2.4 の略号等一覧

略語（略称）	内　容
ACD	慢性疾患に伴う貧血
ACVR1	アクチビン A 受容体 1 型
AUC	濃度－時間曲線下面積
BCRP	Breast cancer resistance protein
BMP	骨形成タンパク質
BSEP	Bile salt export pump
Caco-2	ヒト結腸癌由来細胞株
CHO	チャイニーズハムスター卵巣細胞
Cmax	最高血漿中濃度
CYP	チトクローム P450
DDI	薬物相互作用
EC50	50%有効濃度
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GMP	医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理の基準
HEK	ヒト胎児腎
hERG	ヒト遅延整流性カリウムイオンチャネル遺伝子
IC50	50%阻害濃度
IL	インターロイキン
IRAK1	インターロイキン 1 受容体関連キナーゼ 1
JAK	ヤヌスキナーゼ
Kd	解離定数
LC-MS	液体クロマトグラフィー－質量分析
LC-MS/MS	液体クロマトグラフィー－タンデム質量分析
LLOQ	定量下限
MATE1	Multidrug and toxin extrusion 1
MDCK	イヌ腎尿細管上皮細胞由来細胞株
MF	骨髄線維症
MMB	モメロチニブ
MPN	骨髄増殖性腫瘍
MTD	最大耐量
NOAEL	無毒性量
NOEL	無影響量
NZW ウサギ	New Zealand White ウサギ
OAT	Organic anion transporter
OATP	Organic anion transporting polypeptide
OCT	Organic cation transporter
OECD	経済協力開発機構
PBMC	末梢血単核細胞
P-gp	P-糖蛋白質
PK	薬物動態
SD	Sprague-Dawley
STAT	シグナル伝達兼転写活性化因子
TK	トキシコキネティクス
Tmax	最高血漿中濃度到達時間
THTR	チアミントランスポーター
UGT	ウリジン二リン酸グルクロン酸転移酵素

略語（略称）	内　容
WBC	白血球

2.4. 非臨床試験の概括評価

モメロチニブ（以下、MMB）は、Janus キナーゼ（JAK）1、JAK2 及びアクチビン A 受容体 1 型（ACVR1）／アクチビン受容体様キナーゼ 2（ALK2）の強力な低分子阻害薬である。JAK1 及び JAK2 の二重阻害により骨髄線維症（MF）及びその他の骨髄増殖性腫瘍（MPN）に伴う全身性炎症を抑制し、ACVR1 の阻害によりヘプシジン発現を減少させ、赤血球造血のための鉄利用効率を回復させる。MF 患者の約 60%は貧血であり、そのうち 45%が診断後 1 年以内に輸血依存になるとされ、残りほとんどの患者も時間の経過とともに輸血依存になる[Tefferi, 2012]。輸血への依存、並びに中等度から重度の貧血は、MF の重大な予後不良因子である[Nicolosi, 2018; Pardanani, 2013; Elena, 2011]。

本申請の目的は、MF を適応症として MMB（錠剤、100 mg、150 mg 及び 200 mg）の製造販売承認を得ることである。本申請は、MMB の本邦での最初の製造販売許可申請である。また、MMB は、米国及び欧州において承認申請を行っている。

本非臨床概括評価では、MMB が臨床症候及び貧血を有する MF 患者に安全に使用できることを裏付けるために、MMB の薬理、薬物動態（PK）及び毒性試験結果について包括的かつ重要な評価結果について述べる。臨床的に重要な非臨床情報については、添付文書（案）にも記載する。

MMB の経口製剤の最大量は 200 mg である。臨床試験（GS-US-352-0101 試験）における 200 mg 投与時のヒト曝露量に対して、ラット及びイヌに無毒性量（NOAEL）を投与したときの曝露量は、濃度－時間曲線下面積（AUC）では、ラット及びイヌでそれぞれ約 16 及び 1 倍、最高血漿中濃度（Cmax）では、雄／雌ラット及びイヌでそれぞれ約 8.4／15.8 及び 2 倍に相当した。

2.4.1. 非臨床試験計画概略

非臨床試験計画の概要を以下の項に示した。また、MMB に関連する重要な所見の要約を 2.4.5 に記載した。実施した非臨床試験の概要文及び概要表を 2.6.2 から 2.6.7 に示している。2.6.1 の表 2.6.1-1 では、薬理／薬物動態／毒性評価において MMB とその主要代謝物を記述するために用いたコード及び定義を示している。第 4 部に最終報告書の添付がない項については、理由を別紙 1 に示す。

非臨床試験は、「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン（ICH S9）」及び「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス［ICH M3（R2）］」、及び低分子化合物の開発に関連するその他のガイダンスに従って実施した。

MMB の MF 及びそれに伴う ACD 患者への経口投与を裏付けるため、MMB 及びその主要なヒト代謝物（M21）の効力を裏付ける薬理試験及び副次的薬理試験として一連の in vitro、ex vivo 及び in vivo 試験を実施し、包括的な非臨床薬理評価を実施した。また、一連の in vitro 及び in vivo（ラット及びイヌ）安全性薬理試験も実施した。MMB の薬物動態（PK）を明らかにし、毒性試験に用いる動物種の適切性を評価するために、MMB と血中主要代謝

物 M21 並びにその他の代謝物 M8 及び M19 を用いて、吸収、分布、代謝及び排泄試験を実施した。MMB の毒性試験としては、マウス、ラット、ウサギ及びイヌを用いた単回経口投与毒性試験、並びにマウス（最長 8 週間）、ラット（最長 26 週間及び休薬 10 週間）及びイヌ（最長 39 週間及び休薬 6 週間）を用いた反復経口投与毒性試験を実施した。また、遺伝毒性試験、マウス及びラットを用いたがん原性試験、in vitro 皮膚刺激性試験、ex vivo ウシ角膜を用いた眼刺激性試験、in vitro 光毒性試験、並びにマウスを用いた皮膚感作性試験を実施した。生殖発生毒性はラット及びウサギを用いて評価した。幼若動物を用いた毒性試験はラットで実施した。不純物の安全性は、ラットを用いた 4 週間反復経口投与毒性試験及び in vitro の細菌を用いた復帰突然変異試験（Ames 試験）により評価した。In vivo 毒性試験において MMB 代謝物を測定し、MMB の安全性プロファイルに及ぼす影響を評価した。

安全性薬理試験（in vivo）及び毒性試験の重要な試験はすべて経済協力開発機構（OECD）テストガイドライン及び医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に従い、OECD 加盟国で実施した。重要な試験以外の試験は、試験を実施した非臨床試験施設の標準操作手順書に従って実施した。

重要な毒性試験に用いるげっ歯類及び非げっ歯類としては、それぞれ Sprague-Dawley（SD）ラット及びビーグル犬を用いた。これらの動物種は、非臨床毒性評価に一般的に使用されており、試験施設における背景値が豊富であり、MMB の標的に対してヒトと同様の生理反応を示す。一部の試験では、Swiss マウス及び rasH2 トランスジェニックマウス並びに New Zealand White（NZW）ウサギも使用した。

MMB の臨床製剤は錠剤での 1 日 1 回経口投与であることから、投与経路は経口とした。一部の試験では、PK 及びバイオアベイラビリティを評価するため、静脈内投与で実施した。

MMB 原薬は二塩酸塩一水和物塩であり、その製剤学的特性は第 3 部に詳述した。初回 PK 試験は MMB 遊離塩基を用いて実施し、その後の試験では 3 種類の MMB 塩（二硫酸塩、メシル酸塩及び二塩酸塩）の PK を検討した。開発品は二塩酸塩である。MMB の構造を以下に示す。

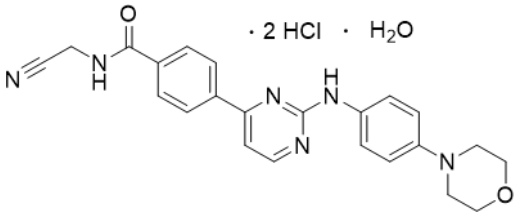


図 2.4.1-1　モメロチニブ（二塩酸塩一水和物体）の化学構造

2.4.2. 薬理試験

MMB 並びに代謝物 M19 及び M21 の効力を裏付ける試験及び薬力学的試験として、in vitro において JAK ファミリー酵素及び骨形成タンパク質（BMP）受容体キナーゼに対する

活性、並びに JAK1、JAK2 及び ACVR1 に対する選択性に関する試験を実施した。また、細胞を用いた in vitro 試験において、シグナル伝達兼転写活性化因子（STAT）リン酸化経路、JAK2 恒常的活性化細胞の増殖阻害、ACVR1 を介したヘプシジン産生及び NF-κB シグナル伝達に対する MMB の作用を検討した。In vivo においては、マウス MPN モデル及びラット ACD モデルを用いて MMB の有効性を検討した。

MMB の副次的薬理試験として、in vitro において 42 種類の酵素パネル、30 種類の受容体パネル、並びに血管作動性受容体及びカルシウムチャネルを含む限定的パネルに対する評価を実施した。また、in vitro で末梢神経機能に関連するイオンチャネル［電位依存性ナトリウムチャネル（hNav1.6、hNav1.7 及び hNav1.8）、カリウムチャネル（hHCN2）又は Shaker ファミリーカリウムチャネル（hKv1.1 及び hKv1.2）］に対する作用を検討した。MMB 及び M21 について、ヒト結腸癌由来細胞株（Caco-2）及びチアミントランスポーター（THTR）過剰発現細胞を用いてチアミン輸送阻害作用を検討した。

MMB の安全性薬理試験として、hERG 発現ヒト胎児腎（HEK）293 細胞を用いた in vitro 評価を実施し、in vivo では SD ラットを用いた中枢神経系及び呼吸系パラメータに対する作用、並びにビーグル犬を用いた心血管系に対する作用を検討した。

薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。

MMB を用いた薬理試験のデータは、薬理試験の概要文（2.6.2）に記載し、薬理試験の概要表（2.6.3）に表としてまとめた。

2.4.2.1. 効力を裏付ける試験

MMB は、JAK1 及び JAK2 の強力かつ可逆的な阻害薬であり、50%阻害濃度（IC50）は、JAK1 及び JAK2 でそれぞれ 30 及び 3.8 nM であった（2.6.2.2.1.1.）。JAK3 及び TYK2 に対する MMB の選択性を 2 回の異なる酵素アッセイで検討した結果、IC50 値は 270 及び 17.1 nM（JAK3）、260 及び 5.03 nM（TYK2）であった。これら 2 つの試験間で IC50 値が異なるのは、2 番目の試験で用いられた ATP 濃度が生理的濃度と比べて低かったことによると考えられている。JAK2 の JH1 及び JH2 ドメインを含む切断型組換えタンパク質を用いた試験において、MMB は JAK2 の WT 及び MPN の原因となる V617F 変異体の両酵素活性を阻害し、IC50 値はそれぞれ 6.6 及び 2.8 nM であった。

ヒトにおける主要な血中代謝物である M21 は、JH1 触媒ドメインのみで構成されるタンパク構造体を用いた JAK ファミリーキナーゼに対する競合結合試験において、その解離定数（Kd）値は 150 nM（JAK1）、1.1 nM（JAK2）、8 nM（JAK3）及び 1.2 nM（TYK2）であった。一方で、マイナーな血中代謝物である M19 は、同じタンパク構造体に対して弱い活性を示し、その Kd 値は 10000 nM 超（JAK1）、280 nM（JAK2）、190 nM（JAK3）及び 1200 nM（TYK2）であった。JH1 触媒ドメインタンパク構造体に対する MMB と M21 活性を直接比較すると、MMB の JAK1（28 nM）及び JAK2（0.13 nM）に対する Kd 値は、M21 の JAK1（53 nM）及び JAK2（0.79 nM）に対する Kd 値よりも小さかった。

JAK2 に対する結合動態を検討した結果、MMB 及び M21 の酵素に対する結合時間はそれぞれ 131 及び 33 秒であった。

MMB は、JAK 酵素の阻害に加えて、ACVR1 も阻害し、その IC50 値は 6.83 nM であった。ATP 非依存的競合結合試験において MMB 及び M21 を比較検討した結果、MMB 及び M21 は ACVR1 を阻害し、Kd 値はそれぞれ 8.6 及び 38 nM であった。456 種類の多様なヒトプロテインキナーゼパネルに対する MMB 及び M21 の作用に関して広範なプロファイリングを実施した結果、MMB 及び M21 は JAK1、JAK2 及び ACVR1 を選択的かつ強力に阻害し、MMB に対する M21 の薬理活性比は、JAK1/2 阻害で 34%及び ACVR1 阻害で 40%であった（2.6.2.2.1.2.、2.6.2.2.1.5.）。

ヒト初代末梢血単核細胞（PBMC）をインターロイキン（IL）-6、トロンボポエチン、又は IL-4 で刺激した後、MMB 及び M21 は JAK 酵素活性の阻害により、STAT3、STAT5 及び STAT6 の JAK1/2 によるリン酸化を抑制し、その 50%有効濃度（EC50）は MMB で 259 nM（STAT3）、59.6 nM（STAT5）及び 236 nM（STAT6）、並びに M21 で 689 nM（STAT3）、725 nM（STAT5）及び 700 nM（STAT6）であった。特に、JAK2 V617F 発現ヒト赤芽球性白血病細胞株（HEL92.1.7）において、MMB は STAT5 の恒常的なリン酸化を強く阻害し、その IC50 値は約 400 nM であった（2.6.2.2.1.3.）。

72 時間の細胞増殖アッセイにおいて、MMB は JAK2 V617F 変異導入 HEL92.1.7 細胞（IC50 値：1.805 nM）及び活性化型 JAK2 発現 Ba/F3 マウス骨髄細胞（IC50 値：798 nM vs 親細胞における IC50 値：1430 nM、活性化型 JAK3 発現細胞における IC50 値：2425 nM）の増殖を強力かつ選択的に阻害した（2.6.2.2.1.4.）。一方、JAK 経路に依存しない 10 種の多様な腫瘍細胞株では、MMB による増殖阻害作用は 3 μM の試験濃度においてほとんどみられなかった。

上記に要約した MMB の効力及び特異性の結果から、MMB は、JAK 阻害作用を示す濃度及び JAK 依存性の下流シグナル伝達を阻害する濃度で用いた場合には、非特異的作用をほとんど示さないと考えられた。

