2.6.6 及び 2.6.7 の略号等一覧

略語（略称）	内容
AUC	血漿中濃度－時間曲線下面積
Cmax	最高血漿中濃度
DMSO	ジメチルスルホキシド
DPBS	ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水
FOB	機能観察総合評価
GALT	腸管関連リンパ組織
GLP	医薬品の安全性試験の実施に関する基準
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
ICH	医薬品規制調和国際会議
LLOQ	定量下限
MF	骨髄線維症
MMB	モメロチニブ
MNU	N-メチル-N-ニトロソ尿素
MPE	平均光作用
NOAEL	無毒性量
NOEL	無影響量
NZW ウサギ	New Zealand White ウサギ
PCE/EC 比	多染性赤血球／全赤血球比
PIF	光毒性係数
QSAR	定量的構造活性相関
RDW	赤血球分布幅
S9-mix	代謝活性化系
SD ラット	Sprague Dawley ラット
TK	トキシコキネティクス
WBC	白血球

2.6.6. 毒性試験の概要文

2.6.6.1. まとめ

モメロチニブ（以下、MMB）のヒトへの経口投与をサポートするために、一連の毒性試験を実施した。MMB 及びその主要代謝物のコードを表 2.6.1 に示す。毒性試験は、「医薬品の臨床試験及び製造販売承認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））及びその他の低分子化合物の開発に関連するガイダンスに従って実施した。

MMB の毒性評価のため、マウス、ラット、ウサギ及びイヌを用いた最長 39 週間投与反復投与毒性試験、遺伝毒性試験、がん原性試験、生殖発生毒性試験、局所刺激性試験、光毒性試験並びに不純物の安全性評価を実施した（表 2.6.6.1）。

MMB の毒性試験における主要所見は、MMB の過剰な薬理作用に関連したものであった。赤血球量及び白血球（WBC）数の低値がみられ、これに関連して用量依存的な骨髄（大腿骨及び胸骨）の細胞密度低下並びに脾臓、リンパ節、胸腺及び腸管関連リンパ組織（GALT）におけるリンパ球枯渇が認められた。ラットに MMB の 50 mg/kg/日を 26 週投与したときに神経伝導速度の可逆的な低下がみられたが、機能観察総合評価（FOB）及び病理組織学的検査において関連した変化は認められなかった。雌雄イヌに MMB の 50 mg/kg/日を 39 週間投与したときに白内障がみられたが、病理組織学的検査では確認されなかった。ラット及びイヌに反復投与したときに用量依存的な精巣変性がみられ、本所見の回復性は影響の程度及び休薬期間に依存した。ラット受胎能に関する試験では、MMB 投与に関連した受胎能の低下がみられ、雄では精子運動性及び濃度の低下、雌では黄体数の低値及び胚・胎児毒性が認められた。ラット及びウサギ胚・胎児発生に関する試験では、着床後胚損失率の増加、胎児体重低値及び生存胎児数低値が認められた。

毒性試験成績は、骨髄線維症（MF）患者の治療のための MMB の臨床使用を支持するものであった。

以下に示す各試験の試験データを 2.6.7 に示す。毒性試験で得られた反復投与時のトキシコキネティクス（TK）データの要約を 2.6.7.3 に、各バッチに含まれる不純物の詳細データを 2.6.7.4 に示す。

表 2.6.6.1 MMB の毒性試験一覧

Study Type and Duration (GLP status)	Route of Administration	Species
Single-Dose Toxicity (non-GLP)		
	Oral	Mouse, Rat, Dog
	Intravenous	Rat
Repeat-Dose Toxicity		
1 week (non-GLP)	Oral	Rabbit
2 weeks (non-GLP)	Oral	Mouse, Rat, Dog
2 weeks (non-GLP)	Intravenous	Rat
3 weeks (GLP)	Oral	Rat
4 weeks (GLP)	Oral	Mouse, Rat, Dog
2-8 weeks (non-GLP)	Oral	Mouse
60 days (non-GLP)	Oral	Rat
13 weeks (GLP)	Oral	Rat, Dog
26 weeks (GLP)	Oral	Rat
39 weeks (GLP)	Oral	Dog
Genotoxicity (GLP)		
In vitro reverse mutation assay	In vitro	not applicable
In vitro chromosome aberration assay	In vitro	not applicable
In vivo micronucleus assay	Oral	Rat
Carcinogenicity (GLP)		
26 weeks	Oral	rasH2 Mouse
104 weeks	Oral	Rat
Reproductive and Developmental Toxicity (GLP)		
Fertility and early embryonic development	Oral	Rat
Embryo-fetal development	Oral	Rat, Rabbit
Prenatal and postnatal development, including maternal function	Oral	Rat
Juvenile Toxicity (GLP)		
Dose range finding (Postnatal Day 7 to 21)	Oral	Rat
Definitive (Postnatal day 7 to 56)	Oral	Rat
Local Tolerance (GLP)		
Dermal irritation	In vitro	Corristex
Ocular toxicity	In vitro	Bovine cornea
Phototoxicity	In vitro	Mouse fibroblasts
Other Studies (GLP)		
Antigenicity	Topical	Mouse
Impurity bacterial reverse mutation assay	In vitro	Not Applicable
Impurity ocular toxicity	Ex vivo	Bovine cornea
Impurity qualification – 4-week repeat-dose toxicity	Oral	Rat
Impurities dermal irritation	Topical	Rabbit

2.6.6.2. 急性毒性試験

2.6.6.2.1. マウス

C57BL6 マウス（各群雄 4 例）を用いた単回投与試験を実施した（CYTO0028:584、非 GLP）。本試験の目的は、MTD（試験期間中に 15%を超える体重減少を誘発せず、死亡及び重篤な病的状態を引き起こさない最高用量）を特定することであった。MMB（遊離塩基）の 5、10、15 及び 20 mg/kg/回を 1 日 2 回（BID）経口投与した。媒体は 5% N-メチル-2 ピロリドン（NMP）及び 95% 0.1M カプチゾール（v/v）を用いた。最高用量までを投与しても、一般状態への影響は認められなかった。MTD は 20 mg/kg BID（40 mg/kg/日）超であった。

次の試験では BALB/c マウス（各群雌 4 例）を用いて MTD を求めた（CYTO0037:759、非 GLP）。MMB（遊離塩基）の 20、30、40 及び 50 mg/kg/回を 1 日 2 回経口投与した。媒体は 5% NMP 及び 95% 0.14M カプチゾールを用いた。最高用量までを投与しても一般状態への影響は認められなかった。MTD は 50 mg/kg BID（100 mg/kg/日）超であった。

2.6.6.2.2. ラット

2.6.6.2.2.1. 経口投与

Sprague-Dawley（SD）ラット（各群雌雄各 3 例）に MMB（二硫酸塩）の 50、250、500 及び 750 mg/kg を単回経口し、14 日間観察した（GWR1000、非 GLP）。対照群（雌雄各 3 例）には媒体（注射用水）を同様に投与した。生存性・一般状態観察、体重・摂餌量測定、臨床病理学的検査（血液学的検査、凝固系検査及び血液生化学的検査）、剖検及び器官重量測定を実施した。

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。一般状態変化として、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。剖検では、雄において大腸及び小腸の膨満、異常内容物（黒色）がみられたのみであった。

50 mg/kg 群では MMB 投与に関連した変化は認められなかった。

500 mg/kg 群では、一般状態の変化として、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 日に体重減少又は体重増加抑制が認められたが、試験 15 日までに回復した。750 mg/kg 群の雌雄では、同時期に摂餌量の低値も認められた。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 WBC の低値がみられ、500 mg/kg 以上の群ではヘマトクリットと血小板数の低値も認められた。これらすべての血液学的変化は、MMB のオンターゲット作用に関連しており、観察期間終了時までに回復した。凝固系検査、血液生化学的検査、器官重量測定及び剖検において MMB 投与に関連した変化は認められなかった。

MTD は 500 mg/kg であった。

2.6.6.2.2.2. 経口及び静脈内投与

ラットにおける MTD を特定するため、SD ラット（各群雄 3 例）を用いた予備試験を実施した（CYTO0041:787、非 GLP）。MMB（遊離塩基）の 20、40 及び 60 mg/kg を 1 日 2 回経口投与、又は 7.5、15、30 及び 60 mg/kg を 1 日 2 回静脈内投与した。対照群（雄 2 例）には媒体（5% NMP 及び 95% 0.14M カプチゾール）を静脈内投与した。いずれの投与経路においても、15%を超える体重減少はみられず、MMB に関連する一般状態の変化は認められなかった。経口及び静脈内投与時の MTD はいずれも 60 mg/kg BID（120 mg/kg/日）超であった。

2.6.6.2.3. イヌ

雌雄イヌに MMB（二硫酸塩）の 15、45、90、150、250、500 及び 1000 mg/kg を経口投与し、14 日間観察した（GWR1002、非 GLP）。媒体には注射用水を用いた。生存性・一般状態観察、体重・摂餌量、臨床病理学的検査（血液学的検査、血液生化学的検査）、剖検及び器官重量測定を実施した。また、血漿サンプルを採取し、MMB 濃度（CAN08107、非 GLP）及びチオシアン酸濃度（CAN08108、非 GLP）を測定した。

一般状態変化として、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がみられ、1000 mg/kg 群では水分補給が必要であった。500 mg/kg 以上の群では、嘔吐が投与直後にみられ、他の用量と比較して血漿中濃度の低下が認められた。150 mg/kg 以下の群では一般状態変化は認められなかった。

体重、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検及び器官重量に影響は認められなかった。

試験 1 日の投与 2 時間後に血漿中 MMB 濃度を評価した。血漿中濃度は 1.50～3.49 μg/mL であり、明らかな用量相関性は認められなかった。

試験 1、8、及び 15 日に血漿中チオシアン酸濃度を測定した。その結果、血漿中チオシアン酸濃度は 1.0～3.3 mg/L であり、用量相関性はみられなかった。MMB 単回投与時の最高チオシアン酸濃度は、反復投与毒性試験（GWR1005）の対照群における血漿中濃度の範囲内（2.3～3.8 mg/L）であった。

以上より、MMB の忍容性は良好であったが、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。

2.6.6.3. 反復投与毒性試験

2.6.6.3.1. マウス

2.6.6.3.1.1. 2 週間経口投与試験

C57BL/6 マウス（各群雄 4 例）に MMB（遊離塩基）の 0（媒体）、5、10、15 及び 20 mg/kg BID（10、20、30 及び 40 mg/kg/日）を 14 日間経口投与した。媒体には 5% NMP 及び 95% 0.1M カプチゾール(v/v)を用いた（CYTO0028:585、非 GLP）。一般状態、体重及び臨床病理学的検査（血液塗抹標本）を評価した。

本試験において MMB に関連した影響は認められなかった。

MTD は 20 mg/kg BID（40 mg/kg/日）超であった。

2.6.6.3.1.2. 8 週間経口投与試験

BALB/c マウス（各群雌 7 例）に MMB（遊離塩基）の 0（媒体）、25 及び 50 mg/kg BID（50 及び 100 mg/kg/日）を 14、28、42 若しくは 56 日間経口投与、又は 56 日間経口投与後に 14 日間休薬した（CYTO0041:795、非 GLP）。対照群（7 例）には媒体（5% NMP 及び 95% 0.14M カプチゾール(v/v)）を投与した。また、4 例の無処置対照群を設定した。一般状態観察、体重・摂餌量・摂水量測定、臨床病理学的検査、剖検及び病理組織学的検査（56 日間投与群のみ）並びに T 細胞、B 細胞及びナチュラルキラー細胞測定［蛍光活性化細胞選択（FACS）法により］を実施した。

MMB 投与群では、摂餌量及び摂水量がわずかに減少したが、体重に明らかな影響は認められなかった。また、50 及び 100 mg/kg/日群で 56 日間投与後に肝臓又は脾臓重量の低値がみられたが、病理組織学的検査では異常は認められなかった。100 mg/kg/日の 56 日間投与後、末梢 T 細胞の低値がみられたが、骨髄への影響は認められなかった。14 日間の休薬後の肝臓及び脾臓重量並びに T 細胞数については、投与群間で有意差は認められなかった。

2.6.6.3.1.3. 4 週間経口投与試験（BALB/c マウス）

BALB/c マウス（各群雌 6 例）に MMB（遊離塩基）の 0（媒体）、35 及び 50 mg/kg BID（12 時間間隔）を 4 週間経口投与した（CTYO0037:834、非 GLP）。媒体には 5% NMP:95% 0.14M カプチゾールを用いた。更に無処置対照群（6 例）を設定した。本試験では、生存性・一般状態観察、体重測定及び血液学的検査を実施した。

15%を超える体重減少及び一般状態への悪影響は認められなかった。投与期間終了時に網状赤血球数及び白血球数の低値がみられたが、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。

2.6.6.3.1.4. 4 週間経口投与試験（rasH2 マウス）

rasH2［001178-W（野生型）、CByB6F1-Tg[HRAS]2Jic］マウス（各群雌雄各 6 例）に MMB（二塩酸塩一水和物）の 0（媒体）30、100 及び 300/150 mg/kg/日を 1 日 1 回 4 週間経口投与した（8283319、GLP）。媒体には酸性化滅菌水（pH 1.35～1.8）を用いた。対照群に雌雄各 6 例及び MMB 投与群に雌雄各 39 例を追加し、試験 1 及び 28 日に TK 評価を実施した。試験 5 日から 300 mg/kg/日を 150 mg/kg/日に減量した。高用量群の動物では、最終的に試験 1～4 日に 300 mg/kg/日、試験 5 日に 150 mg/kg/日を投与し、試験 6～13 日は投与を中止し、試験 14～29 日に 150 mg/kg/日を投与した。一般状態観察、体重・摂餌量測定、臨床病理学的検査（血液及び血液生化学的検査）、剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。

MMB 及びその代謝物（M19 及び M21）について、LC-MS/MS 法（LLOQ＝5 ng/mL）により血漿中濃度を測定した（8283424）。また、十分な試料が得られた場合には、バリデーションされていない LC-MS/MS 法により M20 を測定した。

MMB の曝露量は用量増加（試験 1 日は 30～300 mg/kg/日、試験 28 日は 30～150 mg/kg/日）に伴って概ね増加した。M19、M21 及び M20 の曝露量は、MMB の用量増加に伴って概ね増加した。MMB 及び M19 の最高血漿中濃度（Cmax）及び投与後定量可能時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積（AUC0-t）に性差は認められなかった。M21 については、雌で Cmax 及び AUC0-t が雄よりも概ね高く、試験 1 日では 2 倍超の差を示した。M20 についても、雌で Cmax 及び AUC0-t は雄よりも概ね高く、Cmax はすべての用量で試験 1 日に、AUC0-t は 100 mg/kg/日で試験 1 及び 28 日に、2 倍超の差を示した。MMB 反復投与による 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 比の結果から、MMB は主として M19 に代謝されたが、M21 及び M20 にはほとんど代謝されなかったことが示された。

平均血漿中濃度から算出した TK パラメータを 表 2.6.6.2 に示す。

表 2.6.6.2 rasH2 野生型マウスに MMB を経口投与したときの血漿中 TK パラメータ

Dose (mg/kg/day)	30		100		300/150	
Sex	Male	Female	Male	Sex	Male	Female
MMB Cmax (ng/mL)						
Day 1	2930	3310	7630	11300	14000[a]	16800[a]
Day 28	3820	4100	8680	8260	10800[b]	9000[b]
MMB AUC0-t (ng·h/mL)						
Day 1	13800	17500	45900	92200	191000[a]	158000[a]
Day 28	20500	23000	52600	62400	81800[b]	71800[b]
M19 Cmax (ng/mL)						
Day 1	398	411	1070	1320	1900[a]	1910[a]
Day 28	601	673	1220	1060	1910[b]	1490[b]
M19 AUC0-t (ng·h/mL)						
Day 1	2820	2670	13400	13000	35400[a]	23900[a]
Day 28	3930	4400	11400	9910	22100[b]	12400[b]
M20 Cmax (ng/mL)						
Day 1	12.5	29.9	41.6	110	74.3[a]	218[a]
Day 28	22.6	30.9	47.1	64.2	33.8[b]	45.0[b]
M20 AUC0-t (ng·h/mL)						
Day 1	NC	130	202	486	636[a]	1050[a]
Day 28	56.0	76.0	158	336	219[b]	326[b]
M21 Cmax (ng/mL)						
Day 1	20.2	62.9	81.8	188	163[a]	359[a]
Day 28	48.6	48.2	113	147	101[b]	111[b]
M21 AUC0-t (ng·h/mL)						
Day 1	NC	239	344	853	1240[a]	1980[a]
Day 28	105	250	373	735	572[b]	704[b]

[a] = Animals were administered 300 mg/kg/day on day 1.
[b] = The dose level was reduced to 150 mg/kg/day beginning on Day 5. Animals were not administered the dose on Days 6 to 13.

300 mg/kg/日群では、試験 4 日までに MMB 投与に関連した数例の死亡が認められた。そのため、この群では試験 5 日に 300 mg/kg/日から 150 mg/kg/日に減量した（300/150 mg/kg/日と記載）。300/150 mg/kg/日群では、数例が試験 5 及び 6 日に死亡したため、試験 6 日に投与を中止した。300/150 mg/kg/日群では、試験 8 日までに、主試験群の雄 1 例及び TK 群の雄 9 例、主試験群の雌 4 例及び TK 群の雌 14 例が死亡又は瀕死状態を呈したため安楽死された。また、投与期間中、30 mg/kg/日群の主試験群の雄 1 例及び 300/150 mg/kg/日群の TK 群の雌 1 例で死亡がみられたが、これら 2 例の死亡は偶発的なものであり、MMB 投与との関連性はないと考えられた。

主試験群の死亡例の一般状態観察において、運動失調、活動低下、冷感及び衰弱がみられた。試験 8 日までに死亡及び安楽死させた動物については別の動物を追加した。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 例で円背位がみられたのみであった。

30 及び 100 mg/kg/日群では、一般状態への影響はみられず、MMB 投与に関連した摂餌量の変化も認められなかった。MMB 投与に関連した体重への悪影響もみられなかった。

臨床病理学的検査では、MMB 投与に関連した影響として、100 mg/kg/日以上の群の雄で赤血球量（赤血球数、ヘモグロビン及びヘマトクリット）の軽微低値、及び白血球数の中等度の低値（主にリンパ球数の中等度又は顕著な低値による）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。

MMB 投与に関連する肉眼的所見は認められなかった。

MMB 投与に関連した組織学的所見として、100 mg/kg/日以上の群の雄及び 300/150 mg/kg/日群の雌で白脾髄、300/150 mg/kg/日群の雄で下顎リンパ節、並びに 100 mg/kg/日以上の群の雄で腸間膜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 例で大腿骨及び胸骨骨髄の細胞密度低下及び胸腺のリンパ球減少が認められ、本例の組織学的所見は悪影響と判断された。

以上のように、300/150 mg/kg/日群でみられた組織学的所見を考慮して、MMB の無毒性量（NOAEL）は 100 mg/kg/日と推定された。NOAEL を投与したときの試験 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。

2.6.6.3.2. ラット

2.6.6.3.2.1. 2 週間経口投与用量設定試験

SD ラット（各群雌雄各 5 例）に MMB（二硫酸塩）の 0（媒体）50、100、125 及び 175 mg/kg/日を 1 日 1 回 14 日間経口投与した（GWR1001、非 GLP）。媒体には酸性化滅菌水（pH 1.5）を用いた。生存性・一般状態観察、体重・摂餌量測定、臨床病理学的検査（血液及び血液生化学的検査）、剖検及び器官重量測定を実施した。

175 mg/kg/日群の雌 2 例を瀕死状態のため安楽死させた。本例では、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、血中尿素窒素、総ビリルビン及びコレステロールの高値並びにアルブミン及び総タンパクの低値が認められた。また、100 mg/kg/日以上の群の安楽死例では、一般状態変化として、四肢の赤色化／蒼白化、円背位、活動低下、立毛及び四肢の冷感が認められた。100 mg/kg/日群の雄及び 125 mg/kg/日以上の群の雌雄では、対照群と比較して顕著な体重増加量抑制が認められた。血液学的検査では、すべての用量で用量に依存した網状赤血球数及び白血球数の低値が認められた。血液生化学的検査所見では、175 mg/kg/日群の安楽死例（雌 2 例）でのみ、前述の MMB 投与に関連した変化が認められた。剖検では、肺の赤色化／海綿状化、気管に泡沫、腸間膜リンパ節の赤色化、肝臓の蒼白化及び胸腺に斑紋が用量依存的に認められた。安楽死例（雌 2 例）では、胃、十二指腸及び回腸に異常内容物（それぞれ黒、赤及び黄色）、胸腺の小型化、顎下リンパ節の赤色化、胃に暗色病変及び肝臓の蒼白化が認められた。用量依存的な胸腺及び脾臓の絶対及び相対重量の低値がみられた。

MTD は 125 mg/kg/日であった。

2.6.6.3.2.2. 2 週間経口及び静脈内投与用量設定試験

SD ラット（各群雄 3 例）に MMB（遊離塩基）を 12 時間間隔で 14 日間経口又は静脈内投与した（CYTO0041:788、非 GLP）。経口投与では 20、35 及び 50 mg/kg BID（40、70 及び 100 mg/kg/日）、静脈内投与では 12、18 及び 24 mg/kg BID（24、36 及び 48 mg/kg/日）を投与した。対照群（雄 3 例）には媒体（5% NMP:95% 0.14M カプチゾール）を静脈内投与した。一般状態観察及び体重測定を実施した。

一般状態観察及び体重測定において MMB 投与による影響は認められなかった。

MMB の経口投与時の MTD は、最高用量である 50 mg/kg BID（100 mg/kg/日）超であり、静脈内投与時の MTD は、最高用量である 24 mg/kg BID（48 mg/kg/日）超であった。

2.6.6.3.2.3. 4 週間経口投与試験

SD ラットの各群雌雄各 10 例に MMB（二硫酸塩）の 25 及び 50 mg/kg/日、又は雌雄各 15 例に 125 mg/kg/日を、1 日 1 回 28 日間経口投与した（GWR1004、GLP）。対照群（雌雄各 15 例）には媒体［酸性化滅菌水（対照群及び高用量群：pH 1.0、低及び中用量群：pH 1.2）］を投与した。対照群に雌雄各 6 例及び MMB 群に雌雄各 9 例を追加し、TK 評価を実施した。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、試験を早期に中止した。試験 20 日以降は対照動物がいなかったため、25 及び 50 mg/kg/日群の動物は試験 21 及び 22 日に安楽死させた。対照群については、当初予定していた回復性評価のための動物がいなかったが、125 mg/kg/日群（雌雄各 4 例）並びに 25 及び 50 mg/kg/日の TK 群（各群雌雄各 3 例）は、一般状態変化の回復性検討のため、13 又は 14 日間休薬した。生存性・一般状態観察、体重・摂餌量測定、眼科学的検査、臨床病理学的検査（血液学的検査、凝固検査及び血液生化学的検査）、剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。また、試験 1 及び 21 日（125 mg/kg/日群では試験 1 及び 9 日）に血漿サンプルを採取し、TK 評価を行った。

バリデートされた LC-MS/MS 法（LLOQ＝0.5 ng/mL）により、血漿中濃度を測定した（1668-003）。

試験 1 日に対照群から採取した 12 サンプル中 5 サンプルにおいて、LLOQ 付近の濃度で MMB が検出された。これらのデータは、LLOQ 付近の濃度であることから解析上のばらつきによるものと考えられ、MMB 投与による血漿中 MMB の実際の濃度を示したものではないと考えられた。

TK パラメータに明らかな性差は認められなかった。曝露量［Cmax 及び 0 から 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積（AUC0-24）］は、単回及び反復投与時で同程度であった。試験 21 日の曝露量（Cmax 及び AUC0-24）は用量比を下回って増加した。反復投与により、25～50 mg/kg/日では、Cmax 及び AUC0-24 は用量比に概ね伴って増加し、50～125 mg/kg/日では用量比を下回って増加した。

TK パラメータを表 2.6.6.3 に示す。

表 2.6.6.3 ラット血漿中における MMB の TK パラメータ

Dose (mg/kg/day)	Sex	Day 1		Day 21	
		Cmax (ng/mL)	AUC0-24 (ng·h/mL)	Cmax (ng/mL)	AUC0-24 (ng·h/mL)
25	Male	13000	119000	10800	141000
50	Male	13200	170000	20900	273000
125	Male	17700	293000	31200[a]	463000[a]
25	Female	14000	123000	11100	142000
50	Female	18000	200000	25500	230000
125	Female	25500	310000	35700[a]	476000[a]

a Day 9

対照群の雌 4 例では、重篤な一般状態変化（円背位、四肢の冷感、立毛、喘鳴及び歩行異常）及び体重減少がみられたため、試験 19 日に安楽死させた。これらの変化は対照群の雄では認められなかった。残りの雌 11 例でも重篤かつ同様の一般状態変化及び体重減少がみられたため、試験 20 日に対象群の全例で投与を中止し、安楽死させた。

25 及び 50 mg/kg/日群では、早期死亡は認められなかった。125 mg/kg/日群では 8 例が死亡又は安楽死させ、雄 1 例が試験 11 日、雌 2 例が試験 8 及び 13 日に死亡した。3 例いずれにおいても死亡前に体重減少（最大 16%）がみられたが、その他の一般状態の悪影響は認められなかった。また、雄 1 例及び雌 4 例では、重篤な一般状態変化及び顕著な体重減少（最大 18%）がみられたため、それぞれ試験 9 日又は試験 11、12 及び 13 日（2 例）に安楽死させた。死亡前の一般状態変化として、円背位、四肢の冷感、立毛、不規則呼吸、呼吸困難、並びに鼻部・頭部の被毛の汚れが観察された。試験 9 日に安楽死させた雄の剖検では、食道に裂傷がみられた。この裂傷は投与過誤によるものであり、MMB 又は投与液投与に起因するものではないと考えられた。125 mg/kg/日群の残りの雄 13 例及び雌 9 例でも、重篤かつ同様の一般状態変化及び体重減少がみられたため、試験 12 日に生存例全例で投与を中止した。生存例の多く（雄 9 例及び雌 5 例）は試験 15 日に安楽死させ、一部の動物（雄 4 例及び雌 4 例）は 13 日間休薬した。

対照群の雌の安楽死及び死亡例では、胃及び十二指腸において潰瘍、炎症及び壊死、腎臓において尿細管の拡張及び壊死、肝臓では細胞分裂の亢進と細胞変化（退縮を伴う均質細胞で、時折、好塩基性様変化）が認められた。高用量群の早期死亡例では、リンパ節、脾臓及び胸腺のリンパ球枯渇を伴う重度の骨髄の細胞密度低下がみられた。多くの組織で細菌コロニーが認められた。その他にも、肝臓（胆管を含む）、リンパ節（赤血球増加）及び消化管に影響が認められた。

生存例では、すべての用量で白血球、好中球、リンパ球、単球、好酸球及び好塩基球の低値がみられ、骨髄及び脾臓の細胞密度低下並びに胸腺及びリンパ節でリンパ球枯渇が認められた。125 mg/kg/日群では 13 日間、50 mg/kg/日群では 14 日間の休薬期間終了後、細胞及びリンパ球減少には回復傾向が認められた。

125 mg/kg/日群の雌では不整性周期が認められた。雄では、すべての用量で精巣に変性（精細管上皮変性及びそれに伴う精巣上体の精子数減少）がみられたが、低用量群では低頻度であった。精巣への影響は休薬期間終了後でもみられたが、低用量群では認められず、部分的な回復性が示された。

以上のように、本試験では媒体投与に関連した重篤な所見（おそらくは媒体の低 pH に起因）が認められため、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。

2.6.6.3.2.4. 4 週間経口投与試験

SD ラット（各群雌雄各 10 例）に MMB（二塩酸塩）の 0（媒体）、10、30 及び 100 mg/kg/日を 1 日 1 回 28 日間経口投与した。媒体には酸性化滅菌水（pH 1.4～1.6）を用いた（1009-0461、GLP）。対照群及び 100 mg/kg/日群には雌雄各 5 例を追加し、28 日間休薬した。また、TK 評価のために対照群に雌雄各 3 例、MMB 群に雌雄各 6 例を追加し、血漿チオシアン酸分析のために各 MMB 群に雌雄各 3 例を追加した。生存性・一般状態観察、体重・摂餌量測定、眼科学的検査、臨床病理学的検査（血液学的検査、凝固系検査、血液生化学的検査及び尿検査）、血漿中チオシアン酸測定、剖検、器官重量測定、病理組織学的検査及び骨髄塗抹標本による形態学的検査を実施した。

バリデートされた LC-MS/MS 法（LLOQ＝0.5 ng/mL）により、MMB の血漿中濃度を測定した（1668-003）。

TK パラメータに明らかな性差は認められなかった。曝露量（AUC0-24 及び Cmax）は試験 1 及び 28 日で同程度であったことから、反復投与による MMB の蓄積はないと考えられた。試験 1 日では、AUC0-24 は 10～30 mg/kg/日で用量比を上回って増加したが、30～100 mg/kg/日では用量比を下回って増加した。Cmax は用量比を下回って増加した。試験 28 日では、AUC0-24 は用量比に概ね伴って増加し、Cmax は用量比を下回って増加した。

TK パラメータを表 2.6.6.4 に示す。

表 2.6.6.4 ラットに単回及び反復経口投与したときの MMB の血漿中 TK パラメータ

Dose (mg/kg/day)	Sex	Day 1		Day 28	
		Cmax (ng/mL)	AUC0-24 (ng·h/mL)	Cmax (ng/mL)	AUC0-24 (ng·h/mL)
10	Male	6950	51100	10400	82900
30	Male	14700	207000	17300	209000
100	Male	21900	365000	30600	479000
10	Female	8190	62900	8180	62700
30	Female	15400	221000	15700	173000
100	Female	21400	371000	256000	386000

MMB 投与に起因する死亡及び一般状態の悪影響は認められなかった。100 mg/kg/日群の雄 1 例が眼科学的検査中に死亡したが、この死亡は MMB 投与に起因しないものと判断された。100 mg/kg/日群の TK 群及び休薬群の雌各 1 例が死亡した。休薬群の雌の死因は投与過誤によるものであり、一般状態の悪影響は認められなかった。一般状態、眼科学的検査、凝固系検査、血液生化学的検査及び尿検査では、MMB 投与に関連した毒性変化は認められなかった。

血漿中チオシアン酸濃度は、用量依存的な増加を示した。試験 28 日の対照群の血漿中チオシアン酸濃度は 2.6～4.3 mg/L の範囲であった。MMB の 28 日間投与後（試験 28 日、投与

24 時間後）の血漿中チオシアン酸濃度は、10 mg/kg/日で 3.1～4.2 mg/L（平均 3.7±0.4 mg/L）、30 mg/kg/日で 5.5～6.7 mg/L（平均 6.0±0.4 mg/L）、100 mg/kg/日では 7.8～10.3 mg/L（平均 9.2±1.1 mg/L）であった。

MMB の薬理作用に関連するリンパ組織（リンパ節、脾臓、胸腺、骨髄）の変化がみられ、これに関連して赤血球系及び白血球パラメータに対する影響も認められた。赤血球系パラメータの変化として、100 mg/kg/日群の雌雄で赤血球、ヘモグロビン及びヘマトクリットの低値が認められた。白血球の変化は概ね用量依存的であり、すべての白血球パラメータの低値が認められた。28 日間の休薬期間終了時に、部分的又は完全な回復性が認められた。また、100 mg/kg/日群では、骨髄の赤血球系細胞に軽度かつ可逆的な骨髄異形成がみられ、骨髄リンパ球の低値が認められたが、10 及び 30 mg/kg/日群ではより軽度であった。骨髄の多くの変化（及び骨髄の変化に関連する血液学的検査所見の一部）は休薬により回復した。

病理組織学的検査では、腎臓に可逆性の変化（10 mg/kg/日以上の群で近位尿細管上皮の空胞化）、消化管（30 mg/kg/日以上の群で出血）、心臓（100 mg/kg/日群の雄 3 例で心基部の出血）及び肝臓（100 mg/kg/日群で軽微な単核球浸潤の発現頻度の減少）が認められた。高用量群では骨髄脂肪組織の増加が休薬期間終了後においても認められた。雌性生殖器系への用量依存的かつ可逆的変化として、卵巣の嚢胞及びその発生頻度の増加（30 mg/kg/日以上）並びに子宮頸部の上皮変性（10 mg/kg/日以上）が認められた。雄性生殖器系への用量依存的な変化として、精巣上体管腔内の細胞残屑の蓄積及び軽微な精巣変性がみられ、休薬期間終了後では程度の増悪が認められた（100 mg/kg/日）。

以上より、本試験において NOAEL は推定できなかったが、10 及び 30 mg/kg/日では忍容性が良好と考えられた。

2.6.6.3.2.5. 60 日間経口投与試験

MMB（遊離塩基）の忍容性及び臨床病理学的所見の予備的評価のため、SD ラット（各群雌 5 例）に MMB の 0（媒体）、5、10 及び 20 mg/kg/日を 1 日 1 回 60 又は 61 日間経口投与した。媒体には 5% NMP 95% 0.1M カプチゾールを用いた（CYTO0029:624、非 GLP）。一般状態観察、体重・摂餌量・摂水量測定、血液学的検査、芽球細胞数測定並びに骨髄及び脾臓の病理組織学的検査を実施した。

死亡はみられず、一般状態、体重、摂餌量及び摂水量への影響も認められなかった。いずれの用量においても試験期間中に芽球細胞が増加したことから、MMB は末梢循環において芽球細胞を誘導する可能性が示された。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 投与に関連するリンパ球減少が認められた。MMB は 20 mg/kg/日までの用量で忍容性が良好であると考えられた。

2.6.6.3.2.6. 13 週間経口投与試験

SD ラット（各群雌雄各 10 例）に MMB（二塩酸塩）の 0（媒体）、4.3、17 及び 68 mg/kg/日を 13 週間経口投与した。媒体には酸性化減菌水（pH 1.35～1.8）を用いた（1668-009、GLP）。対照群及び 68 mg/kg/日群には雌雄各 5 例の動物を追加し、10 週間休薬した。

また、対照群に雌雄各 3 例、MMB 群に雌雄各 9 例を追加し、TK 評価を実施した。一般状態観察、体重・摂餌量測定、眼科学的検査、臨床病理学的検査（血液学的検査、凝固系検査、血液生化学的検査及び尿検査）、剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。

バリデートされた LC-MS/MS 法（LLOQ＝0.5 ng/mL）により、MMB の血漿中濃度を測定した（1668-003）。

対照群の血漿サンプルに MMB は認められなかった。

MMB の全身曝露量（Cmax 及び AUC0-24）は、試験 1 及び 91 日において、雄よりも雌でわずかに高かった。AUC0-24 は、4.3～17 mg/kg/日で用量比を上回って増加し、17～68 mg/kg/日では用量比を下回って増加した。反復投与による蓄積は認められなかった。

TK パラメータを表 2.6.6.5 に示す。

表 2.6.6.5　ラットに単回及び反復経口投与したときの MMB の血漿中 TK パラメータ

Dose (mg/kg/day)	Sex	Day 1		Week 13	
		Cmax (ng/mL)	AUC0-24 (ng·h/mL)	Cmax (ng/mL)	AUC0-24 (ng·h/mL)
4.3	Male	1670	744	2410	13700
17	Male	8680	64700	6720	94200
68	Male	16600	235000	18600	258000
4.3	Female	2440	12900	3210	18400
17	Female	8880	90900	7290	102000
68	Female	19300	215000	19500	311000

4.3 mg/kg/日群の主試験群の雄 1 例が試験 12 日に死亡し、死因は腎盂腎炎／膀胱炎症／尿管拡張と考えられた。また、68 mg/kg/日群の主試験群の雄 1 例が試験 70 日に死亡した。死因は投与に関連した外傷に起因するものと考えられた。17 mg/kg/日群の TK 群の雌 1 例及び 68 mg/kg/日群の TK 群の雄 1 例が試験期間中に死亡した。この 2 例の死因は不明であったが、一般状態への影響及び用量との関連性も認められなかったことから、これらの死亡は MMB に関連したものではないと判断された。68 mg/kg/日群の TK 群の雌 1 例を試験 91 日の採血後に安楽死させたが、死因は採血操作に伴う合併症によるものであった。

MMB 投与に関連した一般状態変化として、68 mg/kg/日群の雌雄で流涎がみられた。17 mg/kg/日以上の群で体重増加抑制がみられ、摂餌量の低値と概ね相関していた。68 mg/kg/日群の雌では休薬期間中、対照群よりも体重が低値であった。MMB 投与に関連する眼科学的所見は認められなかった。血液学的検査では、4.3 及び 17 mg/kg/日群では、凝固系検査、血液生化学的検査及び尿検査において、MMB 投与に関連する悪影響は認められなかった。また、リンパ球（68 mg/kg/日群で最大 72%）、好酸球及び好塩基球数の用量依存的な低値が雌雄でみられ、68 mg/kg/日群の雄では赤血球数の軽度な低値が認められた。これらは、MMB の作用機序から予想される所見であった。

剖検では、MMB 投与に関連する肉眼所見は認められなかった。脾臓重量の低値が 4.3 mg/kg/日群の雄及び 17 及び 68 mg/kg/日群の雌雄で、胸腺重量の低値が 17 mg/kg/日群の

雌及び 68 mg/kg/日群の雌雄で認められた。精巣及び精巣上体重量の低値が 68 mg/kg/日群の雄で認められた。器官重量の変化はいずれも休薬期間終了後には回復した。

病理組織学的検査では、68 mg/kg/日群の雌雄の多くで脾臓及び胸腺にリンパ球枯渇がみられた。68 mg/kg/日群の雄全例で精細管内の胚上皮の変性／萎縮及び精巣上体の精子数減少及び生殖細胞残屑が認められた。腸間膜リンパ節のリンパ洞では、赤血球増加／赤血球貪食が 4.3 mg/kg/日群の雄 1 例（早期死亡例）、17 mg/kg/日群の雄 1 例及び 68 mg/kg/日群の雌雄の多くで認められた。MMB 投与に関連した病理組織学的検査所見は、いずれも休薬期間終了後までに回復した。

