

2 units/kg 群の生存動物を用いた回復群の検査では、雄で腎臓重量の減少、雌で胸腺重量の増加及び脾臓重量の減少が認められ、雄の 1 例で脾臓の萎縮及びリンパ球の壊死が認められたが、その他の変化は認められず、死亡又は瀕死期安楽死処置した動物で認められた変化の回復傾向が確認された。

眼科学的検査、心電図検査、血液生化学検査、血液凝固検査及び尿検査の結果、2 units/kg 以下の投与群及び非リポソーム型 AraC・DNR 混合物投与群で被験物質の影響は認められなかった。3 units/kg 投与群は全例が死亡又は瀕死期安楽死処置したため各種検査を実施できなかった。3 units/kg 投与群では 7 日目の心電図検査のみ実施しており、被験物質の影響は認められなかった。銅含有リポソーム投与群では対照群と比較して変化は認められなかった。

血中銅濃度を測定した結果、3 units/kg 投与群のうち早期に瀕死期安楽殺処分とした動物（Day 7～9）では、血中銅濃度の高値が認められた。投与後に生存していた動物における血中銅濃度は Day 33 までに投与前値まで低下した。

血漿中 AraC 及び DNR 濃度について、NS-87 投与群では Day 1 及び Day 5 の各投与日において C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は用量に依存して増加した。反復投与による蓄積性は認められなかった。非リポソーム型 AraC・DNR 混合物投与群においては、NS-87 2 units/kg 投与群と比べ、AraC の $AUC_{0\text{-}24hr}$ 及び全身クリアランスはそれぞれ約 1/100、約 100 倍であった。DNR の血漿中濃度は多くの測定時点において検出限界（30 ng/mL）以下であった。

以上のことから、本試験における無毒性量は雌雄ともに 1 units/kg 未満であると判断した。

表 2.6.6.3.2-1 Dose Levels in 2-Cycle Study in Dogs (Study 1005-0372)

Group/ Treatment	No. of Dogs/Sex		NS-87 (units/ kg)	No. of Cycles	Dose Level					
	Main	Recovery			AraC		DNR		Copper (mg/kg)	Lipid (mg/kg)
					(mg/kg)	(mg/m^2)	(mg/kg)	(mg/m^2)		
1/Control (0.9% NaCl)	3	2	0	2	0	0	0	0	0	0
2/Vehicle (empty, copper-containing liposomes)	3	0	0	2	0	0	0	0	0.3	18.54
3/Low Dose	3	0	1	2	1	20	0.44	8.8	0.1	6.18
4/Mid Dose	1	2	2	1	2	40	0.88	17.6	0.2	12.36
5/High Dose	3	2	3	1	3	60	1.32	26.4	0.3	18.54
6/Comparative Control (commercial AraC and DNR)	3	0	2	2	2	40	0.88	17.6	0	0

2.6.6.4 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。

NS-87 の有効成分である AraC と DNR の遺伝毒性について、下記の通り報告されている。

AraC はヒト白血球細胞を用いた染色体異常試験、マウスを用いた *in vivo* 試験及びマウスを用いた小核試験で染色体異常が認められている [1, 2, 3]。また、ハムスターの胚細胞又はラット由来の H43 細胞を用いた *in vitro* 形質転換試験において、遺伝子突然変異誘発性が認められている [4]。

DNR は細菌を用いた復帰突然変異試験において遺伝子突然変異誘発性が認められており、マウス *in vivo* 小核試験において染色体異常誘発性が認められている [5, 6]。

以上より、NS-87 も遺伝毒性を有すると考えられた。

2.6.6.5 がん原性試験

NS-87 のがん原性試験は実施していない。

本剤は進行がん患者の治療を目的とした医薬品であり、製造販売承認申請には必要とされない（ICH S9 ガイドライン）。

NS-87 投与後の AraC 及び DNR の代謝及び排泄は従来の非リポソーム製剤と質的に同様であると考えられる（2.6.4.5 項及び 2.6.4.6 項参照）ことから、AraC 及び DNR のがん原性情報や、それぞれのリポソーム製剤である DepoCyt 及び DaunoXome のがん原性情報から動物やヒトでのがん原性リスクを評価した。

以下に示すように、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。

（1） AraC のがん原性評価

ラットにおいて AraC はがん原性を示さないことが報告されている。

SD ラットにおける Ara-C の長期がん原性試験 [7]では、投与 1 週目には、5 及び 25 mg/kg を 5 日間反復腹腔内投与、500 mg/kg を 1 週間に 3 回間歇腹腔内投与し、その後 11 週間の休薬期間を設けた。このサイクルを 72 週間繰り返した。AraC による生存期間の短縮はみられなかった。雄ラ

ットでは 25 mg/kg/日投与群（38%）、5 mg/kg/日投与群（35%）及び 500 mg/kg 投与群（87%）において、腫瘍発現率（悪性／良性）が対照群（25%）に比べわずかに高かったが、統計学的に有意な変化ではなかった。

マウス及びラットに AraC を 125 及び 250 mg/kg の用量で週 3 回、6 ヵ月間腹腔内投与し、1 年間観察した試験[8]では、雌ラットの 50 例中 48 例が 18 ヵ月間生存した。これら 48 例のうち 18 例（38%）で腫瘍が認められ、この 18 例のうち 6 例の腫瘍は悪性（乳癌 10 例、下垂体癌 3 例、副腎癌 2 例）であった。乳癌について対照群（32%）と投与群の間に発現率の有意な差は認められなかった。生存した雄ラット 49 例のうち 13 例で腫瘍が発生し、この 13 例のうち悪性腫瘍は 3 例のみであった。マウスに AraC を 62 及び 125 mg/kg の用量で腹腔内投与したとき、18 ヵ月後の生存動物は、雌マウスで 50 例中 10 例、雄マウスで 50 例中 13 例であった。腫瘍が発生した動物は、雌マウスで 10 例中 2 例（20%）、雄マウスで 13 例中 6 例（46%）であった。ただし、マウスにおいては生存率が極めて低く、マウスにおける腫瘍発生率はがん原性評価のパラメータとして適切ではなかった。したがって、本試験条件下では、AraC ががん原性を有すると結論づける根拠はなかった。

AraC のリポソーム製剤である DepoCyt については、がん原性に特化した文献情報はなかった。

（2） DNR のがん原性評価

IARC ワーキンググループは DNR を含む細胞増殖抑制薬（抗悪性腫瘍剤）のがん原性を評価し、DNR を「Group 2B –ヒトに対する発がんの可能性がある」に分類している[9]。

公表文献では、DNR によりラットで腎臓癌及び乳癌が誘発されたとの報告がある[10]。また、SD ラットに DNR 10 mg/kg を単回静脈内投与したとき、雌ラットの 64%で複数の乳腺腫瘍（大部分は腺癌）が認められ、投与後から腫瘍発生までの期間は平均 80 日であった。雄ラットでは 37%の個体で、平均して投与 91 日後に単一の乳腺腫瘍（大部分は腺癌）が認められた[11]。

雌の SD ラットを用いた別の試験[12]では、DNR 10 mg/kg を単回静脈内投与したとき、投与後 8 ヵ月以内に 24 例中 11 例（46%）で乳腺腫瘍が認められた。組織分布試験では、投与後 24 時間までは乳腺組織に比べ肝臓、腎臓、肺、心臓及び腸で DNR 濃度が高かった。*In vitro* で DNR の代謝を乳腺組織と肝細胞とで比較したところ、肝細胞ホモジネートでは 90 分間で DNR の約 70%が代謝されたのに対し、乳腺組織ホモジネートでは代謝がみられなかった。さらに、DNR をラット乳腺に直接投与しても代謝及び全身循環への放出は生じなかった。これらの結果から、DNR を静脈内投与されたラットで主に乳腺に腫瘍が誘発されるのは、乳腺組織に DNR が滞留するためであることが示唆された。

DNR のリポソーム製剤である DaunoXome については、がん原性に特化した文献情報はなかった。

2.6.6.6 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。

NS-87 は進行がん患者の治療を目的とした医薬品であり、ICH S9 ガイドラインでは、雌雄の受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験並びに出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験は製造販売承認申請には必要とされない。

NS-87 の有効成分である AraC 及び DNR はいずれも遺伝毒性が認められている（2.6.6.4 項参照）。また、2.6.6.6（1）項及び（2）項において記載した通り、AraC ではマウス及びラットで胎児死亡率の増加、胎児発育遅延及び催奇形性が認められ、DNR ではラットで胚死亡率増加及び催奇形性が認められている。そのため、本剤は遺伝毒性を有しており、また、生殖発生毒性を誘発すると考えられる。ICH S9 ガイドラインでは、遺伝毒性が陽性で発生毒性を誘発することが既に知られている系統の医薬品について、胚及び胎児発生に関する試験は製造販売承認申請には必須とされない。