MMB は、BMP などの JAK 非依存性細胞内シグナル伝達にも影響を及ぼすことが示された。BMP は、BMP 受容体（ACVR1 を介した SMAD1/5/8 シグナル伝達を含む）を活性化することにより、肝細胞におけるヘプシジン転写誘導の調節に中心的な役割を果たしている。HepG2 ヒト肝癌由来細胞株において、MMB 及び M21 により BMP6 刺激によるヘプシジン RNA 転写量が濃度依存的に減少し、その EC50 値はそれぞれ 652 nM 及び 1420 nM であった（2.6.2.2.1.4.2.）。これらのデータは、MMB、並びに MMB より程度は小さいものの M21 が ACVR1 を介するヘプシジン発現を調節することにより、鉄ホメオスタシスを回復させる可能性があることを示唆している。

また、MMB は NF-κB 調節因子及び NF-κB によるその後の様々な細胞応答の誘導を阻害することにより、炎症を制御する上で広い役割を果たすと考えられる。NF-κB レポーター-HEK293 細胞株において、MMB 及び M21 は NF-κB レポーター活性を阻害し、その IC50 値はそれぞれ 600 nM 及び 2900 nM であった（2.6.2.2.1.4.3.）。競合結合試験において、MMB 及び M21 は、NF-κB 発現を活性化するキナーゼである IKK-α、IKK-β 及び IKK-ε、並びに

IRAK1 の活性部位でのリガンド結合を阻害し、MMB の Kd 値はそれぞれ 0.73、1.9、34 及び 7.7 nM、M21 の Kd 値はそれぞれ 0.28、0.88、24 及び 5.8 nM であった。これらのデータから、MMB は、JAK 阻害作用に加えて、MF に伴う炎症に対しても治療的役割を示すと考えられた。

MMB は、赤血球系前駆細胞（IC50 値：0.90～1.21 μM）及び骨髄系前駆細胞（IC50 値：0.81～1.29 μM）の増殖に対して同様の効力を示した。一般的に、赤血球系及び骨髄系前駆細胞のコロニー形態（大きさ及び密度）に影響が見られた場合は、MMB の毒性がみられたと判断した（2.6.2.2.1.4.4.）。

JAK2 V617F 変異によるマウス MPN モデルにおいて、MMB の投与後 6 日に用量依存的に白血球増加が改善し、投与後 20 日には、MMB 投与開始時にみられたヘマトクリット値の増加を改善し、用量依存的な脾腫の縮小及び脾臓重量の正常化が認められた（2.6.2.2.2.1.）。骨髄では造血が回復し、lineage 陰性（Lin-neg）KIT+/CD34+細胞（前駆細胞）及び KIT+/CD34-細胞（造血幹細胞及び初期前駆細胞）が脾臓において減少し、骨髄においては増加した。MMB は、対照動物に比べて炎症性サイトカイン（IL-17、IL-3 及び IP-10 など）の濃度を低下させたことから、本モデルにおける MMB の作用として NF-κB の阻害が考えられた。

ラット ACD モデルにおいて、MMB は肝臓の STAT3 及び pSMAD1/5/8 レベルを低下させ、血清ヘプシジンの低下及び血清鉄の増加を伴うような肝臓ヘプシジン遺伝子（Hamp）の転写を抑制し、骨髄の成熟赤血球数を増加させた。貧血ラットへの MMB 投与により、脾臓の IL-6 mRNA レベルは減少し、この結果は炎症性サイトカインに対する MMB の既知の抑制作用と一致した（2.6.2.2.2.2.）。

これらの in vivo 試験で得られたデータは in vitro での知見と一致しており、MMB は MPN モデルの炎症関連マーカーを低下させ、ヘプシジンの調節を介して ACD に有効であることを裏付けている。

2.4.2.2. 副次的薬理試験

MMB の副次的薬理試験として、複数の in vitro 試験を実施した。42 種類の酵素パネルに対して、MMB はキナーゼ酵素の PDE4（IC50 値：16.4 μM）及びウリジン二リン酸グルクロン酸転移酵素（UGT）1A1（IC50 値：0.3 μM）に対してのみ意義のある阻害作用を示した（2.6.2.3.1.）。ラットを用いた 26 週間反復投与毒性試験でビリルビンの増加及びそれに伴う病理組織の変化が認められたが、イヌを用いた 39 週間反復投与毒性試験では認められず（2.6.6.3.）、臨床試験（5382-PKPD001）ではビリルビン増加と曝露量に相関は認められなかった。

30 種類の受容体パネル試験において、MMB は、アデノシン、アドレナリン、ドパミン、ムスカリン、ニコチン、イミダゾリン、γ-アミノ酪酸、N-メチル-D-アスパラギン酸、オピオイド μ、プロスタノイド及びシグマを含む受容体に対して有意な阻害を示さなかった（対照値の 50%以下と定義）。また、GPCR103、ヒスタミン H1、ホルボールエステル及びロリ

プラム受容体に対しても有意な阻害を示さず、L 型カルシウムチャネル、ATP 感受性カリウムチャネル、hERG チャネル及びナトリウムチャネル site 2 及びノルエピネフリントランスポーターに関しては影響を与えなかった（2.6.2.3.2.）。同様に、血管作動性受容体及びカルシウムチャネル（すなわち、アドレナリン α 及び β、アンジオテンシン AT1、並びにジヒドロピリジン、ベンゾチアゼピン及びフェニルアルキルアミン L 型カルシウムチャネル）に対して、試験濃度（10 μM）の MMB は有意な阻害を示さなかった（2.6.2.3.3.）。ラットを用いた 26 週間反復投与毒性試験（2.6.6.3.2.）において、尾神経及び指神経の可逆的かつ軽度の伝導速度低下がみられたため、神経学的に発現が知られている他のイオンチャネルの影響を検討した。試験濃度（3 μM）の MMB は、電位依存性ナトリウム（hNav1.6、hNav1.7 及び hNav1.8）、カリウム（hHCN2）及び Shaker ファミリーカリウム（hKv1.1 及び hKv1.2）チャネルを阻害しなかった（2.6.2.4.1.）。

また、MMB 及び M21 は、Caco-2 及び THTR 過剰発現細胞を用いたチアミン輸送を阻害しなかった（2.6.2.3.4.）。

これらの in vitro 試験の結果から、MMB を予定臨床用量・用法で投与したときのヒトにおける推定血漿中曝露量において、上記の副次的薬理作用に起因した毒性が発現する可能性はないと考えられた。

2.4.2.3. 安全性薬理試験

雄 SD ラットに最大 250 mg/kg を単回強制経口投与し、投与後 24 時間における定性的神経学的パラメータ（2.6.2.4.2.）又は呼吸機能（1 回換気量、呼吸数、分時換気量）（2.6.2.4.4.）を評価した結果、MMB に関連した悪影響は認められなかった。なお、ラット 4 週間反復経口投与毒性試験の雄 100 mg/kg 群における投与 1 日の Cmax 値（21900 ng/mL；推定遊離薬物濃度として 547.5 ng/mL）は、MF 被験者に臨床最大用量である 200 mg を投与したときの平均 Cmax 値（479 ng/mL；推定遊離薬物濃度として 92 ng/mL）の 6 倍であった（GS-US-352-0101）。

MMB は hERG チャネルをわずかに阻害し、その IC50 値は 10 μM 超であった。これは、MF 被験者の Cmax 値［推定遊離薬物濃度：0.22 μM（92 ng/mL）］の 45 倍であった（2.6.2.4.3.1.）。

テレメトリーシステムを装着した覚醒下の雄ビーグル犬を用いた心血管系試験において、ラテン方格法を用いて MMB を 0（媒体）、5、30 及び 100 mg/kg を単回強制経口投与した結果、平均動脈圧の用量依存的な低下が認められ、投与後 12 時間で最大 18%（30 mg/kg）、投与後 4 時間で最大 29%（100 mg/kg）の低下がみられた。また、100 mg/kg において PR 及び RR 間隔の短縮を伴う心拍数の顕著かつ持続的な増加が認められ（投与後 6 時間で最大 59%の増加）、QT 間隔の顕著な短縮が投与後 6 及び 12 時間に認められた。この QT 間隔の変化は心拍数の変化によるものであり、MMB が心伝導に直接作用したものではないと考えられた。QRS 幅に影響は認められなかった（2.6.2.4.3.2.）。なお、ビーグル犬を用いた 4 週間反復経口投与毒性試験（2.6.6.3.4.2.）における雄 100 mg/kg/day 群の平均

Cmax 値（1810 ng/mL；推定遊離薬物濃度として 348 ng/mL）は、MF 被験者の Cmax 値（479 ng/mL；推定遊離薬物濃度として 92 ng/mL）の約 4 倍であった（GS-US-352-0101）。臨床試験においては、MMB の血漿中濃度に対して ΔΔQTcF のプロットはわずかに負の傾き（0.002）を示したため、MMB の血漿中濃度と ΔΔQTcF の間に臨床的に意義のある相関はないと判断した（2.5.3.4.）。

2.4.2.4. 薬力学的薬物相互作用試験

MMB を用いた薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

2.4.3. 薬物動態

マウス、ラット、ウサギ及びイヌを用いた毒性試験において、MMB 並びに代謝物 M8、M19 及び M21 の血漿中濃度を測定した。^{14}C-MMB 経口投与後の放射能を測定し、MMB の吸収、分布、代謝及び排泄を評価した。

Caco-2 細胞単層膜を用いて、頂端膜側から基底膜側への MMB の透過性を測定した。MMB を Swiss マウスに単回経口及び腹腔内投与、並びに野生型 001178-W マウスに単回経口投与したときの PK パラメータを評価した。また、SD ラット又はビーグル犬に単回経口及び静脈内投与したときの PK パラメータ及びバイオアベイラビリティを評価した。

マウス、ラット、イヌ及びヒト血漿を用いて、MMB 並びに代謝物 M8、M19 及び M21 の血漿蛋白結合率を評価した。また、ヒト肝ミクロソームにおける MMB、M8、M19 及び M21 の蛋白結合率を評価した。MMB の in vitro 血液／血漿中濃度比をラット及びヒト全血を用いて評価した。雄 SD（白色）及び Long Evans（有色）ラットに ^{14}C-MMB を単回経口投与したときの放射能の組織分布を、定量的全身オートラジオグラフィー又は液体シンチレーションカウンタにより測定した。雄 Swiss マウスに MMB を静脈内投与し、脳への取り込みを検討した。SD ラットを用いた出生前及び出生後の発生に関する試験において MMB の乳汁移行性を検討した。

MMB の安定性は、ラット及びヒト全血中でインキュベートすることにより評価した。^{14}C-MMB の代謝について Aroclor 1254 誘導ラット肝 S9 を用いて評価した。MMB の肝代謝速度を凍結肝細胞及び肝ミクロソームを用いて in vitro で評価した。非選択的チトクローム P450（CYP）阻害薬 1-アミノベンゾトリアゾールがヒト肝ミクロソームにおける MMB の安定性に及ぼす影響を測定することにより、MMB のヒト肝代謝に対する酸化的代謝の相対的寄与率を in vitro で評価した。マウス、ラット及びイヌに ^{14}C-MMB を単回経口投与したときの MMB の代謝を検討した。

無処置雄 CD1 マウス、並びに無処置又は胆管カニュレーションを施した SD ラット及びビーグル犬に ^{14}C-MMB を単回経口投与した後の放射能の排泄量及び経路を評価した。

ヒト肝ミクロソームを用いて、MMB、M8、M19 及び M21 が CYP 阻害により他の薬物の代謝に影響を及ぼす可能性について検討した。ヒト UGT1A1、UGT1A3、UGT1A4、UGT1A6、UGT1A9 及び UGT2B7 を含むミクロソームにおいて、MMB、M8、M19 及び M21

が抱合酵素を阻害する可能性について検討した。ヒト凍結肝細胞を用いて、MMB、M8、M19 及び M21 が薬物代謝酵素及びトランスポーターを誘導する可能性を in vitro で評価した。

野生型並びに P-gp 及び BCRP を過剰発現するイヌ腎尿細管上皮細胞由来細胞株（MDCKII）を用いて、MMB、M8、M19 及び M21 が P-糖蛋白質（P-gp）及び Breast cancer resistance protein（BCRP）の基質となる可能性を in vitro で評価した。トランスポーター発現及び非発現のチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）を用いて、既知の取り込み阻害薬の非存在下及び存在下で、MMB、M8、M19 及び M21 がヒト肝薬物取り込みトランスポーターの基質か否かを明らかにするために、いくつかの in vitro 試験を実施した。MMB、M8、M19 及び M21 によるトランスポーターの濃度依存的阻害を、モデル基質を用いて in vitro でトランスポーター発現細胞及び膜小胞において評価した。

がん原性試験のため、雄 SD ラットに MMB 及び M21 を併用投与したときの単回経口投与 PK 試験を実施した。

MMB を用いた PK 試験成績は、2.6.4（薬物動態試験の概要文）及び 2.6.5（薬物動態試験概要表）に示す。

2.4.3.1. 分析法

マウス、ラット、ウサギ及びイヌを用いた非臨床 PK 試験における MMB 及びその代謝物の血漿中濃度（雌マウスでは血清を使用）を液体クロマトグラフィータンデム質量分析（LC-MS/MS）又は液体クロマトグラフィー質量分析（LC-MS）法により定量した。GLP 試験で得られたマウス、ラット及びイヌの血漿中濃度は、バリデートされた LC-MS/MS 法（2.6.4.2）により測定した。

バリデートされていない高感度の液体クロマトグラフィーに基づく分析法により、単回投与 PK 試験（非 GLP）、並びに Caco-2 膜透過性、血漿蛋白結合及び代謝物プロファイリングに関する試験における血漿中の MMB 及び代謝物を定量した。

PK 及びトキシコキネティクス（TK）データの解析にはノンコンパートメント法を用いた。

2.4.3.2. 吸収

Caco-2 細胞単層膜における頂端膜側から基底膜側への MMB の透過性は、10 及び 30 μM で高く、ヒトにおける MMB の腸管吸収は高い可能性が示された。30 μM で排出比が低かったことから、高濃度では排出トランスポーターの飽和により、透過性が濃度依存的に変化する可能性が示唆された（2.6.4.3.1）。