本試験における NOAEL は 17 mg/kg/日と推定され、試験 91 日の AUC0-24 は雄で 94200 ng·h/mL、雌で 102000 ng·h/mL であった。

2.6.6.3.2.7. 26 週間経口投与試験

SD ラット（各群雌雄各 20 例）に MMB（二塩酸塩）の 0（媒体）、5、15 及び 50 mg/kg/日を 1 日 1 回 26 週間経口投与した。媒体には酸性化滅菌水（pH 1.35～1.8）を用いた（1668-023、GLP）。26 週間投与後、各群雌雄各 5 例を 10 週間休薬した。TK 解析のために、各群雌雄各 10 例に MMB の 0（媒体）、5、15 及び 50 mg/kg/日を主試験群と同様に投与した。最終採血後、TK 動物の生存例のうち 5 例は、末梢神経の病理組織学的検査のため全身潅流を行った。残りの 5 例は休薬期間終了時まで飼育し、末梢神経の病理組織学的検査のため同様に潅流した。一般状態観察、体重・摂餌量測定、眼科学的検査、FOB、臨床病理学的検査（血液学的検査、凝固系検査、血液生化学的検査及び尿検査）、剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。MMB 及びその代謝物 M17、M19、M20 及び M21 について TK 解析を実施した。神経伝導速度及び振幅は、尾神経（感覚、運動及び自律神経軸索）、指神経（坐骨神経の遠位端）及び脛骨神経（後肢筋の刺激後の反応）で測定した。

バリデートされた LC-MS/MS 法（MMB：LLOQ＝0.5 ng/mL、M17、M19、M20 及び M21：10 ng/mL）により、血漿中濃度を測定した（814-1425 及び 814-1432）。M17 及び M20 は全血中では不安定で、両代謝物間で相互変換が認められたが、血漿中では安定であった。

対照群の血漿サンプル中に MMB 又は関連代謝物は認められなかった。

MMB、M20 及び M21 の曝露量に性差は認められなかった。M17 及び M19 は、雄よりも雌で概ね高かった。すべての代謝物の曝露量は MMB よりも低く、親化合物に対する代謝物の曝露量比は全群で概ね同程度であった。曝露量（AUC 及び Cmax）は、MMB 及び代謝物ともに用量増加に伴って増加したが、用量比例性にはばらつきが認められた。MMB の蓄積は認められなかった。

MMB、M19 及び M21 の TK パラメータを表 2.6.6.6 に、M17、M20 及び両代謝物の合算 TK データを表 2.6.6.7 に示す。

表 2.6.6.6 ラットに単回及び反復経口投与したときの血漿中 TK パラメータ

Dose (mg/kg/day)	5		15		50	
Sex	Male	Female	Male	Sex	Male	Female
MMB Cmax (ng/mL)						
Day 1	2220	2810	7170	10800	12800	14100
Week 13	2970	2760	7580	10700	21900	19400
Week 26	4020	7590	10100	12500	24100	16400
MMB AUC0-24 (ng·h/mL)						
Day 1	14400	22400	92000	104000	191000	159000
Week 13	24700	25000	93500	118000	298000	251000
Week 26	33800	73100	105000	131000	306000	265000
M19 Cmax (ng/mL)						
Day 1	356	507	1150	2240	2160	3570
Week 13	407	710	1060	2420	2920	5920
Week 26	456	596	1230	1990	2990	5110
M19 AUC0-24 (ng·h/mL)						
Day 1	NA	2990	NA	13500	12400	51000
Week 13	2430	6150	14200	22600	49700	103000
Week 26	4030	7850	14100	20600	50800	87000
M21 Cmax (ng/mL)						
Day 1	24.4	28.7	41.2	50.5	75.2	72.2
Week 13	48.2	52.4	89.5	110	161	112
Week 26	83.2	70.7	132	118	195	196
M21 AUC0-24 (ng·h/mL)						
Day 1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Week 13	NA	495	NA	NA	2700	1840
Week 26	777	669	NA	NA	3210	2370

表 2.6.6.7 ラットに MMB を単回及び反復経口投与したときの M17、M20 及び両代謝物の合算血漿中 TK パラメータ

Dose (mg/kg/day)	5		15		50	
Sex	Male	Female	Male	Female	Male	Female
M17 Cmax (ng/mL)						
Day 1	0.00	12.4	5.63	4.00	0.00	3.43
Week 13	0.00	5.33	3.67	20.9	35.5	142
Week 26	0.00	8.60	9.40	29.3	40.5	32.4
M17 AUC0-t (ng·h/mL)						
Day 1	NR[a]	NR[a]	NR[a]	NR[a]	NR[a]	NR[a]
Week 13	NR[a]	NR[a]	NR[a]	172	584	793
Week 26	NR[a]	NR[a]	68.8	178	364	394
M20 Cmax (ng/mL)						
Day 1	13.2	16.6	18.8	36.0	26.6	32.3
Week 13	13.4	26.7	26.4	52.8	64.7	57.7
Week 26	21.5	36.4	33.1	67.1	78.1	72.7
M20 AUC0-t (ng·h/mL)						
Day 1	27.8	43.4	110	168	188	335
Week 13	68.4	152	254	454	1140	1020
Week 26	133	248	341	583	1440	1180
Combined Cmax (ng/mL)						
Day 1	13.2	29.0	24.4	40.0	26.6	35.7

Dose (mg/kg/day)	5		15		50	
Sex	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Week 13	13.4	32.0	30.1	73.7	100	200
Week 26	21.5	45.0	42.5	96.4	119	105
Combined AUC0-t (ng·h/mL)						
Day 1	27.8	43.4	110	168	188	335
Week 13	68.4	152	254	626	1720	1810
Week 26	133	248	410	761	1800	1570

a = Not reported; < 3 consecutive quantifiable concentrations.

MMB は 5 及び 15 mg/kg/日で概ね良好な忍容性を示した。

50 mg/kg/日群では、MMB 投与に関連すると考えられる 3 例の死亡が認められた。主試験群の雌 1 例が試験 100 日に死亡したが、死亡までに一般状態変化は認められず、死因は不明であった。雌雄各 1 例の TK 動物が試験 111 日に死亡した。病理組織学的検査を実施していないため、死因は不明であった。

MMB 投与に関連した一般状態変化として、50 mg/kg/日群の雌雄で流涎及び口周囲に赤色物質が認められた。

50 mg/kg/日群で体重増加抑制がみられ、試験 26 週までに雄で 23.6%、雌では 13.1%の体重低値が認められた。50 mg/kg/日群の雄では摂餌量の低値もみられ、体重増加抑制と関連していた。

FOB パラメータ、眼科学的検査及び尿検査に MMB 投与に関連する影響は認められなかった。

50 mg/kg/日群では、可逆的かつ軽度の尾神経及び指神経伝導速度の遅延が認められ、軽微かつ可逆的な遠位感覚速度の低下に関連していた。電気生理学的変化を示唆する末梢神経の組織学的所見はみられなかった。

すべての用量で骨髄抑制を示唆する白血球、リンパ球、好酸球及び好塩基球数の低値がみられ、関連して脾臓、リンパ節、胸腺及び GALT のリンパ球枯渇並びに骨髄細胞密度低下が認められた。50 mg/kg/日群では、雌雄ともに軽微かつ可逆的な赤血球量（赤血球、ヘモグロビン及びヘマトクリット）の低値、並びに網状赤血球及び平均赤血球容積の高値が認められた。これらの所見に関連して総ビリルビンの可逆的な高値、並びに腸間膜リンパ節及び肝臓の可逆的な色素沈着、腎臓及び脾臓の不可逆的な色素沈着並びに下顎及び腸間膜リンパ節の赤血球増加／赤血球貪食が認められた。

そのほか、病理組織学的検査では、15 mg/kg/日以上の群で腎臓（可逆的かつ軽微な尿細管変性／再生）並びに 50 mg/kg/日群で精巣（不可逆的な変性／萎縮）及び精巣上体（精子数減少／生殖細胞残屑）で MMB 投与に関連した悪影響が認められた。

以上のことから、15 mg/kg/日群で腎臓に毒性所見が認められたため、NOAEL は 5 mg/kg/日と推定された。5 mg/kg/日を 26 週間投与したときの MMB の AUC0-24 は雄で 33880 ng·h/mL、雌で 73100 ng·h/mL、Cmax は雄で 4020 ng/mL、雌で 7590 ng/mL であった。

2.6.6.3.3. ウサギ

2.6.6.3.3.1. 7 日間経口投与試験

非妊娠雌 New Zealand White（NZW）ウサギ（各群 3 例）に、MMB（二塩酸塩）の 0（媒体）、30、100 及び 300 mg/kg/日を 1 日 1 回 7 日間経口投与した。媒体には酸性化滅菌水（pH 1.35～1.80）を用いた（8283317、非 GLP）。一般状態観察、体重・摂餌量測定、臨床病理学的検査（血液学的検査、凝固系検査及び血液生化学的検査）、TK 解析、剖検及び器官重量測定を実施した。

LC-MS/MS 法（LLOQ＝4 ng/mL）により、MMB 及びその代謝物（M19、M20 及び M21）の血漿中濃度を測定した。

対照群の血漿サンプル中に MMB 及び関連する代謝物は認められなかった。

試験 1 日の MMB 及び代謝物（M19、M20 及び M21）の曝露量（Cmax 及び AUC0-24）は、30～300 mg/kg/日で用量増加に伴って増加した。30～100 mg/kg/日では、MMB 及び代謝物の曝露量は用量比を上回って増加した。100～300 mg/kg/日では、MMB、M20 及び M21 の曝露量は用量比に概ね伴って増加し、M19 の曝露量は用量比を上回って増加（約 5 倍）した。

試験 7 日の MMB 及び M19 の曝露量は、30 mg/kg/日では試験 1 日と同程度であったが、100 mg/kg/日では試験 1 日の 2～4 倍であった。M20 及び M21 の曝露量は、いずれも 30 及び 100 mg/kg/日の試験 1 日と同程度であった。

MMB 及びその代謝物の平均血漿中 TK パラメータを表 2.6.6.8 に示す。

表 2.6.6.8 ウサギに MMB を単回及び反復経口投与したときの平均血漿中 TK パラメータ

Dose (mg/kg/day)	30	100	300[a]
MMB Cmax (ng/mL)			
Day 1	2120	8040	9040
Day 7	1710	11300	NA
MMB AUC0-24 (ng·h/mL)			
Day 1	6880	56700	173000
Day 7	3740	138000	NA
M19 Cmax (ng/mL)			
Day 1	448	1360	4880
Day 7	427	3280	NA
M19 AUC0-24 (ng·h/mL)			
Day 1	2590	13700	73900
Day 7	2560	50600	NA
M20 Cmax (ng/mL)			
Day 1	103	278	306
Day 7	127	249	NA
M20 AUC0-24 (ng·h/mL)			
Day 1	281	1850	4840
Day 7	302	2740	NA
M21 Cmax (ng/mL)			
Day 1	80.1	262	360
Day 7	92.0	243	NA

Dose (mg/kg/day)	30	100	300[a]
M21 AUC0-24 (ng·h/mL)			
Day 1	194	1830	5030
Day 7	186	2740	NA

a Animals in the 300 mg/kg/day dose group did not survive to day 7.

300 mg/kg/日群では死亡（試験 3 又は 4 日）がみられ、残りの生存例は瀕死状態を呈したため安楽死させた。死亡又は安楽死前に全身衰弱が認められた。

30 及び 100 mg/kg/日群では一般状態への悪影響は認められなかった。

100 mg/kg/日群では、試験 1～7 日（絶食前）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。

30 mg/kg/日群では、臨床病理学的パラメータに MMB 投与に関連する影響は認められなかった。100 mg/kg/日群では、MMB 投与に関連した変化として、網状赤血球数の軽度低値、コレステロール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みられたが、悪影響ではないと判断された。

300 mg/kg/日群の 1 例において、十二指腸で MMB 投与に関連した局所刺激が認められた。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（絶対及び相対重量）の高値が認められた。

30 mg/kg/日群では器官重量の変化がみられたが、本所見の毒性学的意義を判断するための病理組織学的検査を実施していないため、本試験において NOAEL は推定できなかった。

2.6.6.3.4. イヌ

2.6.6.3.4.1. 2 週間経口投与試験

ビーグル犬（各群雌雄各 1 例）に MMB（二塩酸塩）の 3、30、100 及び 300 mg/kg/日を 1 日 1 回 14 日間経口投与した（GWR1003、非 GLP）。媒体には滅菌水（300 mg/kg）及び酸性化滅菌水（3、30 及び 100 mg/kg）を用いた（pH 1.32～1.65）。一般状態観察、体重・摂餌量測定、臨床病理学的検査（血液学的検査、凝固系検査及び血液生化学的検査）、剖検及び器官重量測定を実施した。また、血漿サンプルを採取して MMB 濃度を測定した（CAN09105、非 GLP）。

重度の一般状態変化がみられたため、300 mg/kg/日群の雄 1 例を試験 11 日に安楽死させた。

3 及び 30 mg/kg/日群では MMB 投与に関連する一般状態への悪影響はみられなかった。100 mg/kg/日群では、耳介の赤色化（一過性）、嘔吐、軟便／液状便及び不安定／異常歩行が認められた。300 mg/kg/日群では、同様の一般状態変化がより重度に認められた。

100 mg/kg/日以上の群で摂餌量低値を伴う軽度な体重減少が認められた。血液学的検査では、100 mg/kg/日以上の群で網赤血球の低値（用量依存的）がみられ、300 mg/kg/日群の雌では白血球（リンパ球を含む）の低値が認められた。安楽死させた雄では、赤血球系パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット）、白血球数（分画を含む）及び血

小板数の低値がみられた。対照群は設けていなかったが、3 mg/kg/日群と比較して300 mg/kg/日群では胸腺重量の低値及び副腎重量の高値が認められた。

MMB の血漿中濃度は用量増加に伴って増加した。また、反復投与による蓄積はみられず、試験 1 及び投与 10 日で同程度の濃度であった。

MTD は 100 mg/kg/日であった。

2.6.6.3.4.2. 4 週間経口投与試験

ビーグル犬（各群雌雄各 3 例）に MMB（二塩酸塩）の 0（媒体）、5、30 及び 100 mg/kg/日を 1 日 1 回 28 日間経口投与した。媒体には酸性化滅菌水（pH 1.4～1.6）を用いた（GWR1005、GLP）。また、対照群及び高用量群に雌雄各 2 例を追加し、28 日間休薬した。一般状態観察、体重・摂餌量測定、眼科学的検査、臨床病理学的検査（血液学的検査、凝固系検査、血液生化学的検査及び尿検査）、剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。TK 及びチオシアン酸分析のために血液サンプルを採取した。

バリデートされた LC-MS/MS 法（LLOQ＝0.5 ng/mL）により、MMB の血漿中濃度を測定した（1668-004）。

対照群の血漿中に MMB は認められなかった。

経口投与後の曝露量（Cmax 及び AUC0-24）は雌雄で同程度であった。曝露量は概ね試験 1 日よりも試験 28 日で低かった。Cmax は 5～100 mg/kg/日では用量比を下回って増加したが、AUC0-24 は 5～30 mg/kg/日で用量比に概ね伴って増加し、30～100 mg/kg/日では用量比を下回って増加した。

平均血漿中 TK パラメータを表 2.6.6.9 に示す。

表 2.6.6.9 イヌ血漿中における試験 1 及び 28 日の MMB の平均 TK パラメータ

Dose (mg/kg/day)	Sex	Day 1		Day 28	
		Cmax (ng/mL)	AUC0-24 (ng·h/mL)	Cmax (ng/mL)	AUC0-24 (ng·h/mL)
5	Male	292	835	197	459
30	Male	1470	8930	2060	11000
100	Male	1810	11400	1530	9720
5	Female	315	1090	205	556
30	Female	1360	5410	1000	4400
100	Female	2470	19700	1800	7810

100 mg/kg/日群の雌 1 例では、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。

生存例の一般状態変化として、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。100 mg/kg/日群では、軟便／液状便、嘔吐及び流涎が投与期間を通じて認められた。また、数例において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/日群で認められた異常所見は、いずれも休薬開始 7 日以内に回復した。

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。

眼科学的検査、血液学的検査、凝固系検査及び尿検査では、MMB 投与に関連した影響は認められなかった。100 mg/kg/日群で高脂血漿がみられたが、これは動物の食欲低下を補うために高脂肪食を与えたことによるものと考えられた。

血漿中チオシアン酸濃度の用量依存的な増加が試験 28 日に認められた。

MMB 投与に関連する肉眼的所見は認められなかった。

投与期間終了時に 100 mg/kg/日群の雌で胸腺及び脾臓重量の低値が認められた。

組織学的所見として、30 mg/kg/日以上の群で胆嚢の上皮肥大及び肝臓の細胞質希薄化が認められた。用量依存的な骨髄の細胞密度低下、胸腺萎縮、リンパ節のリンパ球枯渇（100 mg/kg/日）がみられ、これらは MMB の薬理作用に直接関連したものと考えられた。すべての用量の雄で精巣及び精巣上体で軽度の変化がみられたが、これらは対照群でも概ね同程度に認められた。

休薬期間終了後に MMB 投与に関連した所見は認められなかった。

本試験における NOAEL は 30 mg/kg/日と推定された。

2.6.6.3.4.3. 13 週間経口投与試験

ビーグル犬の各群雌雄各 6 例に MMB の 0（媒体）、8.5、17 及び 51 mg/kg/日を 1 日 1 回 13 週間経口投与した（1668-011；GLP）。また、各群雌雄各 6 例に MMB の 0（媒体）及び 8.5 mg/kg を 1 日 2 回経口投与した。媒体には酸性化滅菌水（pH 1.4～1.8）を用いた。各群雌雄各 2 例は 6 週間休薬した。一般状態観察、体重・摂餌量、眼科学的検査、心電図検査（間隔及び波形）、臨床病理学的検査（血液学的検査、凝固系検査、血液生化学的検査及び尿検査）、TK 解析、剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。

バリデートされた LC-MS/MS 法（LLOQ＝0.5 ng/mL）により、MMB の血漿中濃度を測定した（1668-004-B、GLP）。

対照群の血漿中に MMB は認められなかった。

MMB の血漿中曝露量［Cmax 及び 0 から 12 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積（AUC0-12）］は雌雄で同程度であり、反復投与による蓄積は認められなかった。AUC0-12 は、8.5～17 mg/kg/日で用量比を下回って増加し、17～51 mg/kg/日では概ね用量比に伴って増加した。1 日 1 回 17 mg/kg/日及び 8.5 mg/kg BID の曝露量は同程度であった。

平均血漿中 TK パラメータを表 2.6.6.10 に示す。

表 2.6.6.10 イヌ血漿中における試験 1、28 及び 91 日の平均 TK パラメータ

Dose (mg/kg/day)	Sex	Day 1		Day 28		Day 91	
		Cmax (ng/mL)	AUC0-12 (ng·h/mL)	Cmax (ng/mL)	AUC0-12 (ng·h/mL)	Cmax (ng/mL)	AUC0-12 (ng·h/mL)
8.5 (QD)	Male	1030	3480	341	812	379	891
17 (QD)	Male	1510	4820	583	1610	605	1610
51 (QD)	Male	2120	12000	1700	7850	1250	4160
8.5 (BID)	Male	1040	4860	521	2100	539	2300
8.5 (QD)	Female	833	2620	481	1270	370	1080

Dose (mg/kg/day)	Sex	Day 1		Day 28		Day 91	
		Cmax (ng/mL)	AUC0-12 (ng·h/mL)	Cmax (ng/mL)	AUC0-12 (ng·h/mL)	Cmax (ng/mL)	AUC0-12 (ng·h/mL)
17 (QD)	Female	1110	3810	686	1870	818	1950
51 (QD)	Female	1720	7860	1980	6860	1150	3220
8.5 (BID)	Female	995	4200	565	1610	596	1930

死亡はみられなかった。一般状態変化として、散発性の吐物及び皮膚の冷感／温感がみられ、雌 1 例では削痩がみられた。用量依存的な体重増加抑制及び摂餌量の減少も認められた。眼科学的所見はみられなかった。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、器官重量測定、剖検及び病理組織学的検査では、MMB 投与に関連する毒性は認められなかった。

本試験における NOAEL は 51 mg/kg 及び 8.5 mg/kg BID と推定され、試験 91 日の AUC0-12 は、1 日 1 回投与で雄では 4160 ng·h/mL、雌では 3220 ng·h/mL であり、BID 投与では、雄で 2310 ng·h/mL、雌では 1930 ng·h/mL であった。

2.6.6.3.4.4. 39 週間経口投与毒性試験

ビーグル犬（各群雌雄各 6 例）に MMB（二塩酸塩）の 0（媒体）、10、20 及び 50 mg/kg/日を 39 週間経口投与した（814-1407、GLP）。媒体には酸性化滅菌水（pH 1.3～1.8）を用いた。各群雌雄各 2 例は 6 週間休薬した。一般状態観察、FOB、体重・摂餌量測定、眼科学的検査、心電図検査、臨床病理学的検査（血液学的検査、凝固系検査、血液生化学的検査及び尿検査）、剖検、器官重量測定、病理組織学的検査及び末梢神経病理学的検査を実施した。TK 解析のために血漿サンプルを採取し、チアミン及びチアミン二リン酸について非 GLP で分析を行った。

バリデートされた LC-MS/MS 法（LLOQ＝1 ng/mL）により、MMB 及びその代謝物（M19 及び M21）の血漿中濃度を測定した（814-1410）。

対照群の血漿サンプル中の MMB、M19 及び M21 の濃度は定量下限未満であった。

MMB、M19 及び M21 の全身曝露量（Cmax 及び AUC0-24）に性差は認められなかった。MMB 及び M19 については、Cmax 及び AUC0-24 は用量増加に伴って増加した。反復投与による蓄積は認められなかった。M19 の全身曝露は MMB と同程度であった。M21 の全身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。

MMB 並びに代謝物 M19 及び M21 の TK パラメータを表 2.6.6.11 に示す。

表 2.6.6.11 イヌ血漿中における試験 1、28、91、180 及び 271 日の MMB、M19 及び M21 の平均 TK パラメータ

Dose (mg/kg/day)	10		20		50	
Sex (6 per dose group)	Male	Female	Male	Female	Male	Female
MMB Cmax (ng/mL)						
Day 1	549	727	789	1030	1440	1540
Day 28	584	389	373	775	778	1420
Day 91	383	211	513	626	578	1400
Day 180	406	381	858	981	1420	2310
Day 271	663	571	947	930	1730	2050
MMB AUC0-24 (ng·h/mL)						
Day 1	1850	2580	3710	3710	9330	7370
Day 28	1900	876	1010	2490	3990	6200
Day 91	1240	514	1750	2900	2390	6480
Day 180	1470	1240	3920	4580	12000	12800
Day 271	2730	1720	5830	3610	7550	10900
M19 Cmax (ng/mL)						
Day 1	267	465	443	713	1120	1090
Day 28	372	232	301	601	732	1210
Day 91	228	143	313	734	482	1370
Day 180	322	331	683	1030	1550	2280
Day 271	425	422	737	858	1340	2030
M19 AUC0-24 (ng·h/mL)						
Day 1	2040	4070	4570	5240	11100	10200
Day 28	2180	1250	1810	3410	6320	8620
Day 91	1120	747	1980	4420	3370	10300
Day 180	1850	1580	4410	6400	18400	20200
Day 271	2540	2020	5670	4960	8540	15900
M21 Cmax (ng/mL)						
Day 1	1.33	2.11	2.59	2.54	4.24	2.78
Day 28	3.54	3.88	3.71	4.51	3.51	6.22
Day 91	4.16	2.49	4.42	3.59	4.35	4.93
Day 180	4.36	3.96	6.76	5.08	5.75[a]	5.84
Day 271	4.84	5.02	5.61	4.48	6.06[a]	5.24
M21 AUC0-24 (ng·h/mL)						
Day 1	9.20[b]	NA	NA	12.1[b]	43.6[c]	NA
Day 28	20.2[c]	17.5[b]	NA	20.6[d]	22.4[d]	28.0
Day 91	18.4[d]	NA	17.5[c]	54.6[b]	26.4[d]	19.3[c]
Day 180	15.7[a]	16.0[c]	33.9[a]	22.3[b]	39.4[e]	47.5[e]
Day 271	23.6[c]	26.0[c]	26.4[d]	21.1[e]	72.3[b]	46.2[d]

a n = 5
b n = 1
c n = 2
d n = 3
e n = 4

50 mg/kg/日群の雄 1 例が瀕死状態を呈したため、試験 175 日に安楽死させた。死因及び MMB 投与との関連は特定できなかったが、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、瀕死状態に栄養不良が影響したことが示唆された。

MMB に関連した嘔吐、流涎及び軟便／水様便がすべての用量で認められた。

投与期間中、平均体重への明らかな影響はみられなかったが、50 mg/kg/日群の数例で MMB に関連した体重減少が周期的にみられたため栄養強化食を与えた。一部のイヌでは体重減少、食欲低下及び過剰な嘔吐のため、1 週間投与を休止した。全投与期間中、全用量で雌雄ともに中等度又は顕著な体重増加抑制が認められた。

投与期間終了時に、50 mg/kg/日群の雄 2 例及び雌 3 例において、眼科学的検査で後部縫合線に沿って非常に淡い混濁を特徴とする白内障（片眼性又は両眼性）が観察された。これらの動物のうち、雄 1 例及び雌 2 例では休薬期間中も白内障が認められた。病理組織学的検査では、白内障は確認されなかった。

心電図検査（波形又は間隔）において MMB 投与に関連する影響は認められなかった。

血漿中チアミン及びチアミン二リン酸濃度に MMB 投与に関連する影響は認められなかった。

末梢神経病理学的検査において MMB 投与に関連する所見はみられなかった。

臨床病理学的検査では、対照群と比較して、10 mg/kg/日以上の群の雄（最大-11%）及び 20 mg/kg/日以上の群の雌（最大-14%）で赤血球量の低値、50 mg/kg/日群の雌雄で赤血球分布幅（RDW）の増加（最大 13%）、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。赤血球サイズのばらつきの増加を示す RDW の増加は、MMB 投与に関連する変化であるが、悪影響ではないと考えられた。RDW への影響は休薬期間終了後には完全に回復した。雄では休薬期間終了時においても赤血球量の低値（最大 13%）が認められた。20 mg/kg/日群の雌及び 50 mg/kg/日群の雄でみられたアラニンアミノトランスフェラーゼの散発的な高値は、その後の採血時点では概ね回復し、20 mg/kg/日以上の群の雄において肝臓の相対重量の高値に関連する組織学的変化は認められなかった。

MMB 投与に関連する組織学的所見として、50 mg/kg/日群の雌雄で腎臓の軽微又は軽度の尿細管上皮細胞空胞化及び骨髄の軽微な細胞密度低下、雄で精巣の軽度な精子細胞／精母細胞の変性及び精巣上体の軽度な生殖細胞残屑が認められた。

本試験における NOAEL は 20 mg/kg/日と推定された。NOAEL を 39 週間投与したときの MMB の AUC0-24 は、雄で 5830 ng·h/mL、雌で 3610 ng·h/mL、Cmax は雄で 947 ng/mL、雌で 930 ng/mL であった。

2.6.6.4. 遺伝毒性試験

2.6.6.4.1. In vitro 試験

2.6.6.4.1.1. 細菌を用いた復帰突然変異試験

MMB（二塩酸塩）の変異原性について、ネズミチフス菌（TA98、TA100、TA1535 及び TA1537）並びに大腸菌（WP2uvrA）を用い、アロクロール誘導ラット肝 S9 分画を含む代謝活性化系の存在下及び非存在下で、細菌を用いた復帰突然変異試験により評価した（GXE0001、GLP）。MMB の最高濃度は溶解限界を基に設定した（プレート法及びプレインキュベーション法でそれぞれ遊離塩基として 1000 及び 200 µg/plate）。

MMB は代謝活性化系の有無にかかわらず、いずれの試験菌株においてもプレートあたりの平均復帰変異コロニー数の増加を引き起こさなかった。

2.6.6.4.1.2. ヒトリンパ球を用いた染色体異常試験

MMB（二硫酸塩）の染色体異常誘発性について、ヒトリンパ球を用い、アロクロール誘導ラット肝 S9 分画を含む代謝活性化系（S9 mix）の存在下又は非存在下で評価した（GXE0002、GLP）。MMB の最高濃度は、S9 mix 非存在下では 1.25 μg/mL、存在下では 12.7 μg/mL とした。MMB は、代謝活性化の有無にかかわらず、染色体の構造異常を増加させなかった。なお、S9 mix 非存在下の 3 時間処理で核内倍加及び倍数性異常の増加がみられたが、S9 mix 非存在下の 18 時間処理では認められなかったことから、これら所見の意義は不明である。

2.6.6.4.2. In vivo 試験

2.6.6.4.2.1. ラットを用いた小核試験

雌雄 SD ラットに MMB（二塩酸塩）を経口投与し、骨髄赤血球における in vivo 染色体異常誘発能を評価した（AD37FP.125.BTL、GLP）。媒体には酸性化滅菌水（pH 1.7±0.1）を用いた。用量設定試験において、2000 mg/kg で死亡例がみられたことから、本試験では、MMB の 0（媒体）、250、500 及び 1000 mg/kg を経口投与した。各群雌雄各 5 例に MMB の 0、250、500 及び 1000 mg/kg 並びに陽性対照物質を投与し、約 24 時間後に安楽死させ、大腿骨の骨髄細胞を採取して小核誘発を評価した。また、各群雌雄各 5 例に MMB の 0 及び 1000 mg/kg を投与し、約 48 時間に安楽死させた。

投与 24 時間後では、MMB 投与群の雌雄ともに、媒体対照群と比較して、多染性赤血球/全赤血球比（PCE/EC 比）の明らかな低下はみられなかった。投与 48 時間後では、1000 mg/kg 群の PCE/EC 比は、雌雄ともに媒体対照群と比べて最高 35%の低下がみられた。この所見は MMB の赤血球産生抑制作用によるものであり、遺伝毒性に関連したものではないと考えられた。MMB 投与群において、小核を有する PCE の生物学的に有意な増加は、いずれの用量及び採取時点においても認められなかった。陽性対照群では統計学的に有意な PCE の増加がみられた。

以上、MMB は本試験において遺伝毒性を示さなかった。

2.6.6.5. がん原性試験

2.6.6.5.1. 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（各群雌雄各 25 例）に MMB（二塩酸塩一水和物）の 0（水）、0（媒体）、3、10、30 及び 100 mg/kg/日を 1 日 1 回 26 週間経口投与した（8283320、GLP）。媒体には酸性化滅菌水（pH 1.35～1.80）を用いた。TK 解析測定のため、001178-W（野生型、CByB6F1-Tg[HRAS]2Jic）マウスに水及び媒体（各群雌雄各 6 例）並びに MMB（各群雌雄各 39 例）を投与した。001178-T（hemizygous）rasH2 マウス（雌雄各 10 例）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。

がん原性評価は組織学的所見に基づいて行い、生存性・一般状態観察及び体重・摂餌量測定を実施した。TK 動物から血液サンプルを採取し、MMB 及び代謝物 M8、M19、M20、M21 の TK 解析を行った。

バリデートされた LC-MS/MS 法（MMB 及び M19：LLOQ＝5 ng/mL、M8、M20 及び M21：0.5 ng/mL）により、血漿中濃度を測定した（8305686）。

水及び媒体対照群における MMB 及び代謝物の濃度はいずれも LLOQ 未満であった。M8 については、LLOQ を超える血漿中濃度を示したデータが限られていたため、TK 解析は実施しなかった。

MMB の全身曝露量は用量増加（3 mg/kg/日から 100 mg/kg/日）に概ね伴って増加した。Cmax は 3～100 mg/kg/日で一貫した用量比例性を示さなかったが、AUC0-t は用量比を上回って増加した。MMB の Cmax 及び AUC0-t の性差は 2 倍未満であった。反復投与による MMB の蓄積は認められなかった。

M19、M20 及び M21 の全身曝露量は、用量増加（3 mg/kg/日から 100 mg/kg/日）に概ね伴って増加した。M19 の Cmax 及び AUC0-t の性差は概ね 2 倍未満であった。M20 及び M21 については、Cmax 及び AUC0-t は概して雄より雌で高く、性差は試験 1 日で 2 倍を超えたが、試験 26 週では 2 倍未満であった。反復投与による 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 比の結果から、MMB は大部分が M19 に代謝され、M8、M20 及び M21 にほとんど代謝されないことが示された。

MMB、M19、M20 及び M21 の TK パラメータを表 2.6.6.12 に示す。

表 2.6.6.12　001178-W マウス血漿中における MMB 経口投与後の TK パラメータ

Dose (mg/kg/day)	3		10		30		100	
Sex	M	F	M	F	M	F	M	F
MMB Cmax (ng/mL)								
Day 1	218	266	1230	1360	4410	3670	8210	6490
Week 26	191	189	1410	1210	5280	2820	10400	6160
MMB AUC0-t (ng·h/mL)								
Day 1	421	493	4780	4460	16700	17700	87200	64000
Week 26	468	652	5470	4100	22100	18900	85400	86300
M19 Cmax (ng/mL)								
Day 1	36.5	59.2	222	247	666	664	1430	1070
Week 26	37.3	49.9	218	290	609	584	1650	1830
M19 AUC0-t (ng·h/mL)								
Day 1	61.9	184	936	1080	3240	4410	18600	11100
Week 26	169	406	1160	2340	3920	7030	17300	27900
M20 Cmax (ng/mL)								
Day 1	5.18	2.95	6.19	24.9	24.8	30.8	22.0	93.4
Week 26	2.13	10.7	7.36	13.6	30.5	29.8	74.5	74.0
M20 AUC0-t (ng·h/mL)								
Day 1	NR	5.41	14.2	38.8	62.7	127	183	463
Week 26	4.33	15.8	28.1	49.2	128	179	410	405
M21 Cmax (ng/mL)								
Day 1	2.97	5.49	8.50	44.4	52.5	56.6	50.4	167
Week 26	1.75	5.06	10.3	24.4	73.6	49.1	194	141

Dose (mg/kg/day)	3		10		30		100	
Sex	M	F	M	F	M	F	M	F
M21 AUC0-t (ng·h/mL)								
Day 1	NR	8.88	18.4	69.8	92.8	215	353	954
Week 26	3.55	9.08	37.0	60.5	215	233	991	796

MMB 投与による生存率への影響はみられず、投与期間終了後における生存率は全用量で雄が 88%以上、雌が 92%以上であった（水及び溶媒対照の生存率は 92%以上）。したがって、投与期間終了時に生存していた動物数は、MMB の発がん性を適切に評価するために十分であった。

30 mg/kg/日以上の群の雄及び 3 mg/kg/日以上の群の雌では、水及び媒体対照群と比較して、軽微な体重増加抑制がみられ、雌では中等度の摂餌量の低値も認められた。これらの変化は悪影響とは判断されず、生存率及び発がん性への影響もみられなかった。

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。水及び媒体対照群との間に発がんの差はみられず、陽性対照群では明らかな発がんが確認され、死亡率増加は主としてがんに起因していた。

MMB 投与に起因した非腫瘍性病変として、100 mg/kg/日群で脾臓及び腸間膜リンパ節のリンパ球減少並びに大腿骨／胸骨骨髄の細胞密度低下がみられたが、これらの所見の多くは軽微な変化であった。また、30 mg/kg/日以上の群の雄及び 100 mg/kg/日群の雌では、肝臓及び下顎唾液腺における単核細胞浸潤の低値がみられたが、これはリンパ球に対する MMB の薬理作用に関連したものと考えられ、その他の器官（脾臓、リンパ節及び骨髄）における細胞数減少と一致していた。

以上より、rasH2 マウスに最高 100 mg/kg/日までを 26 週間経口投与しても、死亡率の増加及び発がん性は認められなかった。100 mg/kg/日群における雌雄合算平均 Cmax 及び AUC0-t は、それぞれ 7550 ng/mL 及び 90200 ng·h/mL であった。

2.6.6.5.2. ラットを用いた 104 週間投与試験

SD ラット（各群雌雄各 60 例）に MMB（二塩酸塩一水和物）の 0（媒体）、1.5、5 及び 15 mg/kg/日を 1 日 1 回 104 週間経口投与した（814-1519、GLP）。媒体には酸性化滅菌水（pH 1.35～1.80）を用いた。また、別の雌雄各 60 例には MMB の 5 mg/kg/日及び M21 の 25 mg/kg/日を併用経口投与した。TK 測定のために、各群雌雄各 12 例（対照群は雌雄各 4 例）を追加し、主試験群と同様に媒体又は MMB を投与した。

発がん性評価は組織学的所見に基づいて行い、生存率・一般状態観察、体重・摂餌量測定、眼科学的検査及び臨床病理学的検査（血液学的検査）を実施した。MMB 及び M21 の TK 解析は試験 1 及び 182 日に実施した。

バリデートされた LC-MS/MS 法（MMB：LLOQ＝5 又は 10 ng/mL、M21：1 又は 2 ng/mL）により、MMB 及び M21 の血漿中濃度を測定した（814-1517）。

MMB 及び M21 の濃度は、試験 1 日に MMB 投与群から採取した投与前の全サンプル、並びに試験 1 及び 182 日に対照群から採取した全サンプルにおいて、定量限界未満であった。