NS-87 投与後の AraC 及び DNR の代謝及び排泄は従来の非リポソーム薬と質的に同様であると考えられる（2.6.4.4 項及び 2.6.4.5 項参照）ことから、既承認薬である AraC 及び DNR、並びにこれら単剤のリポソーム製剤（DepoCyt 及び DaunoXome）の生殖発生毒性試験結果及び公表文献から NS-87 の生殖発生毒性を評価し、2.6.6.6 (1)項及び(2)項に記載した。すなわち、NS-87 の有効成分である AraC 及び DNR はいずれも胎児死亡率の増加及び催奇形性が認められていること、DNR は精巣の萎縮及び精母細胞の無形成が認められ、ゼブラフィッシュの胚において心臓に毒性を誘発すること、NS-87 として投与される AraC 及び DNR の 1 回投与量（100 units/m^2：100 mg/m^2 AraC+44 mg/m^2 DNR）は、7+3 療法での 1 回投与量（100～200 mg/m^2 AraC＋45～60 mg/m^2 DNR）と類似しているため、AraC 及び DNR による生殖毒性が減弱することはないと考えられることから、NS-87 は生殖毒性及び雄性生殖能への影響を示すと考えられる。根拠とした情報の詳細を以下に示す。

（1） AraC の生殖発生毒性評価

AraC を妊娠ラットに 0、15、30、60 及び 120 mg/kg/day の用量で妊娠 9～14 日に静脈内投与した結果、母動物では 120 mg/kg/day で体重増加抑制及び摂餌量の減少傾向が認められ、胚・胎児では 15 mg/kg/day 以上で平均胎児体重の低値、外形異常（口蓋裂、指趾異常、下顎短小、小口、短四肢、尾異常）の増加が認められ、30 mg/kg/day 以上では胎児死亡率の増加、平均生存胎児数の減少及び骨格異常（肋骨及び胸骨異常）の増加が認められた。また、AraC を妊娠マウスに 1.5、3.0、7.5、10 及び 15 mg/kg/day の用量で妊娠 7～12 日に静脈内投与した結果、母動物では 7.5 mg/kg/day 以上で体重増加抑制が認められ、胚・胎児では 1.5 mg/kg/day 以上で胎児体重の低値、3.0 mg/kg/day 以上で外形異常（口蓋裂、短四肢、指趾異常、尾異常、眼瞼閉鎖不全、内反足、鎖肛）の増加、7.5 mg/kg/day 以上で胎児死亡率の増加、平均生存胎児数の減少、骨格異常（肋骨及び胸骨異常）の増加が認められ、7.5 mg/kg/day では内臓異常（腎の欠如、発育不全）の増加が認められた [13]。

AraC を妊娠マウスに 0、0.5、2 及び 8 mg/kg/day の用量で妊娠 6～15 日に腹腔内投与した結果、母動物では 2 mg/kg/day 以上で体重増加量及び摂餌量の減少が認められ、胚・胎児では 2 mg/kg/day で指の変化が認められ、8 mg/kg/day では胎児体重の減少、生存胎児数の減少並びに早期及び後期胚吸収数の増加、口蓋裂、付属器の異形、アザラシ状奇形、短尾、無尾及び骨格異常が認められた [14]。

AraC を妊娠マウスに 12.5、25 及び 50 mg/kg/day の用量で妊娠 16～18 日に皮下投与した結果、50 mg/kg/day で小脳発生障害及び腎形成障害を示唆する低分化細胞の凝集体が認められた [15]。

AraC を妊娠ラットに 12.5、25 及び 50 mg/kg/day の用量で妊娠 18～21 日に皮下投与した結果、50 mg/kg/day で小脳発生障害、腎臓に小嚢胞性変化、尿細管拡張及び網膜形成異常が認められた[15)]。

AraC を妊娠ラットに 50 mg/kg の用量で妊娠 14 日に単回腹腔内投与した結果、同腹児体重及び脳重量が減少した。また、出生児は 25 日時点で脳に重度の発育遅滞が生じており、15 週齢で実施した T 型迷路試験では対照群に比べ、AraC 投与動物の出生児はエラー数が 80%多かったことから、迷路学習能に障害があることが示唆された。また、AraC を生後 5 日のラットに 50 及び 250 mg/kg の用量で単回腹腔内投与した結果、50 mg/kg 以上で小脳重量が減少し、小脳重量／脳重量比が低下した[16)]。

AraC を妊娠ラットにラット 2.5～900 mg/kg の用量で妊娠 5～12 日のいずれかに単回腹腔内投与した結果、催奇形性が認められた。奇形が認められた最低用量は 20 mg/kg（妊娠 11 又は 12 日に投与）、奇形として、口蓋裂、口唇裂、小顎並びに後部付属器、前肢、後肢及び尾の異形が認められた[17)]。

AraC をマウスに 160、440、660 及び 870 µg/body の用量で単回又は 5 日間腹腔内投与した結果、骨髄では 160 µg/body 以上で減数分裂細胞に対する染色体異常誘発性がみられ、また、精子では 160 µg/body 以上で精子頭部の異常及び染色体異常が用量依存的に増加した[2)]。

なお、AraC のリポソーム製剤（DepoCyt）の生殖毒性に特化した公表文献は確認できなかった。

（2） DNR の生殖発生毒性評価

DNR を 0.25 mg/kg/day の用量で雄性イヌに静脈内投与すると、精巣の萎縮及び精細管における精母細胞の全無形成が生じた[18)]。

DNR を受精 72 時間後のゼブラフィッシュに 1、10、20、50、100、200、500 µM の濃度で処置した結果、胚の 50%致死濃度は 122.7 µM であった。また、受精後 6～72 時間、24～72 時間又は 48～72 時間のいずれかの胚に処置した結果、濃度依存的に心臓管のルーピング不全、心膜の浮腫及び徐脈が誘発され、最終的に死亡に至った[19)]。

DNR のリポソーム製剤である DaunoXome を 0.3、1.0 又は 2.0 mg/kg/day の用量でラットの妊娠 6～15 日に投与した結果、母動物では 0.3 mg/kg/day 以上で痂皮、尾の赤色化又は脱色、膣の赤色分泌物及び赤色化、脱毛、2.0 mg/kg/day で母動物の死亡、活動性低下、便量の減少、軟便、眼球の蒼白、歯茎及び口唇の紫色化、痂皮、腫脹、便の着色、後肢の炎症、前肢の脱色、尾の落屑、指趾の蒼白、口周囲の炎症が認められた。胚・胎児では 0.3 mg/kg/day で胎児奇形（無眼球、小眼球及び骨化不全）、1.0 mg/kg/day で胚死亡率の増加、生存胎児数の減少及び胎児体重の低値が認められ、2.0 mg/kg/day では全ての胚が早期吸収により死亡した[18)]。

（3） AraC と DNR の併用による生殖発生毒性の可能性

AraC 及び DNR は、いずれも DNA の合成及び修復を阻害することで、細胞傷害性、DNA 損傷及び増殖中の細胞のアポトーシスを誘発する[20, 21)]。これらは精巣の精細胞のように増殖能の高い細胞で生じる。このことから、本剤投与により成人の精巣[22)]及び思春期の精巣[23, 24)]において永続

的な精子形成障害をきたすリスクがある。なお、AraC 及び DNR の併用時に、AraC 又は DNR 単独投与で認められている以外の新たな毒性が発現することはないと考えている。

2.6.6.6（1）項及び（2）項で詳述したとおり、AraC 及び DNR を単独投与したときの生殖発生への影響はよく知られている。いずれも DNA 損傷による細胞傷害作用を発揮し、細胞周期の S 期に最大の細胞傷害作用を示す。多くの細胞傷害薬と同様、AraC 及び DNR はいずれもマウス又はラットに単独投与したとき胚毒性を誘発する。AraC による胚毒性は胎児体重の低値、早期及び後期胚吸収の増加並びに生存胎児数の減少を特徴とする一方、DNR による胚毒性は胎児体重の低値を特徴とした。胚胎児発生への影響も特徴が異なっており、AraC は口蓋裂、付属肢の異形及び骨格異常（アザラシ状奇形、短尾及び無尾）を誘発することが知られている一方、DNR を妊娠中に投与すると無眼球、小眼球及び骨化不全が誘発される。いずれも単独で胚胎児発生に影響を及ぼすことから、併用による胚毒性の増強は否定できない。

（4） 幼若動物を用いた毒性試験

NS-87 は小児も含めた高リスク AML 適応を想定しているが、幼若動物を用いた毒性試験は実施しなかった。

以下に示すように、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、幼若動物を用いた毒性試験の実施は不要と判断した。

1） 非臨床における成獣及び幼若動物の安全性情報

本剤の成獣ラットあるいはイヌを用いた単回あるいは反復投与毒性試験において、血小板数や骨髄中造血細胞数の減少等の造血系に対する影響、白血球数の減少やリンパ系組織の萎縮等の免疫系に対する影響、消化管障害、各種臓器の出血が認められている（2.6.6.2 項及び 2.6.6.3 項参照）。

AraC の成獣ラットを用いた 4 週間反復投与毒性試験及び 26 週間反復投与毒性試験では、胸腺、副腎、脾臓、精巣、リンパ節、骨髄に変化が認められている [13)]。また、成獣ラットにおいて AraC の 5 日間投与により協調運動障害及び小脳における神経細胞死を示唆する変化が報告されている [25)]。AraC を幼若ラットに投与した試験では、小脳毒性に起因した協調運動障害及び小脳重量低下、精巣毒性が報告されている [13, 23, 26)]。