Swiss マウスに MMB（遊離塩基）の 10 mg/kg を単回腹腔内又は経口投与したときの AUC は同程度であった。MMB を経口投与したときの AUC は、20～50 mg/kg において用量比を上回って増加した。雄 001178-W マウスに MMB の 500 mg/kg までを単回経口投与したとき、10～30 mg/kg では、MMB、M19、M20 及び M21 の AUC は用量比を上回って増加し

た。30～100 mg/kg では、MMB 及び M19 は用量比を上回って増加したが、M20 及び M21 は用量比を下回って増加した。100～300 mg/kg では、MMB、M19、M20 及び M21 は用量比を下回って増加した（2.6.4.3.2.1）。

雄 SD ラットに MMB（遊離塩基）を単回静脈内投与したとき、見かけの消失半減期は 8～24 時間と長く、分布容積は中等度であり、血漿クリアランスは低かった。MMB 経口投与後の吸収は比較的遅く、Tmax は投与後約 2 時間であり、MMB のバイオアベイラビリティは高かった（>100%）（2.6.4.3.2.2.1）。ラットに MMB の懸濁液を単回経口投与したときのバイオアベイラビリティは、MMB（遊離塩基）の溶液を投与したときよりも低かった（2.6.4.3.2.2.2）。溶解性が高い塩の吸収に及ぼす影響について検討するため、雄 SD ラットに MMB の二硫酸塩、メシル酸塩又は二塩酸塩（遊離塩基換算で 20 mg/kg）溶液を単回経口投与した（2.6.4.3.2.2.3）。MMB の血漿中濃度を比較した結果、いずれの塩においても比較的高いバイオアベイラビリティを示した［二硫酸塩（119%）、メシル酸塩（47%）及び二塩酸塩（70%）］。二硫酸塩ではラットにおいて毒性が強く認められたため、その後の開発には二塩酸塩を選択した。

雄ビーグル犬に MMB 二塩酸塩を経口及び静脈内投与（遊離塩基換算でそれぞれ 20 及び 5 mg/kg）したとき（2.6.4.3.2.3.2）、絶食下における MMB のバイオアベイラビリティは低かった（21%未満）。摂食下では Tmax は遅く（摂食及び絶食下での Tmax はそれぞれ 3 及び 1 時間）、AUC は絶食下の約 2 倍であったことから、イヌにおける MMB 二塩酸塩のバイオアベイラビリティは、食後に投与することにより増加することが示唆された。イヌに静脈内投与したとき、消失半減期は 0.7 時間と短く、クリアランスは 1.8 L/h/kg、分布容積は 2.4 L/kg であった。

以上のように、ラット及びイヌともに、MMB のいずれの塩においても経口投与したときのバイオアベイラビリティは比較的高かった。経口投与後の吸収は比較的遅く、MMB の血漿中半減期は動物種によって異なっていた。

2.4.3.3. 分布

MMB、M8、M19 及び M21 は、すべての動物種の血漿で中等度～高度の蛋白結合率を示し、他の動物種と比べてラットで高かった（2.6.4.4.2.1）。MMB の非結合率はマウスで 11.8%、ラットで 2.5%、イヌ及びヒトで 19.2%であった。M8、M19 及び M21 の非結合率は、0.9～66.6%であった。ヒト肝ミクロソームにおける MMB、M8、M19 及び M21 の結合率は低く、非結合率は MMB で 92.7%、M8、M19 及び M21 で 81.5～100%であった（2.6.4.4.2.2）。MMB の in vitro 血液／血漿中濃度比は、ラット及びヒトで約 1 であり、赤血球及び血漿に同程度に分布することが示唆された。この結果はヒトにおいて ^{14}C-MMB 由来の in vivo 血液／血漿中 AUC 比が約 0.7～0.9 であることと一致していた（GS-US-352-1149 試験）。

雄 SD（白色）及び Long Evans（有色）ラットに ^{14}C-MMB（80 mg/kg、100 μCi/kg）を単回経口投与したとき（2.6.4.4.1）、血液及び血漿中の ^{14}C-MMB 由来放射能の Tmax は投与後

4 時間であり、その後、投与後 120 時間まで血漿中濃度は低下した。MMB 由来放射能は広く組織に分布し、SD 及び Long Evans ラットで類似していた。放射能が最も高かったのは消化管内容物であった。いずれの時点においても、骨、脳、脊髄及び精巣では放射能は定量できなかったことから、^{14}C-MMB 由来放射能の血液脳関門及び血液精巣関門の通過性は低いことが示唆された。Long Evans ラットでは皮膚（有色）及び眼のブドウ膜を除き、投与後 72 時間までに組織から放射能が消失し、可逆的な結合が示唆された。皮膚（有色）及び眼のブドウ膜中の放射能は、徐々に低下したが、投与後 168 時間でも定量可能であった。ラットに ^{14}C-MMB を経口投与したときの脳内濃度が低かったことと一致して、Swiss マウスに 5 mg/kg を静脈内投与したときの脳内への MMB の取り込みは低く、投与後 60 分の脳／血漿中濃度比は約 0.215±0.036 であった（2.6.4.4.4）。SD ラットを用いた出生前及び出生後の発生に関する試験では、MMB は M19 又は M21 にほとんど変換されなかった。MMB の分娩後 10 日の母動物の血漿中 AUC は、出生児の約 4～8 倍であった（2.6.4.4.5）。

2.4.3.4. 代謝

MMB（500 ng/mL）はラット及びヒト全血中で安定であった（2.6.4.5.1.1）。Aroclor 1254 誘発ラット肝 S9 中で ^{14}C-MMB をインキュベート後のプール試料における総放射能の 72.2%（1.32 μM）及び 5.2%（0.10 μM）が、それぞれ未変化体及び代謝物 M17 であった。代謝物 M19 及び M20 は共溶出し、総放射能の約 8.1%であった。M11（デスアセチレンモルホリン体）は総放射能の 14.4%に相当した（2.6.4.5.1.2）。動物及びヒトの肝ミクロソーム並びに肝細胞における MMB 代謝速度は低～中等度であり、代謝の程度に明らかな種差はないことが示された（2.6.4.5.1.3）。ヒト肝細胞における MMB の消失には、CYP3A［寄与率（fm）：0.36）］、CYP2C8/CYP2C19/CYP2C9（fm：0.16～0.2）、CYP1A2（fm：0.1）が関与しており、ヒト肝細胞における M21 の生成には、CYP による生体内変化とそれに続くアルデヒドオキシダーゼによる代謝が関与していた。M21 の生成に関与する CYP 分子種は、MMB の代謝に関与するものと同じであったが、CYP1A2 の寄与がより大きく（fm：約 0.2）、CYP2C9 の寄与はより小さかった（fm：0.1）（2.6.4.5.1.4）。

マウス、ラット及びイヌに ^{14}C-MMB を単回経口投与したときの主要な代謝経路は酸化及び加水分解であった。ヒト血漿中の主代謝物は M21 であり、その他の代謝物はいずれもマイナーであった（2.7.2）。血漿中代謝物について、ヒトに対する動物の相対的曝露量を算出したところ、種を越えて存在する主要な代謝物は、M19（MMB のアミド加水分解体）、M20（モルフォリノ開裂体）及び M21（モルフォリノラクタム体）であった。血漿中 M19 はヒトよりもイヌ及びラットで多く、M20 はヒトよりもラットで多かった。ヒト血漿中の主要代謝物である M21 は、20 mg/kg 投与時のラット血漿中の 4.5 倍、80 mg/kg 投与時のラット血漿中の 2.1 倍であり、イヌでは検出されなかった。M8 はヒトでは主要な代謝物ではないが、ラットではわずかに検出され、イヌでは検出されなかった。M8 の曝露量はラットよりもヒトで大きかった。

MMB が M19 に加水分解されると、同時にアミノアセトニトリルが生成し、これが代謝を受けてシアン化物が生成する。MMB の in vitro 及び in vivo プロファイリングの結果、ラット及びイヌでは、M19 を生成するアミド結合の開裂が主要な代謝経路であるが、ヒトでは主要な代謝経路ではなく、ヒトでの曝露量については安全性上のリスクが低いことが示された（2.6.4.5.2.1）。臨床試験（CCL09101 試験）で採取した血漿試料についてチオシアン酸塩を測定したところ、臨床的に意義のある量ではないと判断された（2.6.6.8.4）。

2.4.3.5. 排泄

無処置の雄 CD-1 マウス、並びに無処置又は胆管カニュレーションを施した SD ラット及びビーグル犬に ^{14}C-MMB を単回経口投与したときの、放射能の平均累積総回収率は、いずれの動物種でも 91%超であり、そのほとんどが投与後 48 時間以内に回収された。無処置動物における排泄経路は動物種間で一致しており、主に糞中（投与量の 70%超）であり、尿中はわずかであった（投与量の 15%未満）。胆管カニュレーションを施したラット及びイヌにおける胆汁中への排泄は、投与量のそれぞれ 33 及び 42%であった（2.6.4.6）。これらの結果は、200 mg の ^{14}C-MMB を経口投与したヒトマスバランス試験の結果と一致しており、^{14}C-MMB は尿中（～27.5%）よりも主に糞中（～69.3%）に排泄された（2.7.2.2.3.1.3）。

2.4.3.6. 薬物動態学的薬物相互作用

代謝物 M21 のヒト血漿中 AUC が薬物関連物質の総 AUC の 10%超であり、また、M8 及び M19 の AUC が MMB の AUC の 25%超であったことから、M8、M19 及び M21 が CYP 及びトランスポーターを介した薬物相互作用（DDI）を引き起こす可能性について in vitro で検討した（2.6.4.7）。

ヒト肝ミクロソームにおいて、MMB は CYP2B6 の弱い可逆的阻害薬（IC50=9.6 μM）であり、M8、M19 及び M21 は CYP 分子種を阻害しなかった（いずれも IC50>100 μM）（2.6.4.7.2.1）。評価した条件下において、MMB、M8、M19 及び M21 は CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4 に対して時間又は代謝依存的阻害を示さず、in vivo において MMB 投与により DDI が生じるリスクは低いことが示唆された。

ヒト UGT1A1、UGT1A3、UGT1A4、UGT1A6、UGT1A9 及び UGT2B7 を含むミクロソームにおいて、MMB による UGT 阻害は、UGT1A1 及び UGT1A9（それぞれ IC50 が 0.9 及び 4.2 μM であった）を除き、弱い又は検出不可であった（IC50≥43.9 μM）。M8、M19 及び M21 による UGT 阻害は、M21 による UGT1A1 阻害（IC50=15.9 μM）を除き、すべての UGT に対して弱い又は検出不可であった（IC50≥39.8 μM）。MMB は、ヒト UGT1A3、UGT1A4、UGT1A6 又は UGT2B7 の阻害を介した DDI を引き起こさないと考えられる（2.6.4.7.2.2）。

3 名のドナー由来のヒト凍結肝細胞において、MMB 及び代謝物（M8、M19 及び M21）の細胞毒性を示す濃度まで検討した結果、MMB、M8、M19 及び M21 は CYP3A4、CYP2C8、

CYP2C9 又は P-糖蛋白質（P-gp）の mRNA レベルの有意な変化を誘発しなかった。CYP1A2、CYP2B6、CYP2C19 及び UGT1A1 の mRNA レベルに一貫した変化は認められなかった。ヒト血漿に対する結合が中等度であることを考慮すると、ヒトにおいて MMB 経口投与後の血漿中濃度で臨床的に意義のある誘導が生じる可能性は低いと考えられる（2.6.4.7.2.3）。

P-gp 及び BCRP 過剰発現 MDCKII 細胞において、MMB（10 μM）及び M21（1 μM）は P-gp 及び BCRP の基質であり、これらの細胞では野生型 MDCKII 細胞と比べて MMB 及び M21 の排出比が増加した。P-gp 及び BCRP の輸送を受けることと一致して、既知の P-gp 及び BCRP 阻害薬の存在下で排出比は減少した（2.6.4.7.1.1）。M8（1 μM）は P-gp 及び BCRP のいずれの基質でもなく、M19（1 μM）は BCRP の基質であったが、P-gp の基質ではなかった。また、MMB、M19 及び M21 はトランスポーター発現 CHO 細胞においてヒト Organic anion transporting polypeptide（OATP）1B1 及び OATP1B3 の基質であったが、Organic cation transporter（OCT）1 の基質ではなかった（2.6.4.7.1.2）。

トランスポーター発現細胞及び膜小胞を用いた検討において、以下の結果が示された（2.6.4.7.2.4）。

- MMB（0.7～72 μM）は BCRP を阻害し（IC50＝2.9 μM）、10 μM において Multidrug and toxin extrusion 1（MATE1）を介する輸送を 34%阻害した。MMB（15 μM）は、P-gp、Organic anion transporter（OAT）1 及び OAT3、OCT1 及び OCT2、OATP1B1 及び OATP1B3 並びに Bile salt export pump（BSEP）を介するプローブ基質の輸送を阻害しなかった。
- M21 は OATP1B1 及び OATP1B3 を濃度依存的に阻害した（IC50 はそれぞれ 8.4 及び 8.5 μM）。また、10 μM において OCT1、OCT2 及び BSEP を介する輸送をそれぞれ 21、15 及び 19%阻害した。MATE1 に対する IC50 は 2.4 μM であった。OAT1 又は OAT3 に対しては濃度依存的な阻害を示さず、P-gp 及び BCRP を介する輸送を阻害しなかった。
- M19 は OATP1B1 及び OATP1B3 を濃度依存的に阻害した（IC50 はそれぞれ>10 及び 8.0 μM）。10 μM において、BSEP 及び OAT1 を介する輸送をそれぞれ 16 及び 18%阻害したが、P-gp 及び BCRP を介する輸送を阻害せず、OAT3、OCT1、OCT2 及び MATE1 に対する濃度依存的な阻害は認められなかった。
- M8 は OATP1B1 を阻害し（IC50＝29.6 μM）、OATP1B3 を介する輸送を 40 μM で 30%阻害した。また、OCT1 及び MATE1 を介する輸送を阻害した（IC50 はそれぞれ 30 及び 24 μM）。OCT2 及び OAT1 を介する輸送を 40 μM で最大 27%阻害した。OAT3 又は BSEP を介する輸送を 40 μM で阻害せず、P-gp 又は BCRP を介する輸送を濃度依存的に阻害しなかった。