MMB 及び M21 の全身曝露量に性差はみられなかった。MMB については、試験 1 及び 182 日の AUC0-24 は用量比を上回って増加した。Cmax は試験 1 日では用量比に概ね伴って増加したが、試験 182 日では用量比をわずかに下回って増加した。M21 については、試験 1 日の AUC0-24 は用量比をわずかに上回って増加し、試験 182 日ではわずかに下回って増加した。Cmax は試験 1 及び 182 日ともに用量比を下回って増加した。MMB の全身曝露量は、MMB の 5 mg/kg/日を単独投与した動物並びに MMB の 5 mg/kg/日及び M21 の 25 mg/kg/日を併用投与した動物で概ね同程度であった。また、MMB の曝露量は 1.5 mg/kg/日の反復投与によりわずかに増加したが、5 及び 15 mg/kg/日の反復投与、又は MMB の 5 mg/kg/日及び M21 の 25 mg/kg/日の併用投与後に増加はみられなかった。M21 の全身曝露量は MMB 単独及び M21 との併用投与により増加したが、MMB 単独投与群でみられた MMB の全身曝露よりも低かった。

MMB 及び M21 の TK パラメータを表 2.6.6.13 に示す。

表 2.6.6.13 ラット血漿中における試験 1 日及び 26 週の MMB 及び M21 の TK パラメータ

MMB/M21 Dose (mg/kg/day)	1.5/0		5/0		15/0		5/25	
Sex	M	F	M	F	M	F	M	F
MMB Cmax (ng/mL)								
Day 1	664	970	2990	4800	7140	9140	2720	4000
Week 26	1090	1460	3400	3420	10200	10300	4220	4030
MMB AUC0-24 (ng·h/mL)								
Day 1	3600	3880	18800	21400	80600	100000	16500	25500
Week 26	6730	6350	28400	23500	126000	94000	25800	27200
M21 Cmax (ng/mL)								
Day 1	4.85	9.04	15.0	24.9	37.4	49.8	40.2	70.3
Week 26	23.6	28.5	52.7	69.2	111	143	98.4	124
M21 AUC0-24 (ng·h/mL)								
Day 1	28.3	50.3	103	142	463	581	441	604
Week 26	169	183	583	422	1850	1210	1000	1070

生存率は雄が 37～52%、雌が 28～45%であった。対照群における雌の生存動物数は試験 101 週で 20 例未満に低下した。対照群及び MMB 投与群の雌全生存例は試験 102 週に、雄は試験 104 週の投与後に安楽死させた。いずれの用量においても、早期死亡（死亡及び安楽死例）の有意な増加は認められなかった。最終剖検時の生存動物数は全投与群で同程度であり、雌雄ともに用量依存性は認められなかった。

MMB 及び M21 投与に関連した一般状態の異常、腫瘤の発現頻度増加、眼科学的変化及び摂餌量への影響は認められなかった。MMB の 15 mg/kg/日群の雄の平均体重は、試験 8 週から対照群と比べて約 10%低く、その後の投与期間中も概ね同程度で推移した。剖検時には MMB の 5 及び 15 mg/kg/日群、並びに MMB の 5 mg/kg/日及び M21 の 25 mg/kg/日の併用投与群の雌雄で軽度～中等度のリンパ球数の低値、雄で好中球及び単球数の軽度高値が認められた。

MMB の 15 mg/kg/日群の雄、並びに MMB の 5 mg/kg/日及び M21 の 25 mg/kg/日の併用投与群の雄では、剖検時に軽度～重度の精巣腫大の発現頻度の高値が認められた。MMB の 15 mg/kg/日群の雄では精巣に MMB 投与に関連した腫瘍性所見が認められた。傾向検定（Cochran-Armitage 及び Peto）で 0.005 以下、及びペアワイズ検定（Fisher の直接確率）で 0.01 以下の有意差を示す腫瘍を発がんとする基準に基づくと、精巣腺腫は統計学的に有意ではなかった。しかしながら、Fisher の直接確率検定は許容値に近く（許容値 p≤0.010 に対して、p=0.0159）、発現頻度は試験実施施設の背景値よりも高かった。精巣間細胞（ライディッヒ細胞）腺腫は、プロラクチンシグナル伝達経路の抑制性調節に関連するヤヌスキナーゼ（JAK）阻害薬においてオフターゲット作用に関連して発現することが報告されている [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、ヒトでの腫瘍形成リスクは低いと考えられる。

MMB 投与に関連した非腫瘍性の組織学的所見として、大腿骨及び胸骨の骨髄細胞密度低下（MMB の 15 mg/kg/日群の雄及び 5 mg/kg/日以上の群の雌）、脾臓の広範囲なリンパ球枯渇（MMB の 15 mg/kg/日群の雌雄）、腸間膜リンパ節の褐色色素沈着マクロファージの増加の有無を伴う赤血球増加及び赤血球貪食の発現頻度及び程度の高値（MMB の 5 mg/kg/日以上の群の雄、MMB の 15 mg/kg/日群の雌、MMB の 5 mg/kg/日及び M21 の 25 mg/kg/日併用投与群の雌雄）が認められた。しかしながら、これら MMB 投与に関連した組織学所見はいずれも対照群においてもみられており、それらの多くは軽微～軽度であること及び／又は薬理作用に基づくものであるため、悪影響ではないと考えられた。

以上より、MMB の 1.5 及び 5 mg/kg/日、並びに MMB の 5 mg/kg/日及び M21 の 25 mg/kg/日の併用による最長 104 週間経口投与による発がん原性は認められなかった。MMB の 15 mg/kg/日群の雄で MMB 投与に関連した精巣間細胞（ライディッヒ細胞）腺腫の発現頻度の高値がみられたが、ラットにおける JAK-2 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たものと考えられた。MMB の 5 mg/kg/日を投与したときの試験 26 週の雌雄合算平均 Cmax 及び AUC0-24 は、それぞれ 3260 ng/mL 及び 26000 ng·h/mL であった。

2.6.6.6. 生殖発生毒性試験

2.6.6.6.1. 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

2.6.6.6.1.1. 雄ラットの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（各群 22 例）に MMB（二塩酸塩一水和物）の 0（媒体）、5、25 及び 100 mg/kg/日を交配前 4 週間以上、交配期間中及び剖検まで 1 日 1 回経口投与した（8287293、GLP）。媒体には酸性化滅菌水（pH 1.35～1.80）を用いた。100 mg/kg/日群では、投与開始後 4 日（試験 4 日）に MMB 投与に関連した死亡が 1 例認められた。同時期に実施した雌ラットの受胎能に関する試験（8291598）においても 100 mg/kg/日群で死亡及び瀕死がみられたことから、試験 5 日以降は投与量を 100 mg/kg/日から 68 mg/kg/日に減量した（本用量群は 100/68 mg/kg/日と表記する）。生存性・一般状態観察、体重・摂餌量測定、生殖能評価、剖検、生殖器重量測定及び精子形成サイクル検査を実施した。

100/68 mg/kg/日群の計 9 例で早期死亡がみられた。1 例は用量減量前に、7 例は試験 5～8 日に死亡し、1 例は試験 17 日に瀕死状態を呈したため安楽死させた。

100/68 mg/kg/日群の一般状態変化として、衰弱、被毛粗剛、呼吸音異常／不規則呼吸、削痩、活動性低下、斜視、眼脂（赤色）、粘液便、蒼白、冷感、円背位、鼻汁（赤色）、口腔からの分泌物（無色）又は生殖器からの分泌物（赤色）が認められた。

全 MMB 投与群で体重への影響が認められた。約 10 週間の投与期間中（試験 0 日～交配終了後 35 日）、5、25 及び 100/68 mg/kg/日群の体重は、対照群と比較してそれぞれ 7.1、15.3 及び 31.5%低値であった。体重増加量は、25 及び 100/68 mg/kg/日群において、試験 3 日～交配終了後 35 日までのほとんどの期間で有意に低値を示し、5 mg/kg/日群でも時折認められた。5、25 及び 100/68 mg/kg/日群の投与期間終了時の体重増加量は、対照群と比較してそれぞれ 86、67 及び 34%であった。摂餌量は、MMB 投与群の雄全例で交配前及び交配期間終了後の投与期間中に低値を示した。

100/68 mg/kg/日群の雄 8 例が交配前投与期間（試験 4～8 日）に死亡したが、MMB 投与に関連した肉眼所見として、胃、回腸、空腸、腸間膜リンパ節及び縦隔リンパ節の変色並びにゼラチン様膵臓が認められた。また、試験 17 日に瀕死状態を呈した同群雄 1 例では腎皮質の両側性変色及び膀胱の赤色内容物が認められた。100/68 mg/kg/日群の雄 13 例中 6 例（生存例）では脾臓の変色がみられ、MMB に関連した変化と考えられたが、悪影響ではないと判断された。雄生殖器における肉眼的所見は、100/68 mg/kg/日群の生存例でのみみられ、死亡及び瀕死例では認められなかった。交尾した雌が不妊であった雄の生殖器に異常は認められなかった。

100/68 mg/kg/日群の生存例 13 例中 3 例の雄において交配した雌の不妊がみられ、これに関連して受胎率［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/日群では精巣重量の低値（左右でそれぞれ 12.3 及び 15.0%；悪影響と判断）がみられ、精子濃度の低下に関連したものと考えられた。精嚢重量は、5、25 及び 100/68 mg/kg/日群でそれぞれ対照群の 83、80 及び 77%であった。
5 mg/kg/日群における変化は、精子に関連する影響はみられていないことから、悪影響ではないと判断された。精子検査では、100/68 mg/kg/日群で精子運動性の有意な低下がみられ、25 及び 100/68 mg/kg/日群で精子数がそれぞれ 32 及び 40%低下した。

以上のことから、雄の生殖能に対する NOAEL は 5 mg/kg/日と推定された。

2.6.6.6.1.2. 雌ラットの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（各群 22 例）に MMB（二塩酸塩一水和物）の 0（媒体）、5、25 及び 100 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 1 日 1 回経口投与した（8291598、GLP）。媒体には酸性化滅菌水（最終 pH 1.35～1.80）を用いた。交尾が確認されなかった雌については、2 週間の交配期間終了後、更に 7 日間投与を継続した。
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/日に減量した（本用量群は 100/68 mg/kg/日と

表記する）。生存性・一般状態観察、体重・摂餌量測定、性周期・生殖能評価及び剖検を実施した。

100/68 mg/kg/日群で死亡が認められた。この群での死亡例 11 例のうち 4 例は用量減量前の試験 3～4 日に死亡した。用量を減量した試験 5～8 日に 5 例が、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。

100/68 mg/kg/日群では、MMB 投与に起因した所見の多くがみられ、一般状態の変化として、衰弱や全身状態の悪化が交配前に認められた。体重の低値が試験 3～14 日及び妊娠期間中（妊娠 0～13 日）にみられ、妊娠 13 日では対照群と比較して 15.2%の低値であった。体重増加量は試験 0～3 日、妊娠 0～3 日及び妊娠 3～7 日に低値であり、これに関連して摂餌量の低値、子宮重量の低値、吸収胚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。また、100/68 mg/kg/日群で交配前に性周期の遅延が認められた。剖検では、100/68 mg/kg/日群で腸間膜リンパ節及び胃の変色並びにゼラチン様膵臓の発現頻度が、対照群と比較してそれぞれ 42.9、38.1 及び 14.3%高値を示したが、これらの所見は同群死亡例でのみ認められた。また、100/68 mg/kg/日群では、対照群と比較して、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/日群において、最終体重及び相対子宮重量の低値（対照群と比較してそれぞれ 13.4 及び 63.2%）が認められた。子宮重量は絶対及び相対重量のいずれも低下したが、相対子宮重量の低下は同腹児数の減少が原因と考えられた。その他の MMB 投与の影響として、卵巣及び膣の絶対重量の低値が認められた。

以上のことから、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。

2.6.6.6.2. 胚・胎児発生に関する試験

2.6.6.6.2.1. ラットの用量設定試験

雌 SD ラット（各群 8 例）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 1 日 1 回経口投与した（8283314、GLP）。媒体には酸性化滅菌水（pH 1.35～1.80）を用いた。また、対照群に 3 例、MMB 投与群には各群 9 例の雌ラットを追加し、TK 解析を実施した。生存性・一般状態観察、体重・摂餌量測定、生殖能評価、剖検、並びに胎児の外表及び内臓検査を実施した。

LC-MS/MS 法［MMB：LLOQ＝0.5 ng/mL（1668-003）、M17、M19、M20 及び M21：10 ng/mL（814-1425）］により、MMB、M17、M20 及び M21 の血漿中濃度を測定した。MMB、M19 及び M21 の分析法については、GLP に準じてバリデートされた。

対照群の MMB、M17、M19、M20 及び M21 の濃度は、いずれも各 LLOQ を下回った。

MMB の曝露量は、用量増加（4.3 mg/kg/日から 68 mg/kg/日）に概ね伴って増加した。反復投与による MMB の蓄積は認められなかった。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 にほとんど代謝されず、大部分が M19 に代謝されることが示された。

MMB の TK パラメータを表 2.6.6.14 に示す。

表 2.6.6.14 ラット血漿中における妊娠 6 及び 17 日の MMB の平均 TK パラメータ

Dose Level	Gestation Day 6		Gestation Day 17	
(mg/kg/day)	Cmax (ng/mL)	AUC0-t (ng·h/mL)	Cmax (ng/mL)	AUC0-t (ng·h/mL)
4.3	2220	16300	2780	15700
17	12300	127000	11900	146000
68	14900	287000	31100	462000

68 mg/kg/日群の 1 例が妊娠 20 日に死亡した。死亡前の一般状態の変化として、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・摂餌量低値が認められた。同群 TK 動物では 4 例が死亡し、そのうち 3 例では MMB 投与に起因したと考えられる一般状態の悪化が認められた。

17 及び 68 mg/kg/日群における一般状態の変化として、蒼白、被毛粗剛及び／又は生殖器からの赤色分泌物が認められた。17 及び 68 mg/kg/日群で母動物の体重の低値（それぞれ対照群の 88 及び 69%）がみられ、68 mg/kg/日群では摂餌量の低値も認められた。17 mg/kg/日群の母動物の体重低値がみられたが、胎児数の減少による二次的な影響と考えられた。

剖検時の肉眼的所見に異常は認められなかった。

17 及び 68 mg/kg/日群で早期吸収胚数の高値がみられた。また、両群では胚・胎児死亡（それぞれ 25 及び 100%）及び着床後胚死亡率の高値（それぞれ 74.7 及び 100%）が認められた。内臓変異として、17 mg/kg/日群で腕頭動脈欠損の高値が認められた。68 mg/kg/日群では生存胎児が得られなかったため、外表及び内臓検査は実施できなかった。

以上のことから、母動物の一般毒性に対する NOAEL は 17 mg/kg/日（妊娠 17 日における MMB の Cmax 及び AUC0-t はそれぞれ 11.9 μg/mL 及び 146 μg·h/mL）、胚・胎児発生に対する NOAEL は 4.3 mg/kg/日（妊娠 17 日における MMB の Cmax 及び AUC0-t はそれぞれ 2.78 μg/mL 及び 15.7 μg·h/mL）と推定された。

2.6.6.6.2.2. ラットの胚・胎児発生に関する試験

雌 SD ラット（各群 25 例）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 1 日 1 回経口投与した（8283315、GLP）。媒体には酸性化滅菌水（pH 1.35～1.80）を用いた。また、対照群に 3 例、各 MMB 投与群には 9 例の雌ラットを追加し、TK 解析を実施した。生存性・一般状態観察、体重・摂餌量測定、生殖能評価、剖検、並びに胎児の外表、内臓及び骨格検査を実施した。

LC-MS/MS 法［MMB：LLOQ＝0.5 ng/mL（1668-003）、M17、M19、M20 及び M21：10 ng/mL（814-1425）］により、MMB、M17、M20 及び M21 の血漿中濃度を測定した。MMB、M19、M21 の分析法については、GLP に準じてバリデートされた。

対照群の MMB、M17、M19、M20 及び M21 の濃度は、いずれも各 LLOQ を下回った。

MMB の曝露量は、用量増加（2 mg/kg/日から 12 mg/kg/日）に概ね伴って増加した。反復投与による MMB の蓄積は認められなかった。M17、M20 及び M21 の曝露量も用量の増加（6 mg/kg/日から 12 mg/kg/日）に伴って概ね増加したが、これらの代謝物の曝露量は低く、測定可能なサンプルは限られていた。反復投与による M19 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 比の結果から、MMB は M17、M20 及び M21 にほとんど代謝されず、大部分が M19 に代謝されることが示された。

MMB の TK パラメータを表 2.6.6.15 に示す。

表 2.6.6.15 ラット血漿中における妊娠 6 及び 17 日の MMB の平均 TK パラメータ

Dose Level	Gestation Day 6		Gestation Day 17	
(mg/kg/day)	Cmax (ng/mL)	AUC0-t (ng·h/mL)	Cmax (ng/mL)	AUC0-t (ng·h/mL)
2	863	5030	1320	6180
6	2720	21900	3580	25500
12	10300	82300	7450	75800

母動物に死亡はみられず、体重、摂餌量、一般状態にも影響は認められなかった。12 mg/kg/日群では、母動物の体重増加量の低値が妊娠 4～21 日までみられたが、妊娠子宮重量で補正した体重は対照群と同程度であったことから、体重増加量の低値は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。

胚・胎児への影響が 12 mg/kg/日群でみられ、早期吸収胚数の高値（対照群 0.7%に対して 2.9%）、着床後胚死亡率の高値（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%）、並びに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/日群では仙椎前椎骨数の増加（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ることから、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。

以上のことから、母動物の一般毒性に対する NOAEL は 12 mg/kg/日（妊娠 17 日における MMB の Cmax 及び AUC0-t はそれぞれ 7.45 µg/mL 及び 75.8 µg·h/mL）、胚・胎児発生に対する NOAEL は 6 mg/kg/日（妊娠 17 日における MMB の Cmax 及び AUC0-t はそれぞれ 3.58 µg/mL 及び 25.5 µg·h/mL）と推定された。

2.6.6.6.2.3. ウサギの用量設定試験

雌 NZW ウサギ（各群 5 例）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 1 日 1 回経口投与した（8283316、GLP）。媒体には酸性化滅菌水（pH 1.35～1.80）を用いた。

生存性・一般状態観察、体重・摂餌量測定、TK 解析、剖検、並びに胎児の外表及び内臓検査を実施した。

LC-MS/MS 法（LLOQ＝5 ng/mL）により、MMB、M19 及び M21 の血漿中濃度を測定した（8283423）。

対照群の MMB、M19 及び M21 の濃度は、いずれも LLOQ を下回った。

MMB の曝露量は、用量増加（7.5 mg/kg/日から 75 mg/kg/日）に伴って増加した。反復投与による MMB の蓄積は認められなかったが、MMB の 75 mg/kg/日において、M19 及び M21 が蓄積する可能性が示唆された。MMB の経口投与後、大部分が M19 に代謝され、M21 には代謝されなかった。

MMB の TK パラメータを表 2.6.6.16 に示す。

表 2.6.6.16 ウサギ血漿中における妊娠 7 及び 20 日の MMB の平均 TK パラメータ

Dose Level	Gestation Day 7		Gestation Day 20	
(mg/kg/day)	Cmax (ng/mL)	AUC0-t (ng·h/mL)	Cmax (ng/mL)	AUC0-t (ng·h/mL)
7.5	13.7	33.9	19.8	30.3
30	908	2570	797	1520
75	2810	20100	2750	20500

75 mg/kg/日群では、MMB 投与に起因して 2 例の死亡がみられ、1 例が妊娠 21 日に瀕死状態を呈したため、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。また、同群 1 例が妊娠 9 日に下肢を骨折したため（MMB 投与との関連はなし）、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、一部の動物では糞量減少も認められた。これらの変化は MMB 投与による悪影響と考えられた。

75 mg/kg/日群では、早期死亡、流産又は不妊により評価例数が少なかったが、MMB 投与との関連性を示唆する所見が観察された。5 例中 2 例では、MMB 投与に関連する一般状態変化として、削痩、糞便減少／無便が認められた。また、摂餌量の低値傾向（妊娠 8～21 日）及び体重の低値傾向（妊娠 18～21 日）がみられ、体重増加量は有意に低値（妊娠 7～21 日）を示した。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。この母動物では、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。これらの所見は重要であるが、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。

以上のことから、母動物の一般毒性に対する NOAEL は 7.5 mg/kg/日（妊娠 20 日における MMB の Cmax 及び AUC0-t はそれぞれ 19.8 ng/mL 及び 30.3 ng·h/mL）、胚・胎児発生に対する NOAEL は 30 mg/kg/日（妊娠 20 日における MMB の Cmax 及び AUC0-t はそれぞれ 797 ng/mL 及び 1520 ng·h/mL）と判断された。

2.6.6.6.2.4. ウサギの胚・胎児発生に関する試験

雌 NZW ウサギ（各群 20 例）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 1 日 1 回経口投与した（8283318、GLP）。媒体には酸性化滅

菌水（pH 1.35～1.80）を用いた。生存性・一般状態観察、体重・摂餌量測定、TK 解析、剖検、生殖能評価、並びに胎児の外表、内臓及び骨格検査を実施した。

LC-MS/MS 法（LLOQ＝5 ng/mL）により、MMB、M19 及び M21 の血漿中濃度を測定した（8283423）。

対照群の MMB 並びに M19 及び M21 の濃度はいずれも LLOQ を下回った。

MMB、M19 及び M21 の曝露量は、用量増加（MMB 及び M19：7.5 mg/kg/日から 60 mg/kg/日、M21：30 mg/kg/日から 60 mg/kg/日）に伴って増加した。反復投与による MMB、M19 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。

MMB の TK パラメータを表 2.6.6.17 に示す。

表 2.6.6.17 ウサギ血漿中における妊娠 7 及び 20 日の MMB の平均 TK パラメータ

Dose Level	Gestation Day 7		Gestation Day 20	
(mg/kg/day)	Cmax (ng/mL)	AUC0-t (ng·h/mL)	Cmax (ng/mL)	AUC0-t (ng·h/mL)
7.5	34.7	67.6	21.6	35.2
30	1230	3480	312	543
60	2620	11800	994	4100

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と考えられた。

60 mg/kg/日群では MMB 投与に起因した異常便がみられた。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／距骨未骨化、胸椎体二分骨化）の増加が観察されたが、いずれも母動物への影響に対する二次的変化と考えられた。

以上のことから、母動物の一般毒性に対する NOAEL は 30 mg/kg/日（妊娠 20 日における MMB の Cmax 及び AUC0-t はそれぞれ 312 ng/mL 及び 543 ng·h/mL）、胚・胎児発生に対する NOAEL は 60 mg/kg/日（妊娠 20 日における MMB の Cmax 及び AUC0-t はそれぞれ 994 ng/mL 及び 4100 ng·h/mL）と推定された。

2.6.6.6.3. 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（各群 24 例）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 1 日 1 回経口投与した（8307965、GLP）。媒体には酸性化滅菌水（pH 1.35～1.80）を用いた。母動物について、一般状態観察、体重・摂餌量測定、出生児・分娩評価及び剖検を実施し、分娩後 10 日に採取した母動物及び出生児の血漿サンプルを用いて MMB、M19 及び M21 の濃度を測定した。出生児については、一般状態観察、体重・摂餌量測定、生後発育及び神経行動学的検査を実施し、性成熟に達した出生児の雌について性周期を評価した。更に、出生児の雌を同用量群の雄と兄妹交配を避けて交配させ、妊娠 13 日に剖検し、生殖パラメータを評価した。

LC-MS/MS 法［MMB：LLOQ＝0.5 ng/mL（1668-003）、M19 及び M21：10 ng/mL（814-1425）］により、MMB、M19 及び M21 の血漿中濃度を測定した。

対照群の MMB、M19 及び M21 の濃度は、いずれも母動物及び出生児ともに LLOQ を下回った。

MMB の曝露量（Cmax 及び AUC0-24）は、母動物では、2 mg/kg/日から 12 mg/kg/日において用量比を上回って増加した（Cmax については、6 mg/kg/日から 12 mg/kg/日で用量比に概ね伴って増加）。出生児では、2 mg/kg/日から 12 mg/kg/日において用量比に概ね伴って増加した。出生児における曝露量の性差は 2 倍未満であった。母動物における MMB の曝露量は、出生児よりも高かった（出生児の 4～8 倍）。

M19 の曝露量（Cmax 及び AUC0-24）は、母動物では、2 mg/kg/日から 12 mg/kg/日において用量比に概ね伴って増加した。2 mg/kg/日から 6 mg/kg/日では、Cmax 及び AUC0-24 は用量比を上回って増加したが、6 mg/kg/日から 12 mg/kg/日では用量比に概ね伴って増加した。出生児における曝露量の性差は 2 倍未満であった。親化合物に対する代謝物の AUC0-24 比の結果から、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）。

M21 の曝露量は、母動物では用量増加（6 mg/kg/日から 12 mg/kg/日）に伴って増加したが、2 mg/kg/日群では LLOQ を下回った。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が、Cmax の性差は 2 倍未満であった。母動物では、MMB は M21 にほとんど代謝されなかった。なお、LLOQ 以上のデータ数が限られているため、用量比例性及び母動物と出生児との曝露比の評価はできなかった。

母動物（分娩後 10 日）及び出生児（生後 10 日）における MMB の TK パラメータを表 2.6.6.18 に示す。

表 2.6.6.18　母動物及び出生児血漿中における MMB の平均 TK パラメータ

Dose Level	Maternal Rats Lactation Day 10		Rat Pups[a] Postnatal Day 10	
(mg/kg/day)	Cmax (ng/mL)	AUC0-24 (ng·h/mL)	Cmax (ng/mL)	AUC0-24 (ng·h/mL)
2	723	3320	69.3	830
6	3360	13900	250	3020
12	4230	35700	377	4450

a　Male and female pups combined.

MMB 投与に起因した死亡はみられず、親動物及び出生児の一般状態への影響も観察されなかった。

母動物では、12 mg/kg/日群で MMB 投与に関連した体重及び摂餌量の低値が妊娠期間中にみられ、対照群と比較して、体重は妊娠 16 日及び 20 日でそれぞれ 6.3 及び 8.9%、摂餌量は妊娠 14～16 日に 12%低値であった。12 mg/kg/日群の体重は授乳期間中に回復したが、摂餌量は、対照群と比較して、分娩後 4～7 日、10～14 日及び 17～21 日でそれぞれ 8.8、16 及び 19%低値であった。出産児数及び生存出生児数は、12 mg/kg/日群で対照群と比較してそれぞれ 28 及び 30%低値であった。着床後胚死亡率は 6 及び 12 mg/kg/日群で対照群と比較してそれぞれ 11 及び 28%高値であった。

出生児では、6 及び 12 mg/kg/日群において、離乳時までの生存率が対照群と比較してそれぞれ 15 及び 11%低値であった。授乳期間中の母動物に異常は観察されなかったことから、

本所見は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、対照群と比較して、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。生後 10 日では雄で有意に低値であったが、離乳前では対照群と比較してわずかに低かった。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。12 mg/kg/日群の雄では、生後 28 日から交配開始後 14 日まで体重の低値がみられ、生後 28 日及び交配開始後 14 日でそれぞれ 8.7 及び 12%低値であった。12 mg/kg/日群の雌では、生後 14～56 日まで体重の低値がみられ、生後 14 日及び 56 日でそれぞれ 8.7 及び 8.0%低値であった。また、6 mg/kg/日群の雌でも、生後 35 日に体重の低値（7.0%）が認められた。12 mg/kg/日群の雄では、生後 14～21 日及び生後 21～28 日に摂餌量の低値（それぞれ 15 及び 16%）がみられた。雌でも摂餌量の低値がみられたが、統計学的に有意ではなかった。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、対照群と比較して体重の低値がみられ、6 mg/kg/日群では全妊娠期間で 5.3%、12 mg/kg/日群では妊娠 4 及び 8 日にそれぞれ 7.5 及び 6.8%低値であったが、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。

以上のように、母動物において 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、母動物の一般毒性に対する NOAEL は 6 mg/kg/日（分娩後 10 日における MMB の Cmax 及び AUC0-24 はそれぞれ 3360 ng/mL 及び 13900 ng·h/mL）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、出生児の一般毒性に対する NOAEL は 2 mg/kg/日（生後 10 日における MMB の Cmax 及び AUC0-24 はそれぞれ 69 ng/mL 及び 830 ng·h/mL）と推定された。

2.6.6.6.4. 新生児を用いた試験

2.6.6.6.4.1. 幼若ラットを用いた用量設定試験

幼若 SD ラット（各群雌雄各 5 例）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 1 日 1 回経口投与した（WIL604183、GLP）。媒体には酸性化滅菌水（pH 1.35～1.80）を用いた。対照群に雌雄各 9 例、各 MMB 投与群には雌雄各 36 例を追加し、生後 7 及び 21 日に TK 解析を実施した。生存性・一般状態観察、体重測定、臨床病理学的検査、剖検（生後 22 日）、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。主試験群には各群雌雄各 1 例/腹を割り付け、TK 群には同腹児の全動物を同一群に割り付けた。

LC-MS/MS 法（MMB 及び M19：LLOQ＝5 ng/mL、M21＝0.5 ng/mL）により、MMB、M19 及び M21 の血漿中濃度を測定した（8342344）。

対照群における MMB、M19 及び M21 の濃度は、生後 7 日の雄 1 例での結果を除き、生後 7 日及び 21 日のいずれも LLOQ を下回った。この例外的な雄 1 例の MMB、M19 及び

M21 の濃度はそれぞれ 2960、340 及び 5.38 ng/mL であったが、その原因は試料分析の手順及び分析法から説明することができなかった。しかしながら、これらの所見が TK 解析及びその結論に影響を及ぼすものではないと判断された。

MMB、M19 及び M21 の曝露量は、用量増加（3～30 mg/kg/日）に伴って増加した。MMB の Cmax 及び AUC0-24 は、生後 7 及び 21 日の 3～10 mg/k/日で用量比を上回って増加し、生後 7 日の 10～30 mg/kg/日で用量比を下回って増加し、生後 21 日の 10～30 mg/kg/日では用量比に概ね伴って増加した。MMB、M19 及び M21 の Cmax 及び AUC0-24 の性差は 2 倍未満であった。幼若ラットへの MMB の反復投与により、M19 は 10 及び 30 mg/kg/日、M21 は 30 mg/kg/日で蓄積が認められたが、それ以外には MMB、M19 及び M21 の蓄積は認められなかった。

MMB 並びに代謝物である M19 及び M21 の血漿中 TK パラメータを表 2.6.6.19 に示す。

表 2.6.6.19　幼若ラット血漿中における TK パラメータ

Dose Level (mg/kg/day)	3		10		30	
Sex	Male	Female	Male	Female	Male	Female
MMB Cmax (ng/mL)						
Postnatal day 7	1120	1670	6300	6500	8130	10400
Postnatal day 21	1550	880	9280	6300	20700	14300
MMB AUC0-24 (ng·h/mL)						
Postnatal day 7	17800	26800	69200	95400	131000	159000
Postnatal day 21	11000	7740	73100	65000	237000	170000
M19 Cmax (ng/mL)						
Postnatal day 7	320	491	1450	1950	3550	3990
Postnatal day 21	549	317	4130	3460	16300	11800
M19 AUC0-24 (ng·h/mL)						
Postnatal day 7	6100	9250	20800	34500	53200	65900
Postnatal day 21	5900	5140	54800	53000	261000	192000
M21 Cmax (ng/mL)						
Postnatal day 7	1.79	2.90	13.7	22.8	26.8	38.5
Postnatal day 21	4.56	3.29	25.5	20.6	113	83.6
M21 AUC0-24 (ng·h/mL)						
Postnatal day 7	29.9	48.6	201	330	524	654
Postnatal day 21	36.1	27.6	222	305	1400	762

TK 群では、30 mg/kg/日群の 7 例が生後 8～13 日に死亡した。これらの死亡した動物のうち、5 例（雄 1 例、雌 4 例）は同腹児であり、生後 7 日の投与開始前の体重は低値を示し、投与期間中も体重増加量の低値又は体重減少がみられた。これらの死亡は MMB 投与と関連した可能性は低いと考えられた。

主試験群では、30 mg/kg/日群の雌 1 例が生後 19 日に死亡したが、一般状態の悪化は認められなかった。剖検では肉眼的異常はみられなかったが、肺に中程度の好中球性浸潤が観察されたことから、死因は投与過誤による可能性が示唆された。この動物では肝臓に小葉中心性変性及び肝細胞空胞化が観察されたが、肺機能低下による無酸素状態に起因した二次的なものであると考えられた。

投与期間最終日まで生存した動物において、一般状態に MMB 投与の影響はみられなかった。

30 mg/kg/日群では投与期間全体を通じて体重増加量の低値（生後 7～22 日、雄及び雌でそれぞれ 37.5 及び 35.0%）が認められた。10 mg/kg/日群では投与期間中に体重増加量の低値が散発的にみられたため、投与期間を通じた体重増加量の低値（雄及び雌でそれぞれ 14.4 及び 17.8%）が認められた。これらの体重の変化は悪影響と判断された。3 mg/kg/日群では体重への影響は認められなかった。

30 mg/kg/日群の雌雄で網状赤血球数の低値及び尿素窒素の高値が、10 mg/kg/日群の雌及び 30 mg/kg/日群の雌雄で白血球数及びリンパ球数の低値が認められた。網状赤血球数、白血球数及びリンパ球数の変化に関連して、骨髄の細胞密度低下及び脾臓のリンパ球減少等の組織学的所見が認められた。30 mg/kg/日群での尿素窒素の高値は脱水に関連した変化と考えられ、体重の低値との相関が認められた。この変化は MMB 投与に関連したものであるが、毒性学的意義はないと判断された。

骨髄における細胞密度低下並びに脾臓及び肝臓における髄外造血の低下は、10 及び 30 mg/kg/日群における脾臓及び胸腺重量の低値、30 mg/kg/日群における肝臓重量の低値傾向、10 及び 30 mg/kg/日群の雌及び 30 mg/kg/日群の雄における白血球及び網状赤血球数の低値との相関がみられた。また、リンパ球数の低値は 30 mg/kg/日群の雄並びに 10 及び 30 mg/kg/日群の雌で観察された脾臓及び胸腺でのリンパ球減少と相関していた。これらの変化は MMB の薬理作用によるものであった。

本試験で認められた組織学的変化は、その程度からいずれも悪影響ではないと判断された。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。高週齢の動物における腎臓の拡張／嚢胞性尿細管及びある程度の鉱質沈着は、通常、対照群の動物においても時折認められる背景所見であり、用量相関性もみられない。この試験では両所見に明らかな用量相関性がみられ、MMB 投与との関連性は不明であるものの、腎臓における変化はその程度を考慮すると、いずれも悪影響ではないと判断された。

以上のように、10 及び 30 mg/kg/日群で体重増加量の低値がみられたことから、幼若動物の一般毒性に対する NOAEL は 3 mg/kg/日と推定された。3 mg/kg/日を投与したときの生後 21 日における雌雄合算平均 Cmax 及び AUC0-24 は、MMB でそれぞれ 1200 ng/mL 及び 9370 ng·h/mL、M19 で 433 ng/mL 及び 5520 ng·h/mL、M21 で 3.92 ng/mL 及び 31.8 ng·h/mL であった。

2.6.6.6.4.2. 幼若ラットを用いた経口投与による毒性試験

SD ラット（各群雌雄各 30 例）の幼若ラットに 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 1 日 1 回経口投与し、10 週間休薬した（WIL-604256、GLP）。媒体には酸性化滅菌水（pH 1.35～1.80）を用いた。主試験群には各群雌雄各 1 例/腹を割り付け、TK 群には同腹児の全動物を同一群に割り付けた（対照群：雌雄各 6

例、MMB 投与群：雌雄各 24 例）。生後 7 日及び 56 日に MMB 並びに代謝物 M19 及び M21 の TK 解析のために血液サンプルを採取した。

生存性・一般状態観察、体重・摂餌量測定、発達評価（眼瞼開裂及び瞳孔反射）、眼科学的検査、脛骨長測定、性成熟評価（生後 25 日から膣開口及び生後 35 日から亀頭包皮分離の観察）を実施した。また、各群雌雄各 10 例について、生後 48 日に聴覚性驚愕反射、生後 49 日に FOB 及び自発運動量、生後 50 日に学習及び記憶を評価した。生後 57 日に全例について臨床病理学的検査（血液学的検査、凝固検査、血液生化学的検査）を実施した。投与期間中に行動試験に供した各群雌雄各 10 例については、生後 57 日に剖検し、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。

各群雌雄各 20 例については休薬期間を設け、生後 119 日に聴覚性驚愕反射、生後 120 日に FOB 及び自発運動量、生後 121 日に学習及び記憶を評価した後、すべての動物を無処置の雄又は雌と 15 日間交配させた。交配前 10 日から膣垢を採取し、性周期を観察した。妊娠 15 日に MMB 投与群及び無処置の雌を帝王切開し、妊娠の有無を確認した。MMB 投与群の雄は雌の帝王切開後に剖検し、無処置の雄は検査を行わずに安楽死させた。MMB を投与した休薬群の全動物について臨床病理学的検査を実施し、雄は精子形成サイクル検査を実施した。また、雌雄とも剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。

LC-MS/MS 法［MMB 及び M19：LLOQ＝5 ng/mL（25 ng/mL に変更）、M21：0.5 ng/mL（2.5 ng/mL に変更）］により、MMB、M19 及び M21 の血漿中濃度を測定した（8342344）。

対照群における MMB、M19 及び M21 の濃度は、いずれも各 LLOQ を下回った。

MMB、M19 及び M21 の全身曝露量は、MMB の用量増加（1～10 mg/kg/日）に伴って増加した。MMB、M19 及び M21 の Cmax 及び AUC0-24 の性差は 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平均 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。

MMB、M19 及び M21 の TK パラメータを表 2.6.6.20 に示す。

表 2.6.6.20　幼若ラット血漿中における TK パラメータ

Dose Level (mg/kg/day)	1		3		10	
Sex	Male	Female	Male	Female	Male	Female
MMB Cmax (ng/mL)						
Postnatal day 7	467	377	1500	1220	2910	4150
Postnatal day 56	250	393	1330	1580	8500	5900
MMB AUC0-24 (ng·h/mL)						
Postnatal day 7	5000	4940	18000	17900	43200	61500
Postnatal day 56	1770	1590	7940	7650	58500	37300
M19 Cmax (ng/mL)						
Postnatal day 7	68.8	59.2	198	229	923	1190
Postnatal day 56	35.9	69.0	173	255	1050	927
M19 AUC0-24 (ng·h/mL)						
Postnatal day 7	1150	1010	3730	4300	17100	19000
Postnatal day 56	368	559	1490	2200	9130	9530