DNR の成獣マウスあるいはラット、イヌ、サルを用いた単回投与、9～14 日間反復投与毒性試験及び 14 週間反復投与毒性試験では、腎臓、心臓、肺、消化管、骨髄、脾臓、精巣に変化が認められている [18, 27)]。成獣あるいは幼若ラットにおいて、DNR は左心室拡張末期圧の上昇や心収縮力の低下といった心筋症を引き起こすことが報告されている [28, 29)]。また、AraC 及び DNR は、遺伝毒性及び生殖発生毒性を有することが報告されている（2.6.6.4 項及び 2.6.6.6（1）～（2）項参照）。

以上より、AraC 及び DNR の幼若動物を用いた試験で認められた標的臓器はすべて成獣を用いた試験でも同様に変化が認められていることから、本剤では幼若動物を用いた試験を実施したとしても、新たな臓器及び器官系が毒性標的となる可能性は低いと考えられる。

さらに、小児患者を対象とした海外臨床試験の最低年齢（1 歳）は、本剤の投与対象として想定している年齢である。ICH S11 ガイドラインによると、この年齢（1 歳）では、本剤の毒性標的と

して想定される免疫系及び消化管、腎臓、心血管、肺等の器官系は全て活発な成長及び成熟期間を終えた穏やかな成長段階にあることから、毒性標的として想定される器官系の感受性に成人と小児とで大きな差が生じる可能性は低いと考えられる。また、ヒトでは出生後から骨髄における造血が主体となることから、小児と成人の間で造血系に対する毒性に大きな差が生じる可能性は低いと考えられる。

2） 臨床における成人及び小児の安全性情報

本剤の有効成分である AraC と DNR は、およそ 50 年間に亘り、国内外において AML の標準治療薬として小児を含め年齢を問わず用いられており、国内外での用法・用量に明らかな差はなく、臨床での有効性及び安全性においても人種、年齢等による差はないと判断されている [30-35]。成人を対象とした海外臨床試験（CLTR0310-301 試験）において、AraC と DNR の併用投与（7+3 療法）と本剤との間で一部の有害事象の発現率に若干の差は認められたものの、全体として安全性プロファイルに明確な差は認められなかった（2.7.6.4 項参照）。

小児 18 例を対象とした海外臨床第 I 相試験（CPX-MA-1201 試験）において本剤 100 units/m^2 を投与したところ、血漿中の AraC と DNR のモル比は 5.96:1（$AUC_{0\text{-}48hr}$）を示し、成人 26 例を対象とした海外臨床第 II 相試験（CLTR0310-206 試験）において本剤 100 units/m^2 を投与したところ、血漿中の AraC と DNR のモル比は 6.36:1（$AUC_{0\text{-}48hr}$）を示したことから、小児においても成人と同様に理想のモル比である 5:1 を維持していた。また、本剤を投与した際の AraC 及び DNR の薬物動態について、成人患者と小児患者との間で明確な差異は認められなかった。

さらに、小児を対象とした海外臨床試験（CPX-MA-1201 試験及び AAML1421 試験）において、小児患者に対する忍容性が確認されており、かつ小児患者で認められた有害事象は成人患者と同様であり、本剤の安全性プロファイルにおいて年齢による明確な差異は認められなかった（2.7.4.5.1.2 項参照）。

2.6.6.7 局所刺激性試験

独立した局所刺激性試験を実施せず、ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験において、投与部位を含む詳細な一般状態観察及び病理組織学的検査を実施して評価した。2.6.6.3 項に詳述するとおり、ラット及びイヌ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、万一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 [36]。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。そのため、DNR と局所組織との相互作用が阻止されるため、局所組織傷害を引き起こすリスクは低いと考えられる。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 抗原性試験

該当試験なし。

2.6.6.8.2 免疫毒性試験

該当試験なし。

2.6.6.8.3 毒性発現の機序に関する試験

該当試験なし。

2.6.6.8.4 依存性試験

該当試験なし。

2.6.6.8.5 代謝物の毒性試験

該当試験なし。

2.6.6.8.6 不純物の毒性試験

該当試験なし。

2.6.6.8.7 その他の試験

NS-87 について、光毒性試験は実施していない。

NS-87 の有効成分である 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[37)]。

また、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（2.7.4 項参照）ため、本剤の光毒性リスクは低いと考えられたことから、非臨床光毒性試験は実施していない。

2.6.6.9 考察及び結論

非臨床毒性試験で認められた NS-87 の毒性プロファイルをもとに、以下に考察する。

（1） 単回投与毒性試験

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 以上の投与群において、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。

イヌにおける用量漸増持続静脈内投与試験では、3 units/kg 投与群（AraC：DNR として 3:1.32 mg/kg）で、活動性低下、脱水及び食欲不振が認められた。それ以外の投与用量においては、投与後には一般状態の変化は認められなかった。

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、すなわち AraC：DNR としてそれぞれ 3:1.32 及び 6:2.64 mg/kg）で投与に関連する死亡、一般状態の悪化並びにリンパ系組織におけるリンパ系細胞減少が認められた。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） 反復投与毒性試験

ラット及びイヌを用いて、2 サイクル持続静脈内投与毒性試験及び 28 日間回復性試験を実施した。いずれの試験でも、1 サイクルは 1 日おきに 3 回間歇投与とし、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 日後に解剖した。この投与スケジュールは臨床用法を基に設定した。臨床用法は、NS-87 を週 2 又は 3 回の隔日投与を、寛解導入療法、地固め療法ともに最大 2 サイクル投与し、サイクルの間は 2 週間以上の間隔をおいて投与する。なお、ICH-S9 では、「進行がん患者の治療に用いる抗悪性腫瘍薬の開発を継続するためには、予定される臨床投与スケジュールに従った 3 ヵ月間投与毒性試験の実施」が求められているが、AraC 及び DNR いずれも投与期間の延長による新規の毒性発現が認められなかったことから、本剤の有効成分について毒性は評価できていると判断した [13)]。

ラットにおける反復投与毒性試験で、NS-87 を 5、10 及び 15 units/kg の用量（AraC：DNR として 5:2.2、10:4.4 及び 15:6.6 mg/kg）で持続静脈内投与したとき、10 及び 15 units/kg 投与群（AraC：DNR として 10:4.4 及び 15:6.6 mg/kg）の用量で一般状態の悪化が認められ、瀕死期安楽殺処分又は死亡のいずれかに至った。5 units/kg 投与群（AraC：DNR として 5:2.2 mg/kg）では薬物に関連する死亡は生じなかったが、血液の毒性を示す所見が発現した。途中死亡及び瀕死期安楽殺処分のため、所見の回復性を評価することができなかった。

イヌにおける反復投与毒性試験で、NS-87 を 2 及び 3 units/kg の用量（AraC：DNR として 2:0.88 及び 3:1.32 mg/kg）で持続静脈内投与すると、一般状態の悪化により、瀕死期安楽殺処分を含む死亡に至った。生存例全例で血液毒性の徴候がみられた。回復群において上記の変化について回復傾向があることを確認した。

NS-87 の反復投与毒性試験では、検討したすべての用量で毒性所見が認められたが、これらは AraC 及び DNR の毒性標的臓器と明確な差はなく、共通して血液毒性が認められていることから、AraC 及び DNR において既知の安全性プロファイルに概ね一致していた [13)]。また、NS-87 を反復投与すると全血中銅濃度がわずかではあるものの一過性に上昇したが、イヌの単回投与毒性試験及び反復投与毒性試験における銅を含むリポソームのみを投与した群において、毒性は特に認められなかったことから、NS-87 中の銅による毒性は発現しなかったと考えられた。

（3） 遺伝毒性試験、がん原性試験、生殖発生毒性試験

NS-87 の遺伝毒性試験、がん原性試験、生殖発生毒性試験及び局所刺激性試験は実施しなかった。AraC、DNR 及びこれらのリポソーム製剤（DepoCyt 及び DaunoXome）で知られている遺伝毒性、がん原性及び生殖発生毒性並びに公表文献で利用可能な情報を参照する。

本剤の有効成分である AraC 及び DNR は既承認薬であり、いずれも遺伝毒性を有する。DNR ではヒトや動物での発がん性が認められるが、AraC では報告されていない。AraC は催奇形性、発達遅滞作用、DNR 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。

これらのことから、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。

（4） 局所刺激性試験

ラット及びイヌの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ことから、NS-87 は局所刺激性を示さないと考えられた。

（5） まとめ

本申請資料に示す非臨床毒性試験から、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。公知文献より入手可能なデータを

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、単剤である AraC 及び DNR の安全性プロファイルと一致するものであった。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。