上記のとおり、これらのトランスポーターを阻害するのに必要な MMB 濃度は、in vitro において JAK 活性を阻害するのに必要な MMB 濃度よりもはるかに高かった。

In vitro 阻害試験のデータを DDI 評価に用いた結果、MMB は消化管の CYP3A4［リスク値（R）=128.68］、UGT1A1（R=1.25）及び BCRP（R=665.58）を有意に阻害する可能性が示唆された。M21 が CYP、UGT 及び MATE1 を阻害する可能性はないと考えられた。

MMB による消化管における CYP3A4 阻害は、FDA の DDI ガイダンスのカットオフ値を超えていたが、CYP3A4 の指標薬であるミダゾラムを用いた臨床試験において DDI は認められなかった（GS-US-352-1151 試験）。

また、曝露-反応（E-R）解析において、UGT1A1 の典型基質である非抱合型ビリルビンは、閾値（2 倍）を超える増加を示さなかったことから、UGT1A1 に対する MMB の阻害が、安全性上問題となる可能性は低いと考えられる。

更に、臨床試験において BCRP の典型基質であるロスバスタチンを用いて、MMB による BCRP 阻害の DDI リスクを評価した結果、MMB と併用投与する場合にはロスバスタチンの用量調節が必要であることが示唆された（GS-US-352-1151 試験）。

健康被験者を対象に、リトナビル（CYP3A4、P-gp 及び BCRP の強い阻害薬）の反復投与が MMB の定常状態における PK プロファイルに及ぼす影響について検討した結果（GS-US-352-1151 試験）、MMB は CYP3A、P-gp 又は BCRP の基質ではないと考えられた。したがって、MMB の臨床用量においてこれらの酵素又はトランスポーターを介した MMB の曝露量への影響が生じる可能性はないと考えられる。

2.4.3.7. その他の薬物動態試験

ラットを用いたがん原性試験における用量設定の検討のため、ラットを用いた MMB 及び M21 の単回併用経口投与試験を実施した（2.6.4.8.1）。

2.4.4. 毒性試験

MMB の毒性評価のため、マウス、ラット、ウサギ又はイヌを用いた単回経口投与毒性試験及び最長 39 週間の反復経口投与毒性試験を実施した。また、遺伝毒性試験、マウス及びラットを用いたがん原性試験、in vitro 皮膚刺激性試験、ex vivo ウシ摘出角膜を用いた眼刺激性試験、in vitro 光毒性試験、並びにマウスを用いた皮膚感作性試験を実施した。生殖発生毒性試験として、ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、ラット及びウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験、ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験を実施した。幼若動物を用いた毒性試験はラットを用いて実施した。

不純物の安全性については、ラットを用いた 4 週間反復経口投与毒性試験及び in vitro 細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames 試験）により評価した。

MMB の毒性試験データを 2.6.6（毒性試験の概要文）及び 2.6.7（毒性試験概要表）に示す。

2.4.4.1. 急性毒性

ICH M3(R2)ガイドラインにおいて単回投与毒性試験の実施は推奨されていないものの、MMB を用いた単回投与毒性試験を実施している。それらの試験の要約を以下に示す。

C57BL6 マウス及び BALB/c マウスにそれぞれ 20 及び 50 mg/kg までを 1 日 2 回投与したところ、忍容性は良好であった（2.6.6.2.1）。

SD ラットに MMB（二硫酸塩）を単回経口投与したときの最大耐量（MTD）は 500 mg/kg であった。750 mg/kg 群では、雄 1 例を試験 5 日に安楽死させ、雌 1 例が試験 6 日に死亡した。これらの動物の一般状態観察では、振戦、立毛、異常呼吸、瞳孔散大、四肢の赤色化及び活動低下が認められたが、剖検では雄において大腸及び小腸の膨満並びに異常内容物（黒色）がみられたのみであった。500 mg/kg 群では、雌雄で四肢の赤色化が認められた。500 及び 750 mg/kg 群では、試験 4～8 日に可逆的な体重減少及び体重増加抑制（摂餌量の低値を伴う）が認められた。血液学的変化として、250 mg/kg 以上の群で用量依存的な網状赤血球数及び白血球（WBC）数の低値がみられ、500 mg/kg 以上の群ではヘマトクリット及び血小板数の低値も認められた（いずれも可逆的）（2.6.6.2.2.1）。

雄 SD ラットに MMB（遊離塩基）の 60 mg/kg までを 1 日 2 回（12 時間間隔）経口又は静脈内投与したときの MTD は、いずれも 60 mg/kg BID（120 mg/kg）超であった（2.6.6.2.2.2）。

雌雄イヌに MMB（二硫酸塩）の 1000 mg/kg までを単回経口投与した結果、250 mg/kg 以上の群で試験 3 日までに流涎、嘔吐、水様便／便色の異常及び耳介の蒼白化、500 mg/kg 以上の群で投与直後に嘔吐が認められ、1000 mg/kg 群では水分補給が必要であった。試験 1、8 及び 15 日の血漿中チオシアン酸濃度は 1.0～3.3 mg/L であった。血漿中チオシアン酸濃度に用量相関性はみられず、対照群の血漿中チオシアン酸濃度の範囲内（2.3～3.8 mg/mL）であった。500 mg/kg 以上の群で嘔吐がみられ、MMB の経口吸収に影響を及ぼした可能性があるため、MTD は特定できなかった（2.6.6.2.3）。

2.4.4.2. 反復投与毒性

反復投与毒性試験では、MMB（遊離塩基、二硫酸塩又は二塩酸塩）を C57/BL6、BALB/c 及び rasH2 マウスに 1 日 1 回又は 2 回最長 56 日間、SD ラットに 1 日 1 回又は 2 回最長 26 週間、非妊娠 NZW ウサギに 1 日 1 回 7 日間、ビーグル犬に 1 日 1 回又は 2 回最長 39 週間経口及び／又は静脈内投与した（2.6.6.3）。予備試験は雌動物のみ、GLP 試験では雌雄の動物を用いて実施した。

2.4.4.2.1. マウスを用いた反復投与毒性試験

雄 C57BL/6 マウスに MMB（遊離塩基）の 20 mg/kg BID（40 mg/kg/日）までを 14 日間経口投与した結果、MMB 投与に関連した悪影響は認められなかった（2.6.6.3.1.1）。雌 BALB/c マウスに MMB（遊離塩基）の 50 mg/kg BID（100 mg/kg/日）までを 56 日間投与し、その後、14 日間休薬した。その結果、摂餌量及び摂水量のわずかな減少がみられた

が、体重に明らかな影響は認められなかった。56 日間投与後、肝臓又は脾臓重量の低値（可逆的）がみられたが、これに関連する組織学的変化は認められなかった。100 mg/kg/日群では、末梢 T 細胞の低値（可逆的）がみられたが、骨髄への影響は認められなかった（2.6.6.3.1.2）。雌 BALB/c マウスを用いた試験では、50 mg/kg BID の 4 週間投与後に網状赤血球及び WBC 数の低値がみられ、7 日間の休薬により回復性が認められた。MTD は 50 mg/kg BID（100 mg/kg/日）超であった（2.6.6.3.1.3）。

rasH2 マウスに MMB（二塩酸塩一水和物）の 300/150 mg/kg までを 1 日 1 回 4 週間経口投与した結果、300 mg/kg/日群で試験 4 日までに数例が死亡したため、投与量を 150 mg/kg/日に減量した。MMB、M19、M20 及び M21 の曝露量は、用量増加に伴って概ね増加した。M20 及び M21 については、雌の曝露量は雄の 2 倍以上であった。MMB、M19、M20 及び M21 の蓄積は認められなかった。親化合物に対する代謝物の AUC0-t 比から、MMB は M21 及び M20 にはほとんど代謝されず、主として M19 に代謝されることが示された。主試験群の死亡例では、運動失調、活動低下、冷感及び衰弱が認められた。試験 14 日に投与を再開したところ、300/150 mg/kg/日群の主試験群全例（死亡動物の代替動物を含む）が予定剖検日まで生存した。これらの動物の一般状態観察では、雄 1 例で円背位が認められたのみであった。高用量群の雄では、赤血球量（赤血球数、ヘモグロビン及びヘマトクリット）の軽微低値及びリンパ球数の中等度又は顕著な低値がみられた。100 mg/kg/日以上の群の雄及び 30 mg/kg/日以上の群の雌では、MMB 投与に関連した脾臓重量の低値がみられ、これに関連して白脾髄のリンパ球減少が認められた。100 mg/kg/日以上の群の雄及び 300/150 mg/kg/日群の雌では腸間膜リンパ節に、300/150 mg/kg/日群の雄では下顎リンパ節にリンパ球減少がみられた。300/150 mg/kg/日群の雄 1 例では、大腿骨及び胸骨骨髄の細胞密度低下並びに胸腺のリンパ球減少が認められ、本例の組織学的変化は悪影響と判断された。NOAEL は 100 mg/kg/日と推定され、この用量での試験 28 日の MMB の Cmax 及び AUC0-t は、雄でそれぞれ 8680 ng/mL 及び 52600 ng·h/mL、雌でそれぞれ 8260 ng/mL 及び 62400 ng·h/mL であった（2.6.6.3.1.4）。

2.4.4.2.2. ラットを用いた反復投与毒性試験

MMB（二硫酸塩）を用いた SD ラットの反復経口投与毒性試験を 2 試験実施した。最初に実施した 2 週間投与試験では、MTD は 125 mg/kg/日であった（2.6.6.3.2.1）。次に実施した SD ラットの 4 週間投与試験（GLP）では、MMB（二硫酸塩）の 25、50 及び 125 mg/kg/日を 1 日 1 回経口投与したところ、対照群及び 125 mg/kg/日群で重篤な一般状態変化が認められたため、予定されていた 28 日間の投与期間前に試験を中止した（2.6.6.3.2.3）。125 mg/kg/日群では 8 例が死亡した（安楽死例を含む）。生存例の投与は試験 12 日に中止したが、本群の動物は瀕死状態を呈したため、試験 15 日に安楽死させた。対照群において体重減少がみられたため、対照群の全例を試験 19 及び 20 日に、25 及び 50 mg/kg/日群の動物を試験 21 及び 22 日に安楽死させた。剖検では、対照群において胃及び十二指腸で潰瘍、炎

症及び壊死、腎臓では尿細管拡張及び壊死、肝臓では細胞分裂の亢進及び細胞変化が認められた。MMB（二硫酸塩）の溶解に必要な媒体の低い pH が動物の状態悪化に影響したと考えられた。本試験では媒体投与に関連した重度の所見がみられたため、MMB 投与に関連した影響を明らかにすることができず、NOAEL は推定できなかった。その後、MMB は二硫酸塩から二塩酸塩に切り替えて開発した。

MMB（遊離塩基）を用いた SD ラットの反復投与毒性試験（非 GLP）では、MMB（遊離塩基）の 20、35 及び 50 mg/kg BID（40、70 及び 100 mg/kg/日）を 14 日間経口投与、又は 12、18 及び 24 mg/kg BID（24、36 及び 48 mg/kg/日）を 14 日間静脈内投与した（2.6.6.3.2.2）。また、MMB（遊離塩基）の 5、10 及び 20 mg/kg を 1 日 1 回 60 日間経口投与した試験を実施した（2.6.6.3.2.5）。いずれの試験においても死亡はみられず、一般状態への悪影響又は体重・摂餌量／摂水量への影響は認められなかった。また、60 日間投与試験ではすべての投与群で MMB 投与に関連したリンパ球減少及び芽球細胞の増加が認められたが、骨髄及び脾臓の病理組織学的検査において悪影響は認められなかった。MMB（遊離塩基）及び非酸性化媒体の経口投与では、20 mg/kg/日まで忍容性は良好であると考えられた。

GLP 下で実施した毒性試験では、SD ラットに MMB（二塩酸塩）の 10、30 及び 100 mg/kg/日を 1 日 1 回 28 日間、4.3、17 及び 68 mg/kg/日を 13 週間、並びに 5、15 及び 50 mg/kg/日を 26 週間経口投与した（2.6.6.3.2.4、2.6.6.3.2.6、2.6.6.3.2.7）。MMB の全身曝露量は、17 mg/kg 以下の用量では概ね用量比を上回り、高用量では用量比を下回って増加した。MMB 及び代謝物である M17、M19、M20 及び M21 の曝露量は、26 週間投与試験では雌雄で概ね同程度であり、代謝物の曝露量は MMB よりも低かった。いずれの試験においても、一般状態観察、眼科学的検査、凝固系検査、血液生化学的検査及び尿検査に MMB 投与に関連した悪影響は認められなかった。

4 週間投与試験では、チオシアン酸塩濃度の用量依存的な増加がみられ、30 及び 100 mg/kg/日群では、試験 28 日に対照群の範囲を超えていた。MMB 投与に関連した赤血球系又は白血球パラメータへの影響（概ね可逆的）がみられ、これに関連してリンパ組織（リンパ節、脾臓、胸腺及び骨髄）の変化が認められた。これらの変化は MMB の薬理作用と一致し、また、高用量及び／又は長期投与で影響が増加する傾向がみられた。病理組織学的検査では、以下のような変化（概ね可逆的）が認められた。

- 腎臓：近位尿細管上皮空胞化、10 mg/kg/日以上
- 消化管：出血、30 mg/kg/日以上
- 心臓：心基部の出血、100 mg/kg/日の雄 3 例
- 肝臓：軽微な単核球浸潤の発現頻度の減少、100 mg/kg/日
- 卵巣：用量依存的な嚢胞の発現頻度の増加、30 mg/kg/日以上
- 子宮頸部：上皮変性、10 mg/kg/日以上
- 精巣上体：用量依存的な管腔内細胞残屑の蓄積、10 mg/kg/日以上

- 精巣：不可逆的な変性（休薬期間終了後で程度の増加）、100 mg/kg/日

13 週間投与試験では、17 mg/kg/日以下の群で MMB 投与に関連した一般状態への影響は認められなかった。17 mg/kg/日以上の群では体重増加抑制が認められた。68 mg/kg/日群では組織学的変化として、脾臓及び胸腺におけるリンパ球枯渇が認められた。血液学的検査では、リンパ球、好酸球及び好塩基球数の用量依存的な低値が認められた。