Dose Level (mg/kg/day)	1		3		10	
Sex	Male	Female	Male	Female	Male	Female
M21 Cmax (ng/mL)						
Postnatal day 7	NC	0.799	2.20	1.80	10.9	15.5
Postnatal day 56	4.47	5.72	9.03	10.5	44.3	49.6
M21 AUC0-24 (ng·h/mL)						
Postnatal day 7	NC	NC	NC	34.8	166	203
Postnatal day 56	39.5	23.3	57.4	48.9	411	287

NC: Not calculated

MMB 投与に起因した死亡は認められなかった。

3 mg/kg/日群の雌 1 例及び 10 mg/kg/日群の雄 1 例が投与期間中に、1 mg/kg/日群の雌 1 例が休薬期間中に死亡した。これら死亡動物の一般状態に異常は観察されず、剖検及び組織学的検査でも死因を特定することはできなかったが、用量反応性はみられず、いずれの群においても他方の性に死亡が認められなかったことから、MMB 投与に起因した死亡ではないと判断された。

10 mg/kg/日群の雌雄では体重増加抑制が概ね投与期間を通じてみられ、生後 13～56 日の体重は対照群と比較して雄で 7.6～13.2%、雌で 7.0～11.0%低値を示し、摂餌量は生後 21～56 日で低値を示した。休薬期間中における 10 mg/kg/日群の体重増加量及び摂餌量は対照群と同程度であったが、体重は生後 87 日まで低値（雄 6.8～10.8%、雌 5.0～8.2%）を示した。

眼科学的検査において MMB 投与に起因した影響は認められなかった。

眼瞼開裂、瞳孔反射、膣開口に MMB 投与に起因した影響は認められなかった。

投与期間を通して、10 mg/kg/日群の雌雄では脛骨長の短縮が認められたが、これは体重低値による二次的な変化と考えられた。10 mg/kg/日群の雄では亀頭包皮分離のわずかな遅延がみられたが、これも体重への影響による二次的なものと考えられた。

FOB に MMB 投与に起因した影響は認められなかった。10 mg/kg/日群の雌雄では生後 49 日に、対照群と比較して前肢握力の低下（統計学的な有意差はなし）が認められたが、体重低値による二次的な変化と考えられた。

聴覚性驚愕反射及び自発運動量に MMB 投与の影響は認められなかった。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/日群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が認められ、MMB 投与に関連した悪影響と判断された。しかしながら、休薬期間中である生後 121 日からの評価では学習・記憶ともに異常は認められず、回復性が示された。

生殖能（交尾所要日数、性周期、交尾率、受胎率）及び精子形成に対する MMB 投与の影響は認められなかった。1 及び 3 mg/kg/日群の無処置の雄と交配させた投与群の雌、並びに全 MMB 投与群の雄と交配させた無処置の雌では生存胚数に MMB 投与の影響はみられなかったが、無処置の雄と交配させた 10 mg/kg/日群の雌では、着床後胚死亡率が対照群と比較して高く（統計学的な有意差はなし）、これに関連して生存胚数及び一腹当たりの胚生存率が低かった。これらの変化は 10 mg/kg/日群の雌 2 例で着床後胚死亡率が 40 及び 100%であ

ったことに起因しており、その他の雌 17 例は対照群と同程度であった。10 mg/kg/日群の変化は 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、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。血液学的検査、凝固検査、血液生化学的検査では、いずれの用量でも MMB 投与による影響は認められなかった。

剖検では、10 mg/kg/日群の投与期間終了時の雌雄、及び休薬期間終了時の雄において脾臓及び精巣重量の低値並びに大腿骨長の短縮がみられたが、病理組織学的検査では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。また、3 及び 10 mg/kg/日群の雌で投与期間終了時にみられた下垂体重量の低値、10 mg/kg/日群の雄で休薬期間終了時にみられた腎重量の低値についても関連した組織学的変化は認められなかった。

病理組織学的検査において、MMB 投与に起因したと考えられる所見は観察されなかった。

以上のことから、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。3 mg/kg/日群の生後 56 日における MMB の Cmax 及び AUC0-24 は、それぞれ雄が 1330 ng/mL 及び 7940 ng·h/mL、雌が 1580 ng/mL 及び 7650 ng·h/mL であった。10 mg/kg/日群の生後 56 日における MMB の Cmax 及び AUC0-24 は、それぞれ雄が 8500 ng/mL 及び 58500 ng·h/mL、雌が 5900 ng/mL 及び 37300 ng·h/mL であった。

2.6.6.7. 局所刺激性試験

2.6.6.7.1. 皮膚刺激性

MMB（二塩酸塩一水和物）の皮膚腐食性を評価するために、in vitro 膜バリア Corrositex を用いた試験を実施した（41501205、GLP）。その結果、本試験条件下で MMB は腐食性を示すと考えられ、UN Packing Group III（United Nations Globally Harmonized System (UN GHS) Hazard Statement H314「重度の皮膚熱傷及び眼損傷を引き起こす」カテゴリー1C）に分類された。

2.6.6.7.2. 眼刺激性

MMB（二塩酸塩一水和物）の in vitro での眼刺激性を評価するために、ウシ摘出角膜（n=3）を用いた混濁度及び透過性（BCOP）試験を実施した（EUN0031、GLP）。媒体には 0.9%生理食塩水を用いた。MMB の 20% w/w 懸濁液の pH は約 2.0 であった。陽性対照にはイミダゾールを用いた。

MMB の 20% w/w 懸濁液と 4 時間インキュベーションしたときの in vitro 刺激性スコア（IVIS）は 142±20.5 であり、化学品の分類及び表示に関する世界調和システム（GHS）のカテゴリー1（重篤な眼刺激性：IVIS＞55）に分類されると予測された。

2.6.6.7.3. 光毒性

MMB（二塩酸塩一水和物）の紫外吸収スペクトルを測定した。溶媒にはアセトニトリル／水（50/50, v/v）混液を用いた。MMB は 198 及び 285 nm の 2 つの吸収極大を示す（3.2.S.3.1）。285 nm での極大は分子の芳香環コアに起因する。有色ラットの ^{14}C-MMB を用いた組織分布では、眼及び皮膚のメラニンへの可逆的結合が認められた（2.6.4.4.1）。

MMB の光毒性を評価するため、MMB を紫外線存在下（+UVR）及び非存在下（-UVR）で BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞に曝露し、紫外線存在下での細胞生存率の低下率を測定した（20054979、GLP）。陽性対照にはプロメタジンを用いた。

Schott WG320 フィルターを装備したキセノンアークソーラーシミュレーターにより発生させた UVA（5 J/cm^2 の）及び UVB（21～22 mJ/cm^2）を細胞に曝露した。MMB の溶解限界は、1%ジメチルスルホキシド（DMSO）／ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（DPBS）（pH 7.0～7.3）中で 3.2 µg/mL であった。

1% DMSO/DPBS 溶液中の MMB は、光毒性を示さなかった［光毒性係数（PIF）及び平均光作用（MPE）に基づく］。なお、試験結果は、OECD テストガイドライン 432 が推奨する全細胞生存率及び OD_{540} 基準、プロメタジン細胞毒性及び光毒性試験基準を満たしており、試験方法が妥当であることが示された。

2.6.6.8. その他の毒性試験

2.6.6.8.1. 抗原性

2.6.6.8.1.1. 皮膚感作性：マウスを用いた局所リンパ節増殖試験

1 群雌 5 例の CBA/Ca マウスに MMB（二塩酸塩一水和物）を 10、25 及び 50% w/v の濃度で 25 µL をマウスの両耳介背面に 3 日間連続塗布した（EUN0029、GLP）。対照群には媒体［アセトン：オリーブ油（4:1 (v/v)）］、陽性対照群には 25% v/v ヘキシルシンナムアルデヒドを同様に投与した。初回適用 5 日後に耳介リンパ節由来のリンパ節細胞（LNC）懸濁液の ^{3}H-メチルチミジン（^{3}HTdR）の取り込みを β シンチレーションカウンターで測定した。増殖反応は、リンパ節当たりの壊変毎分（dpm/リンパ節）及び刺激指数（SI：被験物質と媒体対照群の LNC への ^{3}HTdR 取込み比）で示した。少なくとも 1 つの濃度で SI が 3 以上であれば、感作物質とみなした。

MMB の 10、25 及び 50% w/v 群の SI は、それぞれ 1.3、0.9 及び 0.7 であった。このことから、MMB は皮膚感作性を示さないと考えられた。なお、陽性対照物質であるヘキシルシンナムアルデヒドの SI は 24.3 であり、本試験の妥当性が示された。

2.6.6.8.2. 免疫毒性

MMB を用いた免疫毒性試験及び免疫表現型検査は実施していない。

2.6.6.8.3. 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 を用いた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 ラット及び 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。

2.6.6.8.4. 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。トランスジェニックマウスのがん原性試験（8283320）において、代謝物 M8（GS-698033）、M19（GS-642112）、M20（GS-645348）及び M21（GS-644603；ヒト主要代謝物の 1 種）の血漿中濃度を測定した。また、ラットの 26 週間投与試験（1668-023）では M17（GS-649413）、M19、M20 及び M21 を、イヌの 39 週間投与試験（814-1407）では M19 及び M21 を測定した。ラット薬物動態（PK）試験（1668-021）及びトランスジェニックマウスのがん原性試験でヒト代謝物 M8 が検出され、ラット PK 試験（1668-021）では M15（GS-644066）も検出された。M21 の曝露量は、ラット及びイヌよりもヒトで高いことから、ラットのがん原性試験では M21 を併用投与（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）して、M21 の曝露量を増加させた。試験の詳細は 2.6.6.5.2 に示す。

MMB の M19 への加水分解は、副産物としてアミノアセトニトリルを形成し、更に代謝を受けてシアン化物を形成する。シアン化物はロダナーゼを介してチオシアン酸（SCN）へと解毒される（2.6.4.5.2.1）。MMB の in vitro 及び in vivo プロファイリングにおいて、ラット及びイヌではアミド結合を切断して M19 を生成する経路が主要代謝経路であり、ヒトではマイナーな代謝経路であり、ヒトにおけるリスクは低いことが示された。

MF 患者を対象とした MMB の第 I/II 相試験である臨床試験（CCL09101）において、28 日サイクルの MMB 治療 9 回の各々のベースライン時及び 29 日目に採取した血漿サンプルを用いてチオシアン酸塩分析を実施した結果、チオシアン酸塩濃度の中央値はベースライン時で 257 μM（基準値上限）であり、試験期間を通じてほぼその値が維持されていたことから、MMB によるチオシアン酸塩の生成は臨床的に意義のあるものではないと考えられた。

2.6.6.8.5. 不純物の毒性試験

ラットの 4 週間投与試験（2 試験）により、不純物含量が高い MMB ロットの毒性評価及び TK 測定を実施した。また、製造工程由来不純物の遺伝毒性について検討するため、復帰突然変異試験を実施した。

2.6.6.8.5.1. ラット 4 週間経口投与試験（1）

SD ラット（各群雌雄各 10 例）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（91.9%、ロット番号：[redacted]）の 10 及び 17 mg/kg/日、並びに高純度ロット（96.1%、ロット番号：[redacted]）の 17 mg/kg/日を 1 日 1 回 29 日間投与した（8287290、GLP）。また、TK 解析のため、各群雌雄各 9 例（対照群は雌雄各 3 例）を追加し、1 日 1 回 25 日間投与した。

MMB 及び代謝物（M17、M19、M20、M21）の曝露量（Cmax 及び AUC）は、両ロット間において概ね同程度であった。

MMB の低純度ロットの 10 及び 17 mg/kg/日群、並びに高純度ロットの 17 mg/kg/日群で MMB 投与に関連した悪影響は認められなかった。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。その他に、高純度及び低純度ロットの 17 mg/kg/日を投与した動物間で、生存性・一般状態観察、眼科学的検査、臨床病理学的検査及び病理組織学的検査に相違は認められなかった。

2.6.6.8.5.2. ラット 4 週間経口投与試験（2）

SD ラット（各群雌雄各 10 例）に媒体（酸性化滅菌水、pH 1.35～1.80）又は MMB（二塩酸塩一水和物）の低純度ロット（91.1%、ロット番号：[redacted]）の 10 及び 17 mg/kg/日、並びに高純度ロット（99.5%、ロット番号：[redacted]）の 17 mg/kg/日を 1 日 1 回 28 日投与した（8336287、GLP）。TK 解析のため、各群雌雄各 9 例（対照群は雌雄各 3 例）を追加し、1 日 1 回 25 日間投与した。

MMB 及び代謝物（M19、M21）の曝露量（Cmax 及び AUC）は、両ロット間において概ね同程度であった。

MMB の低純度ロットの 10 及び 17 mg/kg/日群、並びに高純度ロットの 17 mg/kg/日群で MMB 投与に関連した悪影響は認められなかった。生存性・一般状態観察、体重・摂餌量測定、眼科学的検査、臨床病理学的検査及び病理組織学的検査において、いずれのロットでも明らかな差は認められなかった。

2.6.6.8.6. 不純物の遺伝毒性評価

製造工程中の中間体及び不純物について、初めに定量的構造活性相関（QSAR）モデルにより潜在的な遺伝毒性を示す可能性を評価し（GS-IS-2014-81;DSE-IS-2016-1）、その後、細菌を用いた復帰突然変異試験（GLP）を実施した（3 試験；8347289、YDF0001、8340103）。その結果、1 試験目（8347289）で GS-652153 及び GS-652157 が陽性、2 試験目（YDF0001）で GS-713902 が陽性（GS-072388 及び GS-030865 は陰性）を示した。また、GS-642109 は大腸菌株で陽性、ネズミチフス菌株で陰性であった（8340103）。GS-642109 はアリールボロン酸であり、in vitro で変異原性陽性を示す可能性があるが、GS-642109 と類似した構造を有すアリールボロン化合物は in vivo では陽性を示さないため、クラス 5 不純物と考えられている（416301-01）。

また、Sierra 社によって GS-072388（8304635）、GS-713902（8331674）及び GS-030865（8340102）の復帰突然変異試験（GLP）で実施され、いずれの不純物も陰性であった。なお、GS-713902 の所見は両試験で一貫していなかったが、この矛盾の理由は不明である。

遺伝毒性を示す可能性のあるすべての不純物は、原薬製造において適切に管理されている（2.3.S.2.6）。

2.6.6.8.7. 不純物の安全性評価

毒性試験に用いた MMB ロットの不純物プロファイルは 2.6.7.4 に示した。

Good Manufacturing Practice（GMP）原薬中の不純物及び潜在的不純物の安全性を確認するため、2 つのラット 4 週間投与試験を実施した（2.6.7.17.2）。その結果、MMB の低純度及び高純度ロット間で、MMB の無毒性量（ともに最高用量の 17mg/kg/日）に相違は認められなかった。

毒性試験で用いた MMB の複数の GLP ロットは、不純物プロファイルから、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。不純物の規格値は 2.3.S.3.2 に示した。

2.6.6.9. 考察及び結論

MMB を経口投与したときの毒性について、マウス、ラット及びイヌを用いた最長 39 週間の反復投与毒性試験で評価した。遺伝毒性試験としては ICH に準拠した一連の遺伝毒性試験を実施し、がん原性試験としてはトランスジェニックマウスを用いた 26 週間投与試験及びラットを用いた 2 年間投与試験を実施した。生殖発生毒性試験はラット及びウサギを用いて実施した。その他、幼若ラットを用いた反復投与毒性試験、局所刺激性（皮膚及び眼刺激性）試験、光毒性試験及び抗原性試験を実施した。NOAEL 及び NOEL（無影響量）を表 2.6.6.21 に示した。

2.6.6.9.1. 反復投与毒性

いずれの動物種においても MMB 投与に関連した変化がリンパ系／骨髄組織及び雌雄生殖器に一貫して認められた。イヌ及びラットでは水晶体及び末梢神経系への影響が認められたが、長期間投与試験に限られていた。その他の特記すべき所見として、ラットで消化管、心臓及び肝臓への影響及びイヌで食欲不振及び体重減少／体重増加抑制が認められた。

リンパ系組織及び骨髄

マウス、ラット及びイヌにおいて、リンパ系及び骨髄組織への影響として血液学的及び器官重量の変化がみられ、造血及び免疫応答におけるヤヌスキナーゼの関与が示唆された。

マウスの 4 週間投与試験（8283319）、ラットの 4、13 及び 26 週間投与試験（1009-0461、1668-009 及び 1668-023）並びにイヌの 4、13 及び 39 週間投与試験（GWR1005、1668-011 及び 814-1407）において、赤血球量（赤血球数、ヘモグロビン及びヘマトクリット）及び白血球数の低値は、骨髄（大腿骨及び胸骨）における用量依存的な細胞密度低下、並びに脾臓、リンパ節、胸腺及び GALT におけるリンパ球枯渇と関連していた。細胞密度低下及びリンパ球枯渇は部分的に回復性が認められた。

これらの所見は、造血及び免疫応答におけるヤヌスキナーゼの関与と一致していた。マウス及びラットのがん原性試験並びにラット及びイヌの長期反復投与毒性試験（MMB の最高用量はそれぞれ 100、15、50 及び 50 mg/kg/日）では、白血球及びリンパ球低値に伴う日和見感染及び腫瘍の発生は認められなかった。

ラットの 26 週間及びイヌの 39 週間投与試験におけるリンパ系組織及び骨髄への影響に対する NOAEL は、それぞれ 15 及び 20 mg/kg/日と推定された。

生殖器

ラットの 13 及び 26 週間投与試験において、精巣及び精巣上体重量の低値がみられ、これに関連して精細管上皮の変性／萎縮及び精巣上体の精子数減少／生殖細胞残屑が認められた（1668-009 及び 1668-023）。ラットの 4 週間投与試験（1009-0461）においても、精巣及び精巣上体で同様の組織学的所見が認められた。しかしながら、SD 及び Long Evans ラットに ^{14}C-MMB の 80 mg/kg 単回投与したとき、精巣に放射能は検出されなかった（2.6.4.4.1）。イヌに 50 mg/kg/日を 39 週間投与したところ、精巣で軽度な精子細胞／精母細胞変性、精巣

上体では生殖細胞残屑の軽度増加が認められた（814-1407）。精巣所見の回復性は程度に依存していた。

雌生殖器では、4 週間投与試験（1009-461）において 30 mg/kg/日以上の群で卵巣に黄体出血、黄体嚢胞及び卵胞嚢胞の発現頻度の高値がみられ、10 mg/kg/日以上で子宮頸部に上皮変性が認められた。ラット 13 及び 26 週間投与試験（最高用量はそれぞれ 68 及び 50 mg/kg/日）では、雌生殖器への影響は認められなかった（1668-009 及び 1668-023）。

水晶体

イヌに MMB を 39 週間経口投与したときに、高用量の 50 mg/kg/日群の雄 2 例及び雌 3 例で後嚢下白内障の増加が認められた（814-1407）。雄 1 例及び雌 2 例では 6 週間の休薬期間終了時にも認められた。ラットを用いた組織分布試験では、SD ラットの眼球及び水晶体並びに Long Evans ラットの水晶体に放射能は検出されなかったが、Long Evans ラットの眼球では、^{14}C-MMB の 80 mg/kg の単回投与後 8 及び 24 時間に低濃度の放射能が検出された（2.6.4.4.1）。この所見の意義は不明であるが、臨床試験において MMB を投与した被験者に白内障の発現率の増加は認められなかった。

末梢及び中枢神経系

ラットを用いた 26 週間投与試験（1668-023）では、50 mg/kg/日群で可逆的な尾神経及び指神経伝導速度の軽度遅延、並びに可逆的かつ進行性の遠位感覚速度の軽度低下が認められた。これらの変化は休薬期間終了時には認められなかった。FOB パラメータに対する影響は認められなかった。また、神経病理学的検査においても、MMB 投与に関連する電気生理学的所見は認められなかった。伝導変化に対する NOAEL は 15 mg/kg/日と推定された。

高濃度の MMB 投与による伝導変化の機序として、イオンチャネルに影響を及ぼした可能性は否定できないが、末梢神経機能に関連するイオンチャネルである電位依存性ナトリウムチャネル（hNav1.6、hNav1.7 及び hNav1.8/β3、カリウムチャネル（hHCN2）又は Shaker family カリウムチャネル（Kv1.1 及び Kv1.2）の阻害は、最高濃度である 3 μM（約 1 μg/mL）でも認められなかった（2.6.2.4.1.2）。この濃度は、ラットの 26 週間投与試験における 50 mg/kg/日群の Cmax、又は第 3 相臨床試験における MMB 200 mg/日を投与した MF の被験者における平均 Cmax の約 6 倍に相当する。

伝導変化の機序は特定されていないが、軽度な影響で、可逆的であることから、追加試験による検討は実施していない。

非臨床及び臨床において MMB による中枢神経系への悪影響はみられておらず、マウス及びラットでは血液／脳移行性は低いことが示されている（2.6.4.4.1 及び 2.6.4.4.4）。また、MMB はチアミン輸送を阻害しない（2.6.2.3.4）ことから、他の JAK 阻害薬で報告されているウェルニッケ脳症を誘発する可能性は低いと考えられる。

その他の所見

ラット 4 週間投与試験（1009-0461）での組織学的変化のなかで、ラットのより長期間の反復投与試験及びイヌの反復投与試験で認められなかった変化として、30 mg/kg/日以上の群

で消化管の出血、100 mg/kg/日群の雄数例で心基部の出血、100 mg/kg/日群で肝臓の軽微な単核球浸潤の発現頻度低下が認められた。

イヌの反復投与試験における用量制限毒性は、4 週間投与試験（GWR1005）の 100 mg/kg/日群及び 39 週間投与試験（814-1407）の 50 mg/kg/日群でみられた食欲低下及び体重増加抑制であった。

2.6.6.9.2. 遺伝毒性

MMB は、in vitro 細菌を用いた復帰突然変異試験（GXE0001）、in vitro ヒトリンパ球を用いた染色体異常試験（GXE0002）及び in vivo ラット小核試験（AD37FP.125.BTL）において、変異原性及び染色体異常誘発性を示さなかった。

2.6.6.9.3. がん原性

トランスジェニック（001178-T [hemizygous] rasH2）マウスを用いた 26 週間投与試験（8283320）において、最高用量である 100 mg/kg/日までの経口投与でがん原性は認められなかった。

SD ラットを用いた 2 年間投与試験（814-1519）では、最高用量である 15 mg/kg/日群において、試験実施施設の背景値を上回るが、統計学的に有意ではない精巣間細胞（ライディッヒ細胞）腺腫の発現頻度の増加が認められた。ライディッヒ細胞腺腫は、プロラクチンシグナル伝達経路の調節（抑制）に関わる JAK 阻害薬のオフターゲット作用に関連して発現することが報告されている[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、ヒトでの腫瘍形成リスクは低いと考えられる。

2.6.6.9.4. 生殖発生毒性

MMB の生殖発生毒性を評価するため、雌雄ラットの受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、ラット及びウサギの胚・胎児発生に関する試験、並びに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を実施した。

反復投与毒性試験における雌雄生殖器の組織学的所見に一貫して、雌雄受胎能の低下が認められた。雄ラットの受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（8287293）では、25 及び 100/68 mg/kg/日群で雄の受胎率の低下及び精嚢重量の低値、100/68 mg/kg/日群で精巣重量の低値、精子濃度及び精子運動性の低下が認められ、雄の受胎能に対する NOAEL は 5 mg/kg/日と推定された。雌の受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（8291598）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率の高値が観察され、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/日と推定された。帝王切開では 25 及び 100/68 mg/kg/日群で MMB 投与の影響が観察され、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のための用量設定試験及び本試験（それぞれ 8283314 及び 8283315）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、17 及び 68 mg/kg/日群では、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。本試験における母動物の一般毒性に対する NOAEL は 12 mg/kg/日、胚・胎児に対する NOAEL は 6 mg/kg/日と推定された。

ウサギの胚・胎児発生に関する試験のための用量設定試験及び本試験（それぞれ 8283316 及び 8283318）では、30、60 及び 75 mg/kg/日群で母動物毒性がみられ、胚・胎児毒性としては、75 mg/kg/日群で着床後胚死亡率の高値及び胎児体重の低値が認められた。本試験における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。

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（8307965）では、母動物において 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、母動物の一般毒性に対する NOAEL は 6 mg/kg/日と推定された。また、他の生殖発生毒性試験と同様、6 及び 12 mg/kg/日群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/日群では出生児生存率の低値が認められた。6 及び 12 mg/kg/日群における出生児生存率の低値には有意差が認められたが、母動物毒性がみ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/日群の出生児における体重の低値が成長期及び妊娠期間中にも観察された。これらのことから、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。

以上のことから、MMB は女性患者又はパートナーが閉経後でない限り、有効な避妊を施した男性又は女性患者にのみ処方されるべきであると考えられた。

2.6.6.9.5. 幼若動物の毒性

幼若ラットに MMB を生後 7～56 日に反復投与した毒性試験（WIL-604256）では、10 mg/kg/日群で体重／体重増加量の低値、脛骨及び大腿骨長の短縮、亀頭包皮分離の遅延、前肢握力の低下が認められた。10 週間の休薬によりいずれの変化にも回復性が認められた。一般毒性に対する NOAEL は 3 mg/kg/日と推定された。また、10 mg/kg/日群の雌では着床後胚死亡率の高値がみられ、生殖能に対する NOAEL は雄で 10 mg/kg/日、雌で 3 mg/kg/日と推定された。10 mg/kg/日群の雄では、投与期間中の Biel 型水迷路検査において、可逆的な記憶障害が認められ、神経行動毒性に対する NOAEL は雄で 3 mg/kg/日、雌で 10 mg/kg/日と推定された。

2.6.6.9.6. 局所刺激性

MMB の予定臨床投与経路は経口であるため、反復経口投与毒性試験で消化管に対する局所刺激性を評価した。300 mg/kg/日群のウサギ（7 日間投与試験；8283317）及び毒性試験中に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を特定するため、2 つの in vitro 試験を実施した。MMB は BCOP 試験（EUN0031）において重篤な眼刺激性を示した。また、MMB は in vitro 膜バリア Corrositex を用いた試験（41501205）において腐食性を示すと考えられ、UN Packing Group

III（UN GHS Hazard Statement H314「重度の皮膚熱傷及び眼損傷を引き起こす」カテゴリー1C）に分類された。

MMB は in vitro ニュートラルレッド取り込み試験（20054979）で光毒性を示さなかった。

2.6.6.9.7. その他の毒性試験

MMB はマウスの局所リンパ節増殖試験（EUN0029）において皮膚感作性を示さなかった。ラットのがん原性試験（814-1519）では MMB と M21 の併用投与群を設けたが、ヒト特異的な代謝物はないことから、MMB 代謝物を単独投与した試験は実施していない。

低及び高純度ロットを用いたラットの 4 週間経口投与試験（2 試験）を実施し、原薬中の不純物の毒性を評価した（8287290、8336287）。MMB 投与に関連した所見は観察されず、臨床病理学的及び病理組織学的検査において低純度及び高純度ロット間で明らかな相違は認められなかった。無毒性量は 17 mg/kg/日と推定された。

2.6.6.9.8. 曝露量比較

動物における曝露量及び動物／ヒト曝露量との比較結果を表 2.6.6.21 に示す。

表 2.6.6.21 MMB の経口投与時における平均全身曝露量比較

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
Rat (26-weeks) [1668-023]	5	NOAEL	M	33800	10	4020	8.4
			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

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[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] 5[e]	NOEL NOEL	F	NM	-	NM	-
Rat (GD 6-17; Embryo-fetal Development) [8283315]	12[d] 6[e]	NOEL NOEL	F	75800	23	7450	16
				25500	7.8	3580	7.5
Rabbit (GD 7-20; Embryo-fetal Development) [8283318]	30[d] 60[e]	NOAEL NOAEL	F	543	0.2	312	0.7
				4100	1.2	994	2.1
Rat (GD 6-LD 20; Pre- and Postnatal Development) [8307965]	6[df] 2[eg]	NOAEL NOAEL	F	13900	4.2	3360	7.0
				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 Adverse Effect Level;
NOEL = NO 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.

2.6.6.9.9. 結論

MMB を用いた包括的な毒性試験を実施した。これらのデータは、MMB を臨床で使用した際の安全性を十分担保するものであった。

マウス、ラット及びイヌでは MMB の薬理作用に関連した所見として、用量依存的な骨髄（大腿骨及び胸骨）の細胞密度低下、並びに脾臓、リンパ節、胸腺及び GALT におけるリンパ球枯渇に起因した赤血球量及び白血球数の低値が認められた。これらの変化は休薬により回復傾向を示したが、完全には回復しなかった。

MMB は遺伝毒性試験で陰性を示し、トランスジェニックマウスのがん原性試験でがん原性を示す可能性は低いことが示唆された。ラットの 2 年間投与がん原性試験では、高用量群でライディッヒ細胞腺腫の増加がみられたが、プロラクチンシグナル伝達経路の阻害に関連したものであり[Chapin, 2017]、ヒトの正常なライディッヒ細胞はプロラクチン依存性を有していないため、ヒトにおけるリスクは低いと考えられた。

生殖発生毒性試験では、反復投与毒性試験における生殖器の組織学的変化と一貫して雌雄受胎能の低下が認められた。催奇形性は認められなかったが、胚・胎児毒性がみられ、出生児では生存率の低下が認められた。

すべての主要な毒性試験においては、NOAEL 及び NOEL が推定された。

2.6.6.10. 図表

図表は本文中に記載した。

2.6.6.11. 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.

2.6.7. 毒性試験概要表

2.6.7.1. 毒性試験：一覧表

Test Article: MMB

Study Type / Species / Strain	Administration	Duration of Dosing	Doses[a] (mg/kg)	GLP[b]	Testing Facility	Study Number
Single-Dose Toxicity						
Mouse / C57BL6	PO (gavage)	1 day	5, 10, 15, 20 BID	No	[redacted], AUS	CYTO0028:584
Mouse / BALB/c	PO (gavage)	1 day	20, 30, 40, 50 BID	No	[redacted], AUS	CYTO0037:759
Rat / Sprague-Dawley	PO (gavage)	1 day, 14-day observation	0, 50, 250, 500, 750	No	[redacted], UK	GWR1000
Rat / Sprague-Dawley	PO (gavage) & IV (tail vein)	1 day	PO: 20, 40, 60 BID IV: 0, 7.5, 15, 30, 60 BID	No	[redacted], AUS	CYTO0041:787
Dog / Beagle	PO (gavage)	1 day, 14-day observation	15, 45, 90, 150, 250, 500, 1000	No	[redacted], UK	GWR1002
Repeat-Dose Toxicity						
Mouse / C57BL6	PO (gavage)	14 days	5, 10, 15, 20 BID	No	[redacted], AUS	CYTO0028:585
Mouse / BALB/c	PO (gavage)	56 days, 14-day recovery	Untreated, 0, 25, 50 BID	No	[redacted], AUS	CYTO0041:795
Mouse / BALB/c	PO (gavage)	28 days, 7-day recovery	Untreated, 0, 35, 50 BID	No	[redacted], AUS	CYTO0037:834
Mouse / RasH2 [001178-W (wild type) CByB6F1-Tg (HRAS)2Jic]	PO (gavage)	4 weeks	0, 30, **100**, 300/150	Yes	[redacted], US	8283319
Rat / Sprague-Dawley	PO (gavage)	14 days	0, 50, 100, 125, 175	No	[redacted], UK	GWR1001
Rat / Sprague-Dawley	PO (gavage) & IV (tail vein)	14 days, 7-day recovery	PO: 20, 35, 50 BID IV: 0, 12, 18, 24 BID	No	[redacted], AUS	CYTO0041:788

Test Article: MMB

Study Type / Species / Strain	Administration	Duration of Dosing	Doses[a] (mg/kg)	GLP[b]	Testing Facility	Study Number
Rat / Sprague-Dawley	PO (gavage)	21 days[c], 14-day recovery	0, 25, 50, 125	Yes	[redacted], UK	GWR1004
Rat / Sprague-Dawley	PO (gavage)	28 days, 28-day recovery	0, 10, 30, 100	Yes	[redacted], CA	1009-0461
Rat / Sprague-Dawley	PO (gavage)	60-61 days	0, 5, 10, 20	No	[redacted], AUS	CYTO0029:624
Rat / Sprague-Dawley	PO (gavage)	13 weeks, 10-week recovery	0, 4.3, **17**, 68	Yes	[redacted], US	1668-009
Rat / Sprague-Dawley	PO (gavage)	26 weeks, 10-week recovery	0, **5**, 15, 50	Yes	[redacted], US	1668-023
Rabbit / New Zealand White (nonpregnant)	PO (gavage)	7 days	0, 30, 100, 300	No	[redacted], US	8283317
Dog / Beagle	PO (gavage)	14 days	3, 30, 100, 300	No	[redacted], UK	GWR1003
Dog / Beagle	PO (gavage)	28 days, 28-day recovery	0, 5, **30**, 100	Yes	[redacted], UK	GWR1005
Dog / Beagle	PO (gavage)	13 weeks, 6-week recovery	0, 8.5, 17.0, **51** QD **8.5** BID	Yes	[redacted], US	1668-011
Dog / Beagle	PO (gavage)	39 weeks, 6-week recovery	0, 10, **20**, 50	Yes	[redacted], US	814-1407
Genotoxicity						
S. typhimurium / TA1535, TA1537, TA98, and TA100 *E. coli* / WP2*uvrA*	In vitro Experiment 1: plate incorporation method Experiment 2: preincubation method	In vitro	Experiment 1: 1.6, 8, 40, 200, 1000 µg/plate Experiment 2: 0.32, 1.6, 8, 40, 200 µg/plate	Yes	[redacted], UK	GXE0001

Test Article: MMB

Study Type / Species / Strain	Administration	Duration of Dosing	Doses[a] (mg/kg)	GLP[b]	Testing Facility	Study Number
Human peripheral lymphocytes	In vitro	In vitro Experiment 1: (± S9) 3-hour treatment with 18-hour postdose harvest. Experiment 2: (-S9) 18-hour treatment with 18- and 42-hour postdose harvests (+S9) 3-hour treatment with 18- and 42-hour postdose harvests	Experiment 1: (-S9) 0.1, 1, 5 or (+S9) 0.1, 5, 15 µg/mL Experiment 2: (-S9) 0.01, 0.1, 1.25 or (+S9) 0.1, 5, 12.7 µg/mL	Yes	[redacted], UK	GXE0002
Bone Marrow Micronucleus / Rat / Sprague-Dawley	In vivo PO (gavage)	1 day	0, 250, 500, or 1000 (euthanized 24 hours postdose) or 0, 1000 (euthanized 48 hours postdose)	Yes	[redacted], US	AD37FP.125.BTL
Carcinogenicity						
Mouse / 001178-T [hemizygous]RasH2	PO (gavage)	26 weeks	0 (vehicle), 0 (water), 3, 10, 30, 100	Yes	[redacted], US	8283320
Rat / Sprague-Dawley	PO (gavage)	104 weeks (males) 102 weeks (females)[d]	0, 1.5, 5, 15 MMB, 5 MMB + 25 M21	Yes	[redacted], US	814-1519
Reproductive and Developmental Toxicity						
Male fertility / Rat / Sprague-Dawley	PO (gavage)	Approx. 10 weeks total (4 weeks prior to mating, throughout mating until euthanasia)	0, 5, 25, 100/68[e]	Yes	[redacted], US	8287293
Female fertility / Rat / Sprague-Dawley	PO (gavage)	At least 14 days prior to mating through GD 7	0, 5, 25, 100/68[f]	Yes	[redacted], US	8291598

Test Article: MMB

Study Type / Species / Strain	**Administration**	**Duration of Dosing**	**Doses[a] (mg/kg)**	**GLP[b]**	**Testing Facility**	**Study Number**
Embryo-fetal development dose range-finding / Rat / Sprague-Dawley	PO (gavage)	GD 6 to 17	0, 4.3, 17, 68	Yes	[redacted], US	8283314
Embryo-fetal development / Rat / Sprague-Dawley	PO (gavage)	GD 6 to 17	0, 2, 6, 12	Yes	[redacted], US	8283315
Embryo-fetal development dose range-finding / Rabbit / New Zealand White	PO (gavage)	GD 7 to 20	0, 7.5, 30, 75	Yes	[redacted], US	8283316
Embryo-fetal development / Rabbit / New Zealand White	PO (gavage)	GD 7 to 20	0, 7.5, 30, 60	Yes	[redacted], US	8283318
Prenatal and postnatal developmental toxicity / Rat / Sprague-Dawley	PO (gavage)	GD 6 to LD 20	0, 2, 6, 12	Yes	[redacted], US	8307965
Studies in Juvenile Animals						
Dose range-finding / Rat / Sprague-Dawley	PO (gavage)	PND 7 to 21	0, 3, 10, 30	Yes	[redacted], US	WIL-604183
Rat / Sprague-Dawley	PO (gavage)	PND 7 to 56	0, 1, 3, 10	Yes	[redacted], US	WIL-604256
Local Tolerance						
Skin Corrosion Assay / Corrositex	In vitro	4-hour exposure	~0.5 g neat[g]	Yes	[redacted], UK	41501205
Bovine Corneal Opacity and Permeability	In vitro	Opacity assessment at 4 hours with permeability assessment at 90 minutes	20% w/w in 0.9% saline	Yes	[redacted], UK	EUN0031
Phototoxicity / BALB/c 3T3 mouse fibroblasts	In vitro	90 minutes	0, 3.2 µg/mL	Yes	[redacted], US	20054979

Test Article: MMB

Study Type / Species / Strain	Administration	Duration of Dosing	Doses[a] (mg/kg)	GLP[b]	Testing Facility	Study Number
Other Toxicity Studies						
Antigenicity / Local lymph node assay / Mouse / CBA/Ca	Topical	3 days	0, 10, 25, 50% w/v	Yes	[redacted], UK	EUN0029
Impurities / Rat / Sprague-Dawley	PO (gavage)	29 days	0 (vehicle), 17 (Lot No. [redacted]; 96.1% pure), 10 and 17 (Lot No. [redacted]; 91.9% pure)	Yes	[redacted], US	8287290
Impurities / Rat / Sprague-Dawley	PO (gavage)	28 days	0 (vehicle), 17 (Lot No. [redacted]; 99.5% pure), 10 and 17 (Lot No. [redacted]; 91.1% pure)	Yes	[redacted], US	8336287
Impurities Bacterial Reverse Mutation Assay / *S. typhimurium* and *E. coli*	In vitro	52 ± 4 hours	GS-642109 5–5000 µg/plate	Yes	[redacted], US	8340103
Impurities Bacterial Reverse Mutation Assay / *S. typhimurium* and *E. coli*	In vitro	52 ± 4 hours	GS-652153 5–5000 µg/plate GS-652157 5–5000 µg/plate	Yes	[redacted], US	8347289
Impurities Bacterial Reverse Mutation Assay / *S. typhimurium* and *E. coli*	In vitro	66 hours	GS-030865 15-5000 µg/plate GS-072388 50-5000 µg/plate GS-713902 15-1500 µg/plate	Yes	[redacted], UK	YDF0001

Test Article: MMB

Study Type / Species / Strain	Administration	Duration of Dosing	Doses[a] (mg/kg)	GLP[b]	Testing Facility	Study Number
Impurities Bacterial Reverse Mutation Assay / *S. typhimurium* and *E. coli*	In vitro	52 ± 4 hours	GS-072388 5-5000 µg/plate	Yes	[redacted], [redacted], US	8304635
Impurities Bacterial Reverse Mutation Assay / *S. typhimurium* and *E. coli*	In vitro	52 ± 4 hours	GS-713902 5-5000 µg/plate	Yes	[redacted], [redacted], US	8331674
Impurities Bacterial Reverse Mutation Assay / *S. typhimurium* and *E. coli*	In vitro	52 ± 4 hours	GS-030865 5-5000 µg/plate	Yes	[redacted], [redacted], US	8340102

[a] All doses are expressed as free base equivalents and are QD unless specified otherwise. For repeat-dose toxicity studies, the highest NOAEL is underlined and bold font.