2.6.6.10 図表

図表は、本文中の適切な場所に記載した。

2.6.6.11 参考文献

1. Kihlman BA, Nichols WW, Levan A. The effect of deoxyadenosine and cytosine arabinoside on the chromosomes of human leukocytes in vitro. Hereditas. 1963;50:139-43. ＜資料番号 4.3-13＞
2. Beaula Helen KD, Subramanyam S. Genotoxic evaluation of Ara-C by multiple parameters. Mutat Res. 1991;263:185-96. ＜資料番号 4.3-14＞
3. Hayashi M, Sofuni T, Kodama ,Y Ishidate Jr M, Tamura H. Micronucleus test with 1-β-D-arabinofuranosylcytosine administered by intraperitoneal injection and oral gavage. Mutat Res. 1989;223:345-8. ＜資料番号 4.3-15＞
4. Kouri RE, Kurtz SA, Price PJ, Benedict WF. 1-β-D-Arabinofuranosylcytosine-induced malignant transformation of hamster and rat cells in culture. Cancer Res. 1975;35:2413-9. ＜資料番号 4.3-16＞
5. Babudri N, Pani B, Tamaro M, Monti-Bragadin C, Zunino F. Mutagenic and cytotoxic activity of doxorubicin and daunorubicin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells. Br J Cancer. 1984;50:91-6. ＜資料番号 4.3-17＞
6. Madrigal-Bujaidar E, Álvarez-González I, Madrigal-Santillán EO, Morales-González JA. Evaluation of duloxetine as micronuclei inducer in an acute and a subchronic assay in mouse. Biol Pharm Bull. 2015;38:1245-9. ＜資料番号 4.3-18＞
7. Berger MR, Schmähl D. Study on the long-term toxic efficacy of cytosine-arabinoside in sprague-dawley rats. Cancer Lett. 1988;43:59-64. ＜資料番号 4.3-19＞
8. Weisburger EK. Bioassay program for carcinogenic hazards of cancer chemotherapeutic agents. Cancer. 1977;40:1935-49. ＜資料番号 4.3-20＞
9. IARC (2000), IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, *some antiviral and antineoplastic drugs, and other pharmaceutical agents*. vol.76. Lyon, France. ＜資料番号 4.3-21＞
10. Sternberg SS, Philips FS, Cronin AP. Renal tumors and other lesions in rats following a single intravenous injection of daunomycin. Cancer Res. 1972;32:1029-36. ＜資料番号 4.3-22＞

11. Bucclarelli E. Mammary tumor induction in male and female Sprague-Dawley rats by adriamycin and daunomycin. J Natl Cancer Inst. 1981;66:81-4. ＜資料番号 4.3-23＞

12. Howell SK, Stephens LC, Wang YM. Daunorubicin-induced mammary tumors in the rat. Eur J Cancer Clin Oncol. 1989;25:1549-54. ＜資料番号 4.3-24＞

13. キロサイド N 注に関する資料.〔ニ〕安全性試験.（平成 11 年 10 月承認） ＜資料番号 4.3-25＞

14. Ortega A, Puig M, Domingo JL. Maternal and developmental toxicity of low doses of cytosine arabinoside in mice. Teratology. 1991;44:379-84. ＜資料番号 4.3-26＞

15. Percy DH. Taratogenic effects of the pyrimidine analogues 5-iododeoxyuridine and cytosine arabinoside in late fetal mice and rats. Teratology. 1975;11:103-17. ＜資料番号 4.3-27＞

16. Adlard BP, Dobbing J, Sands J. A comparison of the effects of cytosine arabinoside and adenine arabinoside on some aspects of brain growth and development in the rat. Br J Pharmacol. 1975;54:33-9. ＜資料番号 4.3-28＞

17. Chaube S, Kreis W, Uchida K, Murphy ML. The teratogenic effect of 1-β-D-arabinofuranosylcytosine in the rat. Protection by deoxycytidine. Biochem Pharmacol. 1968;17:1213-6. ＜資料番号 4.3-29＞

18. Daunoxome－Drug Approval Package. ＜資料番号 4.3-30＞

19. Han Y, Zhang JP, Qian JQ, Hu CQ. Cardiotoxicity evaluation of anthracyclines in zebrafish (Danio rerio). J Appl Toxicol. 2015;35:241-52. ＜資料番号 4.3-31＞

20. Pourrajab F, Zare-Khormizi MR, Hekmatimoghaddam S, Hashemi AS. Molecular targeting and rational chemotherapy in acute myeloid leukemia. J Exp Pharmacol. 2020;12:107-28. ＜資料番号 4.3-32＞

21. Heasman SA, Zaitseva L, Bowles KM, Rushworth SA, Macewan DJ. Protection of acute myeloid leukaemia cells from apoptosis induced by front-line chemotherapeutics is mediated by haem oxygenase-1. Oncotarget. 2011;2:658-68. ＜資料番号 4.3-33＞

22. Meistrich ML. Male gonadal toxicity. Pediatr Blood Cancer. 2009;53:261-6. ＜資料番号 4.3-34＞

23. Namoju RC, Khan S, Patel RS, Shera FY, Trivedi PP, Kushwaha S, et al. Pre-pubertal exposure of cytarabine-induced testicular atrophy, impaired spermatogenesis and germ cell DNA damage in SD rats. Toxicol Mech Methods. 2014;24:703-12. ＜資料番号 4.3-35＞

24. Guillén S, Muñoz Calvo MT, Pozo Román J, Contra Gómez T, Buño Soto M, Argente Oliver J. Changes in gonadal function in post-pubertal male survivors of acute lymphoblastic leukemia and Hodgkin's disease. An Esp Pediatr. 2000;53:318-23. ＜資料番号 4.3-36＞

25. Koros C, Papalexi E, Anastasopoulos D, Kittas C, Kitraki E. Effects of AraC treatment on motor coordination and cerebellar cytoarchitecture in the adult rat: A possible protective role of NAC. Neurotoxicology. 2007;28:83-92. ＜資料番号 4.3-37＞

26. Patel RS, Rachamalla M, Chary NR, Shera FY, Tikoo K, Jena G. Cytarabine induced cerebellar neuronal damage in juvenile rat: Correlating neurobehavioral performance with cellular and genetic alterations. Toxicology. 2012;293:41-52. ＜資料番号 4.3-38＞

27. Daunorubicin hydrochloride－Drug Approval Package. ＜資料番号 4.3-39＞

28. Soga M, Kamal FA, Watanabe K, Ma M, Palaniyandi S, Prakash P, et al. Effects of angiotensin II receptor blocker (candesartan) in daunorubicin-induced cardiomyopathic rats. Int J Cardiol. 2006;110:378-85. ＜資料番号 4.3-40＞

29. Wu ZJ, Yu J, Fang QJ, Lian JB, Wang RX, He RL et al. Sodium ferulate protects against daunorubicin-induced cardiotoxicity by inhibition of mitochondrial apoptosis in juvenile rats. J Cardiovasc Pharmacol. 2014;63:360-8. ＜資料番号 4.3-41＞

30. 清井仁, 大竹茂樹, 前田嘉信, 山内高弘, 山口博樹. I 白血病 1.急性骨髄性白血病（acute myeloid leukemia: AML）. In: 一般社団法人 日本血液学会. editors. 造血器腫瘍診療ガイドライン 2018 年版補訂版. 金原出版社; 2020.＜資料番号 5.4-12＞

31. 診療ガイドライン委員会. 第 2 章 急性骨髄性白血病 AML. In: 一般社団法人 日本小児血液・がん学会. editors. 小児白血病・リンパ腫 診療ガイドライン 2016 年版. 金原出版; 2016. p. 37-54. ＜資料番号 5.4-8＞

32. National Comprehensive Cancer Network. NCCN clinical practice guidelines in oncology (NCCN Guidelines) Acute myeloid leukemia. ver.3. 2022. Available from: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx. ＜資料番号 5.4-25＞

33. キロサイド N 注審査報告書（平成 11 年 10 月 18 日付）＜資料番号 4.3-42＞

34. キロサイド注 20mg、同注 40mg、同注 60mg、同注 100mg、同注 200mg 審査報告書（令和 2 年 6 月 25 日付） ＜資料番号 4.3-43＞

35. ダウノマイシン静注用 20mg 審査報告書（令和 3 年 1 月 6 日付） ＜資料番号 4.3-44＞

36. Fidalgo JAP, Fabregat LG, Cervantes A, Margulies A, Vidall C, Roila F on behalf of the ESMO guidelines working group. Management of chemotherapy extravasation: ESMO-EONS clinical practice guidelines. Ann Oncol. 2012;23:vii167-73. ＜資料番号 4.3-45＞

37. 医薬品医療機器総合機構 [Homepage on Internet]. 副作用が疑われる症例報告に関する情報. Available from: https://www.pmda.go.jp/safety/info-services/drugs/adr-info/suspected-adr/0005.html. ＜資料番号 4.3-46＞

2.6.7 毒性試験概要表

目次

2.6.7 毒性試験概要表 1
2.6.7.1 毒性試験：一覧表 2
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の一覧表 3
2.6.7.3 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 4
2.6.7.4 毒性試験：被験物質一覧 6
2.6.7.5 単回投与毒性試験 7
2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 10
2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験 11
2.6.7.8 *In Vitro* 遺伝毒性試験 22
2.6.7.9 *In Vivo* 遺伝毒性試験 22
2.6.7.10 がん原性試験 22
2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 22
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 22
2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 22
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胎の機能に関する試験 22
2.6.7.15 幼若動物を用いた試験 22
2.6.7.16 局所刺激試験 23
2.6.7.17 その他の毒性試験 23
2.6.7.18 参考文献 23