26 週間投与試験では、MMB 投与に関連した機能観察総合評価（FOB）パラメータへの影響は認められなかった。50 mg/kg/日群で試験 26 週に体重増加抑制及び体重低値（雌雄でそれぞれ対照群の 13.1 及び 23.6%）がみられ、雄では摂餌量低値も認められた。可逆的かつ軽度の尾及び指神経伝導速度の遅延がみられたが、これらの電気生理学的変化を示唆する末梢神経の病理学的所見は認められなかった。また、可逆的な総ビリルビンの増加がみられ、これに関連して腸間膜リンパ節及び肝臓で可逆的な色素沈着が認められた。腎臓及び脾臓では不可逆的な色素沈着がみられ、下顎及び腸間膜リンパ節では赤血球増加／赤血球貪食が認められた。

13 及び 26 週間投与試験の NOAEL は、それぞれ 17 及び 5 mg/kg/日と推定された。4 週間投与試験では NOAEL は推定できなかったが、10 及び 30 mg/kg/日の忍容性は良好であると考えられた。

2.4.4.2.3. ウサギを用いた反復投与毒性試験

ウサギを用いた毒性試験（非 GLP）では、非妊娠雌 NZW ウサギに MMB（二塩酸塩）の 30、100 及び 300 mg/kg/日を 1 日 1 回 7 日間経口投与した（2.6.6.3.3.1）。300 mg/kg/日群の全例が試験 3 又は 4 日に死亡（瀕死状態による安楽死を含む）した。死亡又は安楽死前の一般状態変化として全身衰弱が認められた。30 及び 100 mg/kg/日群で一般状態への悪影響はみられなかったが、100 mg/kg/日群では試験 1～7 日に体重減少がみられ、これに関連して摂餌量の低値も認められた。また、100 mg/kg/日群では、MMB 投与に関連した網状赤血球数の軽度低値、コレステロールの高値並びにアルカリホスファターゼ活性及び無機リンの軽度低値が認められたが、悪影響ではないと判断された。300 mg/kg/日群の 1 例では十二指腸で MMB 投与に関連した局所刺激が認められ、30 mg/kg/日以上の群で肝臓／胆嚢、心臓及び下垂体、100 mg/kg/日群で卵巣及び副腎で MMB 投与に関連した器官重量の高値（絶対及び相対重量）が認められた。病理組織学的検査は実施しなかった。

2.4.4.2.4. イヌを用いた反復投与毒性試験

ビーグル犬に MMB（二塩酸塩）の 3、30、100 及び 300 mg/kg を 14 日間、5、30 及び 100 mg/kg を 4 週間、8.5、17 及び 51 mg/kg 並びに 8.5 mg/kg BID を 13 週間、並びに 10、20 及び 50 mg/kg を 39 週間経口投与した（2.6.6.3.4）。MMB、M19 及び M21 の血漿中曝露量（Cmax 及び AUC0-24）は、39 週間投与試験では雌雄で同程度であった。また、51 及び

50 mg/kg/日のそれぞれ 13 及び 39 週間反復投与後に MMB の蓄積は認められなかった。13 週間投与試験では、MMB の曝露量は 1 日 1 回 17 mg/kg/日群と 8.5 mg/kg BID 群で同程度であった。M19 の曝露量は、39 週間投与試験では MMB と同程度であった。M21 の曝露量は低かったが（親化合物に対する代謝物の比は 0.01 未満）、用量増加に伴って増加した。

14 日間投与試験では、試験 11 日に雄 1 例（300 mg/kg/日）を瀕死状態のため安楽死させた。MTD は 100 mg/kg/日であった。

28 日間投与試験では、100 mg/kg/日群の雌 1 例で持続的な食欲不振、削痩、活動低下、頬周囲からの出血及び体重減少（試験 1 日に対して 17%）がみられたため、試験 26 日に安楽死させた。生存例の一般状態観察では、30 mg/kg/日以上の群で、触診可能な心拍、一過性かつ散発的な異常歩行及び嗜眠が認められた。また、一過性の変化として、振戦、削痩、嗜眠、部分閉瞼並びに耳介／口の変色が認められた。100 mg/kg/日群では、重度の食欲不振を伴う散発的かつ急激な体重減少がみられ、数例において一時的に投与を中止したが、眼科学的検査、血液学的検査、凝固系検査及び尿検査において MMB 投与に関連した影響並びに肉眼的所見は認められなかった。MMB の薬理作用に関連した変化はいずれも可逆的であった。試験 28 日には、血漿中チオシアン酸濃度の用量依存的な増加が認められた。

13 週間投与試験では、一般状態変化として嘔吐が散見され、冷感／温感がみられ、雌 1 例では削痩が認められた。用量依存的な体重増加抑制及び摂餌量の減少がみられた。眼科学的所見は認められなかった。試験 1 日には 51 mg/kg/日群の雌雄で PR 及び QT 間隔の短縮を伴う用量依存的な心拍数高値が認められたが、心拍数の増加の程度は軽度であり、試験 1 日でのみ発現し、洞頻脈との関連はみられず、また、39 週間投与試験では同程度の用量で認められなかったことから、臨床的に意義がある変化ではないと考えられた。臨床病理学的検査、眼科学的検査、器官重量測定、剖検及び病理組織学的検査では MMB 投与に関連した悪影響は認められなかった。

39 週間投与試験では、50 mg/kg/日群の雄 1 例が試験 175 日に瀕死状態のため安楽死させた。本例では、体脂肪減少、骨髄細胞密度低下及び膵臓の分泌顆粒の減少がみられたことから、栄養不良によるものと考えられた。すべての用量で MMB 投与に関連した嘔吐、流涎及び軟便／水様便がみられ、中等度～顕著な体重増加抑制が認められた。50 mg/kg/日群（ヒトに 200 mg 投与したときの曝露量の 2.8 倍）の雄 2 例及び雌 3 例で白内障（片眼性又は両眼性、回復性なし）がみられたが、病理組織学的検査において異常は認められなかった。本所見の意義は不明であるが、臨床試験（2.5.5）において被験者で白内障の発現頻度の増加は認められなかった。

心電図検査（波形及び間隔）において MMB 投与に関連した悪影響はみられなかった。血漿中チアミン及びチアミン二リン酸濃度に影響はみられず、末梢神経の病理学的所見も認められなかった。10 mg/kg/日以上の群の雄及び 20 mg/kg/日以上の群の雌で可逆的な赤血球量の低値及び 50 mg/kg/日群の雌雄でリンの軽度低値（最大-30%）が認められた。これらの変化は MMB 投与に関連するものの、悪影響ではないと考えられた。病理組織学的検査では、MMB 投与に関連した所見として、50 mg/kg/日群において腎臓で軽微又は軽度の尿細管上皮

細胞空胞化、骨髄で軽微な細胞密度低下、精巣で軽度な精子細胞／精母細胞の変性及び精巣上体で軽度な生殖細胞残屑が認められた。

イヌ 39 週間投与試験における NOAEL は 20 mg/kg/日と推定された。

2.4.4.3. 遺伝毒性

MMB は細菌を用いた復帰突然変異（Ames）試験、ヒトリンパ球を用いた染色体異常試験及び in vivo ラット小核試験において遺伝毒性を示さなかった（2.6.6.4.1.1、2.6.6.4.1.2、2.6.6.4.2.1）。

2.4.4.4. がん原性

2.4.4.4.1. トランスジェニックマウスを用いた 26 週間投与試験

rasH2（001178-T [hemizygous]、CByB6F1-Tg[HRAS]2Jic）マウスに MMB（二塩酸塩一水和物）の 0（水）、0（媒体）、3、10、30 及び 100 mg/kg を 1 日 1 回 26 週間経口投与した（2.6.6.5.1）。また、001178-T（hemizygous）rasH2 マウスに N-メチル-N-ニトロソ尿素（MNU；陽性対照物質）を試験 1 日に単回腹腔内投与した群を設け、試験に用いた動物ががん遺伝子を発現し、発がん作用に対して反応することを確認した。MMB、M19、M20、M21 の全身曝露量は、MMB の用量増加に概ね伴って増加し、曝露量の性差は 2 倍未満であり、蓄積は認められなかった。MMB は、M8、M20 又は M21 にほとんど代謝されなかった。

MMB 投与群における生存率は、雄が 88%以上、雌が 92%以上であった（水及び媒体対照群は 92%以上）。

MMB を 100 mg/kg/日まで投与しても MMB 投与に関連した発がんは認められなかったが、陽性対照群では明らかな発がんが確認された。MMB は生存率に影響を及ぼさず、発がん性を示さなかった。

2.4.4.4.2. ラットを用いた 104 週間投与試験

SD ラットに MMB（二塩酸塩一水和物）の 0（媒体）、1.5、5 及び 15 mg/kg/日を最長 104 週間経口投与した（2.6.6.5.2）。また、別の群には MMB の 5 mg/kg/日及び M21 の 25 mg/kg/日を併用経口投与した。MMB 及び M21 の曝露量に性差はみられなかった。MMB の AUC0-24 は用量比を上回って増加した。M21 の AUC0-24 は用量比に伴って増加し、併用投与による影響は認められなかった。MMB 単独投与群における M21 の曝露量は MMB よりも低かった。

生存率は雄が 37～52%、雌が 28～45%であった。試験 102 週には雌全例を、試験 104 週には雄全例を安楽死させた。腫瘤の発現頻度、眼科学的検査及び摂餌量に MMB 単独又は MMB/M21 併用投与に関連した影響は認められなかった。MMB の 15 mg/kg/日群の雄では精巣に腫瘍所見がみられたが、統計学的に有意ではなかった。MMB 投与に関連した非腫瘍性

組織所見は悪影響ではないと判断された。MMB 投与に関連した精巣間細胞（ライディッヒ細胞）腺腫の増加は有意ではなかったものの、背景値よりも高かった。本所見はラットにおける JAK2 を介したプロラクチンシグナル伝達経路の阻害に関連している可能性が高いと考えられた[Chapin, 2017]。しかしながら、ヒトのライディッヒ細胞はプロラクチン依存性を示さないため、ヒトでのリスクは低いと考えられる。

2.4.4.5. 生殖発生毒性

2.4.4.5.1. 受胎能及び初期胚発生

2.4.4.5.1.1. 雄ラットを用いた経口投与による受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

雄 SD ラットに MMB（二塩酸塩一水和物）の 0（媒体）、5、25 及び 100/68 mg/kg/日を交配前 4 週間以上、交配期間中及び剖検まで経口投与した。100 mg/kg/日群では、投与開始後 4 日（試験 4 日）に 1 例が死亡したため、試験 5 日以降は投与量を 100 mg/kg/日から 68 mg/kg/日（100/68 mg/kg/日）に減量した。また、100/68 mg/kg/日群では 8 例が死亡し、1 例を試験 17 日に瀕死状態のため安楽死させた（2.6.6.6.1.1）。これらの死亡及び安楽死例では、一般状態の悪化（衰弱、体調不良等）、体重低値及び剖検所見が認められた。剖検まで生存した動物では、100/68 mg/kg/日群でのみ、MMB 投与に起因した雄生殖器への影響が認められた。100/68 mg/kg/日の生存例 13 例中 3 例において雌の不妊がみられ、受胎率［fecundity index（妊娠させた雄動物数／交尾動物数；対照群 100%に対して 77%）及び fertility index（妊娠させた雄動物数／交配動物数；対照群の 85%に対して 77%）］の低値が認められた。100/68 mg/kg/日群で精巣重量の低値並びに精子運動性及び濃度の低下がみられ、全投薬群で精嚢重量の低値が認められ、5 mg/kg/日群での精嚢重量の低値を除き、悪影響と判断された。雄受胎能に対する NOAEL は 5 mg/kg/日と推定された。

2.4.4.5.1.2. 雌ラットを用いた経口投与による受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

雌 SD ラットに MMB（二塩酸塩一水和物）の 0（媒体）、5、25 及び 100/68 mg/kg/日を交配前 14 日間以上、交配期間中及び妊娠 7 日まで経口投与した（2.6.6.6.1.2）。100 mg/kg/日群では、試験 4 日までに MMB 投与に起因した死亡が 4 例みられたため、試験 5 日以降は投与量を 100 mg/kg/日から 68 mg/kg/日（100/68 mg/kg/日）に減量した。100/68 mg/kg/日群では計 11 例の死亡がみられ、減量前に 4 例、試験 5～8 日に 5 例、妊娠 8 日に 1 例が死亡し、試験 10 日に瀕死状態を呈した 1 例を安楽死させた。死亡／瀕死例では衰弱や体調不良等の一般状態の悪化、体重増加量・摂餌量の低値、子宮重量の低値、吸収胚数の高値及び生存胎児数の低値が認められた。MMB 投与群の生存例では全例が妊娠していたが、100/68 mg/kg/日群では 11 例中 9 例で生存胎児が認められなかった。100/68 mg/kg/日群では交配前の性周期の延長がみられ、早期吸収胚数及び着床後胚死亡率の高値（それぞれ 691 及び 833%）、並

びに黄体数、着床痕数及び生存胎児数の低値（それぞれ 18.7、38.9 及び 99.2%）が認められた。25 mg/kg/日群でも早期吸収胚数及び着床後胚死亡率の高値（それぞれ 300 及び 177%）及び生存胎児数の低値（20.3%）が認められた。100/68 mg/kg/日群では、最終体重、相対子宮重量、同腹児数及び卵巣・膣の絶対重量の低値が認められた。母動物の一般毒性及び生殖能に対する NOEL は 25 mg/kg/日、初期胚発生に対する NOEL は 5 mg/kg/日と推定された。

2.4.4.5.2. 胚・胎児発生

2.4.4.5.2.1. ラットを用いた経口投与による用量設定試験

雌 SD ラットに MMB（二塩酸塩一水和物）の 0（媒体）、4.3、17 及び 68 mg/kg/日を妊娠 6～17 日に経口投与した（2.6.6.6.2.1）。MMB の曝露量は用量増加（4.3 mg/kg/日から 68 mg/kg/日）に伴って増加した。反復投与による MMB の蓄積は認められなかった。MMB は M17、M20 及び M21 にほとんど代謝されず、大部分が M19 に代謝された。68 mg/kg/日群の 1 例が妊娠 20 日に死亡し、生殖器からの赤色分泌物（同腹児の死亡／吸収を示す）、体調不良（蒼白、被毛粗剛）及び体重・摂餌量の低値が認められた。同様の変化は 17 mg/kg/日群でもみられたが、その程度は軽度であり、母動物における体重の低値は胎児毒性（胎児数の減少）による二次的な影響と考えられた。剖検時に肉眼的所見は認められなかった。17 及び 68 mg/kg/日群では早期吸収胚数及び着床後胚死亡率の用量依存的な高値がみられ、17 mg/kg/日群では内臓変異（腕頭動脈欠損の高値）が認められた。母動物の一般毒性に対する NOAEL は 17 mg/kg/日、胚・胎児発生に対する NOAEL は 4.3 mg/kg/日と推定された。