[b] "Yes" indicates study includes a GLP compliance statement.

[c] Dosing was originally scheduled for 28 days but was terminated on Day 21 due to severe clinical signs.

[d] Dosing was terminated after 102 weeks due to survival falling below 20%.

[e] During the first 4 days of dosing, one MMB-related death occurred at 100 mg/kg/day. Due to this death and mortality data in the concurrent companion female fertility study (8291598), the dose level was reduced to 68 mg/kg/day beginning on Premating Day 5.

[f] During the first 4 days of dosing, 4 MMB-related deaths occurred at 100 mg/kg/day. The MMB dose level was then reduced to 68 mg/kg/day.

[g] The assay calls for 500 mg test article, but the membrane discs would not hold this quantity; they were filled with the maximum amount of test article to completely fill each insert.

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

Test Article: MMB

Type of Study	Test System	Administration	Doses (mg/kg)[a]	GLP[b]	Study Number
4-week repeat dose toxicity	Mouse (RasH2 [001178 W (wild type) CByB6F1 Tg(HRAS)2Jic])	PO (gavage)	0, 30, 100, 300/150	Yes	8283319
26-week repeat dose carcinogenicity	Mouse (001178-T [Hemizygous] RasH2)	PO (gavage)	0, 3, 10, 30, 100	Yes	8283320
21-day repeat dose toxicity study with a 14-day recovery	Rat (Sprague-Dawley)	PO (gavage)	0, 25, 50, 125	Yes	GWR1004
28-day repeat dose toxicity study with a 28-day recovery	Rat (Sprague-Dawley)	PO (gavage)	0, 10, 30, 100	Yes	1009-0461
13-week repeat dose toxicity study with a 10-week recovery	Rat (Sprague-Dawley)	PO (gavage)	0, 4.3, 17, 68	Yes	1668-009
26-week repeat dose toxicity study with a 10-week recovery	Rat (Sprague-Dawley)	PO (gavage)	0, 5, 15, 50	Yes	1668-023
104-week repeat dose carcinogenicity study	Rat (Sprague-Dawley)	PO (gavage)	0, 1.5, 5, 15 MMB, 5 MMB + 25 M21	Yes	814-1519
28-day repeat dose toxicity study with a 28-day recovery	Dog (Beagle)	PO (gavage)	0, 5, 30, 100	Yes	GWR1005
13-week repeat dose toxicity study with a 6-week recovery	Dog (Beagle)	PO (gavage)	0, 8.5, 17.0, 51.2 QD 8.5 BID	Yes	1668-011
39-week repeat dose with a 6-week recovery	Dog (Beagle)	PO (gavage)	0, 10, 20, 50	Yes	814-1407
Embryo-fetal development dose range finding	Rat (Sprague-Dawley)	PO (gavage)	0, 4.3, 17, 68	Yes	8283314

Test Article: MMB

Type of Study	Test System	Administration	Doses (mg/kg)[a]	GLP[b]	Study Number
Embryo-fetal development	Rat (Sprague-Dawley)	PO (gavage)	0, 2, 6, 12	Yes	8283315
Prenatal and postnatal developmental	Rat (Sprague-Dawley)	PO (gavage)	0, 2, 6, 12	Yes	8307965
Embryo-fetal development dose range finding	Rabbit (New Zealand White)	PO (gavage)	0, 7.5, 30, 75	Yes	8283316
Embryo-fetal development	Rabbit (New Zealand White)	PO (gavage)	0, 7.5, 30, 60	Yes	8283318
Juvenile toxicity dose range finding	Rat (Sprague-Dawley)	PO (gavage)	0, 3, 10, 30	Yes	WIL-604183
Juvenile toxicity	Rat (Sprague-Dawley)	PO (gavage)	0, 1, 3, 10	Yes	WIL-604256
4-week impurity qualification	Rat (Sprague-Dawley)	PO (gavage)	0, 10, 17	Yes	8287290
4-week impurity qualification	Rat (Sprague-Dawley)	PO (gavage)	0, 10, 17	Yes	8336287

[a] All doses are expressed as free-base equivalents and are QD dosing unless specified otherwise.

[b] "Yes" indicates study includes a GLP compliance statement.

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

2.6.7.3.1. MMB

Test Article: MMB

MMB Steady State AUC_{0-24} (ng·h/mL)							
Species	**Mouse**		**Rat**		**Dog**		**Rabbit**
Administration	**PO (gavage)**		**PO (gavage)**		**PO (gavage)**		**PO (gavage)**
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Female**
Dose (mg/kg/day)[a]							
2			NA	6180[b], 3260/830[c]			
3	468[d]	652[d]	11000[e]	7740[e]			
4.3			13700[f]	18400[f], 15700[g]			
5			33800[h]	73100[h]	459[i]	556[i]	
6			NA	25500[b], 13900/3020[c]			
7.5							30.3[j], 35.2[k]
8.5					891[l]	1080[l]	
10	5470[d]	4100[d]	82900[m], 44100[n], 43600[o], 73100[e]	62700[m], 39900[n], 48500[o], 65000[e]	2180 (combined sex)[p]		
12			NA	75800[b], 35700/4450[c]			
15			105000[h]	131000[h]			
17			94200[f], 77000/79800[n], 74100/88300[o]	102000[f], 146000[g], 96300/87000[n], 89800/108000[o]	1610 (QD), 2310 (BID)[l]	1950 (QD), 1930 (BID)[l]	
20					4620 (combined sex)[p]		
25			141000[q]	142000[q]			

Test Article: MMB

MMB Steady State AUC_{0-24} (ng·h/mL)							
Species	**Mouse**		**Rat**		**Dog**		**Rabbit**
Administration	**PO (gavage)**		**PO (gavage)**		**PO (gavage)**		**PO (gavage)**
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Female**
Dose (mg/kg/day)[a]							
30	20500[r], 22100[d]	23000[r], 18900[d]	20900[m], 237000[e]	173000[m], 170000[e]	11000[i]	4400[i]	1520[j], 543[k]
50			273000[q], 306000[h]	230000[q], 265000[h]	9390 (combined sex) [p]		
51.2					4160[l]	3220[l]	
68			258000[f]	311000[f], 462000[g]			
75							20500[j], 4100[k]
100	52600[r], 85400[d]	62400[r], 86300[d]	479000[m]	386000[m]	9720[i]	7810[i]	
125			463000[q]	476000[q]			
150	81800[r]	71800[r]					
300	191000[r]	158000[r]					

[a] All doses are expressed as free-base equivalents and are QD dosing unless specified otherwise.
[b] 8283315 (GD 17)
[c] 8307965 (LD 10 dams / PND 10 pups - combined sex)
[d] 8283320 (Week 26)
[e] WIL-604183 (PND 21)
[f] 1668-009 (Day 91)
[g] 8283314 (GD 17)
[h] 1668-023 (Day 178)
[i] GWR1005 (Day 28)
[j] 8283316 (GD 20)
[k] 8283318 (GD 20)
[l] 1668-011 (Day 91; AUC_{0-12})
[m] 1009-0461 (Day 28)
[n] 8287290 (Week 4, 10 mg/kg lot [redacted]; 17 mg/kg lot [redacted]/lot [redacted])
[o] 8336287 (Week 4, 10 mg/kg lot [redacted]; 17 mg/kg lot [redacted]/lot [redacted])
[p] 814-1407 (Day 271)
[q] GWR1004 (Day 21 for 25 and 50 mg/kg; Day 9 for 125 mg/kg)
[r] 8283319 (Day 28 for 30, 100, 150 mg/kg; Day 1 for 300 mg/kg)

2.6.7.3.2. M21

Test Article: MMB

	M21 Steady State AUC_{0-24} (ng·h/mL)					
Species	**Mouse**		**Rat**		**Dog**	
Administration	**PO (gavage)**		**PO (gavage)**		**PO (gavage)**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Dose (mg/kg/day)[a]						
3	3.55[b]	9.08[b]	36.1[c]	27.6[c]		
5			777[d]	669[d]		
10	37.0[b]	60.5[b]	131[e], 281[f], 222[c]	115[e], 193[f], 305[c]	24.8 (combined sex)[g]	
15			NA[d]	NA[d]		
17			503/529[e], 541/513[f]	433/120[e], 547/384[f]		
20					23.4 (combined sex)[g]	
30	105[h], 215[b]	250[h], 233[b]	1400[c]	762[c]		
50			3210[d]	2370[d]	52.7 (combined sex)[g]	
100	373[h], 991[b]	735[h], 796[b]				
150	572[h]	704[h]				
300	1240[h]	1980[h]				

[a] All doses are expressed as free-base equivalents.
[b] 8283320 (Week 26)
[c] WIL-604183 (PND 21)
[d] 1668-023 (Day 178)
[e] 8287290 (Week 4, 10 mg/kg lot [redacted], 17 mg/kg lot [redacted]/lot [redacted])
[f] 8336287 (Week 4, 10 mg/kg lot [redacted], 17 mg/kg lot [redacted]/lot [redacted])
[g] 814-1407 (Day 271)
[h] 8283319 (Day 28 for 30, 100, 150 mg/kg; Day 1 for 300 mg/kg

2.6.7.3.3. M19

Test Article: MMB

	M19 Steady State AUC_{0-24} (ng·h/mL)					
Species	**Mouse**		**Rat**		**Dog**	
Administration	**PO (gavage)**		**PO (gavage)**		**PO (gavage)**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Dose (mg/kg/day)[a]						
3	169[b]	406[b]	5900[c]	5140[c]		
5			4030[d]	7850[d]		
10	1160[b]	2340[b]	4180[e], 6770[f], 54800[c]	4270[e], 16900[f], 53000[c]	2280 (combined sex)[g]	
15			14100[d]	20600[d]		
17			7420/7350[e], 11500/10400[f]	27800/20100[e], 29700/26500[f]		
20					5320 (combined sex)[g]	
30	3930[h], 3920[b]	4400[h], 7030[b]	261000[c]	192000[c]		
50			50800[d]	87000[d]	12600 (combined sex)[g]	
100	11400[h], 17300[b]	9910[h], 27900[b]				
150	22100[h]	12400[h]				
300	35400[h]	23900[h]				

[a] All doses are expressed as free-base equivalents.
[b] 8283320 (Week 26)
[c] WIL-604183 (PND 21)
[d] 1668-023 (Day 178)
[e] 8287290 (Week 4, 10 mg/kg lot [redacted], 17 mg/kg lot [redacted]/lot [redacted])
[f] 8336287 (Week 4, 10 mg/kg lot [redacted], 17 mg/kg lot [redacted]/lot [redacted])
[g] 814-1407 (Day 271)
[h] 8283319 (Day 28 for 30, 100, 150 mg/kg; Day 1 for 300 mg/kg)

2.6.7.3.4. M20

Test Article: MMB

	M20 Steady State AUC_{0-24} (ng·h/mL)			
Species	**Mouse**		**Rat**	
Administration	**PO (gavage)**		**PO (gavage)**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Dose (mg/kg/day)[a]				
3	4.33[b]	15.8[b]		
5			155[c]	274[c]
10	28.1[b]	49.2[b]		
15			NA[c]	NA[c]
30	56.0[d], 128[b]	76.0[d], 179[b]		
50			1440[c]	1180[c]
100	158[d], 410[b]	336[d], 405[b]		
150	219[d]	326[d]		
300	636[d]	1050[d]		

[a] All doses are expressed as free-base equivalents.

[b] 8283320 (Week 26)

[c] 1668-023 (Day 178)

[d] 8283319 (Day 28 for 30, 100, 150 mg/kg; Day 1 for 300 mg/kg)

2.6.7.4. 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧

	Total Impurities (Area %)	Assay (Wt/Wt%)	Individual Specified Impurities Results[a]												Study No./Type
			A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	
Proposed DS Specification	**1.5%[b]**	**92.5-110.0**	**0.40**	**0.50**	**0.25**	**0.20**	**0.25**	**2.00**	**NA**	**0.50**	**NA**	**NA**	**0.20**	**NA**	
Proposed DP Specification	**3.0%**	**90.0-110.0**	**0.30**	**0.50**	**1.00**	**0.50**	**0.35**	**NA**	**NA**	**NA**	**NA**	**NA**	**NA**	**NA**	
Batch No.															
[redacted]	0.1	99.8	< 0.05	ND	ND	ND	ND	< 0.05	ND	ND	< 0.05	ND	ND	ND	20054979/ In vitro phototoxicity
[redacted]	0.1	99.8	ND	ND	ND	ND	ND	0.14	ND	ND	ND	ND	< 0.05	ND	EUN0029/ mouse antigenicity WIL-604256/ juvenile rat, oral
[redacted]	0.88	98.5	0.09	ND	ND	ND	ND	ND	0.43	0.13	0.06	ND	ND	ND	GXE0002/ human lymphocyte in vitro assay
[redacted]	0.7	98.3	0.07	ND	ND	ND	ND	ND	0.13	0.19	ND	ND	ND	ND	1009-0461/ rat, 28-day oral/ ZNA15648.004/ dog, CV safety GXE0001/ bacterial reverse mutation assay GXE0002/ human lymphocyte in vitro assay

	Total Impurities (Area %)	Assay (Wt/Wt%)	Individual Specified Impurities Results[a]												Study No./Type
			A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	
[redacted]	0.2	98.7	< 0.05	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.09	ND	ND	ND	ND	AD37FP.125.BTL / rat, bone marrow micronucleus test 1668-009/ rat, 13-week oral 1668-011/ dog, 13-week oral
[redacted]	0.5	97.7	0.07	ND	ND	ND	ND	ND	< 0.05	0.14	ND	ND	ND	ND	1668-011/ dog, 13-week oral
[redacted]	0.3	98.0	0.05	ND	ND	ND	ND	0.08	ND	0.09	ND	ND	ND	ND	1668-023/ rat, 26-week oral 814-1407/ dog, 39-week oral
[redacted]	1.1	99.4[c]	0.19	0.06	0.07	ND	< 0.05	<0.05	0.07	0.23	0.09	ND	ND	ND	Study nos. and types for batch no. [redacted][d]
[redacted]	6.2	91.9[c]	1.26	1.29	2.23	0.98	ND	< 0.05	0.14	0.34	ND	ND	ND	ND	8287290/ rat, 4-week oral impurity qualification
[redacted]	2.4	96.1[c]	1.11	1.05	ND	ND	ND	0.05	ND	0.15	ND	ND	ND	ND	8287290/ rat, 4-week oral impurity qualification
[redacted]	0.1	99.4	ND	ND	< 0.05	ND	ND	0.07	ND	0.07	ND	ND	ND	ND	Study nos. and types for batch no. [redacted][e]

	Total Impurities (Area %)	Assay (Wt/Wt%)	Individual Specified Impurities Results[a]												Study No./Type
			A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	
[redacted]	0.2	99.5	ND	ND	ND	ND	ND	0.14	ND	0.05	ND	ND	ND	ND	WIL-604183/ juvenile rat, oral range-finding 8336287/ rat, 4-week oral impurity qualification
[redacted]	10.4	91.1[c]	0.05	0.08	0.05	ND	3.22	< 0.05	1.67	1.74	2.00	0.79	0.81	ND	8336287/ rat, 4-week oral impurity qualification

[a] Study key: **A**, GS-644066; **B**, GS-644067; **C**, GS-644676; **D**, GS-644677; **E**, GS-701820; **F**, GS-642112; **G**, GS-644070; **H**, GS-644068; **I**, GS-644069; **J**, GS-642111; **K**, GS-651535; **L**, GS-649413.

[b] Excluding GS-642112.

[c] Purity by high performance liquid chromatography (HPLC).

[d] 8283319, 4-week oral study in rasH2 mice; 8287291, central nervous system safety pharmacology in rats; 8287292, respiratory system safety pharmacology in rats; 8283314, oral embryo-fetal range-finding development study in rats; 8283315, oral embryo-fetal development study in rats; 8283316, oral embryo-fetal range-finding development study in rabbits; 8283317, 7-day oral study in nonpregnant rabbits; 8287293, oral male fertility study in rats; 8291598, oral female fertility study in rats.

[e] EUN0031, in vitro bovine corneal opacity and permeability assay; 41501205, in vitro skin corrosion assay; 8283320, 26-week oral carcinogenicity study in transgenic mice; 8307965, oral pre- and postnatal study in rats; 814-1519, 104-week oral carcinogenicity study in rats.

2.6.7.5. 単回投与毒性試験

Test Article: MMB

Species/Strain	Administration (Vehicle/ Salt Form)	Doses (mg/kg)[a]	Sex and No. per Group	Observed Maximum Nonlethal Dose (mg/kg)[a]	Approximate Lethal Dose (mg/kg)[a]	Noteworthy Findings	Study Number
Mouse / C57BL6	Oral gavage (5% NMP; 95% 0.1M Captisol / free base)	5, 10, 15, 20 BID	4M	≥ 20 BID	> 20 BID	No adverse effects	CYTO0028:584
Mouse / BALB/c	Oral gavage (5% NMP; 95% 0.14M Captisol / free base)	20, 30, 40, 50 BID	4F	≥ 50 BID	> 50 BID	No adverse effects	CYTO0037:759
Rat / Sprague-Dawley	Oral gavage or IV (5% NMP; 95% 0.14M Captisol / free base)	20, 40, 60 BID 7.5, 15, 30, 60 BID	3M	≥ 60 BID	> 60 BID	No adverse effects	CYTO0041:787
Rat / Sprague-Dawley	Oral gavage (SWFI / bis-bisulfate)	0, 50, 250, 500, 750	3M, 3F	500	750	• 750 mg/kg: 2 premature deaths. • 750 mg/kg (Day 4): dose-dependent hematologic changes consistent with pharmacology (reduction in WBC and differential, reticulocytes). Hematology changes showed recovery at Day 15. • ≥ 250 mg/kg: dose-dependent reduction in WBC count, differential count, and reticulocytes. Decrease in HCT and platelets observed at 500 and 750 mg/kg. • Clinical signs noted only at 750 mg/kg were piloerection. Clinical signs noted at 500 and 750 mg/kg (occurring over several days) included an initial reddening of the extremities, followed by subsequent pallor of the extremities at 750 mg/kg. Loose feces were noted	GWR1000

Test Article: MMB

Species/Strain	Administration (Vehicle/ Salt Form)	Doses (mg/kg)[a]	Sex and No. per Group	Observed Maximum Nonlethal Dose (mg/kg)[a]	Approximate Lethal Dose (mg/kg)[a]	Noteworthy Findings	Study Number
						in males on Day 1. • Weight loss/reduced weight gain was noted by Day 4 through to Day 8 in individual animals at both 500 and 750 mg/kg, which resolved by Day 15, consistent with decreases in food consumption in individual animals from these groups across the same period.	
Dog / Beagle	Oral gavage (SWFI / bis-bisulfate)	15, 45, 90, 150, 250, 500, 1000 single dose with 14-day observation period	1F: 15-500 1M: 250, 1000	≥ 1000	> 1000	• No treatment-related findings in clinical pathology, body weights or organ weights (organ weights not collected for 1000 mg/kg animal). • ≥ 250 mg/kg: transient inappetence. • ≥ 250 mg/kg: incidents of vomiting, salivation, liquid/colored feces, and pale pinnae. • 1000 mg/kg: stimulated appetite postdose, vomiting and salivation on 2 occasions.	GWR1002

[a] All doses are expressed as free-base equivalents and are QD dosing unless specified otherwise.
BID =twice daily; HCT = hematocrit; NMP = N-methyl-2 pyrrolidone; SWFI = Sterile Water for Injection; WBC = while blood cells.

2.6.7.6. 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

Test Article: MMB

Species/Strain	Administration (Vehicle /Salt Form)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Sex and No. per Group	NOAEL (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study Number
Mouse / C57BL6	Oral gavage (5% NMP; 95% 0.1M Captisol / free base)	14 days	5, 10, 15, 20 BID	4M	Not determined MTD > 20 BID	No adverse effects	CYTO0028:585
Mouse / BALB/c	Oral gavage (5% NMP; 95% 0.14M Captisol / free base)	Up to 56 days, 14-day recovery	Untreated, 0, 25, 50 BID	4F (untreated), 7F (all other groups)	Not determined MTD > 50 BID	• 25 mg/kg BID: reduced food and water consumption, reduced spleen weights. • 50 mg/kg BID: reduced food and water consumption, depletion of peripheral T cell levels, reduced liver and spleen weights. Recovery in T cell levels and organ weights after a 2-week recovery period.	CYTO0041:795
Mouse / BALB/c	Oral gavage (5% NMP; 95% 0.14M Captisol / free base)	4 weeks, 7-day recovery	Untreated, 0, 35, 50 BID	6F	Not determined MTD > 50 BID	• 50 mg/kg BID: dose-dependent decrease in WBC differential count and reticulocytes. Some recovery noted after 7 days.	CYTO0037:834
Rat / Sprague-Dawley	Oral gavage (5% NMP; 95% 0.14M Captisol / free base)	14 days, 7-day recovery	20, 35, 50 BID	3M	Not determined MTD > 50 BID	No adverse effects	CYTO0041:788
Rat / Sprague-Dawley	Intravenous (5% NMP; 95% 0.14M Captisol / free base)	14 days, 7-day recovery	0, 12, 18, 24 BID	3M	Not determined MTD > 24 BID	No adverse effects	CYTO0041:788
Rat / Sprague-Dawley	Oral gavage (HCl in SWFI, pH ~1.5 / bis-bisulfate)	14 days	0, 50, 100, 125, 175	5M, 5F	Not determined MTD = 125	• Two premature terminations at 175 mg/kg due to clinical signs of reddened/pale extremities, hunched posture, subdued behavior, piloerection, and cold extremities. • Clinical observations at 100 and 125 mg/kg were limited to	GWR1001

Test Article: MMB

Species/Strain	Administration (Vehicle /Salt Form)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Sex and No. per Group	NOAEL (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study Number
						reddened/pale extremities. • Reduction in body weight gain at 100 mg/kg (male), and 125 and 175 mg/kg. • Premature deaths showed increases in AST, urea, bilirubin, and cholesterol, and decreases in albumin and total protein. • Dose-dependent reductions in circulating reticulocytes, WBC count, and WBC types at Day 8 and Day 15. • Generally dose-dependent decreases of up to ~4-fold in thymus and spleen weights. • 50 mg/kg: 1 incidence each in males of reddened lungs, froth-filled trachea, mottled thymus or abnormal (black) stomach contents, reddened mesenteric lymph nodes. • 100 mg/kg: reddened mesenteric lymph nodes, thymus appearance small, raised foci on nonglandular stomach mucosa, reddened submandibular lymph nodes. • 125 mg/kg: reddened or spongy lungs, froth-filled trachea, reddened mesenteric lymph nodes, pale liver, mottled thymus. • 175 mg/kg: reddened mesenteric lymph nodes, mottled thymus; abnormal contents in stomach, duodenum, and ileum (black, red, and yellow material, respectively), small thymus, reddened submandibular lymph nodes, dark	

Test Article: MMB

Species/Strain	Administration (Vehicle /Salt Form)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Sex and No. per Group	NOAEL (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study Number
						stomach lesion, and pale liver in early decedents.	
Rat / Sprague-Dawley	Oral gavage or IV (5% (NMP:95% 0.14M Captisol / free base)	14 days	20, 35, or 50 BID 12, 18, or 24 BID	3M	Not determined	• No findings of note	CYTO0041:788
Rat / Sprague-Dawley	Oral gavage (SWFI/bis-bisulfate)	21 days, 14-day recovery	0, 25, 50, 125, QD	15M, 15F (0,125 mg/kg); 10M, 10F (25, 50 mg/kg)	Not determined	• Vehicle: 4 premature vehicle-related deaths led to early termination of group at Day 20. • Due to severe vehicle-related findings, treatment-related effects could not be clearly defined and NOAEL could not be determined. • 125 mg/kg: 8 premature deaths led to termination of dosing by Day 12 and euthanasia of the majority of surviving animals by Day 15. • 25 and 50 mg/kg groups were terminated by Day 22 due to no control animals remaining on study. • Clinical signs in control group included hunched posture, cold extremities, piloerection, noisy breathing, abnormal gait, and BW loss. 125 mg/kg animals exhibited similar signs. • 125 mg/kg: Reduction in BW gain to Day 8 relative to control, but not thereafter. • ≥ 25 mg/kg: A slight dose-dependent decrease in RBC, Hgb, HCT in females at termination. Leucopenia (including differentials) noted in males and females with no observable dose	GWR1004

Test Article: MMB

Species/Strain	Administration (Vehicle /Salt Form)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Sex and No. per Group	NOAEL (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study Number
						relationship. Recovery of all parameters noted after 2-week recovery. • ≥ 25 mg/kg: increase in APTT values in males with no dose relationship. • ≥ 25 mg/kg: Dose-dependent decrease in absolute and relative thymus and spleen weights. Recovery of organ weights changes noted after 2-week recovery. • At necropsy, changes (ulceration/ inflammation) in stomach and duodenum in control and high dose animals. Vehicle pH contributed to deaths in vehicle control (and possibly high dose) groups. Severe immunosuppression and widespread bacteremia at high dose. • Reversible reductions (> 40%) in M:E ratios in bone marrow smears at 125 mg/kg due to both decreased myeloid count and increased erythroid count. Less marked reductions (< ~20%) at 25 and 50 mg/kg. • Dose-dependent cellular depletion in the bone marrow and spleen, and lymphoid depletion in the thymus and/or lymph nodes. • Reproductive changes in high-dose female animals (hemorrhagic corpora lutea). • Minimal to slight testicular degeneration in male animals at all dose levels; not evident in low-dose	

Test Article: MMB

Species/Strain	Administration (Vehicle /Salt Form)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Sex and No. per Group	NOAEL (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study Number
						animals at recovery. • Dose-dependent increase in plasma thiocyanate levels.	
Rat / Sprague-Dawley	Oral gavage (5% NMP; 95% 0.1M Captisol / free base)	60-61 days	0, 5, 10, 20	0: 10F 5, 10, 20: 5F	Not determined MTD > 20	• Dose-dependent decreases in lymphocytes and WBC. • Increase in blast cells at all doses. • Reduction in spleen weight to body weight ratio at all doses.	CYTO0029:624
Rabbit / New Zealand White	Oral gavage (0.05M HCl in sterile water at final pH of 1.35 to 1.80 / dihydrochloride salt)	7 days	0, 30, 100, 300	3F	Not determined	<u>30 mg/kg</u> • Increased organ and organ to body weight percentage in liver/gall bladder, heart, pituitary. <u>100 mg/kg</u> • Reduced body weight. • Reduced food consumption. • Increased organ and organ to body weight percentage in liver/gall bladder, heart, pituitary, ovary, adrenal. Reduced spleen and thymus weight. <u>300 mg/kg</u> • Unscheduled deaths in all animals. • Clinical signs of general debilitation. • Reduced body weight. • Reduced food consumption. • Discolored stomach and duodenum consistent with local irritation.	8283317
Dog / Beagle	Oral gavage (0.05M HCl in SWFI [3, 30, 100 mg/kg]; SWFI [300 mg/kg] / dihydrochloride salt)	14 days	3, 30, 100, 300	1M, 1F	Not determined MTD = 100	• 300 mg/kg: 1 premature death. • Clinical signs at 3 and 30 mg/kg: sporadic loose or liquid stool, pre- and postdose salivation, and yellow vomitus. 100 mg/kg: reddened ears, vomitus, loose or	GWR1003

Test Article: MMB

Species/Strain	Administration (Vehicle /Salt Form)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Sex and No. per Group	NOAEL (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study Number
						liquid stool, abnormal gait, pre- and postdose salivation, and partially closed eyes. 300 mg/kg: red pinnae, gastrointestinal disturbance (evidenced by vomiting and loose and/or liquid feces), muscle rigidity and tremors, abnormal gait, partially closed eyes, a more palpable heartbeat, lethargy, and increased salivation. • 30 mg/kg: inappetence and body weight loss; reversed with supplemented diet. At necropsy, BW gain consistent at 3 and 30 mg/kg. Slight BW loss at 100 and 300 mg/kg. • 300 mg/kg: reduced RBC, Hgb, HCT, platelets, WBC (including differential). • Dose-dependent decrease in reticulocytes. • 300 mg/kg: Decrease in thymus weights and increase in adrenal gland weights. • Treatment-related findings at necropsy limited to male animals only; yellow discoloration of the stomach at 100 mg/kg and reddening of the duodenal mucosa, jejunum, and colon, and red foci on the urinary bladder at 300 mg/kg.	

APPT = activated partial prothrombin time; BID =twice daily; BW =body weight; Hgb = hemoglobin; HCT = hematocrit; M:E myeloid:erythroid; MTD = maximum tolerated dose; NMP = N-Methyl-2-pyrrolidone; RBC = red blood cells; SWFI = Sterile Water for Injection; WBC = while blood cells.

2.6.7.7. 反復投与毒性試験：重要な試験

2.6.7.7.1. マウス

2.6.7.7.1.1. 4 週間反復投与毒性試験

2.6.7.7A Report Title: 4-Week Oral Dose Range-Finding Toxicity and Toxicokinetic Oral Gavage Study With GS-0387-01 in RasH2 [001178-W (wild type), CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic] Mice		**Test Article:** MMB
Species/Strain: Mice / RasH2 [001178-W (wild type) CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic]	**Duration of Dosing:** 29 days	**Study No.** 8283319
Initial Age: 7-8 weeks	**Duration of Postdose:** None	
Date of First Dose: 30 July 2013	**Method of Administration:** Oral gavage	
	Vehicle/Salt Form: 0.05 M HCl in SWFI (pH 1.35 to 1.80) / dihydrochloride monohydrate	**GLP Compliance:** Yes
Special Features: An additional 6 mice/sex in the control group and 39 mice/sex treated group were used for toxicokinetic monitoring only.		
No Observed Adverse Effect Level: 100 mg/kg/day		

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**30**		**100**		**300/150**	
Number of Animals (TK)	**M:6**	**F:6**	**M:39**	**F:39**	**M:39**	**F:39**	**M:39**	**F:39**
Toxicokinetics:								
MMB C_{max} (ng/mL)								
Day 1	NA	NA	2930	3310	7630	11300	14000	16800
Day 28	NA	NA	3820	4100	8680	8260	10800	9000
MMB AUC_{0-t} (ng·h/mL)								
Day 1	NA	NA	13800	17500	45900	92200	191000	158000
Day 28	NA	NA	20500	23000	52600	62400	81800	71800
M21 C_{max} (ng/mL)								
Day 1	NA	NA	20.2	62.9	81.8	188	163	359
Day 28	NA	NA	48.6	48.2	113	147	101	111

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**30**		**100**		**300/150**	
M21 $AUC_{0\text{-}t}$ (ng·h/mL)								
Day 1	NA	NA	NC	239	344	853	1240	1980
Day 28	NA	NA	105	250	373	735	572	704
M19 C_{max} (ng/mL)								
Day 1	NA	NA	398	411	1070	1320	1900	1910
Day 28	NA	NA	601	673	1220	1060	1910	1490
M19 $AUC_{0\text{-}t}$ (ng·h/mL)								
Day 1	NA	NA	2820	2670	13400	13000	35400	23900
Day 28	NA	NA	3930	4400	11400	9910	22100	12400
M20 C_{max} (ng/mL)								
Day 1	NA	NA	12.5	29.9	41.6	110	74.3	218
Day 28	NA	NA	22.6	30.9	47.1	64.2	33.8	45.0
M20 $AUC_{0\text{-}t}$ (ng·h/mL)								
Day 1	NA	NA	NC	130	202	486	636	1050
Day 28	NA	NA	56.0	76.0	158	336	219	326
Number of Animals (Main)	**M:6**	**F:6**	**M:6**	**F:6**	**M:6**	**F:6**	**M:6**	**F:6**
Noteworthy Findings:								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	1	4
Body Weight (%)	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption (%)	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology								
Red blood cell count ($\times 10^6/\mu L$)	10.59	-	10.24	-	9.96*	-	9.45*	-
Hemoglobin (g/dL)	16.0	-	15.7	-	15.3	-	14.6*	-
Hematocrit (%)	52.5	-	51.5	-	49.6*	-	46.8*	-
White blood cell count ($\times 10^3/\mu L$)	3.13	-	2.41	-	1.02*	-	1.03*	-
Lymphocyte count ($\times 10^3/\mu L$)	2.51	-	1.72	-	0.66*	-	0.57*	-
Serum Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**30**		**100**		**300/150**	
Organ Weights (%)[a]								
Spleen	0.0716 g	0.0866 g	-13	-22*	-34*	-38*	-36*	-38*
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology								
Number Examined	6	6	5	6	6[b]	6	6[b]	6[b]
Spleen								
Lymphocytes, decreased white pulp								
Minimal	0	0	0	0	3	0	4	2
Lymph node, mandibular								
Lymphocytes, decreased								
Minimal	0	0	0	0	0	0	3	0
Lymph node, mesenteric								
Lymphocytes, decreased								
Minimal	0	0	0	0	1	0	1	0
Slight	0	0	0	0	0	0	1	0
Marrow, femur								
Cellularity, decreased								
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	0
Marrow, sternum								
Cellularity, decreased								
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	0
Thymus								
Lymphocytes, decreased								
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	0

[a] For controls group, mean absolute weights are shown. For treated groups, percent difference from controls is shown.

[b] For males administered 100 mg/kg, 5 animals were examined for the mesenteric and mandibular lymph nodes. For males administered 300/150 mg/kg, 5 animals were examined for the mesenteric lymph node. For females administered 300/150 mg/kg, 5 animals were examined for the mandibular lymph node.

-, No noteworthy findings. *, $p \leq 0.05$.