2.6.7.1 毒性試験：一覧表

一覧表

被験物質：NS-87 (Cytarabine＋Daunorubicin)

試験の種類	動物種/系統	投与方法	投与期間	投与量（units/kg/日）	GLP適用	実施施設	試験番号	CTD記載箇所
単回投与毒性試験	ラット Sprague-Dawley	持続静脈内投与	単回	0, 5, 10, 15, 20	適	[redacted]（カナダ）	1004-3331	4.2.3.1-1（評価資料）
	イヌ Beagle	持続静脈内投与	週 1 回、4 週間	1, 2, 3, 4（用量漸増）	不適	[redacted]（カナダ）	3004-3322	4.2.3.1-2（参考資料）
	イヌ Beagle	持続静脈内投与	単回	0, 1.5, 3, 6	適	[redacted]（カナダ）	1004-3342	4.2.3.1-3（評価資料）
反復投与毒性試験	ラット Sprague-Dawley	持続静脈内投与	2 サイクル（3 回／サイクル）	0, 5, 10, 15	適	[redacted]（カナダ）	1005-0361	4.2.3.2-1（評価資料）
	イヌ Beagle	持続静脈内投与	2 サイクル（3 回／サイクル）	NS-87：0, 1, 2, 3 非リポソーム：2:0.88 mg/kg AraC:DNR	適	[redacted]（カナダ）	1005-0372	4.2.3.2-2（評価資料）
遺伝毒性試験：該当試験なし								
がん原性試験：該当試験なし								
生殖発生毒性試験：該当試験なし								
局所刺激性試験	ラット Sprague-Dawley	持続静脈内投与	2 サイクル（3 回／サイクル）	0, 5, 10, 15	適	[redacted]（カナダ）	1005-0361	4.2.3.2-1（評価資料）
	イヌ Beagle	持続静脈内投与	2 サイクル（3 回／サイクル）	NS-87：0, 1, 2, 3 非リポソーム：2:0.88 mg/kg AraC:DNR	適	[redacted]（カナダ）	1005-0372	4.2.3.2-2（評価資料）
その他の毒性試験：該当試験なし								

[redacted]：現 [redacted]

AraC=Cytarabine; DNR=daunorubicin

投与は 1 時間かけて持続静脈内投与とした。

反復投与毒性試験では、1 サイクルは 21 日間、1 日おきに 3 回の間歇投与とし、Day 1、3、5（1 サイクル目）並びに Day 22、24、26（2 サイクル目）に投与した（Day は初回投与からの日数）。

局所刺激性試験は反復投与毒性試験の中で評価した。

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の一覧表

トキシコキネティクス試験の一覧表

被験物質：NS-87 (Cytarabine＋Daunorubicin)

試験の種類	試験系	投与方法	投与量（units/kg/日）	GLP 適用	試験番号	CTD 記載箇所
ラット 2 サイクル反復投与毒性試験	ラット Sprague-Dawley	持続静脈内投与	5, 10	適	1005-0361	4.2.3.2-1 （評価資料）
イヌ 2 サイクル反復投与毒性試験	イヌ Beagle	持続静脈内投与	NS-87：1, 2, 3 非リポソーム：2:0.88 mg/kg AraC:DNR	適	1005-0372	4.2.3.2-2 （評価資料）

2.6.7.3 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

Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data (AUC)

Test Article: NS-87 (Cytarabine＋Daunorubicin)

Dose (units/kg) [a] [AraC:DNR (mg/kg)]	Study No.	Day	AUC_{0-t} (ng·hr/mL)					
			Rat (M/F)		Dog (M/F)		Human	
			AraC	DNR	AraC	DNR	AraC	DNR
1 (1:0.44)	1005-0372	1	–	–	132589/151259	72553/79547	–	–
		5	–	–	108907/121993	59938/66837	–	–
2 (2:0.88)	1005-0372	1	–	–	364713/395024	178378/211504	–	–
		5	–	–	455831/435680	188908/203138	–	–
—[b] (2:0.88)	1005-0372	1	–	–	3018/3557	NA	–	–
		5	–	–	3022/3093	NA	–	–
2.18 (2.18：0.96)	CLTR0310-206	1	–	–	–	–	1110000	499000
		5	–	–	–	–	1900000	637000
3 (3:1.32)	1005-0372	1	–	–	531756/698313	304374/400135	–	–
		5	–	–	911629/902906	430334/457412	–	–
5 (5:2.2)	1005-0361	1	1598082/1278387	444989/646256	–	–	–	–
		5	1555565/1153976	1313338/541134	–	–	–	–
10 (10:4.4)	1005-0361	1	3135371/3099705	1348911/1386307	–	–	–	–
		5	3963012/3178525	1569630/1218737	–	–	–	–

AraC=Cytarabine; BLQ = below the limit of quantification; DNR=daunorubicin

a：Test article was administered as refrigerated liquid formulation of NS-87 at a target AraC:DNR molar ratio of 5:1, except as noted.

b：Non-liposomal AraC and DNR dosed as comparative control.

Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data (C_{max})

Test Article: NS-87 (Cytarabine＋Daunorubicin)

Dose (units/kg) [a] [AraC:DNR (mg/kg)]	Study No.	Day	C_{max} (ng/mL)					
			Rat (M/F)		Dog (M/F)		Human	
			AraC	DNR	AraC	DNR	AraC	DNR
1 (1:0.44)	1005-0372	1	–	–	13600/12933	9017/9013	–	–
		5	–	–	12300/12900	7987/8867	–	–
2 (2:0.88)	1005-0372	1	–	–	28100/26500	17933/20200	–	–
		5	–	–	26233/24700	16367/18200	–	–
— (2:0.88) [b]	1005-0372	1	–	–	1710/2150	BLQ	–	–
		5	–	–	1730/1780	BLQ	–	–
21.8 (2.18:0.96)	CLTR0310-206	1	–	–	–	–	46000	23100
		5	–	–	–	–	62200	26000
3 (3:1.32)	1005-0372	1	–	–	37133/40867	26667/30000	–	–
		5	–	–	45867/39500	27833/28067	–	–
5 (5:2.2)	1005-0361	1	107317/103533	46480/45867	–	–	–	–
		5	107867/99150	42200/44720	–	–	–	–
10 (10:4.4)	1005-0361	1	212833/215667	91160/92080	–	–	–	–
		5	203333/185667	87200/77467	–	–	–	–

AraC=Cytarabine; BLQ = below the limit of quantification; DNR=daunorubicin

a：Test article was administered as refrigerated liquid formulation of NS-87 at a target AraC:DNR molar ratio of 5:1, except as noted.

b：Non-liposomal AraC and DNR dosed as comparative control.

2.6.7.4 毒性試験：被験物質一覧

使用ロット

被験物質：NS-87 (Cytarabine＋Daunorubicin)

項目		申請規格 [a]	試験バッチ [b]	
			規格	batch ID：050110BOC
純度（purity）	AraC	[redacted]～[redacted]% [c]	5.0 mg/mL ± [redacted]%	[redacted] mg/mL
	DNR	[redacted]～[redacted]% [c]	2.2 mg/mL ± [redacted]%	[redacted] mg/mL
封入率（encapsulation）	AraC	[redacted]%以上	NLT [redacted]%	[redacted]%
	DNR	[redacted]%以上	NLT [redacted]%	[redacted]%
不純物（impurity）	AraC 由来 (derived from AraC)	ウラシルアラビノシド：[redacted]%以下 その他の類縁物質：[redacted]%以下 類縁物質の合計量：[redacted]%以下	No single impurity greater than [redacted]% ([redacted]%)	[redacted], [redacted]
	DNR 由来 (derived from DNR)	ダウノルビシノール：[redacted]%以下 [redacted]：[redacted]%以下 [redacted]：[redacted]%以下 その他の類縁物質：[redacted]%以下 類縁物質の合計量：[redacted]%以下	No single impurity greater than [redacted]% ([redacted]%)	[redacted], [redacted]%
	脂質由来（[redacted]）	[redacted]：[redacted]%以下 [redacted]：[redacted]%以下	[redacted]	[redacted]
	残留溶媒（residual solvents） [redacted]	[redacted] ppm 以下	NMT [redacted]ppm	[redacted]
	残留溶媒（residual solvents） [redacted]	[redacted] ppm 以下	NMT [redacted]ppm	[redacted]
脂質含量（lipid content）	distearoylphosphatidyl choline	[redacted]～[redacted] mg/mL	[redacted] mg/mL ± [redacted]%	[redacted] mg/mL
	distearoylphosphatidyl glycerol Na	[redacted]～[redacted] mg/mL	[redacted] mg/mL ± [redacted]%	[redacted] mg/mL
	cholesterol	[redacted]～[redacted] mg/mL	[redacted] mg/mL ± [redacted]%	[redacted] mg/mL
銅含量（copper content）		[redacted]～[redacted] mg/mL	[redacted]～[redacted] mg/mL	[redacted] mg/mL

AraC=cytarabine; DNR=daunorubicin; NLT=no less than; NMT=not more than.