2.4.4.5.2.2. ラットを用いた経口投与による胚・胎児発生に関する試験

雌 SD ラットに MMB（二塩酸塩一水和物）の 0（媒体）、2、6 及び 12 mg/kg/日を妊娠 6～17 日に経口投与した（2.6.6.6.2.2）。MMB の曝露量は用量増加に概ね伴って増加し、MMB の蓄積はなかった。M17、M20 及び M21 の曝露量は用量増加に概ね伴って増加した。親化合物に対する代謝物の AUC0-t 比の結果から、MMB は M17、M20 及び M21 にはほとんど代謝されず、大部分が M19 に代謝された。母動物の体重、摂餌量、一般状態に影響はみられなかった。12 mg/kg/日群では、体重増加量の低値が妊娠 4～21 日に認められたが、早期吸収胚数及び着床後胚死亡率の増加による二次的な影響と考えられた。MMB の胚・胎児発生に対する影響として、12 mg/kg/日群で早期吸収胚数の高値（対照群 0.7%に対して 2.9%）、着床後胚死亡率（対照群 5.6%に対して 25.6%）及び妊娠子宮重量の低値（対照群の 77.0%）がみられ、生存胎児数及び胎児体重の低値（対照群のそれぞれ 81.0 及び 90.8%）が認められた。6 mg/kg/日群でも胎児体重の低値（対照群の 96.4%）がみられたが、悪影響ではないと判断された。骨格変異として、6 及び 12 mg/kg/日群で過剰肋骨がみられ（胎児のそれぞれ 7.33 及び 27.15%）、12 mg/kg/日群では仙骨前椎骨の増加（胎児の 3.93%）も認められた。骨格検査所見はいずれも変異であり、MMB 投与に起因した変化ではあるが、悪影

響ではないと判断された。母動物の一般毒性に対する NOAEL は 12 mg/kg/日、胚・胎児発生に対する NOAEL は 6 mg/kg/日と推定された。

2.4.4.5.2.3. ウサギを用いた経口投与による用量設定試験

雌 NZW ウサギに MMB（二塩酸塩一水和物）の 0（媒体）、7.5、30 及び 75 mg/kg/日を妊娠 7～20 日に経口投与した（2.6.6.6.2.3）。MMB の曝露量は用量増加（7.5 mg/kg/日から 75 mg/kg/日）に伴って増加し、蓄積は認められなかった。M19 及び M21 については、MMB の 75 mg/kg/日の反復投与により蓄積する可能性が示唆された。MMB は大部分が M19 に代謝され、M21 には代謝されなかった。75 mg/kg/日群では 2 例が MMB の投与に起因して死亡した。そのうちの 1 例が妊娠 21 日に瀕死状態を呈し、別の 1 例が妊娠 22 日に流産したため、いずれも安楽死させた。7.5 mg/kg/日群では MMB 投与による影響は認められなかった。30 mg/kg/日群では、体重増加量の低値（妊娠 7～21 日）及びそれに伴う摂餌量の低値傾向（妊娠 8～19 日）がみられた。75 mg/kg/日群では、一部の動物で削痩、糞便減少／無便、摂餌量の低値傾向（妊娠 8～21 日）、体重の低値傾向（妊娠 18～21 日）及び体重増加量の低値（妊娠 7～21 日）が認められた。剖検では、75 mg/kg/日群の生存例 2 例のうち、妊娠と判定されたのは 1 例のみであった。この動物では、後期吸収胚数、全吸収胚数及び着床後胚死亡の高値並びに胎児体重の低値がみられたが、これらのデータの解釈の際には評価例数が少ないこと（1 例）を考慮する必要があると考えられた。母動物の一般毒性に対する NOAEL は 7.5 mg/kg/日、胚・胎児発生に対する NOAEL は 30 mg/kg/日と推定された。

2.4.4.5.2.4. ウサギを用いた経口投与による胚・胎児発生に関する試験

雌 NZW ウサギに MMB（二塩酸塩一水和物）の 0（媒体）、7.5、30 及び 60 mg/kg/日を妊娠 7～20 日に経口投与した（2.6.6.6.2.4）。MMB 及び M19 の曝露量は用量増加（7.5 mg/kg/日から 60 mg/kg/日）に伴って増加した。M21 の曝露量は用量増加（30 mg/kg/日から 60 mg/kg/日）に伴って増加した。MMB、M19 及び M21 の蓄積はなかった。親化合物に対する代謝物の AUC0-t 比の結果から、MMB は大部分が M19 に代謝され、M21 にはほとんど代謝されなかった。60 mg/kg/日群では、妊娠 26 日に 1 例が流産したため安楽死させたが、流産は母動物への影響に対する二次的変化であり、MMB 投与とは直接関連しないもの考えられた。60 mg/kg/日群では MMB 投与に起因した異常便が認められた。これに伴い摂餌量の低値（妊娠 11～21 日）がみられたが、体重への影響は認められなかった。また、60 mg/kg/日群では、胎児体重の低値、骨化遅延（恥骨／距骨の未骨化、胸椎体二分骨化）の増加が観察されたが、母動物への影響に対する二次的変化と考えられた。母動物の一般毒性に対する NOAEL は 30 mg/kg/日、胚・胎児発生に対する NOAEL は 60 mg/kg/日と推定された。

2.4.4.5.3. 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

雌 SD ラットに MMB（二塩酸塩一水和物）の 0（媒体）、2、6 及び 12 mg/kg/日を妊娠 6 日から分娩後 20 日まで経口投与した（2.6.6.6.3）。MMB、M19 及び M21 の曝露量は、母動物及び出生児ともに用量増加（2 mg/kg/日から 12 mg/kg/日）に伴って増加し、母動物における MMB の曝露量は出生児よりも高かった。母動物では、MMB は M19 に多くは代謝されず、母動物における M19 の曝露量は出生児よりも低かった（出生児の約 1/3～1/2 倍）。MMB は母動物では M21 にほとんど代謝されなかった。M21 の濃度は 2 mg/kg/日群で定量下限（LLOQ）を下回り、出生児では、12 mg/kg/日群の 1 時点でのみ測定可能であった。

母動物において、MMB 投与に起因した死亡及び一般状態の影響は認められなかった。12 mg/kg/日群では、妊娠期間中に母動物の体重及び摂餌量の低値、並びに出産児数及び生存児数の低値（対照群と比較してそれぞれ 28 及び 30%）が認められた。着床後胚死亡率は 6 及び 12 mg/kg/日群でそれぞれ 11 及び 28%高値であった。

出生児において、6 及び 12 mg/kg/日群では離乳時までの生存率がそれぞれ 15 及び 11%低値であったが、乳汁を介した曝露による出生児への直接的な影響と考えられた。12 mg/kg/日群では生後 0 日及び生後 4 日の体重（腹児数調整）の低値がみられた。離乳後においても、12 mg/kg/日群の雌雄では MMB 投与に関連した体重の低値が認められた。MMB 投与に起因した一般状態及び発達又は神経行動学的パラメータ（自発運動量、聴覚性驚愕反射、Morris 水迷路）への影響は認められなかった。妊娠期間中、6 及び 12 mg/kg/日群において体重の低値がみられたが、摂餌量への影響は認められなかった。性周期、生殖能、剖検及び帝王切開において MMB 投与による影響は認められなかった。

母動物では 12 mg/kg/日群で妊娠期間中の体重及び摂餌量の低値がみられたことから、一般毒性に対する NOAEL は 6 mg/kg/日と推定された。また、6 mg/kg/日以上の群で着床後胚死亡率の高値及び出生児生存率の低値がみられたことから、母動物の生殖能及び次世代の発生に対する NOAEL は 2 mg/kg/日と推定された。出生児では 6 及び 12 mg/kg/日群で離乳前後及び妊娠期間中の体重の低値がみられたことから、一般毒性に対する NOAEL は 2 mg/kg/日と推定された。

2.4.4.5.4. 新生児を用いた試験

2.4.4.5.4.1. 幼若ラットを用いた経口投与による用量設定試験

幼若 SD ラットに MMB（二塩酸塩一水和物）の 0（媒体）、3、10 及び 30 mg/kg/日を生後 7～21 日に経口投与した（2.6.6.6.4.1）。MMB、M19 及び M21 の曝露量は用量増加（3 mg/kg/日から 30 mg/kg/日）に伴って増加し、性差は 2 倍未満であった。MMB の反復投与による MMB、M19 及び M21 の明らかな蓄積は認められなかった。

生存例では、MMB に関連した一般状態への影響はみられなかったが、10 及び 30 mg/kg/日群で体重増加量の低値が認められた。MMB 投与群では、腎臓の拡張／嚢胞性尿細管及び髄質の尿細管鉱質沈着の用量依存的な発現頻度の増加が認められたが、いずれも悪影響では

ないと判断された。体重増加量への影響がみられたことから、幼若毒性の一般毒性に対するNOAELは3 mg/kg/日と推定された。

2.4.4.5.4.2. 幼若ラットを用いた経口投与による毒性試験

幼若SDラットにMMB（二塩酸塩一水和物）の0（媒体）、1、3及び10 mg/kg/日を生後7～56日に経口投与し、10週間休薬した（2.6.6.6.4.2）。MMB、M19及びM21の曝露量は、用量増加（1 mg/kg/日から10 mg/kg/日）に伴って増加し、蓄積は認められなかった。親化合物に対する代謝物の雌雄合算Cmax及びAUC0-24比より、MMBは速やかにM19に代謝されるが、M21にはほとんど代謝されないことが示された。

10 mg/kg/日群の雌雄では、体重増加抑制（概ね可逆的）がみられ、これに関連して摂餌量の低値が認められた。MMB投与に関連した眼科学的所見はみられず、眼瞼開裂、瞳孔反射、膣開口、聴覚性驚愕反射及び自発運動量への影響も認められなかった。1及び3 mg/kg/日群の雌雄並びに10 mg/kg/日群の雌では、学習及び記憶に対する影響は認められなかった。10 mg/kg/日の雄では、投与期間中である生後50日において学習の評価にMMB投与の影響はみられなかったが、記憶の評価では統計的に有意な逃避時間の延長及び誤差数の高値（可逆的）が認められ、MMB投与に関連した悪影響と判断された。10 mg/kg/日群の雄で生後57日の剖検時に認められたリンパ球の低値は、程度が低く、病理組織学的検査でも関連する所見が認められなかったことから、悪影響ではないと判断された。臨床病理学的パラメータ、器官重量及び大腿骨長でみられた変化はMMBに起因したものであるが、悪影響ではないと判断された。10 mg/kg/日群では、MMBに関連した脛骨長の短縮と亀頭包皮分離のわずかな遅延は体重の低値による二次的な影響と考えられた。生殖能（交尾所要日数、性周期、交尾率、受胎率）や精子形成にMMB投与の悪影響は認められなかった。投薬群の雌を無処置の雄と交配させた場合、1及び3 mg/kg/日群ではMMB投与の影響は観察されなかったが、10 mg/kg/日群では統計学的に有意ではないものの、対照群と比較して着床後胚死亡率が高く、MMB投与に起因した悪影響と判断された。

雌雄の幼若動物の一般毒性に対するNOAELは3 mg/kg/日、生殖能に対するNOAELは雄が10 mg/kg/日、雌が3 mg/kg/日と推定された。また、幼若動物の神経行動毒性に対するNOAELは雄が3 mg/kg/日、雌が10 mg/kg/日と推定された。

2.4.4.6. 局所刺激性

2.4.4.6.1. 皮膚及び眼刺激性

MMBの臨床投与経路は経口投与を予定しているため、反復経口投与毒性試験において消化管に対する局所刺激性を評価した。MMBの300 mg/kg/日を投与したウサギ（2.6.6.3.3）及び毒性試験において死亡したラットを除き、消化管毒性は認められなかった。

意図しない接触曝露の危険性について検討するため、2 つの in vitro 試験を実施した。MMB は Corrositex 法を用いた試験（2.6.6.7.1）で腐食性を示し、ウシ摘出角膜を用いた混濁度及び透過性（BCOP）試験（2.6.6.7.2）では腐食性／重度の眼刺激性を示した。

2.4.4.6.2. 光毒性

MMB は 2 つの吸収極大（198 及び 285 nm）を示す。285 nm での極大は分子の芳香族コアに起因する（3.2.S.3.1）。有色ラットを用いた ^{14}C-MMB による組織分布試験では、皮膚及び眼のメラニンへの可逆的結合が示された（2.6.4.4.1）。

MMB 及び紫外線（+UVR）を曝露した BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞の生存率の低下率を測定した in vitro 試験において、MMB は溶解限界まで光毒性を示さなかった（2.6.6.7.3）。

2.4.4.7. その他の毒性試験

2.4.4.7.1. 感作性

マウスを用いた局所リンパ節増殖試験において、MMB は皮膚感作性を示さなかった（2.6.6.8.1.1）。陽性対照物質であるヘキシルシンナムアルデヒドの刺激指数（SI）は 24.3 であったのに対し、MMB の最大 SI 値は 1.3 であった。

2.4.4.7.2. 免疫毒性

免疫抑制は MMB に期待される薬理作用である。MMB を用いた免疫毒性及び免疫表現型検査は実施していないが、免疫毒性試験を実施した場合には、他の JAK 阻害薬であるルキソリチニブ及びトファシチニブと同様の結果を示すことが予想される。

幼若サルを用いたトファシチニブによる TDAR（T 細胞依存性抗体反応）試験が実施されている[XELJANZ (tofacitinib), 2012]。サル 39 週間投与試験の最高用量である 10 mg/kg において KLH に対する TDAR の有意な低下がみられている。ラット及びサルの免疫表現型検査では、ヘルパーT 細胞、細胞傷害性 T 細胞及び NK 細胞の用量依存的な減少が認められた。ラット 26 週間投与試験では、B 細胞数の減少も認められた。また、ルキソリチニブのイヌの 12 ヵ月間投与試験において、ルキソリチニブの免疫表現型試験が実施されており、サルにおけるトファシチニブの作用と同様、ルキソリチニブでイヌのヘルパーT 細胞及び細胞傷害性 T 細胞の減少が認められている[JAKAVI (ruxolitinib), 2011]。