2.6.7.7.2. ラット

2.6.7.7.2.1. 4 週間反復投与毒性試験

2.6.7.7B Report Title: CYT387: A 28-Day Oral Gavage Toxicity Study Followed by a 28-Day Recovery Period in Sprague-Dawley Rats		**Test Article:** MMB
Species/Strain: Rat / Sprague-Dawley	**Duration of Dosing:** 28 Days	**Study No.** 1009-0461
Initial Age: 6-7 weeks	**Duration of Postdose:** 28 Days	
Date of First Dose: 10 March 2009	**Administration:** Oral gavage	
	Vehicle/Salt Form: 0.05 M HCl in SWFI (pH 1.4-1.6) /dihydrochloride salt	**GLP Compliance:** Yes
Special Features: An additional 3 rats/sex in the control group and 6 rats/sex treated group were used for toxicokinetic monitoring only. Toxicokinetic control animals were also used for plasma thiocyanate analysis. Ten rats/sex/group were euthanized at the end of the dosing period with 5/sex in the control and 100 mg/kg groups retained for a 28-day postdose recovery period.		
No Observed Adverse Effect Level: Not determined		

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**	
Number of Animals (TK)	**M:3**	**F:3**	**M:6**	**F:6**	**M:6**	**F:6**	**M:6**	**F:6**
Toxicokinetics:								
MMB C_{max} (ng/mL)								
Day 1	NA	NA	6950	8190	14700	15400	21900	21400
Day 28	NA	NA	10400	8180	17300	15700	30600	25600
MMB $AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)								
Day 1	NA	NA	51100	62900	207000	221000	365000	371000
Day 28	NA	NA	82900	62700	209000	173000	479000	386000
Number of Animals (Main)	**M:15**[a]	**F:15**[a]	**M:10**	**F:10**	**M:10**	**F:10**	**M:15**[a]	**F:15**[a]
Noteworthy Findings:								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	1	0
Body Weight (%)[b]	423 g	261 g	-1%	-2%	-5%	-3%	-22%**	-21%**
Food Consumption (g/animal/day) (%)[b]	41.8 g	37.2 g	-0.5%	-13%	-14%	-29%	-26%*	-43%
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**	
Hematology								
Red blood cell count ($\times 10^6/\mu L$)								
Day 15	7.87	7.80	7.68	7.72	7.63	7.81	7.29**	6.86**
Day 29	7.79	7.63	7.80	7.67	7.67	7.83	6.88**	6.45**
Hemoglobin (g/dL)								
Day 15	15.9	15.9	15.8	15.9	15.9	15.8	14.8**	14.1**
Day 29	15.2	15.4	15.5	15.5	15.4	15.4	13.7**	13.1**
Hematocrit (%)								
Day 15	0.46	0.45	0.45	0.45	0.46	0.44	0.43*	0.40**
Day 29	0.43	0.42	0.44	0.43	0.43	0.42	0.38**	0.35**
Red cell distribution width (%)								
Day 15	12.1	11.4	12.2	11.4	12.5	11.7	13.8**	12.7**
Day 29	12.3	11.1	12.3	11.1	12.9	11.5	15.0****	14.2**
Hemoglobin distribution width (g/dL)								
Day 29	3.02	2.72	3.01	2.77	3.18	2.91*	3.53**	3.41**
Mean corpuscular Hgb concentration (g/dL)								
Day 29	35.3	36.5	35.6	36.5	35.7	36.4	36.1**	37.1*
Reticulocyte count ($\times 10^3/\mu L$)								
Day 15	335.1	188.9	299.5	196.6	301.5	172.3	245.9**	131.8***
Day 29	257.6	174.3	241.8	168.4	250.4	180.1	235.3	165.4
White blood cell count ($\times 10^3/\mu L$)								
Day 15	11.99	9.76	8.99**	9.25	9.00**	9.29	5.66**	4.09**
Day 29	11.07	7.38	8.89*	5.89	6.78**	4.73**	3.13**	2.45**
Lymphocyte count ($\times 10^3/\mu L$)								
Day 15	9.54	7.92	6.90**	7.61	7.57*	7.93	4.35**	3.17**
Day 29	9.07	6.22	7.29*	4.99	5.60**	3.85*	1.88**	1.89**
Monocyte count ($\times 10^3/\mu L$)								
Day 15	0.31	0.18	0.26	0.22	0.25	0.18	0.17**	0.13
Day 29	0.27	0.14	0.22	0.16	0.18	0.18	0.13**	0.09

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**	
Eosinophil count ($\times 10^3/\mu L$)								
Day 15	0.09	0.10	0.07	0.06*	0.05	0.05**	0.03**	0.01**
Day 29	0.10	0.08	0.07*	0.05**	0.05**	0.03**	0.01**	0.01**
Basophil count ($\times 10^3/\mu L$)								
Day 15	0.25	0.24	0.12	0.13	0.10	0.13	0.07***	0.04****
Day 29	0.24	0.17	0.19	0.12*	0.12***	0.09**	0.03****	0.02**
Neutrophil count ($\times 10^3/\mu L$)								
Day 15	1.66	1.22	1.54	1.14	1.17	0.91	0.98*	0.70**
Day 29	1.30	0.71	1.05	0.54	0.79	0.54	1.08	0.43
Serum Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Total bilirubin (μmol/L)								
Day 29	1.9	2.0	2.3	2.0	2.4	2.2	4.7****	3.5**
Coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-
APTT (sec)								
Day 29	19.1	19.5	18.9	19.0	18.4	18.7	17.6**	17.0**
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights (%)[c]								
Spleen	0.8377 g	0.5633 g	-21**	-19**	-31**	-25**	-52**	-48**
Thymus	0.5816 g	0.4803 g	-16	-12	-34**	-19*	-76**	-82**
Gross Pathology								
Number Examined	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:9[d]	F:10
Kidneys: dark discoloration	0	0	0	0	0	0	0	4
Thymus: small	0	0	0	0	0	0	3	6
Lymph nodes: dark discoloration	0	0	0	0	4	0	7	8
Rectum: dark areas	0	0	0	0	3	0	5	6
Ovaries: dark or raised areas	NA	0	NA	0	NA	0	NA	6

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**	
Histopathology								
Number Examined	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10[d]	F:10
Kidney: vacuolation, tubular epithelium								
Minimal	0	0	6	7	3	9	2	5
Mild	0	0	3	3	7	1	7	4
Heart								
Fibrosis								
Minimal	0	1	0	0	0	0	2	0
Hemorrhage								
Minimal	0	0	0	0	0	0	3	0
Pigment, hemosiderin								
Minimal	0	1	0	0	0	0	2	0
Liver: infiltration, mononuclear								
Minimal	10	10	10	10	10	10	2	0
Bone Marrow, Sternum								
Adipose tissue, increased								
Minimal	0	0	0	0	8	6	2	2
Mild	0	0	0	0	0	0	8	8
Depletion								
Minimal	0	0	0	0	0	0	10	9
Bone Marrow, Femur								
Adipose tissue, increased								
Minimal	0	0	0	0	8	6	2	2
Mild	0	0	0	0	0	0	8	8
Depletion								
Minimal	0	0	0	0	0	0	10	9

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**	
Thymus: Lymphoid depletion								
Minimal	0	0	0	0	0	0	4	4
Mild	0	0	0	0	0	0	5	4
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	2
Spleen: Lymphoid depletion								
Minimal	0	0	0	0	0	0	7	8
Mild	0	0	0	0	0	0	3	2
Lymph Node, Mandibular								
Lymphoid depletion								
Minimal	0	0	0	0	0	0	6	3
Mild	0	0	0	0	0	0	4	7
Hemorrhage								
Minimal	1	0	0	0	0	0	3	2
Mild	0	0	0	0	0	0	1	1
Lymph Node, Mesenteric								
Lymphoid depletion								
Minimal	0	0	0	0	0	0	3	5
Mild	0	0	0	0	0	0	0	1
Hemorrhage								
Minimal	0	0	0	0	4	1	1	5
Mild	0	0	0	0	4	0	9	5
Gastrointestinal Tract: Hemorrhage								
Stomach	0	0	0	0	0	0	1	2
Duodenum	0	0	0	0	0	0	2	2
Ileum	0	0	0	0	0	0	1	1
Colon	0	0	0	0	1	0	5	4
Rectum	0	0	0	0	6	2	7	8

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**	
Testes: Degeneration								
Minimal	0	NA	1	NA	3	NA	10	NA
Epididymides: Luminal debris								
Minimal	0	NA	1	NA	4	NA	1	NA
Mild	0	NA	0	NA	1	NA	9	NA
Ovaries								
Corpus hemorrhagicum	NA	0	NA	0	NA	1	NA	9
Cyst, luteal	NA	1	NA	0	NA	0	NA	5
Cyst, follicular	NA	0	NA	0	NA	2	NA	7
Cervix: Degeneration, epithelial								
Minimal	NA	0	NA	1	NA	3	NA	1
Mild	NA	1	NA	1	NA	2	NA	4
Moderate	NA	0	NA	0	NA	0	NA	3
Additional Examinations								
Thiocyanate Analysis								
Number Examined	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3
Plasma Thiocyanate (mg/L)								
Day 1 (3 h postdose)	2.9	2.8	2.2	2.5	1.9	2.3	2.3	2.4
Day 28 (3 h postdose)	3.3	3.2	3.7	3.6	5.5	5.2	7.1	8.2
Day 28 (24h postdose)	3.4	3.3	4.0	3.4	6.1	6.0	8.3	10.0
Bone Marrow Evaluation								
Number Examined	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10
Total Myeloid Cell Count	214	211	210	207	196	191	178	182
Total Erythroid Cell Count	192	177	205	196	222	224	261	257
M:E Ratio	1.16	1.28	1.04	1.12	0.91	0.88	0.72	0.79
Lymphocyte Count	84	100	71	79	69	72	49	48

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**	
Postdose Evaluation								
Number Examined	**M:5**	**F:5**	**NA**	**NA**	**NA**	**NA**	**M:5**	**F:4**
Body Weight[e]	550 g	304 g	NA	NA	NA	NA	-10%	-8%
Hematology								
White blood cell count ($\times 10^3/\mu L$)	11.86	6.11	NA	NA	NA	NA	8.54*	5.33
Lymphocyte count ($\times 10^3/\mu L$)	9.32	4.97	NA	NA	NA	NA	6.99	4.46
Monocyte count ($\times 10^3/\mu L$)	0.33	0.19	NA	NA	NA	NA	0.30	0.15
Eosinophil count ($\times 10^3/\mu L$)	0.15	0.07	NA	NA	NA	NA	0.07**	0.05
Basophil count ($\times 10^3/\mu L$)	0.24	0.12	NA	NA	NA	NA	0.16	0.11
Organ Weights (%)[c]								
Spleen	0.1945 g	0.2123 g	NA	NA	NA	NA	-8	-10
Histopathology								
Bone Marrow, Femur								
Adipose tissue, increased								
Minimal	0	0	NA	NA	NA	NA	5	4
Gastrointestinal Tract								
Hemorrhage, duodenum	0	0	NA	NA	NA	NA	1	0
Testes: Degeneration								
Minimal	0	NA	NA	NA	NA	NA	1	NA
Mild	0	NA	NA	NA	NA	NA	2	NA
Moderate	0	NA	NA	NA	NA	NA	1	NA
Severe	0	NA	NA	NA	NA	NA	1	NA
Epididymides: Luminal debris								
Minimal	0	NA	NA	NA	NA	NA	1	NA
Mild	0	NA	NA	NA	NA	NA	3	NA
Moderate	0	NA	NA	NA	NA	NA	1	NA

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**	
Bone Marrow Evaluation								
Number Examined	**M:5**	**F:5**	**NA**	**NA**	**NA**	**NA**	**M:5**	**F:5**
Total Myeloid Cell Count	211	212	NA	NA	NA	NA	196	189
Total Erythroid Cell Count	198	176	NA	NA	NA	NA	215	211
M:E Ratio	1.00	1.25	NA	NA	NA	NA	0.94	0.92
Lymphocyte Count	77	95	NA	NA	NA	NA	75	86

[a] Hematology (Day 29), coagulation, serum chemistry, urinalysis, and organ weights were evaluated in 10 animals/sex in the control group and in 9 males and 10 females in the 100 mg/kg group.

[b] At end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, the percent difference from controls is shown. Statistical significance is based on actual data (not percent difference).

[c] Both absolute and relative weights differed from controls in the direction indicated. Number indicates percent difference for the absolute organ.

[d] One male animal (4001) was found dead on Day 25 and was excluded from gross pathology counts for main study animals; this animal was included in histopathology counts for main study animals.

[e] At end of the recovery period. For controls, group means are shown. For treated groups, the percent difference from controls is shown. Statistical significance is based on actual data (not percent difference).

-, No noteworthy findings. Dunnett's Test: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$; Dunn's Test: *** $p \leq 0.05$, **** $p \leq 0.01$.

2.6.7.7.2.2. 13 週間反復投与毒性試験

2.6.7.7C Report Title: CYT387: A 13-Week Oral Gavage Toxicity Study in Rats With a 10-Week Recovery Period		**Test Article:** MMB
Species/Strain: Rat / Sprague-Dawley	**Duration of Dosing:** 13 Weeks	**Study No.** 1668-009
Initial Age: 6-7 weeks	**Duration of Postdose:** 10 Weeks	
Date of First Dose: 10 May 2011	**Administration:** Oral gavage	
	Vehicle/Salt Form: 0.05 M HCl in SWFI (pH 1.35-1.80) / dihydrochloride salt	**GLP Compliance:** Yes
Special Features: An additional 3 rats/sex in the control group and 9 rats/sex treated group were used for toxicokinetic monitoring only.		
No Observed Adverse Effect Level: 17 mg/kg/day		

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**4.3**		**17**		**68**	
Number of Animals (TK)	**M:3**	**F:3**	**M:9**	**F:9**	**M:9**	**F:9**	**M:9**	**F:9**
Toxicokinetics:								
MMB C_{max} (ng/mL)								
Day 1	NA	NA	1670	2440	8680	8880	16600	19300
Day 91	NA	NA	2410	3210	6720	7290	18600	19500
MMB $AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)								
Day 1	NA	NA	7440	12900	64700	90900	235000	215000
Day 91	NA	NA	13700	18400	94200	102000	258000	311000
Number of Animals (Main)	**M:15**	**F:15**	**M:15**	**F:15**	**M:15**	**F:15**	**M:15**	**F:15**
Noteworthy Findings:								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	1	0	0	0	1	0
Body Weight (%)[a]	581 g	322 g	-2	-4	-7*	-9**	-22**	-16**
Food Consumption (g/animal/day) (%)[a]	29.3 g	21.2 g	+5	0	-1	-7	-9*	-7
Clinical Observations[b]								
Salivation	0/0	0/0	0/0	0/0	3/3	0/0	49/10	8/4
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology								
Lymphocyte count ($\times 10^3/\mu L$)	12.002	9.143	9.547*	8.281	6.617**	5.900**	3.303**	2.986**

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**4.3**		**17**		**68**	
Eosinophil count ($\times 10^3/\mu L$)	0.162	0.120	0.159	0.135	0.095**	0.087	0.039**	0.023**
Basophil count ($\times 10^3/\mu L$)	0.077	0.047	0.055**	0.043	0.024**	0.016**	0.008**	0.010**
Coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights (%)[c]								
Epididymides	1.505 g	NA	-4	NA	-3	NA	-20**	NA
Spleen	0.841 g	0.535 g	-13*	-4	-34**	-26**	-49**	-38**
Testes	3.986 g	NA	-4	NA	-8	NA	-27**	NA
Thymus	0.414 g	0.368 g	0	-8	-15	-23*	-40**	-55**
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology								
Number Examined	M:10	F:10	M:11	F:10	M:10	F:10	M:11	F:10
Epididymides								
Oligospermia/germ cell debris, bilateral								
Minimal	0	NA	0	NA	0	NA	3	NA
Severe	0	NA	0	NA	0	NA	3	NA
Lymph Node, Mesenteric								
Erythrocytosis/erythrophagocytosis, sinus								
Minimal	0	0	1	0	1	0	5	4
Mild	0	0	0	0	0	0	3	4
Spleen								
Depletion, lymphoid, generalized								
Mild	0	0	1	0	0	0	0	0
Depletion, lymphoid, periarteriolar lymphoid sheaths								
Minimal	0	0	0	0	0	0	2	3
Mild	0	0	0	0	0	0	7	7

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**4.3**		**17**		**68**	
Testes								
Degeneration/atrophy, seminiferous tubules, bilateral								
Minimal	0	NA	0	NA	0	NA	3	NA
Moderate	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Severe	0	NA	0	NA	0	NA	2	NA
Thymus								
Depletion, lymphoid, generalized								
Minimal	0	0	0	0	0	0	2	4
Mild	0	0	0	0	0	0	5	4
Moderate	0	0	0	0	0	0	3	1
Severe	0	0	0	0	0	0	1	0
Postdose Evaluation								
Number Examined	**M:5**	**F:5**	**M:4**	**F:5**	**M:5**	**F:5**	**M:4**	**F:5**
Body Weight[d]	617 g	346 g	+3	-5	-4	-2	-3	-15

[a] At end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, the percent difference from controls is shown. Statistical significance is based on actual data (not percent difference).

[b] Incidence of observation / number of animals exhibiting sign.

[c] Both absolute and relative weights differed in the direction indicated. For controls, group mean absolute weights are shown. For treated groups, percent difference from controls is shown. Statistical significance is based on actual data (not percent difference).

[d] At end of recovery period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent difference from controls is shown. Statistical significance is based on actual data (not percent difference).

-, No noteworthy findings.

Dunnett's Test: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

2.6.7.7.2.3. 26 週間反復投与毒性試験

2.6.7.7D Report Title: GS-0387: A 26-Week Oral Toxicity Study in Rats With a 10-Week Recovery Period		**Test Article:** MMB
Species/Strain: Rat / Sprague-Dawley	**Duration of Dosing:** 26 Weeks	**Study No.** 1668-023
Initial Age: 6-7 weeks	**Duration of Postdose:** 10 Weeks	
Date of First Dose: 19 December 2012	**Administration:** Oral gavage	
	Vehicle/Salt Form: 0.04 M HCl in SWFI (pH 1.35-1.80) dihydrochloride salt	**GLP Compliance:** Yes
Special Features: An additional 10 rats/sex/group were used for toxicokinetic monitoring only and specialized pathology procedures on peripheral nerves. Neuroelectrophysiological and functional observation battery evaluations were also performed on main study and recovery animals.		
No Observed Adverse Effect Level: 5 mg/kg/day		

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**5**		**15**		**50**	
Number of Animals (TK)	**M:10**	**F:10**	**M:10**	**F:10**	**M:10**	**F:10**	**M:10**	**F:10**
Toxicokinetics:								
MMB C_{max} (ng/mL)								
Day 1	NA	NA	2220	2810	7170	10800	12800	14100
Week 13	NA	NA	2970	2760	7580	10700	21900	19400
Week 26	NA	NA	4020	7590	10100	12500	24100	16400
MMB AUC_{0-24h} (ng·h/mL)								
Day 1	NA	NA	14400	22400	92000	104000	191000	159000
Week 13	NA	NA	24700	25000	93500	118000	298000	251000
Week 26	NA	NA	33800	73100	105000	131000	306000	265000
M17 C_{max} (ng/mL)								
Day 1	NA	NA	0	12.4	5.63	4	0	3.43
Week 13	NA	NA	0	5.33	3.67	20.9	35.5	142
Week 26	NA	NA	0	8.6	9.4	29.3	40.5	32.4
M17 AUC_{0-24h} (ng·h/mL)								
Day 1	NA	NA	NA[a]	NA[a]	NA[a]	NA[a]	NA[a]	NA[a]
Week 13	NA	NA	NA[a]	NA[a]	NA[a]	200	584	793
Week 26	NA	NA	NA[a]	NA[a]	NA[a]	200	NA[b]	394

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**5**		**15**		**50**	
M19 C_{max} (ng/mL)								
Day 1	NA	NA	356	507	1150	2240	2160	3570
Week 13	NA	NA	407	710	1060	2420	2920	5920
Week 26	NA	NA	456	596	1230	1990	2990	5110
M19 $AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)								
Day 1	NA	NA	NA[b]	2990	NA[b]	13500	12400	51000
Week 13	NA	NA	2430	6150	14200	22600	49700	103000
Week 26	NA	NA	4030	7850	14100	20600	50800	87000
M20 C_{max} (ng/mL)								
Day 1	NA	NA	13.2	16.6	18.8	36	26.6	32.3
Week 13	NA	NA	13.4	26.7	26.4	52.8	64.7	57.7
Week 26	NA	NA	21.5	36.4	33.1	67.1	78.1	72.7
M20 $AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)								
Day 1	NA	NA	35.4	51.1	NA[b]	NA[b]	NA[b]	335
Week 13	NA	NA	76.4	170	NA[b]	NA[b]	1140	1020
Week 26	NA	NA	155	274	NA[b]	NA[b]	1440	1180
M21 C_{max} (ng/mL)								
Day 1	NA	NA	24.4	28.7	41.2	50.5	75.2	72.2
Week 13	NA	NA	48.2	52.4	89.5	110	161	112
Week 26	NA	NA	83.2	70.7	132	118	195	196
M21 $AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)								
Day 1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Week 13	NA	NA	NA	495	NA	NA	2700	1840
Week 26	NA	NA	777	669	NA	NA	3210	2370
Number of Animals (Main)	**M:20**	**F:20**	**M:20**	**F:20**	**M:20**	**F:20**	**M:20**	**F:20**
Noteworthy Findings:								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	2
Body Weight (%)[c]	763 g	421 g	-5	-4	-7	-5	-24**	-13**
Food Consumption (g/animal/day) (%)[c]	29.9 g	20.7 g	-3	-4	-4	-3	-14**	-1

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**5**		**15**		**50**	
Clinical Observations[d]								
Salivation	1/1	0/0	0/0	7/1	1/1	5/1	44/7	93/9
Material around mouth, red	0/0	0/0	0/0	0/0	5/1	0/0	14/3	3/1
Palpable Masses	-	-	-	-	-	-	-	-
Functional Observation Battery	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-
Neuroelectrophysiological Evaluation	A mild slowing of caudal and digital nerve conduction velocity, consistent with a mild, minimally progressive, and reversible deficit in distal sensory velocities, was observed at 50 mg/kg/day.							
Hematology								
Red blood cell count ($\times 10^6/\mu L$)								
Week 4	8.152	7.99	8.227	8.127	8.126	7.777	8.208	7.703**
Week 13	9.048	8.472	8.952	8.48	8.812	8.264	8.256**	7.489**
Terminal	8.534	7.919	8.597	7.983	8.382	7.887	7.571**	6.873**
Hemoglobin concentration (g/dL)								
Week 4	16.09	15.79	16.28	16.01	16.21	15.36	16.23	15.51
Week 13	16.16	15.75	16	15.83	16.07	15.41	15.13**	14.32**
Terminal	15.07	14.81	15.27	15.15	15.37	15.05	14.09**	13.58**
Hematocrit (%)								
Week 4	47.58	45.73	48.01	46.21	47.83	44.06*	47.85	44.68
Week 13	46.9	45.39	46.73	45.31	46.96	44.06	44.30**	41.52**
Terminal	47.73	46.32	48.32	46.97	48.13	46.59	44.35**	42.15**
Mean cell volume (fL)								
Week 4	58.36	57.28	58.39	56.88	58.89	56.64	58.35	58.03
Week 13	51.84	53.63	52.24	53.44	53.33*	53.32	53.72**	55.52**
Terminal	55.96	58.58	56.27	58.87	57.44	59.09	58.63**	62.02**
Reticulocyte count ($\times 10^3/\mu L$)								
Week 4	214.68	156.6	195.88	151.88	178.01**	150.37	171.63**	162.84
Week 13	210.1	156.34	186.52	163.2	165.78**	158.65	213.23	212.25*
Terminal	152.84	123.07	149.39	123.95	165.16	148.33	226.85**	165.35**

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**5**		**15**		**50**	
White blood cell count ($\times 10^3/\mu L$)								
Week 4	11.06	9.15	9.8	8.02	9.59*	7.53	7.60**	6.98*
Week 13	11.36	8.86	8.84**	7.19*	7.68**	6.31**	5.79**	5.20**
Terminal	11.22	7.93	9.21**	7.03	8.14**	5.82**	5.62**	4.75**
Lymphocyte count ($\times 10^3/\mu L$)								
Week 4	8.905	7.405	7.445*	6.326	7.065**	5.759	5.789**	5.615
Week 13	9.274	7.289	6.755**	5.580*	5.718**	4.369**	3.936**	3.661**
Terminal	8.767	6.425	6.583**	5.493	5.313**	3.956**	2.947**	2.805**
Eosinophil count ($\times 10^3/\mu L$)								
Week 4	0.112	0.119	0.112	0.122	0.103	0.105	0.070*	0.074**
Week 13	0.135	0.121	0.154	0.126	0.142	0.115	0.057**	0.048**
Terminal	0.149	0.112	0.156	0.107	0.123	0.096	0.062**	0.048**
Basophil count ($\times 10^3/\mu L$)								
Week 4	0.119	0.091	0.13	0.059	0.067*	0.046	0.039**	0.036*
Week 13	0.061	0.041	0.032*	0.033	0.031*	0.018**	0.011**	0.014**
Terminal	0.066	0.053	0.048*	0.043	0.031**	0.032**	0.019**	0.014**
Coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Chemistry								
Phosphorus (mg/dL)								
Week 4	8.94	7.79	8.97	7.67	9.07	7.82	8.68	8.04
Week 13	6.94	5.5	6.94	5.33	7.01	5.8	6.75	5.92
Terminal	7.56	6.62	7.83	7.1	8.47*	7.65**	8.45*	7.51**
Total bilirubin (mg/dL)								
Week 4	0.12	0.12	0.12	0.11	0.13	0.11	0.19**	0.20**
Week 13	0.2	0.19	0.17	0.21	0.21	0.2	0.27**	0.26**
Terminal	0.11	0.15	0.11	0.13	0.13	0.13	0.19**	0.16

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**5**		**15**		**50**	
Urea nitrogen (mg/dL)								
Week 4	15.2	16.2	17.5*	16.2	18.8**	17.3	24.0**	21.3**
Week 13	15.4	13.1	16.9	14.2	18.7**	16.2*	17.9*	19.5**
Terminal	12.8	12.7	13.8	12.9	14.1	13.2	14.9**	15.6**
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights (%)[e]								
Epididymides	1.513 g	NA	+3	NA	+8	NA	-20	NA
Spleen	0.978 g	0.598 g	-23**	-8	-31**	-22**	-51**	-36**
Testes	3.979 g	NA	-4	NA	0	NA	-15**	NA
Gross Pathology								
Number Examined	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15
Epididymides								
Small								
Mild	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Stomach, Nonglandular								
Focus/foci, tan								
Mild	0	0	0	0	0	0	1	0
Testes								
Small								
Mild	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Histopathology								
Number Examined	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15
Bone Marrow, Femur								
Cellularity, decreased								
Minimal	0	0	1	2	5	3	7	4
Mild	0	0	0	0	0	0	5	1

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**5**		**15**		**50**	
Bone Marrow, Sternum								
Cellularity, decreased								
Minimal	0	0	2	2	6	3	11	4
Mild	0	0	0	0	0	0	2	1
Epididymides								
Oligospermia/germ cell debris, bilateral								
Minimal	0	NA	0	NA	0	NA	2	NA
Moderate	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Gut-Associated Lymphoid Tissue								
Depletion, lymphoid, generalized								
Minimal	0	0	0	0	0	0	2	1
Mild	0	0	0	0	0	0	2	4
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Kidneys								
Degeneration/regeneration, tubular								
Minimal	0	0	0	0	3	1	8	3
Pigment, tubular								
Minimal	0	0	6	4	6	5	1	4
Mild	0	0	0	0	1	1	12	8
Moderate	0	0	0	0	0	0	2	3
Liver								
Pigment, increased, Kupffer cell								
Minimal	0	0	3	1	7	2	12	12
Mild	0	0	0	0	0	0	2	2
Lymph Node, Mandibular								
Depletion, lymphoid, generalized								
Minimal	0	1	0	0	2	0	2	2
Mild	0	0	0	0	0	0	1	6

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**5**		**15**		**50**	
Erythrocytosis/erythrophagocytosis, sinus								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	0
Mild	0	0	0	1	1	0	0	0
Lymph Node, Mesenteric								
Depletion, lymphoid, generalized								
Mild	0	0	0	0	0	0	0	1
Erythrocytosis/erythrophagocytosis, sinus								
Minimal	0	0	0	0	0	2	10	9
Mild	0	0	0	0	1	0	2	2
Spleen								
Depletion, lymphoid, generalized								
Minimal	1	0	0	1	0	0	0	1
Mild	0	0	0	0	0	0	11	10
Moderate	0	0	0	0	0	0	2	2
Depletion, lymphoid, marginal zone								
Minimal	0	0	9	7	12	15	0	0
Mild	0	0	0	0	0	0	1	2
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	0
Pigment, increased macrophage								
Minimal	0	0	0	5	0	5	0	2
Mild	0	3	0	0	0	0	5	4
Stomach, Nonglandular								
Hyperplasia, epithelial, limiting ridge								
Minimal	1	0	0	0	0	1	3	1
Mild	0	0	0	0	0	0	2	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	1

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**5**		**15**		**50**	
Testes								
Degeneration/atrophy, seminiferous tubules, bilateral								
Minimal	1	NA	0	NA	0	NA	7	NA
Moderate	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Thymus								
Depletion, lymphoid, generalized								
Minimal	12	14	14	15	11	14	2	5
Mild	3	1	0	0	2	1	13	10
Additional Examinations								
Number Examined	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5
Peripheral Neuropathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Postdose Evaluations								
Number Examined	**M:5**	**F:5**	**M:5**	**F:5**	**M:5**	**F:5**	**M:5**	**F:5**
Organ Weights (%)[e]								
Epididymides	1.603 g	NA	-5	NA	0	NA	-9	NA
Spleen	1.137 g	0.672 g	+4	-13	-15	-11	-27*	-10
Testes	4.205 g	NA	-6	NA	+4	NA	-18*	NA
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology								
Epididymides								
Oligospermia/germ cell debris, bilateral								
Minimal	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Severe	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Kidneys								
Pigment, tubular								
Minimal	2	1	2	4	3	4	2	2
Mild	0	0	0	0	0	1	2	3

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		5		15		50	
Lymph Node, Mesenteric								
Erythrocytosis/erythrophagocytosis, sinus								
Minimal	0	0	1	0	0	0	1	3
Spleen								
Depletion, lymphoid, generalized								
Minimal	0	0	0	0	0	1	0	0
Depletion, lymphoid, marginal zone								
Minimal	0	0	0	0	0	0	2	0
Pigment, increased, macrophage								
Minimal	0	2	1	0	2	0	3	2
Mild	0	0	0	1	0	0	0	2
Testes								
Degeneration/regeneration, seminiferous tubules, bilateral								
Minimal	0	NA	0	NA	0	NA	2	NA
Mild	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Severe	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA

[a] AUC not reported due to less than 3 consecutive quantifiable concentrations.

[b] $AUC_{0\text{-}24h}$ not reported due to $\%AUC_{Extrap} > 25\%$.

[c] At end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent difference from controls is shown. Statistical significance is based on actual data (not percent difference).

[d] Incidence of observation / number of animals exhibiting sign.

[e] Both absolute and relative weights differed from controls in the direction indicated. For controls group, mean absolute weights are shown. For treated groups, percent difference from controls is shown. Statistical significance is based on actual data (not percent difference).

-, No noteworthy findings. Dunnett's Test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

2.6.7.7.3. イヌ

2.6.7.7.3.1. 4 週間反復投与毒性試験

2.6.7.7E Report Title: Oral 28-Day Repeat Dose Toxicity Study With CYT387 in Beagle Dogs		**Test Article:** MMB
Species/Strain: Dog / Beagle	**Duration of Dosing:** 28 Days	**Study No.** GWR1005
Initial Age: 11 months	**Duration of Postdose:** 28 Days	
Date of First Dose: 19 March 2009	**Administration:** Oral gavage	
	Vehicle/Salt Form: 0.05 M HCl in SWFI (pH 1.4 to 1.6) /dihydrochloride salt	**GLP Compliance:** Yes
Special Features: Thiocyanate analysis		
No Observed Adverse Effect Level: 30 mg/kg/day		

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**5**		**30**		**100**	
Number of Animals (TK)	**M:5**	**F:5**	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**	**M:5**	**F:5**
Toxicokinetics:								
MMB C_{max} (ng/mL)								
Day 1	NA	NA	292	315	1470	1360	1810	2470
Day 28	NA	NA	197	205	2060	1000	1530	1800
MMB AUC_{0-24} (ng·h/mL)								
Day 1	NA	NA	835	1090	8930	5410	11400	19700
Day 28	NA	NA	459	556	11000	4400	9720	7810
Number of Animals (Main)	**M:5**	**F:5**	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**	**M:5**	**F:5**
Noteworthy Findings:								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	1
Body Weight (%)[a]	8.938 kg	6.700 kg	-3	+4	-7	0	-7	-6
Food Consumption (g/animal/day) (%)[a]	267 g	171 g	-11	+9	-6	+37	FS	FS
Clinical Observations[b]								
Lip licking and salivation	18/5	31/5	45/3	13/3	102/3	79/3	215/5	231/5
Emesis	0/0	1/1	0/0	0/0	6/3	1/1	28/5	25/5
Liquid/loose feces	0/0	5/5	3/3	0/0	0/0	0/0	104/5	6/5

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**5**		**30**		**100**	
More palpable heartbeat	0/0	0/0	2/1	0/0	128/3	76/3	139/5	206/5
Abnormal gait (gastrointestinal-related)	0/0	0/0	0/0	0/0	63/2	9/2	82/5	24/5
Lethargy	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	6/2	9/2	4/1
Tremors	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	2/1	5/1
Subdued	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0	8/2	22/1
Inappetence	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	5/1	0/0
Thin appearance	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	60/2	10/1
Partially closed eyelids	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0
Abnormal color, pinnae / mouth	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	17/1
Bleeding from peribuccal area	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	14/1
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Chemistry								
Triglycerides (mmol/L)	0.7	0.7	0.6	0.7	1.3	1.2	2.7**	2.4
Urinalysis								
Color	straw	straw	straw	straw	straw	straw	yellow	straw
Organ Weights	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology								
Number Examined	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3
Epididymides: Increased cellular debris	0	NA	1	NA	2	NA	2	NA
Gall bladder: Epithelial hypertrophy								
Minimal	0	0	0	0	0	1	0	0
Slight	0	0	0	0	1	0	2	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Liver: Increased cytoplasmic rarefaction								
Slight	0	0	0	0	1	0	2	1

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**5**		**30**		**100**	
Lymph Nodes: Germinal center/lymphoid depletion								
Slight	0	0	0	0	0	0	1	1
Spleen: Increased hemosiderin	0	0	0	0	0	0	0	2
Bone Marrow, Sternum: Decreased cellularity								
Minimal	0	0	0	0	2	0	2	1
Slight	0	0	0	0	0	0	1	1
Testes: Degenerate cells								
Minimal	3	NA	2	NA	0	NA	1	NA
Slight	0	NA	1	NA	3	NA	2	NA
Thymus: Atrophy								
Slight	0	0	1	0	1	0	1	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	1
Additional Examinations								
Plasma Thiocyanate (mg/L)								
Day 1 (3 h postdose)	3.0	2.9	2.9	3.2	3.1	3.1	3.1	3.4
Day 28 (3 h postdose)	2.5	2.5	4.0	3.6	5.4	5.7	5.4	7.0
Day 28 (24 h postdose)	3.0	2.7	4.3	3.5	5.1	5.8	5.7	8.4

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**5**		**30**		**100**	
Postdose Evaluation								
Number Examined	**M:2**	**F:2**	**NA**	**NA**	**NA**	**NA**	**M:2**	**F:2**
Histopathology								
Epididymides: Increased cellular debris	0	NA	NA	NA	NA	NA	1	NA
Testes: Degenerate/multinucleate cells								
Minimal	1	NA	NA	NA	NA	NA	2	NA
Slight	1	NA	NA	NA	NA	NA	0	NA

[a] At end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, the percent difference from controls is shown. Statistical significance is based on actual data (not percent difference).

[b] Incidence of observation / number of animals exhibiting sign.

FS is supplemented diet fed ad libitum from Day 7 for precautionary welfare considerations.

-, No noteworthy findings.

Dunnett's test: ** $p \leq 0.01$.

2.6.7.7.3.2. 13 週間反復投与毒性試験

2.6.7.7F Report Title: CYT387: A 13-Week Oral Toxicity Study in Dogs With a 6-Week Recovery Period		**Test Article:** MMB
Species/Strain: Dog / Beagle	**Duration of Dosing:** 13 Weeks	**Study No.** 1668-011
Initial Age: 8-9 months	**Duration of Postdose:** 6 Weeks	
Date of First Dose: 12 July 2011	**Administration:** Oral gavage	
	Vehicle/Salt Form: 0.05 M HCl in SWFI (pH 1.35 to 1.80) dihydrochloride salt	**GLP Compliance:** Yes
Special Features: None		
No Observed Adverse Effect Level: 51.2 mg/kg/day QD and 8.5 mg/kg/day BID		

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**8.5**		**17**		**51.2**		**8.5 BID**	
Number of Animals (TK)	**M:6**	**F:6**	**M:6**	**F:6**	**M:6**	**F:6**	**M:6**	**F:6**	**M:6**	**F:6**
Toxicokinetics:										
MMB C_{max} (ng/mL)										
Day 1	NA	NA	1030	833	1510	1110	2120	1720	1040	995
Day 28	NA	NA	341	481	583	686	1700	1980	521	565
Day 91	NA	NA	379	370	605	818	1250	1150	539	596
MMB AUC_{0-12} (ng·h/mL)										
Day 1	NA	NA	3480	2620	4820	3810	12000	7860	4860	4200
Day 28	NA	NA	812	1270	1610	1870	7850	6860	2100	1610
Day 91	NA	NA	891	1080	1610	1950	4160	3220	2310	1930
Number of Animals (Main)	**M:6**	**F:6**	**M:6**	**F:6**	**M:6**	**F:6**	**M:6**	**F:6**	**M:6**	**F:6**
Noteworthy Findings:										
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (%)[a]	9.37 kg	7.26 kg	-3	-5	-9	-7	-15*	-6	-12	-9
Food Consumption (g/animal/day) (%)[a]	298.5 g	215.5 g	-4	-3	-20	-3	-19	-15	-19	+3
Clinical Observations[b]										
Vomitus/Emesis	0/0	1/1	2/1	5/4	2/2	17/5	16/3	25/6	2/2	10/4
Thin	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	10/1

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**8.5**		**17**		**51.2**		**8.5 BID**	
Skin cold to touch	0/0	2/1	0/0	2/1	3/2	4/2	12/2	40/3	11/3	22/5
Skin warm to touch	2/1	0/0	10/3	0/0	0/0	38/4	2/1	0/0	19/3	7/2
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography										
Heart Rate (bpm)										
Day 1 postdose	97.0	96.0	132.0	114.0	133.0	129.0*	149.0**	117.0	122.0	131.0*
PR Interval (msec)										
Day 1 postdose	91.63	88.77	86.80	88.23	90.90	86.37	79.60*	84.43	85.17	80.67
QT Interval (msec)										
Day 1 postdose	196.33	197.43	181.27	189.73	188.63	189.67	181.33	185.43*	184.43	188.10
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Postdose Evaluation										
Number Examined	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**
Noteworthy Findings:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[a] At end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not percent difference).

[b] Incidence of observation / number of animals exhibiting sign.

-, No noteworthy findings.