a：3.2.P.5.1 参照

b：単回投与毒性試験（ラット：1004-3331、イヌ：1004-3342）、反復投与毒性試験（ラット 2 サイクル：1005-0361、イヌ 2 サイクル：1005-0372）

c：100% = 5.0 mg/mL AraC＋2.2 mg/mL DNR

2.6.7.5 単回投与毒性試験

Test Article: NS-87 (Cytarabine＋Daunorubicin)

Species/ Strain	ROA (Vehicle/ Formulation)	Dose (units/kg) [AraC:DNR (mg/kg)]	No. per Sex per Group	Observed Max. Nonlethal Dose (units/kg) [AraC:DNR (mg/kg)]	Approx. Lethal Dose (units/kg) [AraC:DNR (mg/kg)]	Noteworthy Findings	Study No.
Rat/ Sprague-Dawley	IV 60-minute infusion (Saline)	0 (0:0, saline) 5 (5: 2.2) 10 (10: 4.4) 15 (15: 6.6) 20 (20: 8.8)	10/dose 5M/5F	20 (20:8.8)	NA	• No mortality, drug-related clinical signs, changes in body weight, coagulation, clinical chemistry, or urinalysis. • Compared with saline control values, a dose-dependent trend was observed in plasma copper levels collected on Day 15, but the trend was not statistically significant. • Slight to moderate decrease in WBC, RBC lymphocytes and eosinophils, and increase in neutrophils, monocytes and relative reticulocyte counts in 15 and 20 units/kg (15:6.6 and 20:8.8 mg/kg AraC:DNR) doses. • dose-related increase in splenic weight was observed in 20 units/kg (15:6.6 and 20:8.8 mg/kg AraC:DNR) dose. • Drug-related increase in spleen and liver extramedullary hematopoiesis.	1004-3331 （4.2.3.1-1）
Dog/ Beagle	IV 60-minute infusion (Saline)	Single ascending dose given once each week at: 1 (1: 0.44) 2 (2: 0.88) 3 (3: 1.32) 4 (4: 1.76)	1F	4 (4:1.76)	NA	• Decreased food consumption and activity after 3 units/kg (3:1.32 mg/kg AraC:DNR) dose. No clinical signs after 4 units/kg (4:1.76 mg/kg AraC:DNR) dose.	3004-3322 （4.2.3.1-2）

(Continued)

Species/ Strain	ROA (Vehicle/ Formulation)	Dose (units/kg) [AraC:DNR (mg/kg)]	No. per Sex per Group	Observed Max. Nonlethal Dose (units/kg) [AraC:DNR (mg/kg)]	Approx. Lethal Dose (units/kg) [AraC:DNR (mg/kg)]	Noteworthy Findings	Study No.
Dog/ Beagle	IV 60-minute infusion (Saline)	0 (0:0, (saline) 0 (0:0, vehicle) 1.5 (1.5: 0.66) 3 (3.0: 1.32) 6 (6.0: 2.64)	2/dose, 1M/1F	1.5 (1.5: 0.66)	3.0 (3.0:1.32)	• Poor condition led to premature termination of animals in the 3 and 6 units/kg (3.0:1.32 and 6.0:2.64 mg/kg AraC:DNR) groups. These animals displayed decreased food consumption after Day 2 and body weight, weakness, thin body condition, vomiting, diarrhea, loss of activity, dehydration, liquid pale/green/dark feces, presence of red liquid in feces, hypothermia, rales, pale skin color, salivation, liquid red feces, soft/liquid pale/dark feces, presence of mucoid yellow/red/white material and red liquid in the feces, presence of red liquid exiting from the nose, oral cavity and anus, retching, tremors, coughing, and pale gums after Day 5. • Blood samples for copper concentration analysis were collected once prior to treatment and on Days 2 and 15 (or earlier in pre-terminal sacrificed animals). Compared to predose, blood copper concentrations on Day 2 were elevated. • Animals terminated early had marked dark red or black mucosal discolorations in the duodenum and segments of the large intestine (cecum, colon and rectum), lymphoid hypocellularity/atrophy of the spleen and of the thymus, glandular necrosis, GI tract hemorrhage, decreased WBC, decreased platelets, decreased PHOS, and increased bilirubin (total).	1004-3342 （4.2.3.1-3）

(Continued)

Species/ Strain	ROA (Vehicle/ Formulation)	Dose (units/kg) [AraC:DNR (mg/kg)]	No. per Sex per Group	Observed Max. Nonlethal Dose (units/kg) [AraC:DNR (mg/kg)]	Approx. Lethal Dose (units/kg) [AraC:DNR (mg/kg)]	Noteworthy Findings	Study No.
(Continued)						• In the animal surviving to termination in the 3 units/kg (3.0:1.32 mg/kg AraC:DNR), microscopic findings included lymphoid hypocellularity/atrophy of the spleen. • No treatment-related gross or microscopic findings in vehicle or 1 units/kg (1.5:0.66 mg/kg AraC:DNR) dosing groups.	

AraC=cytarabine; DNR=daunorubicin; F = female; GI = gastrointestinal; IV = intravenous; M = male; NA = not applicable; RBC = red blood cell; ROA = route of administration; WBC = white blood cell; PHOS = Phosphorus, .

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

該当試験なし。

2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験

2.6.7.7.1 ラット 2 サイクル反復投与毒性試験

Title: CPX-351: A two-cycle IV infusion toxicity study followed by a 28-day recovery period in Sprague-Dawley rats		**Test Article**: NS-87 (Cytarabine+Daunorubicin)
Species/Strain: Rat/ Sprague-Dawley	**Dosing Duration**: 26 days (Dosed on Days 1, 3, 5; 22, 24 and 26)	**Study No**. 1005-0361
Initial Age: 8-9 weeks	**Duration of Postdose**: 28 days	**Location in CTD**: 4.2.3.2-1
Date of First Dose: [redacted], 20[redacted]	**Method of Administration**: IV infusion over 1 hour via surgically implanted catheter	**GLP Compliance:** Yes
		Vehicle/Formulation: 0.9% NaCl
Special Features: Samples for plasma copper concentration were analyzed from each Recovery animal on Day 27 (24 hours post start of the last infusion). A partial neurological assessment was performed on all Main animals on Day 33 (6 days following administration of the last dose) and Recovery animals.		
No Observed Adverse Effect Level: Lower than 5 units/kg		

Group	Group 1		Group 2		Group 3		Group 4	
Daily Dose (units/kg)	0 (Saline Control)		5 (5:2.2 mg/kg AraC:DNR)		10 (10: 4.4 mg/kg AraC:DNR)		15 [a] (15: 6.6 mg/kg AraC:DNR)	
Number of Animals								
Main group	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:0	F:0
Recovery group	M:5	F:5	M:0	F:0	M:0	F:0	M:15	F:15
Toxicokinetics group [b]	M:0	F:0	M:9	F:9	M:9	F:9	M:0	F:0

(Continued)

Group	Group 1		Group 2		Group 3		Group 4	
Daily Dose (units/kg)	0 (Saline Control)		5 (5:2.2 mg/kg AraC:DNR)		10 (10: 4.4 mg/kg AraC:DNR)		15 [a] (15: 6.6 mg/kg AraC:DNR)	
Noteworthy Findings:								
Died or Sacrificed Moribund	1 [c]	0	1 [c]	3 [c]	7	7	15	15
Body Weight (g) Day 29 [d]	437 (14)	273 (15)	369**(9)	281 (7)	378* (3)	259 (5)	–	–
Food Consumption (g) [e]	225 (14)	176 (15)	189** (10)	168 (10)	188** (9)	152** (10)	163** (15)	134** (13)
Hematology Day 34								
WBC×10^9L	8.51 (9)	6.49 (10)	3.51** (8)	3.52 (7)	1.04 (2)	5.08 (3)	--	--
Lymphocyte×10^9L	6.05 (9)	4.75 (10)	1.70** (8)	1.92** (7)	0.78 (1)	2.92 (1)	--	--
Eosinophil×10^9L	0.10 (9)	0.10 (10)	0.03** (8)	0.02** (7)	0.01 (1)	0.02 (1)	--	--
RBC×10^{12}/L	7.97 (9)	8.08 (10)	5.97** (8)	6.34** (7)	4.04 (2)	3.77** (3)	--	--
Hemoglobin	143 (9)	146 (10)	116** (8)	123**[f] (7)	93 (2)	81**[f] (3)	--	--
Hematocrit	0.41 (9)	0.42 (10)	0.34** (8)	0.35**[f] (7)	0.28 (2)	0.24**[f] (3)	--	--
PLT×10^9/L	1243 (9)	1113 (10)	502 (8)	562** (7)	105 (2)	320** (3)	--	--
Organ Weights (g) Day 34								
Thymus (g)	0.393 (9)	0.309 (10)	0.120 [f] (9)	0.153** (7)	0.099 (2)	0.063** (3)	--	--
Spleen (g)	0.970 (9)	0.586 (10)	0.743 (9)	0.453 (7)	0.514 (2)	0.494 (3)	--	--
Prostate (g)	1.262 (9)	--	1.024* (9)	--	0.789 (2)	--	--	--
Adrenals (g)	0.0686 (8)	0.0694 (10)	0.0754 (9)	0.0704 (7)	0.0630 (2)	0.691 (3)	--	--