2.4.4.7.3. 依存性

MMB の依存性を評価するための試験は実施していない。MMB の非臨床試験において、依存性を示唆する所見は認められなかった。MMB をマウスに静脈内投与したときの、脳への取り込み量は低かった（2.6.4.4.4）。^{14}C-MMB を用いた組織分布試験では、SD 及び Long Evans ラットの脳組織における放射能は LLOQ 未満であった（2.6.4.4.1）。これらのことから、依存性試験を実施する必要はないと考えられた。

2.4.4.7.4. 代謝物に関する試験

MMB 代謝物の単独投与による試験は実施していない。上記の多くの試験においてマイナーな代謝物（M8、M17、M19 及び M20）の曝露が確認されている。主要代謝物 M21 についても、多くの試験で確認されている。ラットの 104 週間投与がん原性試験では、MMB の 5 mg/kg/日及び M21 の 25 mg/kg/日を併用投与した群を設定している（2.6.6.8.4）。

2.4.4.7.5. 不純物に関する試験

ラットの 4 週間経口投与毒性試験（2 試験）により、不純物含量が異なる 2 つの MMB ロットの毒性評価及び TK 測定を実施した。

2.4.4.7.5.1. 低純度及び高純度ロットを用いたラット 4 週間経口投与試験

雌雄 SD ラットに媒体（酸性化滅菌水、pH 1.35～1.80）、MMB（二塩酸塩一水和物）の低純度ロット（[redacted]、純度：91.9%）の 10 及び 17 mg/kg/日、高純度ロット（[redacted]、純度：96.1%）の 17 mg/kg/日を 29 日間経口投与した（2.6.6.8.5.1）。試験 25 日の MMB 及び代謝物（M17、M19、M20 及び M21）の曝露量（Cmax 及び AUC）は MMB の両ロット（[redacted] 及び [redacted]）間で概ね同程度であった。高純度ロットの 17 mg/kg/日群の雌では、他の投与群と比較して体重増加量及び摂餌量の低値が認められた。別のラット 4 週間投与毒性試験では、高純度ロット（[redacted]、純度：99.5%）及び低純度ロット（[redacted]、純度：91.1%）を投与したときに両群で同様の結果が得られた（2.6.6.8.5.2）。このように、いずれの試験においても不純物による毒性の増強は認められなかった。

2.4.4.7.5.2. 不純物の安全性確認

非臨床毒性試験に用いた MMB ロットの不純物プロファイルを 2.6.7.4 に示す。Good Manufacturing Practice（GMP）原薬の不純物及び潜在的不純物の安全性について、上記のラット 4 週間経口投与毒性試験（2 試験）により評価した結果、不純物含量が異なっていてもラットの 4 週間経口投与毒性試験の NOAEL に影響を及ぼさなかった。不純物プロファイルを比較した結果、毒性試験で使用した MMB の複数の GLP ロットは、GMP 原薬を代表するものであり、MMB 製剤の不純物及び分解生成物の規格値を支持するものと考えられる。これらの不純物は原薬及び製剤の製造過程で管理されている（2.3.S 及び 2.3.P）。安全性確認レベルについては 2.3.S.3.2 に示す。

2.4.4.7.5.3. その他の GLP 試験

製造工程中の中間体及び不純物について、定量的構造活性相関による遺伝毒性評価を実施した（2.6.6.8.6）。その後、GS-072388（陰性）、GS-713902（陽性）、GS-030865（陰

性）、GS-642109（陽性）、GS-652153（陽性）及び GS-652157（陽性）の細菌を用いた復帰突然変異試験を実施した。遺伝毒性を示す可能性のある不純物は、いずれも原薬の製造時に管理されている（2.3.S.2.6）。

2.4.5. 総括及び結論

MMB の効力を裏付ける薬理試験及び薬力学的試験は、MMB 及び主要なヒト血中代謝物である M21 の in vitro 試験系を用いて検討した。複数の濃度反応性試験により、MMB は JAK2 及び JAK1 の両酵素に対して強力かつ可逆的な阻害作用を示し、他の JAK ファミリーキナーゼである JAK3 及び TYK2 に対する活性は弱いことが示された。MMB は、ヘプシジン産生及び鉄代謝維持の重要な制御因子である BMP 受容体キナーゼの ACVR1 も強く阻害する。NF-κB の上流の制御因子である IKK-α、IKK-β、IKK-ε 及び IRAK1 に対しても nM レベルで結合した。これらのデータから、MMB は、JAK1 及び JAK2 等の重要な炎症関連キナーゼ、並びにヘプシジン産生及び鉄ホメオスタシスの上流制御因子である ACVR1 を強く阻害することが明らかとなった。主要なヒト血中代謝物である M21 は、JAK1、JAK2、JAK3、TYK2 及び ACVR1 に対する阻害作用は MMB と比較して約 4 倍程度弱く、更にヒトにおけるマイナーな代謝物である M19 は、ほとんど活性を示さなかった。

In vitro における MMB の JAK2 阻害作用は、外部刺激により活性化した初代ヒト PBMC の STAT3、STAT5 及び STAT6 リン酸化を MMB が抑制したことから確認された。同様に、JAK2 V617F 変異導入赤芽球性白血病細胞株である HEL92.1.7 細胞において、MMB は STAT5 のリン酸化を強く抑制した（nM レベル）。これら JAK2 を介したシグナル阻害作用に関しては、MMB が HEL92.1.7 細胞を含む恒常的活性化型 JAK2 発現細胞の細胞増殖及び／又は前駆コロニー形成を選択的に減少させること、並びに細胞増殖に JAK が寄与しない腫瘍細胞株（10 種類）の細胞増殖を抑制しないことによって、重要性がより増していると考えられる。この細胞選択性は、MMB が患者において非特異的な毒性をほとんど示さない可能性を示唆している。

MMB、並びに M21（MMB と比較して程度は低い）は、HepG2 肝癌細胞株における BMP6 刺激ヘプシジン RNA 量を濃度依存的に減少させた。これらのデータは、MMB による ACVR1 の阻害を介したヘプシジン発現の低下及びそれによる鉄利用能の調節作用が強まる可能性を示し、MMB が MF 貧血の改善に有用である可能性を示唆している。

また、MMB は NF-κB 調節因子と結合し、NF-κB による炎症に関わる様々な細胞応答の誘導を抑制することにより、炎症を更に抑制する可能性がある。NF-κB レポーター-HEK293 細胞株において、MMB は NF-κB レポーター活性を強く阻害した（nM レベル）。これらのデータは、MMB が MF における炎症に対して、単純な JAK-STAT 阻害による作用を上回る治療的役割を有する可能性を示唆している。

MMB の有効性は、2 つの疾患モデル動物を用いた検討によって評価した。JAK2 V617F 変異によるマウス MPN モデルにおいて、MMB 投与により投与 6 日及び 20 日以内にそれぞれ白血球の増加及び骨髄の髄外造血は用量依存的に回復した。また、髄外造血の回復と同時

に、ヘマトクリット値の改善、並びに脾腫の縮小及び脾臓重量の回復が認められた。ラットACDモデルにおいて、MMBは肝臓のpSTAT3及びpSMAD1/5/8レベルを低下させ、血清ヘプシジンを減少させ、血清鉄を増加させた。その結果、ヘモグロビン及び赤血球値が増加した。MMBがACVR1及びヘプシジンを調節することによりACDに有効であることが示唆された。

MMBはhERGチャネルK^+電流を僅かに阻害し、そのIC50は10 μM超であった。テレメトリーシステムを装着したイヌを用いた心血管系に対する安全性薬理試験では、MMBは用量依存的に動脈圧を低下させ、MMB 30 mg/kgの投与後12時間及び100 mg/kg投与後6時間に最大変化を示し、それぞれ18及び29%の低下を示した。イヌ4週間反復経口投与毒性試験の雄100 mg/kgにおける投与1日のCmax値（1810 ng/mL；フリー体濃度348 ng/mL）は、MF患者のCmax値（479 ng/mL；推定遊離薬物濃度として92 ng/mL）の約4倍であった。これらのデータは、MF患者に対する臨床用量のMMB投与によって、臨床的に有意な動脈圧の低下がもたらされる可能性が低いことを示唆している。更に重要なこととして、臨床QTc評価試験において、治療量を上回る800 mgまでの用量のMMBの投与においても、QT間隔への影響は認められていない（2.7.2.）。

JAK阻害薬であるフェドラチニブ[INREBIC capsules 米国添付文書, 2023]の臨床開発期間中に報告されたウェルニッケ脳症の推定メカニズムとしてTHTRの阻害が考えられていることから、Caco-2細胞及びTHTR過剰発現細胞を用いてMMB及びそのヒト主要代謝物であるM21のチアミン輸送阻害の可能性について検討した。その結果、MMB及びM21はこれらの細胞においてチアミン輸送を阻害せず、フェドラチニブで報告されているような脳症を引き起こすことはないと考えられた。

定性的な神経学的パラメータや呼吸機能（1回換気量、呼吸数、分時換気量）に対してMMBに関連した影響はみられなかった。

イオンチャネル試験では、試験濃度（3 μM）のMMBは、電位依存性ナトリウム（hNav1.6、hNav1.7及びhNav1.8）、カリウム（hHCN2）又はShakerファミリーカリウム（hKv1.1及びhKv1.2）チャネルを阻害しなかった。この濃度は、ラット26週間反復経口投与毒性試験において、可逆的で軽度の尾部及び指神経伝導速度の遅延が認められた際の推定遊離薬物濃度（1.1 μM）の約3倍であった。MMBの放射性標識体を用いた試験において、ラットでは脳及び脊髄組織への移行性が低く、マウスではMMBの脳への取り込みが低かった。また、ラットでは定性的な神経学的パラメータに対してMMBに関連した影響は認められなかった。これらのデータから、MMBは推定ヒト血漿中濃度（推定遊離薬物濃度でのCmax値：0.22 μM）において、ヒトの（末梢）神経伝導に影響を及ぼすことはないと考えられた。なお、伝導速度変化の機序は明らかにされなかった。

Caco-2細胞を用いてMMBの透過性について検討した結果、ヒトにおけるMMBの腸管吸収は高い可能性が示された。このことは、マウス、ラット、ウサギ及びイヌにMMBを単回経口投与したときのバイオアベイラビリティが中程度～高度（媒体及び塩に依存）であったことからも支持された。MMB二硫酸塩（酸性化滅菌水）のバイオアベイラビリティは

100%であったが、ラットの反復投与毒性試験において高用量で毒性が認められたことから、二硫酸塩の開発を中止し、その後の開発には二塩酸塩（バイオアベイラビリティは70%）を選択した。イヌでは、MMB（二塩酸塩）を経口投与したときのバイオアベイラビリティは低かったが、摂食下における AUC が絶食下の AUC の約 2 倍であったことから、食後の経口投与により MMB 二塩酸塩のバイオアベイラビリティが増加することが示唆された。経口投与後の吸収は比較的遅く、それに伴って MMB の血漿中半減期が延長した。

MMB はすべての動物種の血漿中で中等度～高度の蛋白結合率を示し、他の動物種よりもラットで高い蛋白結合率を示した。ラットに ^{14}C-MMB を経口投与したとき、白色及び有色動物ともに広く組織に分布し、消化管内の放射能濃度が最も高く、骨、脳、脊髄及び精巣では定量不能であった。Swiss マウスに 5 mg/kg を静脈内投与したとき、MMB の脳への取り込みは低く、投与後の脳／血漿中濃度比は 0.215 であった。SD ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験では、MMB を投与した母動物から授乳を受けた出生児において、母動物に比べて約 4～8 倍低い曝露が認められ、MMB は乳汁中に存在することが示唆された。

マウス、ラット及びイヌに ^{14}C-MMB を単回経口投与したときの主要な代謝経路は酸化及び加水分解であった。代謝物のなかで生成量が多かったのは、M19（MMB のアミド加水分解体）、M20（モルフォリノ開裂体）、M21（モルフォリノラクタム体）であり、ラットでは M8 もわずかに認められた。M20 はヒトよりもラットで多かった。ヒト血漿中の主要代謝物は M21 であったが、その他はいずれもマイナーであった。ヒト血漿中 M21 はラット血漿よりも 2.1～4.5 倍多かった（MMB の用量に依存）。M21 はイヌでは検出されなかった。M19 はヒト血漿よりもイヌ及びラットで多かった。M21 の曝露量（MMB の AUC の 10%超）は、ラット及びイヌよりもヒトで高かったことから、ラットの 104 週間投与がん原性試験では、M21 の曝露量を増加させるために、MMB の 5 mg/kg/日及び M21 の 25 mg/kg/日を併用投与した群を追加した。その結果、MMB の AUC0-24 は用量比を上回って増加し、M21 の AUC0-24 は用量比に概ね伴って増加し、併用投与による影響はみられなかった。また、MMB 単独投与群における M21 の曝露量は MMB よりも低かった。

ラット及びイヌでは、MMB の M19 への加水分解によりアミノアセトニトリルが生成され、これが更に代謝を受けてシアン化物を生成し、最終的にロダネーゼを介してチオシアン酸塩が生成される。ラット及びイヌでは M19 の生成が主要代謝経路であるが、ヒトでは主要な代謝経路ではなく、ヒトでの曝露量については安全性上のリスクが低いことが示された。臨床試験（CCL09101 試験）で採取した血漿試料についてチオシアン酸塩を測定したが、臨床的に意義のある量ではないと判断された。

無処置動物における排泄経路は動物種間で一致しており、主に糞中（投与量の 70%超）であり、尿中（投与量の 15%未満）はわずかであった。胆管カニュレーションを施したラット及びイヌにおける胆汁中への排泄は、投与量のそれぞれ約 33 及び 42%であった。

MMB の CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4 に対する阻害は、25 μM（検討した最高濃度）において、時間又は代謝依存的ではなく、MMB