Dunnett's test: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

2.6.7.7.3.3. 39 週間反復投与毒性試験

2.6.7.7G Report Title: GS-0387: A 39-Week Oral Toxicity Study in Dogs With a 6-Week Recovery Period		**Test Article:** MMB
Species/Strain: Dog / Beagle	**Duration of Dosing:** 39 Weeks	**Study No.** 814-1407
Initial Age: 9-10 months	**Duration of Postdose:** 6 Weeks	
Date of First Dose: 21 March 2013	**Administration:** Oral gavage	
	Vehicle/Salt Form: 1N HCl in SWFI (pH 1.3 to 1.8) / dihydrochloride salt	**GLP Compliance:** Yes
Special Features: Thiamine and thiamine diphosphate analysis; functional observation battery; peripheral neuropathology evaluation.		
No Observed Adverse Effect Level: 20 mg/kg/day		

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**20**		**50**	
Number of Animals (TK)	**M:6**	**F:6**	**M:6**	**F:6**	**M:6**	**F:6**	**M:6**	**F:6**
Toxicokinetics:	Combined Sexes		Combined Sexes		Combined Sexes		Combined Sexes	
MMB C_{max} (ng/mL)								
Day 1	NA		638		912		1490	
Week 4	NA		486		574		1100	
Week 13	NA		297		569		987	
Week 26	NA		393		919		1910	
Week 39	NA		617		938		1910	
MMB AUC_{0-24} (ng·h/mL)								
Day 1	NA		2220		3710		8350	
Week 4	NA		1390		1750		5100	
Week 13	NA		843		2380		4430	
Week 26	NA		1350		4250		12500	
Week 39	NA		2180		4620		9390	

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**20**		**50**	
M19 C_{max} (ng/mL)								
Day 1	NA		366		578		1100	
Week 4	NA		302		451		972	
Week 13	NA		185		524		924	
Week 26	NA		327		855		1950	
Week 39	NA		424		798		1720	
M19 AUC_{0-24} (ng·h/mL)								
Day 1	NA		3060		4900		10600	
Week 4	NA		1720		2610		7470	
Week 13	NA		934		3200		6830	
Week 26	NA		1720		5410		19400	
Week 39	NA		2280		5320		12600	
M21 C_{max} (ng/mL)								
Day 1	NA		1.72		2.56		3.51	
Week 4	NA		3.71		4.11		4.87	
Week 13	NA		3.33		4.00		4.64	
Week 26	NA		4.16		5.92		5.80	
Week 39	NA		4.93		5.04		5.61	
M21 AUC_{0-24} (ng·h/mL)								
Day 1	NA		9.2		12.1		43.6	
Week 4	NA		19.3		20.6		26.1	
Week 13	NA		18.4		29.9		23.6	
Week 26	NA		15.7		32		43.5	
Week 39	NA		24.8		23.4		52.7	
Number of Animals (Main)	**M:6**	**F:6**	**M:6**	**F:6**	**M:6**	**F:6**	**M:6**	**F:6**
Noteworthy Findings:								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	1	0
Body Weight (%)[a]	9.19 kg	6.88 kg	-2	-5	-4	-9	-7	-4
Food Consumption (g/animal/day) (%)[a]	227.02 g	196.07 g	-9	-7	-13	-25*	-25	-64**

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**20**		**50**	
Clinical Observations[b]								
Emesis after dosing	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0
Emesis after dosing, Clear	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Emesis after dosing, Tan	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	2/2
Emesis after dosing, Yellow	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	1/1
Emesis during dosing, Tan	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1
Emesis during dosing, Yellow	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0
Emesis, Clear	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1
Emesis, Tan	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	3/2	15/3	11/4
Emesis, Yellow	0/0	0/0	0/0	2/2	1/1	3/2	2/2	1/1
Excessive salivation	0/0	6/2	7/2	25/1	16/4	15/5	42/5	15/5
Feces, Soft	63/5	13/5	166/6	30/6	141/6	20/5	288/6	80/6
Feces, Watery	8/3	2/2	89/5	0/0	37/6	1/1	164/6	33/4
Vomitus, Tan	3/2	5/5	11/5	23/4	14/6	12/6	38/6	59/6
Vomitus, White	2/1	0/0	1/1	14/4	0/0	2/2	0/0	0/0
Vomitus, Yellow	0/0	0/0	4/3	3/2	6/2	6/4	8/4	19/6
Functional Observation Battery	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmoscopy								
Left Eye – cataract – capsular posterior	0	0	0	0	0	0	2	2
Right Eye – cataract – capsular posterior	0	0	0	0	0	0	2	3
Electrocardiography	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology								
Red blood cell count ($\times 10^6/\mu L$)								
Week 13	7.48	6.855	7.457	7.072	7.69	6.678	7.005	6.592
Week 26	7.558	7.147	7.145	7.115	7.103	6.505	6.742*	6.132*
Terminal	7.603	6.705	7.36	7.082	7.16	6.322	7.052	6.443

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**20**		**50**	
Hemoglobin concentration (g/dL)								
Week 13	17	15.77	16.98	16.35	17.18	15.27	16.2	15.27
Week 26	17.22	16.17	16.3	16.27	15.95	14.77	15.38	14.07*
Terminal	17.28	15.17	16.75	16.32	15.95	14.23	15.98	14.52
Hematocrit (%)								
Week 13	50.82	46.4	50.65	48.67	50.88	45.32	48.68	46.05
Week 26	51.03	47.28	47.8	47.52	47.02	43.33	45.44*	41.73*
Terminal	51.5	45.32	49.82	48.5	47.68	42.9	47.74	43.78
Red cell distribution width (%)								
Week 13	12.87	12.55	12.85	13.15	13.42	13	13.25	13.15
Week 26	12.78	12.25	13	12.80*	13.27	12.77*	14.10**	13.82**
Terminal	12.48	12.17	12.47	12.52	12.97**	12.55	12.96*	13.05**
Coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Chemistry								
Alanine aminotransferase (U/L)								
Week 4	26.7	24.8	24.2	23.7	24.7	26.3	33.2	28.3
Week 13	31.8	30.0	30.7	25.2	34.5	29.5	678	26.5
Terminal	32.0	28.7	29.5	28.2	33.3	59.7	49.6	35.8
Phosphorus (mg/dL)								
Week 4	4.83	3.90	4.65	4.25	4.65	4.17	3.87*	4.20
Week 13	4.47	4.13	3.73	3.72	3.85	3.65	3.38*	3.25
Terminal	3.93	3.8	3.5	3.58	3.48	3.55	3.14	2.65**
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights (%)[c]								
Liver	223.7 g	-	+5	-	+16	-	+26	-
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology								

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**20**		**50**	
Number Examined	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4
Bone Marrow, Rib								
Cellularity, decreased								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	0
Bone Marrow, Sternum								
Cellularity, decreased								
Minimal	0	0	0	0	0	0	2	0
Epididymides								
Germ cell debris, increased, bilateral								
Minimal	0	NA	1	NA	1	NA	1	NA
Mild	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Germ cell debris, increased, unilateral								
Minimal	1	NA	0	NA	0	NA	0	NA
Kidneys								
Vacuolation, tubular								
Minimal	0	0	0	1	0	1	1	3
Testes								
Degeneration, spermatocyte/spermatid, bilateral								
Minimal	0	NA	1	NA	1	NA	0	NA
Mild	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Degeneration, spermatocyte/spermatid, unilateral								
Minimal	2	NA	0	NA	0	NA	0	NA
Additional Examinations								
Thiamine and Thiamine Diphosphate Analysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Peripheral Neuropathological Examination	-	-	-	-	-	-	-	-
Postdose Evaluation								
Number Examined	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**
Food Consumption (g/animal/day) (%)[d]	242.57 g	225.14 g	+22	-16	+10	-25	-34	-50

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**20**		**50**	
Ophthalmology								
Left Eye – cataract – capsular posterior	0	0	0	0	0	0	1	2
Right Eye – cataract – capsular posterior	0	0	0	0	0	0	1	2
Hematology								
Red blood cell count (×106/μL)	8.145	6.56	7.38	7.51	7.46	6.585	7.62	7.475
Hemoglobin concentration (g/dL)	19.05	15.05	17.1	17.15	16.5	15.1	17.35	17.35
Hematocrit (%)	55.6	43.65	49.95	50.55	48.4	44.05	50.6	50.5

[a] At end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent difference from controls is shown. Statistical significance is based on actual data (not percent difference).

[b] Incidence of observation / number of animals exhibiting sign.

[c] Both absolute and relative weights differed in the direction indicated. Number indicates percent difference for the absolute organ weight. Statistical significance ins based on actual data (not percent difference).

[d] At end of recovery period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent difference from controls is shown. Statistical significance is based on actual data (not percent difference).

-, No noteworthy findings.

Dunnett's test: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

2.6.7.8. In Vitro 遺伝毒性試験

2.6.7.8.1. 細菌を用いる復帰突然変異試験

2.6.7.8A Report Title: Bacterial Reverse Mutation Test		**Test Article:** MMB (dihydrochloride salt)
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells	**No. of Independent Assays:** 2	**Study No.** GXE0001
Strains: *S. typhimurium* and *E. coli*	**No. of Replicate Cultures:** 3	
Metabolizing System: Aroclor-induced rat liver S9	**No. of Cells Analyzed/Culture:** -	**GLP Compliance:** Yes
Vehicle for Test Article: 0.05M HCl in SWFI (pH 1.4-1.6)	**Vehicle for Positive Controls:** DMSO except sodium azide (SWFI)	
Treatment: Plate incorporation for 66 hours (Assay 1) and preincubation (20 mins) followed by incubation for 66-67 hours (Assay 2).		**Date of Treatment:** 12 March 2009
Cytotoxic Effects: None	**Genotoxic Effects:** None	

ASSAY 1							
Metabolic Activation	**Treatment**	**Dose Level (µg/plate)**	**Revertant Colony Counts (Mean ± SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
Without Activation	Supplemented agar (medium control)	100 µL/plate	28.7 ± 2.52	111.0 ± 10.39	13.3 ± 3.79	6.0 ± 2.00	31.7 ± 12.01
	0.05M HCl in SWFI	100 µL/plate	23.7 ± 6.35	132.5 ± 9.19	16.7 ± 2.08	8.7 ± 2.52	28.7 ± 8.14
	MMB	1.6	31.3 ± 7.64	131.7 ± 6.81	12.0 ± 6.08	10.0 ± 1.73	29.7 ± 5.77
		8	30.0 ± 4.00	131.3 ± 29.26	14.7 ± 1.15	8.3 ± 0.58	28.7 ± 10.26
		40	29.7 ± 7.64	127.7 ± 4.73	19.3 ± 4.04	6.3 ± 2.31	26.3 ± 1.53
		200*	32.7 ± 11.59	121.0 ± 5.00	20.3 ± 3.21	9.0 ± 5.57	27.3 ± 7.77
		1000*	26.3 ± 4.16	114.0 ± 16.52	12.3 ± 5.86	6.0 ± 5.29	20.7 ± 2.52
	2-Nitrofluorene	0.5	69.7 ± 13.58	NA	NA	NA	NA
	Sodium azide	1	NA	747.3 ± 35.80	763.0 ± 60.70	NA	NA
	9-Aminoacridine	50	NA	NA	NA	115.7 ± 55.90	NA
	4-Nitroquinoline-N-oxide	1	NA	NA	NA	NA	694.3 ± 76.37
With Activation	Supplemented agar (medium control)	100 µL/plate	38.3 ± 4.51	115.3 ± 5.13	19.0 ± 5.00	14.0 ± 5.57	30.7 ± 7.64
	0.05M HCl in SWFI	100 µL/plate	41.3 ± 4.16	135.3 ± 11.59	14.3 ± 0.58	14.7 ± 1.53	36.0 ± 9.85
	MMB	1.6	39.7 ± 5.13	144.7 ± 13.01	17.0 ± 6.08	11.0 ± 3.46	30.7 ± 8.62
		8	32.7 ± 2.52	152.0 ± 15.59	15.7 ± 4.62	7.7 ± 1.53	34.0 ± 4.58
		40	38.3 ± 5.51	120.7 ± 3.21	14.0 ± 6.56	12.3 ± 2.08	32.0 ± 1.73
		200*	43.3 ± 10.02	123.7 ± 4.93	11.3 ± 4.04	8.3 ± 2.52	28.3 ± 8.33
		1000*	40.3 ± 3.21	87.7 ± 10.97	9.7 ± 4.04	13.0 ± 5.00	35.7 ± 8.74
	2-Aminoanthracene	2	135.3 ± 19.35	NA	91.7 ± 10.97	NA	NA
		4	NA	719.7 ± 62.42	NA	89.7 ± 11.02	NA
		10	NA	NA	NA	NA	231.0 ± 24.76

ASSAY 2							
Metabolic Activation	**Treatment**	**Dose Level (µg/plate)**	**Revertant Colony Counts (Mean ± SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
Without Activation	Supplemented agar (medium control)	100 µL/plate	29.3 ± 5.51	113.3 ± 7.02	13.3 ± 1.15	7.3 ± 3.21	35.3 ± 1.15
	0.05M HCl in SWFI	100 µL/plate	21.0 ± 6.00	100.3 ± 10.41	22.7 ± 4.51	9.3 ± 7.02	36.7 ± 10.79
	MMB	0.32	23.7 ± 3.51	99.7 ± 3.21	14.7 ± 2.89	15.0 ± 3.46	36.7 ± 11.02
		1.6	21.0 ± 4.58	104.7 ± 3.79	22.7 ± 6.35	10.7 ± 3.21	28.7 ± 7.57
		8	27.7 ± 2.89	95.0 ± 14.73	16.3 ± 2.08	9.0 ± 1.73	32.0 ± 10.58
		40	31.0 ± 5.57	115.3 ± 7.51	18.0 ± 7.00	8.0 ± 2.65	35.7 ± 1.15
		200*	28.7 ± 6.66	92.7 ± 1.15	21.3 ± 6.43	5.0 ± 3.00	20.7 ± 2.31
	2-Nitrofluorene	0.5	117.3 ± 18.61	NA	NA	NA	NA
	Sodium azide	1	NA	703.7 ± 15.63	732.3 ± 12.42	NA	NA
	9-Aminoacridine	50	NA	NA	NA	70.0 ± 41.01	NA
	N-Nitroquinoline-N-oxide	1	NA	NA	NA	NA	1649.3 ± 89.76
With Activation	Supplemented agar (medium control)	100 µL/plate	38.0 ± 6.00	128.7 ± 19.60	11.3 ± 3.06	12.7 ± 2.89	38.3 ± 5.69
	0.05M HCl in SWFI	100 µL/plate	21.3 ± 3.79	107.7 ± 5.69	12.7 ± 4.51	12.0 ± 2.00	35.7 ± 6.81
	MMB	0.32	31.3 ± 1.15	105.0 ± 7.94	13.3 ± 6.11	15.0 ± 2.65	39.7 ± 7.37
		1.6	36.7 ± 5.69	106.7 ± 9.71	12.0 ± 1.73	13.7 ± 3.79	37.3 ± 6.35
		8	38.7 ± 1.15	116.3 ± 8.08	12.3 ± 1.53	12.7 ± 5.51	35.3 ± 0.58
		40	43.3 ± 15.31	117.0 ± 25.87	12.3 ± 4.04	10.3 ± 2.08	37.3 ± 12.50
		200*	29.0 ± 10.44	106.3 ± 22.48	12.0 ± 1.73	11.7 ± 6.03	45.0 ± 9.85
	2-Aminoanthracene	2	647.3 ± 34.15	NA	103.3 ± 7.23	NA	NA
		4	NA	1429.3 ± 36.25	NA	122.7 ± 8.62	NA
		10	NA	NA	NA	NA	297.0 ± 28.84

*, Precipitation.

2.6.7.8.2. ヒトリンパ球を用いる染色体異常試験

2.6.7.8B Report Title: In Vitro Mammalian Cell Cytogenetic Test: Human Lymphocyte		**Test Article:** MMB (bis-bisulfate salt)
Test for Induction of: Chromosome aberrations	**No. of Independent Assays:** 2	**Study No.** GXE0002
Strains: Human peripheral lymphocytes	**No. of Replicate Cultures:** 2	
Metabolizing System: Aroclor-induced rat liver S9	**No. of Cells Analyzed/Culture:** -	**GLP Compliance:** Yes
Vehicle for Test Article: SWFI (pH 1.4-1.6)	**Vehicle for Positive Controls:** BP (DMSO), MMC (0.9% sodium chloride)	
Treatment: Assay 1: 3 h treatment (± S9) and harvested 18 h postdose; Assay 2: 3 h treatment (+S9) and 18 h treatment (-S9) and harvested at 18 h postdose or 42 h postdose.		**Date of Treatment:** 28 August 2008
Cytotoxic Effects: Dose-related decreases in relative mitotic indices.		
Genotoxic Effects: MMB was not clastogenic. There was evidence of endoreduplication and polyploidy induction in the absence of S9 following 3 h treatment in Assay 1, but not following 3 h or 18 h treatment (±S9) in Assay 2.		

Assay 1: 3 h treatment, 18 h postdose harvest

	Treatment	Concentration (µg/mL)	Cytotoxicity (% of control)	Total Cells	Aberrant Cells			Numerical Aberrations		
					Number	% Cells (+ gaps)	% Cells (- gaps)	Poly	Endo	Hyper
Without Activation	SWFI	0	100	400	3	0.8	0.0	0	0	0
	Media	0	118	200	2	1.0	1.0	0	0	0
	MMB	0.1	96	200	2	1.0	0.0	0	0	0
		1	79	200	1	0.5	0.5	0	0	0
		5	52	200	5	2.5	1.5	1	5	0
	MMC	0.5	15	200	27	13.5	10.5	0	0	0
With Activation	SWFI	0	100	400	7	1.8	1.3	0	0	0
	Media	0	95	200	3	1.5	1.0	0	0	0
	MMB	0.1	94	200	1	0.5	0.5	0	0	0
		5	68	200	4	2.0	1.5	0	1	0
		15	54	200	3	1.5	1.0	0	0	0
	BP	5	27	200	26	13.0	9.0	0	0	0

	Treatment	Concentration (µg/mL)	Cytotoxicity (% of control)	Total Cells	Aberrant Cells			Numerical Aberrations		
					Number	% Cells (+ gaps)	% Cells (- gaps)	Poly	Endo	Hyper
Without Activation	**Assay 2: 18 h treatment, 18 h postdose harvest**									
	SWFI	0	100	400	3	0.8	0.5	0	0	0
	Media	0	130	200	1	0.5	0.0	0	0	0
	MMB	0.01	150	200	1	0.5	0.0	0	0	0
		0.1	132	200	3	1.5	1.5	0	0	0
		1.25	54	200	1	0.5	0.0	0	0	0
	MMC	0.5	6	125	25	20.0	20.0	0	0	0
	Assay 2: 18 h treatment, 42 h postdose harvest									
	SWFI	0	100	400	3	0.8	0.8	1	0	0
	Media	0	101	200	1	0.5	0.5	0	0	0
	MMB	1.25	91	200	1	0.5	0.5	0	0	0
With Activation	**Assay 2: 3 h treatment, 18 h postdose harvest**									
	SWFI	0	100	400	4	1.0	0.5	1	0	0
	Media	0	123	200	0	0.0	0.0	0	0	0
	MMB	0.1	180	200	1	0.5	0.5	1	0	0
		5	63	200	1	0.5	0.5	1	0	0
		12.7	46	200	2	1.0	0.5	1	0	0
	BP	6	127	50	19	38.0	32.0	0	0	0
	Assay 2: 3 h treatment, 18 h postdose harvest									
	SWFI	0	100	400	3	0.8	0.8	0	0	0
	Media	0	89	200	1	0.5	0.0	0	0	0
	MMB	5	50	200	5	2.5	1.5	0	0	0

Assay 1: Endoreduplication in the absence of metabolic activation						
Treatment	**Concentration (µg/mL)**	**Metaphases Analyzed**	**No. of Diploid Cells**	**No. of Polyploid Cells**	**No. of Endoreduplicated Cells**	**Total 4n (Tetraploid)**
SWFI	0	1000	999.3	0.8	0.0	0.8
Media	0	1000	998.0	2.0	0.0	2.0
MMB	0.1	1000	997.0	2.0	1.0	3.0
	1	1000	993.0	2.0	5.0	7.0
	5	1000	975.5	10.0	13.5	24.5

2.6.7.9. In Vivo 遺伝毒性試験

2.6.7.9.1. 小核試験

2.6.7.9A Report Title: Rat Bone Marrow Erythrocyte Micronucleus Test Following Oral Administration of CYT387		**Test Article:** MMB
Test for Induction of: Micronuclei in bone marrow erythrocytes	**Treatment Schedule:** Single dose	**Study No.** AD37FP.125.BTL
Species/Strain: Rat / Sprague-Dawley	**Sampling Time:** 24 h and 48 h postdose	
Age: 7 weeks	**Administration:** Oral	**GLP Compliance:** Yes
No. of Cells Evaluated/Animal: 2000	**Vehicle/Salt Form:** ~0.05M HCl in SWFI (pH 1.7 ± 0.1) / dihydrochloride salt	**Date of Dosing:** 30 September 2011
Special Features: None	**Toxic/Cytotoxic Effects:** None	
Genotoxic Effects: None	**Evidence of Exposure:** Overt toxicity at 1000 mg/kg	

Treatment	Dose (mg/kg)	Sex	Time (h)	No. of Animals	PCE/Total Erythrocytes (Mean ± SD)	Change From Control (%)	No. of MPCE/1000 PCE (Mean ± SD)	No. of MPCE/PCE Scored
SWFI (negative control)	0	M	24	5	0.557 ± 0.04	-	0.4 ± 0.22	4 / 10000
		F	24	5	0.519 ± 0.05	-	0.1 ± 0.22	1 / 10000
MMB	250	M	24	5	0.560 ± 0.04	+1	0.3 ± 0.27	3 / 10000
		F	24	5	0.540 ± 0.03	+4	0.2 ± 0.45	2 / 10000
	500	M	24	5	0.560 ± 0.04	+1	0.1 ± 0.22	1 / 10000
		F	24	5	0.514 ± 0.03	-1	0.5 ± 0.00	5 / 10000
	1000	M	24	5	0.536 ± 0.01	-4	0.2 ± 0.27	2 / 10000
		F	24	5	0.503 ± 0.04	-3	0.3 ± 0.27	3 / 10000
Cyclophosphamide (positive control)	40	M	24	5	0.442 ± 0.05	-21	12.0 ± 2.62	120** / 10000
		F	24	5	0.441 ± 0.08	-15	9.1 ± 1.14	91** / 10000
SWFI (negative control)	0	M	48	5	0.592 ± 0.01	-	0.2 ± 0.27	2 / 10000
		F	48	5	0.507 ± 0.07	-	0.0 ± 0.00	0 / 10000
MMB	1000	M	48	5	0.382 ± 0.05	-35	0.6 ± 0.42	6 / 10000
		F	48	5	0.346 ± 0.01	-32	0.7 ± 0.57	7*** / 10000

** $p \leq 0.05$ (binomial distribution, Kastenbaum-Bowman tables [Kastenbaum, 1970]). Kastenbaum MA, Bowman KO. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. Mutat Res. 1970;9(5):527-49.

*** $p \leq 0.05$ (binomial distribution, Kastenbaum-Bowman tables), but not biologically relevant.

2.6.7.10. がん原性試験

2.6.7.10.1. マウス 26 週間投与試験

2.6.7.10A Report Title: 26-Week Oral Gavage Carcinogenicity and Toxicokinetic Study With GS-0387-01 in 001178-T (Hemizygous) RasH2 Mice		**Test Article:** MMB
Species/Strain: Mouse / 001178-T (Hemizygous) RasH2	**Duration of Dosing: 26 Weeks**	**Study No.** 8283320
Initial Age: 9 to 10 weeks	**Administration:** Oral gavage	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: 11 August 2014 (males), 12 August 2014 (females)	**Vehicle/Salt Form:** 0.05 M HCl in sterile water (pH 1.35-1.80) /dihydrochloride monohydrate	
	Treatment of Controls: Reverse osmosis water (Group 1); vehicle (Group 2).	
Basis for High-Dose Selection: In the 4-week study (study 8283319), animals were administered 30, 100, or 300/150 mg/kg/day. Administration of 300 mg/kg/day resulted in early deaths, adverse clinical observations, and suspension of dosing, after which dosing was resumed at 150 mg/kg/day. After the dosing holiday, administration of 150 mg/kg/day caused no adverse clinical effects. The NOAEL for the 4-week study was 100 mg/kg/day because the pathology effects of 150 and 300 mg/kg/day could not be separated.		
Special Features: A seventh group of animals (10 animals/sex) was administered an intraperitoneal dose of MNU on Day 1 at 75 mg/kg as a positive control to ensure animals supplied appropriately expressed oncogenes and responded to carcinogenic insult. The MNU dose was 10 mL/kg. A clear carcinogenic response occurred in animals administered MNU. Increased mortality in the positive control group was attributed primarily to the presence of malignant neoplasms, implying MNU was an effective positive control article. An additional 39 animals/sex/group in each treated group and an additional 6 animals/sex/group in each control group were used for toxicokinetic monitoring on Day 1 and at Week 26.		

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Water)**		**0 (Vehicle)**		**3**		**10**		**30**		**100**	
No. of Animals (TK)	**M:6**	**F:6**	**M:6**	**F:6**	**M:39**	**F:39**	**M:39**	**F:39**	**M:39**	**F:39**	**M:39**	**F:39**
Toxicokinetics:												
MMB C_{max} (ng/mL)												
Day 1	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	218	266	1230	1360	4410	3670	8210	6490
Week 26	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	191	189	1410	1210	5280	2820	10400	6160
MMB AUC_{0-t} (ng·h/mL)												
Day 1	NC	NC	NC	NC	421	493	4780	4460	16700	17700	87200	64000
Week 26	NC	NC	NC	NC	468	652	5470	4100	22100	18900	85400	86300
M19 C_{max} (ng/mL)												
Day 1	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	36.5	59.2	222	247	666	664	1430	1070
Week 26	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	37.3	49.9	218	290	609	584	1650	1830

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Water)**		**0 (Vehicle)**		**3**		**10**		**30**		**100**	
M19 AUC_{0-t} (ng·h/mL)												
Day 1	NC	NC	NC	NC	61.9	184	936	1080	3240	4410	18600	11100
Week 26	NC	NC	NC	NC	169	406	1160	2340	3920	7030	17300	27900
M21 C_{max} (ng/mL)												
Day 1	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	2.97	5.49	8.50	44.4	52.5	56.6	50.4	167
Week 26	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	1.75	5.06	10.3	24.4	73.6	49.1	194	141
M21 AUC_{0-t} (ng·h/mL)												
Day 1	NC	NC	NC	NC	NR	8.88	18.4	69.8	92.8	215	353	954
Week 26	NC	NC	NC	NC	3.55	9.08	37.0	60.5	215	233	991	796
M20 C_{max} (ng/mL)												
Day 1	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	5.18	2.95	6.19	24.9	24.8	30.8	22.0	93.4
Week 26	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	2.13	10.7	7.36	13.6	30.5	29.8	74.5	74.0
M20 AUC_{0-t} (ng·h/mL)												
Day 1	NC	NC	NC	NC	NR	5.41	14.2	38.8	62.7	127	183	463
Week 26	NC	NC	NC	NC	4.33	15.8	28.1	49.2	128	179	410	405
No. of Animals (Main)												
At Start	**M:25**	**F:25**	**M:25**	**F:25**	**M:25**	**F:25**	**M:25**	**F:25**	**M:25**	**F:25**	**M:25**	**F:24[a]**
Died or Sacrificed Moribund	2	0	2	2	1	2	2	2	3	2	1	1
Terminal Sacrifice	23	25	23	23	24	23	23	23	22	23	24	23
Survival (%)	92	100	92	92	96	92	92	92	88	92	96	96
Body Weight (%)[b]	26.5 g	20.2 g	26.7 g	20.7 g	0	-1	-1	-3	-5	-3	-4	-7*
Food Consumption (g/animal/day) (%)[b]	3.4 g	2.5 g	3.3 g	2.5 g	-6	-8	-6	-8*	-9	-4*	-9	-12*
No. of Animals With Neoplastic Lesions:												
Vascular Neoplasm												
B-Hemangioma	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1
M-Hemangiosarcoma	4	3[c]	1	3	1	0	2	3	2	6	1	3

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Water)**		**0 (Vehicle)**		**3**		**10**		**30**		**100**	
Lung												
B-Adenoma, bronchiolo-alveolar	1	1	4	1	1	0	1	1	1	1	2	0
M-Carcinoma, bronchiolio-alveolar	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Harderian Gland												
B-Adenoma	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Liver												
B-Adenoma, hepatocellular	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Stomach, Nonglandular												
B-Papilloma, squamous cell	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Thymus												
M-Thymoma	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
Skin/Subcutis												
B-Papilloma, squamous cell	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
M-Fibrosarcoma	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kidney												
B-Adenoma, tubule cell	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
Mandibular Salivary Gland												
M-Carcinoma, squamous cell	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Hemolymphoreticular System												
M-Lymphoma	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Noteworthy Findings:												
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Palpable Masses	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Water)**		**0 (Vehicle)**		**3**		**10**		**30**		**100**	
Histopathology – Non-Neoplastic Lesions												
Spleen												
Cellularity, decreased, lymphocytes												
Minimal	1	0	1	0	1	0	0	1	3	1	16	15
Slight	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Marrow, Femur												
Cellularity, decreased												
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19	12
Marrow, Sternum												
Cellularity, decreased												
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	7
Lymph Node, Mesenteric												
Cellularity decreased, lymphocytes												
Minimal	0	0	0	1	0	0	1	1	2	0	5	2
Slight	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Liver												
Infiltrate, mononuclear cell												
Minimal	11	22	10	18	14	13	8	17	5	19	3	13
Slight	0	0	1	0	0	3	0	2	0	1	0	0

Daily Dose (mg/kg)	0 (Water)		0 (Vehicle)		3		10		30		100	
Mandibular Salivary Gland												
Infiltrate, mononuclear cell												
Minimal	6	7	8	15	5	6	4	6	1	5	1	2
Slight	0	2	1	2	0	1	0	1	0	0	0	0

[a] One female animal (A12359) was missing from the cage on Day 16 and could not be located. This animal was not replaced and the group continued with 24 animals.

[b] At end of study. For control groups, group means are shown. For treated groups, percent difference from vehicle controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not percent difference).

[c] Includes 1 animal with hemangiosarcoma at 2 sites.

-, No noteworthy findings.

* $p \leq 0.05$ (ANOVA and protected t-tests).

2.6.7.10.2. ラット 104 週間投与試験

2.6.7.10B Report Title: GS-0387: A 104-Week Oral Gavage Carcinogenicity Study in Sprague-Dawley Rats		**Test Article:** MMB (dihydrochloride monohydrate)
Species/Strain: Rat / Sprague-Dawley	**Duration of Dosing:** 104 Weeks	**Study No.** 814-1519
Initial Age: 8 weeks	**Administration:** Oral gavage	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: 26 February 2015	**Vehicle/Formulation:** 0.05M in SWFI (pH 1.35-1.80)	
	Treatment of Controls: Vehicle	
Basis for High-Dose Selection: Dose levels were selected based on results of a 26-week oral gavage toxicity and toxicokinetic study with MMB in rats (study 1668-023) and after consultation with the Executive Carcinogenicity Assessment Committee of the Food and Drug Administration. Metabolite M21 is the major circulating plasma metabolite in human subjects. An M21 dose of 25 mg/kg/day in combination with 5 mg/kg/day MMB was expected to achieve the estimated human M21 exposure. The additional exposure with the metabolite was not expected to cause any undesired toxicities and would be tolerated for the duration of the study. M21 was coadministered with MMB to rats in single-dose pharmacokinetic studies at the doses intended in the present study with no clinical signs observed.		
Special Features: An additional 12 animals/sex/group in each treated group and an additional 4 animals/sex in the control group were used for toxicokinetic monitoring on Day 1 and at Week 26.		

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**1.5**		**5**		**15**		**5/25**	
Number of Animals (TK)	**M:4**	**F:4**	**M:12**	**F:12**	**M:12**	**F:12**	**M:12**	**F:12**	**M:12**	**F:12**
Toxicokinetics:										
MMB C_{max} (ng/mL)										
Day 1	BLQ	BLQ	664	970	2990	4800	7140	9140	2720	4000
Week 26	BLQ	BLQ	1090	1460	3400	3420	10200	10300	4220	4030
MMB AUC_{0-24} (ng·h/mL)										
Day 1	NC	NC	3600	3880	18800	21400	80600	100000	16500	25500
Week 26	NC	NC	6730	6350	28400	23500	126000	94000	25800	27200
M21 C_{max} (ng/mL)										
Day 1	BLQ	BLQ	4.85	9.04	15.0	24.9	37.4	49.8	40.2	70.3
Week 26	BLQ	BLQ	23.6	28.5	52.7	69.2	111	143	98.4	124

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**1.5**		**5**		**15**		**5/25**	
M21 AUC_{0-24} (ng·h/mL)										
Day 1	NC	NC	28.3	50.3	103	142	463	581	441	604
Week 26	NC	NC	169	183	583	422	1850	1210	1000	1070
Number of Animals (Main)										
At Start	**M:60**	**F:60**	**M:60**	**F:60**	**M:60**	**F:60**	**M:60**	**F:60**	**M:60**	**F:60**
Died or Sacrificed Moribund	38	43	31	40	29	33	31	33	34	39
Terminal Sacrifice	22	17	29	20	31	27	29	27	26	21
Survival (%)	37	28	48	33	52	45	48	45	43	35
Body Weight (%)[a]	829 g	-	-1	-	-7	-	-10*	-	-1	-
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
No. of Animals With Neoplastic Lesions:										
Adrenal Glands										
B-Adenoma, cortical	1	4	0	2	1	0	0	0	0	0
M-Carcinoma, cortical	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
B-Pheochromocytoma	11	4	7	0	11	2	7	2	6	2
M-Pheochromocytoma	2	0	3	1	0	0	3	0	4	0
Bone, Femur										
M-Osteosarcoma	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Brain										
M-Glioma	2	1	5	0	1	0	5	2	4	3
B-Granular cell tumor	2	1	0	0	1	0	0	0	2	0
M-Granular cell tumor	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0
M-Oligodendroglioma	0	3	0	1	0	0	0	0	1	0
Coagulating Glands										
M-Adenocarcinoma	0	NA	1	NA	0	NA	0	NA	0	NA
Harderian Glands										
M-Adenocarcinoma	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
M-Carcinoma, squamous cell	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

Daily Dose (mg/kg)	0 (Vehicle)		1.5		5		15		5/25	
Heart										
B-Mesothelioma, atriocaval	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
B-Schwannoma, endocardial	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
Kidneys										
B-Adenoma, renal tubule (av) type	1	0	0	2	1	0	0	1	0	0
B-Adenoma, tubular cell	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1
B-Lipoma	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
M-Liposarcoma	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Liver										
B-Adenoma, hepatocellular	0	0	1	0	0	0	1	0	2	1
M-Carcinoma, hepatocellular	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0
M-Cholangiocarcinoma	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Mammary Gland										
M-Adenocarcinoma	0	27	0	24	1	24	0	10	0	15
B-Fibroadenoma	0	34	3	24	0	20	0	16	1	24
Multicentric Neoplasm										
B-Hemangioma	1	0	0	0	0	0	6	2	1	0
M-Hemangiosarcoma	0	1	2	0	3	0	3	0	1	1
M-Leukemia, granulocytic	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0
M-Lymphoma	1	5	1	1	2	0	3	2	5	0
M-Sarcoma, histiocytic	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
Pancreas										
B-Adenoma, acinar cell	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
B-Adenoma, islet cell	5	3	5	1	2	2	3	2	1	0
M-Carcinoma, islet cell	1	0	3	1	1	1	0	0	0	0
Parathyroid Glands										
B-Adenoma	1	1	3	0	2	1	2	0	2	0

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**1.5**		**5**		**15**		**5/25**	
Pituitary Gland										
B-Adenoma, pars distalis	36	52	31	48	34	49	34	48	32	43
B-Adenoma, pars intermedia	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
M-Carcinoma, pars distalis	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
Preputial Glands										
M-Carcinoma, squamous cell	0	NA	1	NA	0	NA	1	NA	1	NA
Prostate Gland										
M-Adenocarcinoma	0	NA	0	NA	0	NA	2	NA	0	NA
B-Adenoma	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Seminal Vesicles										
M-Adenocarcinoma	1	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA
Skin / Skin, Subcutis										
B-Fibroma	6	0	3	0	1	0	0	0	1	0
M-Fibrosarcoma	4	0	2	0	2	0	2	0	3	2
B-Tumor, hair follicle	1	0	2	0	1	0	2	0	2	0
M-Tumor, hair follicle	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
B-Keratoacanthoma	3	1	2	0	0	0	0	0	1	0
B-Lipoma	1	0	1	0	1	1	1	2	0	1
M-Osteosarcoma	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0
B-Papilloma, squamous cell	1	0	0	0	0	0	1	0	2	0
M-Sarcoma, undifferentiated	0	0	0	2	1	0	1	0	1	0
Spinal Cord, lumbar										
M-Glioma	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Spleen										
M-Sarcoma, undifferentiated	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Stomach, Glandular										
M-Adenocarcinoma	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
M-Sarcoma, undifferentiated	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

Daily Dose (mg/kg)	0 (Vehicle)		1.5		5		15		5/25	
Stomach, Nonglandular										
M-Sarcoma, undifferentiated	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Testes										
B-Adenoma, interstitial cell	2	NA	4	NA	4	NA	11	NA	6	NA
Thymus										
B-Thymoma	1	0	0	0	0	0	0	1	2	0
M-Thymoma	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
Thyroid Gland										
B-Adenoma, c-cell	6	4	3	4	10	5	6	4	7	12
B-Adenoma, follicular cell	0	2	1	0	1	1	2	1	0	0
M-Carcinoma, c-cell	1	0	2	0	1	0	0	0	0	0
M-Carcinoma, follicular	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0
Zymbal's Gland										
M-Carcinoma	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0

[a] At end of study. For controls, group means are shown. For treated groups, percent difference from controls is shown. Statistical significance is based on actual data (not percent difference).

-, No noteworthy findings.

*, $p < 0.05$ (Dunnett's Test).