(Continued)

Group	Group 1		Group 2		Group 3		Group 4	
Daily Dose (units/kg)	0 (Saline Control)		5 (5:2.2 mg/kg AraC:DNR)		10 (10: 4.4 mg/kg AraC:DNR)		15 [a] (15: 6.6 mg/kg AraC:DNR)	
Histopathology Day 34								
Hematopoietic hypocellularity of bone marrow [g] (femur)	0	0	1	0	4	4	9	8
Lymphoid hypocellularity/atrophy of spleen [g]	0	0	1	0	6	4	9	8
Lymphoid hypocellularity/atrophy of thymus [g]	0	0	4	3	8	8	8	8
Cryptal epithelium necrosis of small intestine mucosae [g]	0	0	0	0	0	0	6	2
Glandular epithelium necrosis of colon [g]	0	0	0	0	0	0	4	0

Additional Noteworthy Findings

- Clinical signs included decreased activity, decreased body temperature, labored respiration, and reduced or absent righting reflex. in the 10 units/kg (10:4.4 mg/kg AraC:DNR) and above.
- Mortality, including pre-terminal sacrifice, was observed in the 10 units/kg (10:4.4 mg/kg AraC:DNR) group and was associated with toxicity in the adrenals, kidneys, pancreas, small intestine, stomach, lymph nodes, heart, and lungs.
- Surviving animals in the 5 and 10 units/kg (5:2.2 and 10:4.4 mg/kg AraC:DNR) groups had weight loss and significant reductions in WBC and RBC parameters.
- For copper concentration analysis, blood samples were collected on Day 34 (7 days after the last dose), just prior to necropsy or on the day of unscheduled termination. A second sample was taken from surviving animals at Day 56 (28 days after the last dose). The blood copper concentration in the 5 units/kg (5:2.2 mg/kg AraC:DNR) group at Day 34 was statistically greater than the control group, but the change was small and may not be clinically significant. The increases in copper concentration in blood were noted with increased CPX-351 dose level. Animals terminated early generally had higher blood copper concentrations, suggesting that it takes several days for copper to be cleared.
- Decreases in thymic and splenic weight and increases in adrenal, kidney, and liver weights were observed, some of which were correlated with macroscopic and histological findings.

Numbers in parentheses are the number of animals evaluated. Statistical significance compared with Control group (Group 1) is designated as follows:
* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$.

a: The dose level for the 15 units/kg (15:6.6 mg/kg AraC:DNR) group (Group 4) was reduced to 10 units/kg (10:4.4 mg/kg AraC:DNR) (after the first or second dose for Main animals) due to severe clinical signs leading to mortality and pre-terminal sacrifice. Clinical signs preceding death included decreased grooming and piloerection, partial or complete ptosis, decreased activity, hunched back position, pallor, dehydration, reduced or absent righting reflex, increased or labored respiration and changes in the consistency and/or color of the feces. The surviving animals (5/sex) were reassigned as recovery animals. All animals in Group 4 were either found dead or terminated in moribund condition between Days 8 and 16.

b: Toxicokinetics of NS-87 are summarized in m2.6.5.3.3 and m2.6.5.4.1 for Day 1 and Day 5 data, respectively.

c: Deaths in the control and 5 units/kg (5:2.2 mg/kgAraC:DNR) groups (Groups 1 and 2, respectively) were considered unrelated to test/control article, but to procedural aspects of catheterization.

d: Group mean body weights on Day 29 are shown.

e: Group mean food consumption for the period of Day 1 to Day 8 are shown.

f: Statistically significant when compared with Control group (Group 1) (Dunnett's test).

g: Number of animals among the original 10/sex/group in the Main group at time of necropsy.

2.6.7.7.2 イヌ２サイクル反復投与毒性試験

Report Title: CPX-351: A 2-cycle IV infusion toxicity study in beagle dogs followed by a 28-day recovery period		**Test Article**: NS-87 (Cytarabine+Daunorubicin)
Species/Strain: Dog/ Beagle	**Duration of dosing**: 26 days (Dosed on Days 1, 3, 5 and 22, 24, 26)	**Study No.** 1005-0372
Initial Ages: 8-9 months	**Duration of postdose**: 22 days; main animals necropsied on Day 34	**Location in CTD**: 4.2.3.2-2
Date of first dose: [redacted], 20[redacted]	**Method of administration**: IV infusion over 1 hour	**GLP compliance:** Yes
	Control Formulation: 0.9% NaCl; **Vehicle Formulation**: empty copper-containing liposomes	
Special Features: Blood samples collected[a] predose, and on Days 33 and 56 for copper analysis ECG was performed pretreatment and on Day 7 and 33. Vehicle animals received liposomes containing copper but no drug. Comparative Control animals received non-liposomal formulation of both drugs (commercial formulations of non-liposomal AraC and DNR HCl for injection). AraC at 2 mg/kg was infused over 1 hour, followed by a slow, IV push injection of 0.88 mg/kg DNR (0.3 mg/ml) as DNR HCl in a dose volume of 2.9 mL/kg. The first cycle was administered on Days 1, 3 and 5, to animals of all groups, and on Days 22, 24 and 26 to Groups 1 (control), 2 (vehicle), 3 (low dose) and 6 (comparator). Due to the number of deaths and/or pre-terminal sacrifices in the high dose Group 5 (high dose) animals, the remaining animals from this group were pre-terminally sacrificed on Day 11.		
No Observed Adverse Effect Level: Lower than 1 units/kg		

（1） Group 1～3

Group	**Group 1 (Control)**		**Group 2 (Vehicle)**		**Group 3 (Low dose)**	
Daily Dose (units/kg)	0		0		1 (1:0.44 mg/kg AraC:DNR)	
No. of animals	M:5	F:5	M:3	F:3	M:3	F3:
Doses received	6	6	6	6	6	6
Died/sacrificed moribund	0	0	0	0	0	0

(Continued)

Group	Group 1 (Control)		Group 2 (Vehicle)		Group 3 (Low dose)	
Daily Dose (units/kg)	0		0		1 (1:0.44 mg/kg AraC:DNR)	
Body weight (kg)						
Day 8	13.5	11.1	13.0	11.3	11.4	11.2
Day 34 (n=3)	14.7	11.9	13.8	12.3	12.5	12.2
Day 56 (n=2)	14.6	12.3	--	--	--	--
Food consumption (g)						
Day 8	400	347	362	317	400	383
Day 33	400	387	345	341	400	400
Day 55 (n=2)	400	400	--	--	--	--
Hematology: Before Cycle 2	**M:5**	**F:5**	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**
WBC×10^9/L	11.24	9.70	11.02	12.66	9.37	9.62
RBC×10^{12}/L	6.27	6.67	6.56	6.97	5.87	5.15 *,†
PLT×10^9/L	323	334	303	338	226 §§	364
Hematology: Day 33	**M:5**	**F:5**	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**
WBC×10^9/L	9.90 §§	9.80 §	9.90 §§	10.10 §	3.41 **,††	5.30 *
RBC×10^{12}/L	6.20	6.73	6.72	7.09 §	5.71	5.77 †
PLT×10^9/L	314 §§	311 §§	278 §	346 §§	94 **,††	113 **,††
RDW %	12.2 §§	12.5 §§	12.7 §	12.1 §§	14.6 *	14.6 **,††
HDW g/L	14.6 §	14.6	14.7 §	14.7	19.4 *	19.0 *

(Continued)

Group	Group 1 (Control)		Group 2 (Vehicle)		Group 3 (Low dose)	
Daily Dose (units/kg)	0		0		1 (1:0.44 mg/kg AraC:DNR)	
Hematology: Day 56	**M:2**	**F:2**	–	–	–	–
WBC×10^9/L	11.46	9.81	--	--	--	--
RBC×10^{12}/L	6.50	6.80	--	--	--	--
PLT×10^9/L	268	367	--	--	--	--
RDW %	11.8	12.6	--	--	--	--
HDW g/L	15.4	15.8	--	--	--	--
Organ weights (g): Day 34	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**
Thymus	20.337	27.643	23.278	19.347	15.832	19.687
Spleen	45.218	63.408	38.448	84.105	53.186	54.404
Kidneys	66.092	55.964	67.566	56.201	61.956	54.047
Organ weights (g): Day 56	**M:2**	**F:2**	–	–	–	–
Thymus	11.901	21.700	--	--	--	--
Spleen	57.249	83.766	--	--	--	--
Kidneys	73.124	52.882	--	--	--	--
Histopathology: Main Necropsy	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**
Hypocellularity of bone marrow (femur)	0	0	0	0	0	0
Glandular mucosal necrosis (colon)	0	0	0	0	0	0
Lymphoid necrosis/atrophy (spleen)	0	0	0	0	0	0
Lymphoid hypocellularity/atrophy (Thymus)	0	0	0	0	0	0

(Continued)