のトランスポーター阻害濃度は、in vitro における JAK 活性阻害濃度よりもはるかに高かった。したがって、MMB の予定臨床用量において、MMB による CYP 分子種又はトランスポーターの阻害により DDI に関連した影響が生じる可能性は低いと考えられる。臨床試験では、MMB は CYP3A、P-gp 及び BCRP に対する基質ではないことが示された。

MMB（二塩酸塩）を反復経口投与したとき、血漿中濃度は用量増加に伴って増加した。長期間投与による MMB の蓄積はみられず、いずれの動物種においても曝露量に性差は認められなかった。

ラット及びイヌのそれぞれ最長 26 及び 39 週間反復投与試験における毒性所見として、MMB の薬理作用に関連した変化（リンパ系及び骨髄組織での血液学的変化及び臓器重量の変化を含む）が認められた。摂餌量の低値を伴う体重減少及び体重増加量の低値がみられ、高用量ではより顕著にみられ、悪影響と考えられた。また、高用量では、精巣（変性）、眼（39 週間投与後のイヌの白内障）、腎臓（尿細管変性／再生）、消化管、心臓及び肝臓に変化が認められた。ラットでは、13 週間投与後に末梢神経伝導速度の低下がみられたが、26 週間投与後では回復性がみられ、MMB の 50 mg/kg/日群で末梢神経の組織学的変化は認められなかった。イヌは悪影響に対して最も感受性の高い動物種であった。イヌ 39 週間投与試験の NOAEL である 20 mg/kg/日を投与したときの曝露量（AUC0-24）は、MF 患者を対象とした第 III 相試験（GS-US-352-101 試験）におけるヒト曝露量と同程度であった。イヌでは 50 mg/kg/日で悪影響（食欲不振、体重減少、重度の嘔吐等）が認められたが、このときの曝露量は、MMB の 200 mg を MF 患者に投与したときの約 3 倍であった。

In vitro 及び in vivo 遺伝毒性試験において、MMB は変異原性及び染色体異常誘発性を示さなかった。また、MMB は rasH2 マウスを用いた試験においてがん原性を示さなかった。ラットの 104 週間投与がん原性試験において、MMB の 15 mg/kg/日群で精巣間細胞（ライディッヒ細胞）腺腫の発現頻度の増加が認められた。ラットのライディッヒ細胞腺腫は、JAK 阻害薬のオフターゲット作用であるプロラクチンシグナル伝達経路の阻害に関連したものと考えられる。ヒトのライディッヒ細胞はプロラクチン依存性を示さないため、ヒトでの腫瘍形成リスクは低いと考えられる[Chapin, 2017; ゼルヤンツ錠 5mg 添付文書, 2022]。

ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験では、雄で受胎能の低下がみられ、雄受胎能に対する NOAEL は 5 mg/kg/日と推定された。雌では、100/68 mg/kg/日群で妊娠動物数の低値、早期吸収胚及び着床後胚死亡の高値がみられ、大部分の妊娠ラットで生存胎児を得ることができなかった。母動物の一般毒性及び受胎能に対する NOEL は 25 mg/kg/日、初期胚発生に対する NOEL は 5 mg/kg/日と推定された。ラットの胚・胎児発生に関する試験では、胚・胎児毒性がみられたが、催奇形性は認められなかった。12 mg/kg/日以上の群では、早期吸収胚及び着床後胚死亡率の高値、妊娠子宮重量の低値、生存胎児数及び胎児体重の低値が認められた。17 mg/kg/日群では内臓変異である腕頭動脈欠損の増加が認められた。母動物の一般毒性及び胚・胎児発生に対する NOAEL は、それぞれ 12 及び 6 mg/kg/日と推定された。ウサギでは、30 mg/kg/日以上の群で母動物毒性が観察された。胚・胎児毒性としては、75 mg/kg 群の母動物 1 例で着床後胚死亡の高値、胎児重量の低値が

認められた。母動物の一般毒性及び胚・胎児発生に対する NOAEL は、それぞれ 7.5 及び 60 mg/kg/日であった。受胎能及び胚・胎児発生に対する影響は、ラット及びイヌの生殖器で認められた悪影響と一致していた。

ラットの出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験では、他の生殖発生毒性試験と同様、6 mg/kg/日以上の群の母動物で着床後胚死亡率の高値が認められた。12 mg/kg/日群では出産児数の低値、6 及び 12 mg/kg/日群で出生児生存率の低値がみられた。6 及び 12 mg/kg/日群では、生後 14～21 日に出生児生存率が有意に低下したが、この群では明らかな母動物毒性が認められなかったことから、乳汁を介した曝露による出生児への直接的影響と考えられた。12 mg/kg/日群では、母動物の体重への影響に関連して出生児体重の低値が成長期及び妊娠期間中に観察された。母動物の生殖能、次世代の発生及び出生児の一般毒性に対する NOAEL はいずれも 2 mg/kg/日と推定された。

胚・胎児毒性は他の JAK 阻害薬（トファシチニブ、ルキソリチニブ等）でも観察されていることから、クラスエフェクトである可能性が考えられる。しかしながら、催奇形性は MMB 及びルキソリチニブ（JAK1 及び JAK2 阻害薬）ではみられず、JAK1 及び 2 並びに JAK3 を阻害するトファシチニブでは認められている。MMB の生殖発生への影響は、対象患者の年齢及び／又は添付文書において妊娠中及び授乳中の禁忌等により適切に管理されていることを考慮すると、臨床において問題となる可能性はないと考えられる。

幼若ラットでは、MMB の 10 mg/kg/日群で可逆的な脛骨及び大腿骨長の短縮（体重増加量及び摂餌量の低値に関連）、亀頭包皮分離の遅延、前肢握力の低下、並びに雄で記憶障害がみられた。雌では着床後胚死亡率の高値を伴う生殖能の低下が観察された。これらのことから、NOAEL は 3 mg/kg/日と推定された。MMB は小児適用を予定していないことから、幼若ラットへの影響は臨床において問題となることはないと考えられた。

MMB は溶解限界まで in vitro 光毒性を示さず、マウスに局所投与しても感作性を示さなかったが、BCOP 試験では重度の刺激性を示した。また、in vitro 膜バリア Corrositex を用いた試験で皮膚に対して腐食性を示すと考えられた。なお、臨床試験において刺激性又は光線過敏性は認められなかった（2.5.5）。

MMB の反復投与毒性試験における NOEL／NOAEL 投与時の動物における曝露量及びヒト曝露量との比較結果を表 2.4.5-1 に示す。

表 2.4.5-1　MMB を経口投与したときの全身曝露量比較

Species (Duration) [Study No.]	Dose (mg/kg)	NOEL/ NOAEL	Sex	AUC0-t (ng·h/mL)	AUC Exposure Multiples	Cmax (ng/mL)	Cmax Exposure Multiples
Mouse (4-weeks) [8283319]	100	NOAEL	M/F	57500	17	8470	18
Rat (28-days) [1009-0461]	30[a]	ND	M/F	191000	58	16500	34
Rat (13-weeks) [1668-009]	17	NOAEL	M/F	98100	30	7005	115
	5	NOAEL	M	33800	10	4020	8.4

Species (Duration) [Study No.]	Dose (mg/kg)	NOEL/ NOAEL	Sex	AUC0-t (ng·h/mL)	AUC Exposure Multiples	Cmax (ng/mL)	Cmax Exposure Multiples
Rat (26-weeks) [1668-023]			F	73100	22	7590	15.8
Dog (28-days) [GWR1005]	30	NOAEL	M	11000	3.3	2060	4.3
			F	4400	1.3	1000	2.1
Dog (13-weeks) [1668-011]	51 QD	NOAEL	M/F	3690	1.1	1200	2.5
	8.5 BID[b]	NOAEL	M/F	2120	0.6	568	1.2
Dog (39-weeks) [814-1407]	20	NOAEL	M/F	4720	1.4	939	2.0
Mouse (26-weeks; carcinogenicity) [8283320]	100	NOAEL	M/F	90200	27	7550	15.8
Rat[c] (2-years; carcinogenicity) [814-1519]	5	NOAEL	M/F	26000	7.9	3260	6.8
Rat (~10-weeks; Fertility-male) [8287293]	5	NOEL	M	NM	-	NM	-
Rat (~2-weeks; Fertility-female) [8291598]	25[d]	NOEL	F	NM	-	NM	-
	5[e]	NOEL					
Rat (GD 6-17; Embryo-fetal Development) [8283315]	12[d]	NOEL	F	75800	23	7450	16
	6[e]	NOEL		25500	7.8	3580	7.5
Rabbit (GD 7-20; Embryo-fetal Development) [8283318]	30[d]	NOAEL	F	543	0.2	312	0.7
	60[e]	NOAEL		4100	1.2	994	2.1
Rat (GD 6-LD 20; Pre- and Postnatal Development) [8307965]	6[df]	NOAEL	F	13900	4.2	3360	7.0
	2[eg]	NOAEL		830	0.3	69.3	0.14
Rat (PND 7-56; Juvenile Toxicity) [WIL-604256]	3	NOAEL	M/F	7795	2.4	1455	3.0
Human [GS-US-352-0101]	200 mg	-	M/F	3288	-	479	-

Key: BID = Twice daily; GD = Gestation Day; F = Female; LD = Lactation Day; M = Male;
ND = Not determined; NM = Not measured; NOAEL = NO Observed Adverse Effect Level;
NOEL = NO Observed Effect Level; PND = Postnatal Day; QD = Once daily.
a = Highest tolerated dose, NO(A)EL not determined.
b = 8.5 mg/kg group only twice daily dosing in this study.
c = Additional group of 5 mg/kg/day was co-administered with 25 mg/kg/day of metabolite M21.
d = NOEL for maternal toxicity.
e = NOEL for fetal toxicity.
f = Dam exposure measured on LD 10.
g = Pup exposure measured on PND 10.
Note: Exposure multiples are calculated from end of study values.

結論として、臨床曝露量において MMB は JAK1、JAK2 及び ACVR1 に対する阻害活性を示し、炎症性シグナル伝達の低下及び造血のための鉄利用率の上昇が認められた。非臨床試験に用いた動物において、MMB は in vitro で高い透過性及び経口バイオアベイラビリティを示した。血液脳関門及び血液精巣関門の通過性は低く、肝抽出率は中等程度であり、ヒトで

も同様の結果が予測された。MMB が相互作用薬又は被相互作用薬として DDI を誘導する可能性は低いことが示され、臨床薬理試験（2.7.2）においても確認された。主要な毒性試験において NOAEL 又は NOEL は特定している。これらの試験で NOAEL／NOEL を投与したときの動物における曝露量及びヒトとの曝露量比較結果を表 2.4.5-1 に示す。マウス及びラットを用いた毒性試験及びがん原性試験における曝露量は、臨床用量である 200 mg 投与時のヒト曝露量と比較して十分な安全域（10 倍超）を有していたが、イヌを用いた毒性試験（1～4 倍）及び生殖発生毒性試験（7 倍以下）における安全域は低かった。しかしながら、反復投与毒性試験で認められた主要所見の大半は、モニタリング可能かつ可逆的なものであり、臨床での安全性に懸念を及ぼすものではなかった。MMB の薬理、薬物動態及び毒性プロファイルは、MF 患者への治療用量として予定している 200 mg の用量を支持するものである。

2.4.6. 参考文献

Chapin RE, Ball DJ, Radi ZA, et al. Effects of the Janus kinase inhibitor, tofacitinib, on testicular Leydig cell hyperplasia and adenoma in rats, and on prolactin signaling in cultured primary rat Leydig cells. Toxicol Sci. 2017;155(1):148-56.

Elena C, Passamonti F, Rumi E, et al. Red blood cell transfusion-dependency implies a poor survival in primary myelofibrosis irrespective of IPSS and DIPSS. Haematologica. 2011;96(1):167-70.

INREBIC capsules, for oral use. 米国添付文書. (fedratinib) 2023 年 5 月改訂.2023

JAKAVI (ruxolitinib), Pharmacology Review. November 2011.
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2011/202192Orig1s000PharmR.pdf

Nicolosi M, Mudireddy M, Lasho TL, et al. Sex and degree of severity influence the prognostic impact of anemia in primary myelofibrosis: analysis based on 1109 consecutive patients. Leukemia. 2018;32(5):1254-8.

Pardanani A, Finke C, Abdelrahman RA, et al. A. Associations and prognostic interactions between circulating levels of hepcidin, ferritin and inflammatory cytokines in primary myelofibrosis. Am J Hematol. 2013;88(4):312-6.

Tefferi A, Lasho TL, Jimma T, et al. One thousand patients with primary myelofibrosis: the Mayo Clinic experience. Mayo Clin Proc. 2012;87(1):25-33.

XELJANZ (tofacitinib), Pharmacology Review. November 2012.
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2012/203214Orig1s000PharmR.pdf

ゼルヤンツ錠 5mg 添付文書. (トファシチニブクエン酸塩錠). 2022 年 12 月改訂(第 5 版). 2022.

別紙 1

eCTD Section	Title	Explanation for Missing Studies
4.2.1.4	Pharmacodynamic Drug Interactions	Pharmacodynamic drug interaction studies were not considered necessary since concomitant administration of drugs competing with MMB at the pharmacological target and/or with similar or opposing pharmacodynamic effects is unlikely.
4.2.3.7.2	Immunotoxicity	Immune suppression is an expected pharmacological effect of MMB. No immunotoxicology or immunophenotyping studies were conducted with MMB. MMB would be expected to produce similar results as the marketed JAK inhibitors ruxolitinib and tofacitinib in specialized nonclinical immunological assessments.
4.2.3.7.3	Mechanistic studies (if not included elsewhere)	Mechanism of action is included in the pharmacology reports, no additional mechanistic studies were performed.
4.2.3.7.4	Dependence	No specific studies have been conducted to evaluate dependency of MMB. There was no evidence of development of dependence in nonclinical studies with MMB. MMB exhibited low brain uptake following IV administration in mice (Module 2.6.4, Section 4.5). In the tissue distribution studies using ^{14}C-MMB, radioactivity was below the limit of quantification in brain tissues from SD rats and Long Evans rats (m2.6.4, Section 4.4). Consequently, dependency studies were not considered warranted.
4.2.3.7.5	Metabolites	No specific toxicology studies with MMB metabolites were conducted. Systemic plasma exposure to MMB metabolites following oral dosing of MMB was evaluated in PK and repeat-dose toxicology and carcinogenicity studies.