Group	**Group 1 (Control)**		**Group 2 (Vehicle)**		**Group 3 (Low dose)**	
Daily Dose (units/kg)	0		0		1 (1:0.44 mg/kg AraC:DNR)	
Lymphoid atrophy of gut-associated lymphoid tissue (small intestine)	0	0	0	0	0	0
Cryptal epithelium necrosis of mucosae (small intestine)	0	0	0	0	0	0
Histopathology: Day 56 [b]	**M:2**	**F:2**	--	--	--	--
Hypocellularity of bone marrow (femur)	0	0	--	--	--	--
Glandular mucosal necrosis (colon)	0	0	--	--	--	--
Lymphoid necrosis/atrophy (spleen)	0	0	--	--	--	--
Lymphoid hypocellularity/atrophy (Thymus)	0	0	--	--	--	--
Lymphoid atrophy of gut-associated lymphoid tissue (small intestine)	0	0	--	--	--	--
Cryptal epithelium necrosis of mucosae (small intestine)	0	0	--	--	--	--

（2） Group 4～6

Group	**Group 4 (Mid dose)**		**Group 5 (High dose)**		**Group 6 (Comparator)**	
Daily Dose (units/kg)	2 (2:0.88 mg/kg AraC:DNR)		3 (3:1.32 mg/kg AraC:DNR)		—[c] (2:0.88 mg/kg AraC:DNR)	
No. of animals	**M:3**	**F:3**	**M:5**	**F:5**	**M:3**	**F:3**
Toxicokinetics [a]						
Doses received	3	3	3	3	6	6
Died/sacrificed moribund	1 (Day 12)	1 (Day 12)	5 (Day 7-10)	5 (Day 7-9)	0	0

(Continued)

Group	Group 4 (Mid dose)		Group 5 (High dose)		Group 6 (Comparator)	
Daily Dose (units/kg)	2 (2:0.88 mg/kg AraC:DNR)		3 (3:1.32 mg/kg AraC:DNR)		—[c] (2:0.88 mg/kg AraC:DNR)	
Body weight (kg)						
Day 8	13.4	10.9	11.7	9.5	12.1	11.6
Day 34 (n=3)	--	--	--	--	12.8	12.0
Day 56 (n=2)	14.9	12.3	--	--	--	--
Food consumption (g)						
Day 8	379	198	27 **,§	0 **,††, §§	400	329
Day 33	400	324	--	--	267	344
Day 55 (n=2)	400	338	--	--	--	--
Hematology: Before Cycle 2	**M:2**	**F:2**	–	–	**M:3**	**F:3**
WBC×10^9/L	10.54	7.95	--	--	13.32	13.40
RBC×10^{12}/L	5.24	5.33	--	--	5.68	5.81
PLT×10^9/L	192	136	--	--	421	399
Hematology: Day 33	**M:2**	**F:2**	–	–	**M:3**	**F:3**
WBC×10^9/L	8.54	8.72	--	--	3.92 **,††	4.29 *,†
RBC×10^{12}/L	6.05	5.98	--	--	5.63	5.82 †
PLT×10^9/L	301	308	--	--	147 **,†	148 **,††
RDW %	13.9	14.6	--	--	15.0 **,†	13.9 *,††
HDW g/L	21.4	20.3	--	--	20.7 *,†	17.9

(Continued)

Group	Group 4 (Mid dose)		Group 5 (High dose)		Group 6 (Comparator)	
Daily Dose (units/kg)	2 (2:0.88 mg/kg AraC:DNR)		3 (3:1.32 mg/kg AraC:DNR)		—[c] (2:0.88 mg/kg AraC:DNR)	
Hematology: Day 56	**M:2**	**F:2**	–	–	–	–
WBC×10^9/L	8.71	7.38	--	--	--	--
RBC×10^{12}/L	6.18	6.66	--	--	--	--
PLT×10^9/L	311	299	--	--	--	--
RDW %	13.3	13.9	--	--	--	--
HDW g/L	17.7	17.6	--	--	--	--
Organ weights (g): Day 34	–	–	–	–	**M:3**	**F:3**
Thymus	--	--	--	--	15.620	13.212
Spleen	--	--	--	--	54.645	45.809
Kidneys	--	--	--	--	68.199	58.420
Organ weights (g): Day 56	**M:2**	**F:2**	–	–	–	–
Thymus	26.436	25.408	--	--	--	--
Spleen	59.233	42.924	--	--	--	--
Kidneys	53.616	58.820	--	--	--	--
Histopathology: Main Necropsy	**M:1**	**F:1**	**M:5**	**F:5**	**M:3**	**F:3**
Hypocellularity of bone marrow (femur)	1	1	5	5	0	0
Glandular mucosal necrosis (colon)	0	0	5	5	0	0
Lymphoid necrosis/atrophy (spleen)	1	1	5	5	0	0
Lymphoid hypocellularity/atrophy (Thymus)	1	1	2	3	1	0

(Continued)

Group	Group 4 (Mid dose)		Group 5 (High dose)		Group 6 (Comparator)	
Daily Dose (units/kg)	2 (2:0.88 mg/kg AraC:DNR)		3 (3:1.32 mg/kg AraC:DNR)		—[c] (2:0.88 mg/kg AraC:DNR)	
Lymphoid atrophy of gut-associated lymphoid tissue (small intestine)	0	0	5	5	0	0
Cryptal epithelium necrosis of mucosae (small intestine)	0	0	5	5	0	0
Histopathology: Day 56 [b]	**M:2**	**M:2**	**--**	**--**	--	--
Hypocellularity of bone marrow (femur)	0	0	--	--	--	--
Glandular mucosal necrosis (colon)	0	0	--	--	--	--
Lymphoid necrosis/atrophy (spleen)	1	0	--	--	--	--
Lymphoid hypocellularity/atrophy (Thymus)	0	0	--	--	--	--
Lymphoid atrophy of gut-associated lymphoid tissue (small intestine)	0	0	--	--	--	--
Cryptal epithelium necrosis of mucosae (small intestine)	0	0	--	--	--	--

Additional Noteworthy Findings

- Clinical signs included decreased activity, emesis and dehydration in the 2 units/kg (2:0.88 mg/kg AraC:DNR) and above.
- NS-87 dosage at 1, 2, and 3 units/kg (1:044, 2:0.88, and 3:1.32 mg/kg AraC:DNR) were associated with poor and deteriorating condition leading to mortality including pre-terminal sacrifice on Day 7-12. Animals terminated early displayed GI toxicity, internal hemorrhaging and significant bone marrow hypocellularity consistent with the expected toxicological profile of AraC and DNR and observed in the comparator group.
- Animals surviving the full study displayed clinical signs of emesis, dehydration and changes in the color and/or consistency of feces.
- Body weight and food intake were reduced after the first dosing cycle in the 2 units/kg (2:0.88 mg/kg AraC:DNR) NS-87 and the comparator (2:0.88 mg/kg AraC:DNR) groups.
- The 1 units/kg (1:0.44 mg/kg AraC:DNR) NS-87 and the comparator (2:0.88 mg/kg AraC:DNR) groups displayed decreased WBC at Day 33, as well as reduced thymic weight. Splenic weight was increased slightly for males and reduced slightly for females in these groups.
- There were no drug-related changes in ophthalmoscopy, electrocardiography, coagulation, blood chemistry and urinalysis in the 2 units/kg (2:0.88 mg/kg AraC:DNR) and below and the comparator (2:0.88 mg/kg AraC:DNR) groups.
- The 3 units/kg (3:1.32 mg/kg AraC:DNR) NS-87 group displayed no drug-related changes in electrocardiography on Day7.
- Surviving dogs in the 2 units/kg (2:0.88 mg/kg AraC:DNR) group were dosed for 1 cycle only and had no drug-related adverse effects on Day 34, suggesting the effects of NS-87 are reversible.
- The blood copper concentration in the 3 units/kg (3:1.32 mg/kg AraC:DNR) group at Day 7-9 was statistically greater than the control group, but the change was small and may not be clinically significant. The increases in copper concentration in blood were noted with increased CPX-351 dose level. Animals terminated early generally had higher blood copper concentrations, suggesting that it takes several days for copper to be cleared.

Statistical significance is designated as follows:

* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$: Compared to Group 1 (control)

† p≤0.05, †† p≤0.01: Compared to Group 2 (vehicle)
§ p≤0.05, §§ p≤0.01: Compared to Group 6 (comparator)
a: Toxicokinetics of NS-87 are summarized in m2.6.5.3.5 and m2.6.5.4.2 for Day 1 and Day 5 data, respectively.
b: No significant histopathology findings were noted at Day 56.
c: Non-liposomal AraC and DNR dosed as comparative control

2.6.7.8 *In Vitro* 遺伝毒性試験

該当試験なし。

2.6.7.9 *In Vivo* 遺伝毒性試験

該当試験なし。

2.6.7.10 がん原性試験

該当試験なし。

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

該当試験なし。

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

該当試験なし。

2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

該当試験なし。

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胎の機能に関する試験

該当試験なし。

2.6.7.15 幼若動物を用いた試験

該当試験なし。

2.6.7.16 局所刺激試験

特記所見なし［毒性試験の概要文（2.6.6.3 項及び 2.6.6.7 項）参照］。

2.6.7.17 その他の毒性試験

該当試験なし。

2.6.7.18 参考文献

該当なし。