2.6.7.11. 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

Test Article: MMB

Species / Strain	Administration (Vehicle / Formulation /Salt Form)	Dosing Period	Doses (mg/kg)	No./Group	Noteworthy Findings	Study No.
Rat / Sprague-Dawley	Oral gavage (0.05M HCl in sterile water at a final pH of 1.35 to 1.80 / dihydrochloride monohydrate)	GD 6-17	0, 4.3, 17, 68	Main: 8F TK: 3F control; 9F treated	4.3 mg/kg/day: no maternal effects. Fetal NOEL (Maternal GD 17 MMB C_{max} = 2.78 µg/mL, $AUC_{(0-24)}$ = 15.7 µg·h/mL) 17 mg/kg/day: Maternal NOAEL (GD 17 MMB C_{max} = 11.9 µg/mL, $AUC_{(0-24)}$ = 146 µg·h/mL). Adverse clinical signs, ↓ maternal BW (secondary effect of fetal toxicity due to a reduced number of fetuses), ↑early resorptions, ↓gravid uterine weight, 25% complete litter loss, and 75% postimplantation loss, ↑visceral variation of absent innominate artery. 68 mg/kg/day: 1 main study animal and 4 TK animals died. Adverse clinical signs, ↓ maternal BW and FC, ↑early resorptions, ↓gravid uterine weight, 100% complete litter loss and 100% postimplantation loss. (GD 17 MMB C_{max} = 31.1 µg/mL, $AUC_{(0-24)}$ = 462 µg·h/mL).	8283314[a]
Rabbit / New Zealand White	Oral gavage (0.05M HCl in sterile water at a final pH of 1.35 to 1.80/ dihydrochloride monohydrate)	GD 7-20	0, 7.5, 30, 75	5F	7.5 mg/kg/day: Maternal NOAEL: (GD 20 MMB C_{max} = 19.8 ng/mL, AUC_{0-t} = 30.3 ng•h/mL). 30 mg/kg/day: ↓maternal BW gain and food consumption. Fetal NOAEL (maternal GD 20 MMB C_{max} = 797 ng/mL, AUC_{0-t} = 1520 ng•h/mL). 75 mg/kg/day: 3 deaths (1 broken leg GD 9 not MMB related, 1 euthanized after complete litter abortion GD 22, 1 euthanized due to general debilitation GD 21); ↓ maternal BW, BW gain and food consumption, thin appearance, few or no feces; 1 animal non gravid. 1 gravid at cesarean section: ↑ late resorptions, total resorptions, and postimplantation loss and ↓ fetal weight. (GD 20 MMB C_{max} = 2750 ng/mL, AUC_{0-t} = 20500 ng•h/mL).	8283316[a]

[a] Indicates GLP compliant.

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

2.6.7.12.1. 雄受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

2.6.7.12A Report Title: Oral Gavage Study of Fertility and Early Embryonic Development to Implantation With GS-0387-01 in Male Sprague Dawley Rats		**Test Article:** MMB
Design similar to ICH 4.1.1? Yes	**Duration of Dosing:** Males: At least 28 days prior to mating, and throughout the mating period until termination (~10 weeks). Females: Untreated.	**Study No.** 8287293
Species/Strain: Rat / Sprague-Dawley	**Day of Mating:** Day 0 of gestation	**GLP Compliance:** Yes
Initial Age: 10 weeks	**Day of C-Section:** Gestation Day 13	
Date of First Dose: 13 January 2014	**Administration:** Oral gavage	
Special Features: None	**Vehicle/Salt Form:** 0.05 M HCl in sterile water at final pH of 1.35 to 1.80 /dihydrochloride monohydrate	
No Observed Adverse Effect Level: F_0 Males, Paternal: 5 mg/kg/day. Fertility: 5 mg/kg/day		

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**5**	**25**	**100/68[a]**
Males				
Toxicokinetics: AUC_{0-24} (ng•h/mL)	-	33800[b]	141000[c]	258000[d]
No. Evaluated	**22**	**22**	**22**	**22**
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	9
Clinical Observations[e]				
Appearance, hunched	0	0	0	1
Appearance, swollen, right dorsal thorax	0	1	0	0
Appearance, thin	0	0	0	2
Behavior, hyperactive	0	1	0	0
Behavior, hypoactive	0	0	0	8
Discharge, genital red	0	0	0	1
Discharge, nasal, brown or red	2	3	1	3
Discharge, oral, clear	0	0	2	3
Excretion, feces, mucoid	0	0	0	1
Eyes, discharge, clear or red	2	0	0	3
Eyes, squinting	1	0	0	1

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**5**	**25**	**100/68[a]**
Respiration, audible or irregular	0	0	0	6
Skin and pelage, cold to touch, entire body	0	0	0	2
Skin and pelage, pale ears or entire body	0	0	0	3
Skin and pelage, rough hair coat	2	0	4	16
Body Weight (%)[f]				
PM 3	362 g	-1.9	-1.9	-11.9#H
PM 14	427 g	-3.5	-4.4*H	-15.7#H
PM 28	489 g	-4.9*H	-8.2#H	-19.8#H
PP 0	540 g	-5.7*H	-11.7#H	-26.1#H
PP 17	582 g	-6.9+H	-13.4#H	-28.7#H
PP 35	634 g	-7.1+H	-15.3#H	-31.5#H
Food Consumption (%)[f]				
PM 0-7	363.6 g	-3.1*R	-0.7#R	-36.8#R
PM 14-21	375.5 g	-10.0	-9.7	-10.2
PP 0-7	204.0 g	-7.0*H	-13.3#H	-22.2#H
PP 28-35	205.6 g	-5.5	-11.7#H	-27.3#H
No. of Males That Mated	**22**	**22**	**22**	**13**
No. of Fertile Males	**22**	**21**	**21**	**10**
Necropsy Observations				
Spleen, discolored	0	0	0	6
Testes, small	0	0	0	1
Testes, soft	0	0	0	2
Epididymis, discolored	0	0	0	1
Epididymis, mass	0	0	0	2
Epididymis, soft	0	0	0	1

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**5**	**25**	**100/68[a]**
Organ Weights (%)				
No. Examined	22	22	22	13
Testes (Left)				
Mean Absolute (% change from control)	1.9625	1.9702 (+0.4)	1.7804 (-9)	1.5122 (-23)
Mean Adjusted for Terminal Body Weight	1.8827	1.9412	1.8066	1.6519+H
Testes (Right)				
Mean Absolute (% change from control)	1.9744	1.984 (+0.5)	1.7809 (-10)	1.5495 (-22)
Mean Adjusted for Terminal Body Weight	1.9252	1.9662	1.7971	1.6356
Epididymis (Left)				
Mean Absolute (% change from control)	0.7674	0.7600 (-1)	0.6811 (-11)	0.6999 (-9)
Mean Adjusted for Terminal Body Weight	0.7873	0.7673	0.6746	0.6650
Epididymis (Right)				
Mean Absolute (% change from control)	0.7803	0.8119 (+4)	0.7345 (-6)	0.6723 (-14)
Mean Adjusted for Terminal Body Weight	0.7653	0.8065	0.7395	0.6985
Seminal Vesicle				
Mean Absolute (% change from control)	1.5775	1.3144 (-17)	1.2639 (-20)	1.2128 (-23)
Mean Adjusted for Terminal Body Weight	1.6718	1.3487+H	1.2329#H	1.0476#H
Sperm Motility (% motile)	66.70	69.00	52.00	2.6#R

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	5	25	100/68[a]
Females				
No. of Pregnant Females	**22**	**21**	**21**	**10**
No. Aborted or With Total Resorption of Litter	0	0	0	1
Mean No. Corpora Lutea	15.9	15.9	15.4	14.9
Mean No. Implantations	15.5	15.4	14.6	12.1
Mean % Preimplantation Loss	2.4	2.6	6.4	18.5
Mean No. Live fetuses	14.7	15.0	14.0	11.5
Mean No. Early Resorptions	0.8	0.5	0.6	0.6
Mean No. Late Resorptions	0	0	0	0
Mean % Postimplantation Loss	4.8	3.3	3.8	13.9

[a] During the first 4 days of dosing, 1 MMB-related death occurred at 100 mg/kg/day. Due to this death and mortality data in the concurrent companion female fertility study (8291598), the dose level for this group was reduced to 68 mg/kg/day.

[b] Source: 1668-023.

[c] Source: GWR1004.

[d] Source: 1668-009.

[e] Number of animals exhibiting sign.

[f] For controls, group means are shown. For treated groups, percent change from the control is shown. Statistical significance is based on actual data and not on the percent.

*H, Dunnett Exact Homogeneous Test significant at 0.05 level; +H, Dunnett Exact Homogeneous Test significant at 0.01 level; #H, Dunnett Exact Homogeneous Test significant at 0.001 level.

*R, Wilcoxon Rank Sum Test significant at 0.05 level; +R, Wilcoxon Rank Sum Test significant at 0.01 level; #R, Wilcoxon Rank Sum Test significant at 0.001 level.

2.6.7.12.2. 雌受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

2.6.7.12B Report Title: Oral Gavage Study of Fertility and Early Embryonic Development to Implantation With GS-0387-01 in Female Sprague-Dawley Rats		**Test Article:** MMB
Design similar to ICH 4.1.1? Yes	**Duration of Dosing:** Males: Untreated; Females: At least 14 days prior to mating through Day 7 of gestation	**Study No.** 8291598
Species/Strain: Rat / Sprague-Dawley	**Day of Mating:** Day 0 of gestation	
Initial Age: 12 weeks	**Day of C-Section:** Gestation Day 13	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: 13 January 2014	**Administration:** Oral Gavage	
Special Features: None	**Vehicle/Salt Form:** 0.05 M HCl in sterile water at final pH of 1.35 to 1.80 / dihydrochloride monohydrate	
No Observed Adverse Effect Level: F_0 Females, Maternal: 25 mg/kg/day. Fertility: 25 mg/kg/day. F_1 Litters: 5 mg/kg/day		

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**5**	**25**	**100/68[a]**
Females				
Toxicokinetics: AUC_{0-24} (ng•h/mL)	-	73100[b]	142000[c]	462000[d]
No. Evaluated	**22**	**22**	**22**	**22**
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	11
Clinical Observations (Premating)[e]				
Appearance, hunched	0	0	0	2
Appearance, tremors, intermittent, entire body	0	0	0	2
Behavior, ataxic	0	0	0	1
Behavior, decreased reactivity to stimulus	0	0	0	1
Behavior, hypoactive	0	0	0	8
Discharge, genital, red	0	0	0	1
Discharge, nasal, red	0	1	0	4
Excretion, feces, mucoid	0	0	0	1
Excretion, feces, nonformed	0	0	0	1
Eye(s), discharge, brown	0	0	0	2
Eyes, squinting	0	0	0	2

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**5**	**25**	**100/68[a]**
Respiration, audible	0	0	0	1
Respiration, labored	0	0	0	2
Skin and pelage, cold to touch, all feet	0	0	0	7
Skin and pelage, pale, ears	0	0	0	1
Skin and pelage, pale, entire body	0	0	1	7
Skin and pelage, rough hair coat	0	0	1	6
Clinical Observations (Gestation)	-	-	-	-
Premating Body Weight (%)[f]				
Day 3	282 g	-0.7	-2.1	-7.4#H
Day 14	294 g	-0.3	-1.4	-9.2#H
Gestation Body Weight (%)[f]				
GD 0	309 g	-1.3	-3.2	-12.6#H
GD 13	374 g	-0.5	-3.2	-15.2#H
Premating Food Consumption (%)[f]				
Days 0-7	250.2 g	-1.6#R	-5.4	-44.1#R
Days 7-14	249.8 g	+2.1	-0.9	-16.4 *H
Gestation Food Consumption (%)[f]				
GD 3-7	96.2	-2.2	-4.4	-16.0 #H
GD 10-13	76.1	+1.7	-0.5	-17.5 #H
Necropsy Observations				
Lymph node, mesenteric, discolored[g]	0	0	0	9
Pancreas, gelatinous[g]	0	0	0	3
Stomach, discolored[g]	0	0	0	8
Organ Weights (g)				
Uterus				
Mean Absolute	8.2722	8.9481	7.5322	1.7084
Mean Adjusted for Terminal Body Weight	7.9775	8.6831	7.5190	2.7981#H

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	5	25	100/68[a]
Ovaries				
Mean	0.1617	0.1572	0.1521	0.1265
Mean Adjusted for Terminal Body Weight	0.1591	0.1518	0.1515	0.1454
Vagina				
Mean	0.4270	0.3808	0.3791	0.3462
Mean Adjusted for Terminal Body Weight	0.4156	0.3574	0.3767	0.4269
Mean No. Estrous Cycles/14 days	2.3	2.1	2.4	1.3 #R
No. of Pregnant Females	18	22	22	11
No. Aborted or With Total Resorption of Litter	0	0	0	9
Mean No. Corpora Lutea	16.6	17.5	16.4	13.5 *R
Mean No. Implantations	14.4	15.7	15.0	8.8 #R
Mean % Preimplantation Loss	12.7	8.4	8.1	33.2
Mean No. Live Fetuses	13.3	14.7	10.6 +R	0.1 #R
Mean No. Early Resorptions	1.1	1.0	4.4 #R	8.7 #R
Mean No. Late Resorptions	0	0	0	0
Mean % Postimplantation Loss	10.5	5.9	29.1 #R	98.0 #R

[a] During the first 4 days of dosing, 4 MMB-related deaths occurred at 100 mg/kg/day. The dose level for this group was consequently reduced to 68 mg/kg/day beginning on Premating Day 5.

[b] Source: 1668-023.

[c] Source: GWR1004.

[d] Source: 8283314.

[e] Number of animals exhibiting sign.

[f] For controls, group means are shown. For treated groups, percent change from control is shown. Statistical significance is based on actual data and not the percent.

[g] Occurred only in animals found dead.

*H, Dunnett Exact Homogeneous Test significant at 0.05 level; #H, Dunnett Exact Homogeneous Test significant at 0.001 level.

*R, Wilcoxon Rank Sum Test significant at 0.05 level; +R, Wilcoxon Rank Sum Test significant at 0.01 level; #R, Wilcoxon Rank Sum Test significant at 0.001 level.

2.6.7.13. 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

2.6.7.13.1. ラット

2.6.7.13A Report Title: Oral Gavage Embryo-Fetal Development Study for Effects With GS-0387-01 in Sprague-Dawley Rats		**Test Article:** MMB
Design similar to ICH 4.1.3? Yes	**Duration of Dosing:** GD 6-17	**Study No.** 8283315
Species/Strain: Rat / Sprague-Dawley	**Day of Mating:** GD 0	
Initial Age: 11-12 weeks	**Day of C-Section:** GD 21	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: 19 August 2013	**Administration:** Oral Gavage	
	Vehicle/Salt Form: 0.05 M HCl in sterile water at a final pH of 1.35 to 1.80 / dihydrochloride monohydrate	
Special Features: An additional 3 rats/sex in the control group and 9 rats/sex in the treated group were used for toxicokinetic monitoring only.		
No Observed Adverse Effect Level: F_0 Females: 12 mg/kg/day; F_1 Litters: 6 mg/kg/day		

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**2**	**6**	**12**
Dams/Does	**F:25**	**F:25**	**F:25**	**F:25**
Toxicokinetics:				
MMB C_{max} (ng/mL)				
GD 6	NA	863	2720	10300
GD 17	NA	1320	3580	7450
MMB AUC_{0-t} (ng•h/mL)				
GD 6	NA	5030	21900	82300
GD 17	NA	6180	25500	75800
M17 C_{max} (ng/mL)				
GD 6	NA	8.07	7.40	12.8
GD 17	NA	13.4	4.97	26.5
M17 AUC_{0-t} (ng•h/mL)				
GD 6	NA	NC	NC	75.6
GD 17	NA	NC	NC	139

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**2**	**6**	**12**
M19 C_{max} (ng/mL)				
GD 6	NA	107	606	2450
GD 17	NA	202	760	2600
M19 AUC_{0-t} (ng•h/mL)				
GD 6	NA	1010	5200	17100
GD 17	NA	1520	6380	19800
M20 C_{max} (ng/mL)				
GD 6	NA	4.73	4.73	16.1
GD 17	NA	3.33	10.9	30.2
M20 AUC_{0-t} (ng•h/mL)				
GD 6	NA	NC	NC	112
GD 17	NA	NC	NC	152
M21 C_{max} (ng/mL)				
GD 6	NA	NC	16.4	28.2
GD 17	NA	NC	6.50	28.6
M21 AUC_{0-t} (ng•h/mL)				
GD 6	NA	NC	91.8	157
GD 17	NA	NC	NC	173
No. Pregnant	**25**	**25**	**25**	**25**
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
No. Aborted or With Total Resorption of Litter	0	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-
Body Weight (%)[a]				
GD 6	258	+0.8	0.0	+0.8
GD 12	294	+1.4	-0.7	0.0
GD 18	348	+1.7	-1.1	-2.6
Body Weight (%)[a]				
GD 4-21	129.9	+2.0	-5.5	-9.6*H

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**2**	**6**	**12**
Food Consumption (%)[a]				
GD 6-8	124.2	+2.2	-3.9	-0.3
GD 12-14	137.6	-0.4	-6.3	-5.8
GD 16-18	148.4	+2.0	-6.1	-4.6
Necropsy Observations	-	-	-	-
Mean No. Corpora Lutea	12.8	13.4	12.9	13.5
Mean No. Implantations	12.3	12.4	12.1	12.4
Mean % Preimplantation Loss	4.0	5.7	6.1	7.8
Litters				
No. Litters Evaluated	**25**	**25**	**25**	**25**
No. Live Fetuses	11.6	11.8	11.9	9.4*R
Mean No. Resorptions	0.7	0.8	0.2	3.0
Mean % Postimplantation Loss	5.6	5.8	1.6	25.6#R
Adjusted Mean Fetal Body Weight (g)	5.86	5.76	5.65*H	5.32#H
Percent Males	49.9	45.3	46.8	59.7*R
Fetal Anomalies				
Gross External	-	-	-	-
Visceral Anomalies	-	-	-	-
Skeletal Anomalies				
Supernumerary rib (% fetal)	3.81	2.80	7.33	27.15
Presacral vertebra (% fetal)	0.00	0.00	0.67	3.93

[a] For controls, group means are shown. For treated groups, percent change from control is shown. Statistical significance in based on actual data and not on the percent.

-, No noteworthy findings.

*H, Dunnett Exact Homogeneous Test significant at 0.05 level; #H, Dunnett Exact Homogeneous Test significant at 0.001 level.

*R, Wilcoxon Rank Sum Test significant at 0.05 level; #R, Wilcoxon Rank Sum Test significant at 0.001 level.

2.6.7.13.2. ウサギ

2.6.7.13B Report Title: Oral Gavage Study for Embryo-Fetal Development and Toxicokinetics With GS-0387-01 in Rabbits		**Test Article:** MMB
Design similar to ICH 4.1.3? Yes	**Duration of Dosing:** GD 7-20	**Study No.** 8283318
Species/Strain: Rabbit / New Zealand White	**Day of Mating:** GD 0	
Initial Age: 6 months	**Day of C-Section:** GD 29	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: 07 October 2013	**Administration:** Oral Gavage	
	Vehicle/Salt Form: 0.05 M HCl in sterile water at a final pH of 1.35 to 1.80 /dihydrochloride monohydrate	
Special Features: An additional 3 rabbits/sex/group were used for toxicokinetic monitoring only.		
No Observed Adverse Effect Level: F_0 Females: 30 mg/kg/day; F_1 Litters: 60 mg/kg/day		

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**7.5**	**30**	**60**
Dams/Does	**F:20**	**F:20**	**F:20**	**F:20**
Toxicokinetics:				
MMB C_{max} (ng/mL)				
GD 7	NA	34.7	1230	2620
GD 20	NA	21.6	312	994
MMB AUC_{0-t} (ng•h/mL)				
GD 7	NA	67.6	3480	11800
GD 20	NA	35.2	543	4100
M19 C_{max} (ng/mL)				
GD 7	NA	52.1	365	705
GD 20	NA	45.4	171	364
M19 AUC_{0-t} (ng•h/mL)				
GD 7	NA	259	1950	4790
GD 20	NA	226	861	3620
M21 C_{max} (ng/mL)				
GD 7	NA	NC	57.2	119
GD 20	NA	NC	27.3	60.7

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**7.5**	**30**	**60**
M21 AUC_{0-t} (ng•h/mL)				
GD 7	NA	NC	136	490
GD 20	NA	NC	41.5	310
No. Pregnant	**19**	**20**	**20**	**19**
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	1
No. Aborted or With Total Resorption of Litter	0	0	0	1
Clinical Observations				
Excretion, feces, discolored	0	0	0	3
Excretion, feces, few	2	1	1	12
Excretion, feces, none	0	1	0	1
Excretion, feces nonformed	0	0	0	1
Excretion, feces, small	0	1	0	3
Body Weight Gain (%)[a]				
GD 7-21	187.8	+9.85	+27.3*R	-52.4
GD 21-29	172.4	+14.2	+16.5	+13.3
Food Consumption (%)[a]				
GD 11-12	125.9	+4.2	+10.8	-22.0+H
GD 12-13	119.6	-0.7	+12.9*r	-30.9*R
GD 13-14	117.8	+5.9	+11.5	-41.3+R
GD 14-15	118.1	+5.6	+15.7+R	-44.7+R
GD 15-16	120.4	+6.9	+13.5*R	-36.0*R
GD 16-17	126.4	+4.0	+10.4	-29.3*R
GD 17-18	131.4	+1.6	+5.6	-31.6+R
GD 18-19	135.6	-1.7	+2.1	-30.3+R
GD 19-20	135.8	+1.7	+0.1	-26.7+R
GD 20-21	131.8	+0.4	+3.9	-20.3*R

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**7.5**	**30**	**60**
Necropsy Observations	-	-	-	-
Mean No. Corpora Lutea	9.9	9.9	9.8	10
Mean No. Implantations	9.1	8.7	8.6	9.4
Mean % Preimplantation Loss	7.4	11.0	12.7	6.0
Litters				
No. Litters Evaluated	**25**	**25**	**25**	**25**
No. Live Fetuses	8.2	8.4	8.6	8.6
Mean No. Resorptions	0.9	0.4	0	0.8
Mean % Postimplantation Loss	9.8	3.8	0	8.6
Adjusted Mean Fetal Body Weight (g)	40.7	42.7	42.2	37.9*H
Percent Males	44.1	50.6	41.3	53.3
Fetal Anomalies:				
Gross External	-	-	-	-
Visceral Anomalies	-	-	-	-
Skeletal Anomalies				
Supernumerary rib (% fetal)	55.98	58.47	52.51	56.69
Presacral vertebra (% fetal)	10.37	9.44	12.03	16.24

[a] For controls, group means are shown. For treated groups, percent change from control is shown. Statistical significance in based on actual data and not on the percent.

-, No noteworthy findings.

*H, Dunnett Exact Homogeneous Test significant at 0.05 level; #H, Dunnett Exact Homogeneous Test significant at 0.001 level.

*R, Wilcoxon Rank Sum Test significant at 0.05 level; #R, Wilcoxon Rank Sum Test significant at 0.001 level.

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

2.6.7.14A Report Title: Oral Gavage Study for Effects on Pre- and Postnatal Development, Including Maternal Function With GS-0387-01 in Sprague-Dawley Rats		**Test Article:** MMB
Design similar to ICH 4.1.2? Yes	**Duration of Dosing:** GD 6 to LD 20	**Study No.** 8307965
Species / Strain: Rat / Sprague-Dawley	**Day of Mating:** GD 0	
Initial Age: 10 to 12 weeks	**Day of F_1 C-Section:** GD 13	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: 05 September 2014	**Administration:** Oral Gavage	
Special Features: None	**Vehicle/Salt Form:** 0.05 M HCl in sterile water at a final pH of 1.35 to 1.80 /dihydrochloride monohydrate	
No Observed Adverse Effect Level: F_0 Females: 6 mg/kg/day; F_1 Litters: 2 mg/kg/day		

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**2**	**6**	**12**
F_0 Females	**F:24**	**F:24**	**F:24**	**F:24**
Toxicokinetics (LD10):				
MMB C_{max} (ng/mL)	NA	723	3360	4230
MMB AUC_{0-24} (ng•h/mL)	NA	3320	13900	35700
M19 C_{max} (ng/mL)	NA	54.0	224	470
M19 AUC_{0-24} (ng•h/mL)	NA	312	1460	4960
M21 C_{max} (ng/mL)	NA	NC	12.4	20.2
M21 AUC_{0-t} (ng•h/mL)	NA	NC	NR	143
No. Pregnant	**23**	**23**	**22**	**23**
No. Died or Sacrificed Moribund	0	1	0	0
No. Aborted or With Total Resorption of Litter	0	0	1	0
Clinical Observations	-	-	-	-
Gestation Body Weight (g)[a]				
GD 14	300	-2	-8	-12
GD 16	318	-5	-11	-20+H
GD 18	346	-4	-12	-28#H
GD 20	369	-7	-14	-33#H

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**2**	**6**	**12**
Lactation Body Weight	-	-	-	-
Gestation Food Consumption (g)[a]				
GD 12-14	104.2	-2.4	-5.4	-7.8
GD 14-16	110.2	-6.2	-4.6	-13.2*H
GD 16-18	110.7	-1.3	-4.7	-12.4
GD 18-20	101.2	-6.3	-2.6	-6.6
Lactation Food Consumption (g)[a]				
LD 0-4	125.6	-0.4	+2.3	-12.2
LD 4-7	121.3	+3.4	+2.6	-10.7*R
LD 7-10	154.4	+2.4	-0.9	-20.8+R
LD 10-14	216.5	+4.7	-7.6	-33.8+R
LD 14-17	186.1	-2.0	-16.0*R	-41.7#R
LD 17-21	260.0	-1.7	-19.1	-49.4+R
Mean Duration of Gestation (days)	22.8	23.1*R	23.1*R	23.4#R
Necropsy Observations	-	-	-	-
F_0 Litters: (Preweaning)				
No. Litters Evaluated	**23**	**23**	**22**	**22**
Mean No. of Implantations	12.61	12.43	13.00	12.68
Mean No. Pups/Litter	12.09	11.74	11.05	8.68#R
Mean No. Liveborn Pups/Litter	12.04	11.65	10.95	8.41#R
No. of Litters With Stillborn Pups	1	2	2	6
Postnatal Survival to Day 4 (%)	99	96	92	96
Postnatal Survival to Weaning (%)	96	90	82	85
No. of Total Litter Losses	0	0	1	0
Pup Sex Ratios (% male)	56	51	46	55
Pup Clinical Signs	-	-	-	-
Pup Necropsy Observations	-	-	-	-

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**2**	**6**	**12**
F_1 Males: (Postweaning)				
No. Evaluated Postweaning	**23**	**22**	**21**	**21**
No. Died or Sacrificed Moribund	-	-	-	-
Clinical Observations	-	-	-	-
Necropsy Observations	-	-	-	-
Body Weight Change (g)[a]				
Maturation Day 14	214	-4	-4	-19
Maturation Day 28	345	-6	-3	-30*H
Maturation Day 42	444	-11	-6	-40+H
Maturation Day 56	510	-11	-5	-44+H
Food Consumption (g)[a]				
Maturation Day 7-14	498.6	-41.0	+3.0	-76.8
Maturation Day 21-28	588.3	-36.7	+23.1	-95.5*H
Maturation Day 35-42	608.1	-40.6	+23.9	-94
Maturation Day 49-56	617.8	-27.9	+33.2	-91.7
Preputial Separation	-	-	-	-
Sensory Function (Acoustic Startle)	-	-	-	-
Motor Activity	-	-	-	-
Learning and Memory (Morris Water Maze)	-	-	-	-
No. of Males That Mated	**20**	**17**	**18**	**19**
No. of Fertile Males	20	15	18	18
F_1 Females: (Postweaning)				
No. Evaluated Postweaning	**22**	**22**	**20**	**22**
No. Died or Sacrificed Moribund	-	-	-	-
Clinical Observations	-	-	-	-
Necropsy Observations	-	-	-	-

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**2**	**6**	**12**
Premating Body Weight Change (g)[a]				
Maturation Day 14	172	-4	-7	-15+H
Maturation Day 28	235	-8	-14	-23#H
Maturation Day 42	275	-8	-15	-23+H
Maturation Day 56	301	-10	-18	-24*H
Gestation Body Weight Change (g)[a]				
GD 0	305	-10	-16	-25
GD 4	332	-9	-18	-25*H
GD 8	351	-8	-21	-24*H
GD 13	375	-4	-19	-22
Premating Food Consumption (g)[a]				
Maturation Day 7-14	366.1	-15.6	+4.5	-31.2
Maturation Day 21-28	397.0	-23.4	+0.9	-36.1
Maturation Day 35-42	407.9	-13.8	+4.7	-33.8
Maturation Day 49-56	418.0	-23.4	+22.3	-22.1
Gestation Food Consumption	-	-	-	-
Mean Age of Vaginal Patency (days)	-	-	-	-
Sensory Function (Acoustic Startle)	-	-	-	-
Motor Activity	-	-	-	-
Learning and Memory (Morris Water Maze)	-	-	-	-
No. of Females Confirmed to Have Mated	**21**	**19**	**20**	**22**
No. of Pregnant Females	21	17	19	20
Mean No. Corpora Lutea	17.0	16.7	17.2	16.4
Mean No. Implantations	15.7	15.0	15.8	15.0
Mean % Preimplantation Loss	8.0	10.6	7.6	9.1

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**2**	**6**	**12**
F_1 Litters				
No. of Litters Evaluated	**20**	**15**	**19**	**18**
Mean No. Live Fetuses/Litter	15.3	14.4	15.2	14.1
Mean No. Early Resorptions/Litter	0.4	0.6	0.6	0.9
Mean No. Late Resorptions/Litter	0	0	0	0
Mean % Postimplantation Loss	2.5	3.7	4.1	7.2

[a] For controls, group means are shown. For treated groups, absolute differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data and not on the absolute difference from controls.

*H, Dunnett Exact Homogeneous Test significant at 0.05 level; +H, Dunnett Exact Homogeneous Test significant at 0.01 level; #H, Dunnett Exact Homogeneous Test significant at 0.001 level.

*R, Wilcoxon Rank Sum Test significant at 0.05 level; +R, Wilcoxon Rank Sum Test significant at 0.01 level; #R, Wilcoxon Rank Sum Test significant at 0.001 level.

-, No noteworthy findings.

2.6.7.15. 新生児を用いた試験

2.6.7.15.1. 重要な試験以外の試験

Test Article: MMB

Species/Strain	Administration Method (Vehicle/Formulation /Salt Form)	Dosing Period	Doses (mg/kg)	Sex and No. Per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Rat / Sprague-Dawley	Oral Gavage (0.024 M HCl in sterile water / dihydrochloride monohydrate)	PND 7 to 21	3, 10, 30	Main: 5/sex TK: 9/sex control; 36/sex treated	3 mg/kg/day (NOAEL): PND 21 AUC_{0-24} (ng·h/mL) = 9370 MMB, 5520 M19, 31.8 M21. 10 mg/kg/day: Decreased BW gain PND 7 to 21 (up to 17.8% decreased from control), decreased WBC count, spleen and thymus had decreased weights with decreased lymphocytes, hypocellular bone marrow. 30 mg/kg/day: Decreased BW gain PND 7 to 21 (up to 37.5% decreased from control), decreased reticulocytes and WBC count, spleen and thymus had decreased weights with decreased lymphocytes, hypocellular bone marrow.	WIL-604183

2.6.7.15.2. 重要な試験

2.6.7.15.2A Report Title: An Oral (gavage) Toxicity and Toxicokinetic Study of GS-0387-01 in Juvenile Sprague-Dawley Rats		**Test Article:** MMB
Species/Strain: Rat / Sprague-Dawley	**Dosing Period:** PND 7 to 56	**Study No.** WIL-604256
Date of First Dose: 10 March 2009	**Duration of Postdose:** 10 Weeks	
No Observed Adverse Effect Level: Juvenile toxicity: 3 mg/kg/day (males and females) Reproductive toxicity: 10 mg/kg/day (males); 3 mg/kg/day (females) Neurobehavioral toxicity: 3 mg/kg/day (males); 10 mg/kg/day (females)	**Administration:** Oral gavage	**GLP Compliance:** Yes
	Vehicle/Salt Form: 0.024 M HCl in sterile water, pH 1.35 to 1.80 dihydrochloride monohydrate	
	Special Features: An additional 6 rats/sex (control) and 24 rats/sex (each MMB-treated group) were used for toxicokinetic monitoring only. Recovery animals were mated with naïve males or females at the end of the recovery period for reproductive performance assessments.	

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**1**		**3**		**10**	
Number of Animals (TK)	**M:6**	**F:6**	**M:24**	**F:24**	**M:24**	**F:24**	**M:24**	**F:24**
Toxicokinetics:								
MMB C_{max} (ng/mL)								
PND 7	NA	NA	467	377	1500	1220	2910	4150
PND 56	NA	NA	250	393	1330	1580	8500	5900
MMB AUC_{0-24} (ng·h/mL)								
PND 7	NA	NA	5000	4940	18000	17900	43200	61500
PND 56	NA	NA	1770	1590	7940	7650	58500	37300
M19 C_{max} (ng/mL)								
PND 7	NA	NA	68.8	59.2	198	229	923	1190
PND 56	NA	NA	35.9	69.0	173	255	1050	927
M19 AUC_{0-24} (ng·h/mL)								
PND 7	NA	NA	1150	1010	3730	4300	17100	19000
PND 56	NA	NA	368	559	1490	2200	9130	9530

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**1**		**3**		**10**	
M21 C_{max} (ng/mL)								
PND 7	NA	NA	NC	0.799	2.20	1.80	10.9	15.5
PND 56	NA	NA	4.47	5.72	9.03	10.5	44.3	49.6
M21 $AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)								
PND 7	NA	NA	NC	NC	NC	34.8	166	203
PND 56	NA	NA	39.5	23.3	57.4	48.9	411	287
Number of Animals (Main)	**M:30**	**F:30**	**M:30**	**F:30**	**M:30**	**F:30**	**M:30**	**F:30**
Noteworthy Findings:								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	1[a]	1[a]	0
Body Weight (%)[b]	331 g	219 g	-1	-2	-2	-6*H	-9 +H	-9 +H
Food Consumption (g/animal/day) (%)[c]	20.3 g	15.4 g	-1	-1	-2	-3	-7	-5
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Eye Opening	-	-	-	-	-	-	-	-
Pupillary Reflex	-	-	-	-	-	-	-	-
Tibial Length (mm) PND 57	41.4	38.0	41.3	38.3	41.4	38.1	40.9	37.6
Vaginal Patency	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-
Balanopreputial Separation (PND)	44.4	NA	44.0	NA	43.5	NA	46.3*H	NA
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-
Functional Observational Battery	-	-	-	-	-	-	-	-
Sensory Function (Acoustic Startle)	-	-	-	-	-	-	-	-
Motor Activity	-	-	-	-	-	-	-	-
Learning (BWM)	-	-	-	-	-	-	-	-
Memory (BWM)	-	-	-	-	-	-	+	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**1**		**3**		**10**	
Serum Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights (%)[d]								
Pituitary	-	0.015 g	-	-7	-	-16*H	-	-19*H
Spleen	0.68 g	0.54 g	-6	-2	-7	-9	-13*H	-19*H
Testis (Left)	1.53 g	NA	-3	NA	-4	NA	-11+H	NA
Testis (Right)	1.54 g	NA	-3	NA	-4	NA	-11*H	NA
Femur Length (mm) PND 57	34.30	31.86	34.00	31.92	34.08	31.28	33.49*H	30.63+H
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Postdose Evaluation								
Number Examined	**M:20**	**F:20**	**M:20**	**F:20**	**M:20**	**F:20**	**M:20**	**F:20**
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	1[a]	0	0	0	0
Organ Weights (%)[d]								
Kidney	4.62 g	-	0	-	-6	-	-9*H	-
Pituitary	-	0.021 g	-	+4	-	-13	-	-3
Spleen	1.04 g	-	-11	-	-11	-	-14*H	-
Femur Length (mm)	43.64	-	43.63	-	43.37	-	42.54+H	-

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**1**		**3**		**10**	
Reproductive Endpoints[e]	-	-	-	-	-	-	-	-
Intra-uterine Survival of Embryos								
Naïve females paired with treated males	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-
Treated females paired with naïve males								
Viable Embryos/Litter	NA	14.9	NA	14.1	NA	13.8	NA	12.8

[a] Cause of death was undetermined but considered not MMB-related.

[b] At end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, the percent difference from controls is shown. Statistical significance is based on absolute values and not percent difference.

[c] PND 21 to 56. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

[d] For controls, group mean absolute weights are shown. For treated groups, the percent difference from control is shown. Statistical significance is based on actual data (not percent differences). Both absolute and relative weights differed from control in the direction indicated.

[e] Precoital intervals, estrous cycle lengths, and mating, fertility and copulation/conception indices.

*H, Dunnett Exact Homogeneous Test significant at 0.05 level; +H, Dunnett Exact Homogeneous Test significant at 0.01 level.

2.6.7.16. 局所刺激性試験

Test Article: MMB

Type of Study	Species/Strain	Administration (Vehicle/ Salt Form)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Sex and No. Per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Skin Corrosion Assay	Corrositex	In vitro (not reported / dihydrochloride monohydrate)	240-minute exposure	~0.5 g neat	NA	Breakthrough was observed at 2 hours 21 minutes and 30 seconds. MMB was considered corrosive and classified under UN Packing Group III; UN GHS Category 1C (corrosive).	41501205[a]
Bovine Corneal Opacity and Permeability	Bovine cornea	In vitro (0.9% saline / dihydrochloride monohydrate)	Opacity assessment (at 4 hours) followed by permeability assessment (90 minutes)	20% w/w	3 Corneas	In Vitro Irritancy Score = 142.0 ± 20.5; classed as Category 1 (severe eye irritant).	EUN0031[a]
Phototoxicity	Fibroblasts / Mouse / BALB/c 3T3 cells	In vitro (1% DMSO/DPBS, pH of 7.0-7.3 / dihydrochloride monohydrate)	90 minutes	0, 3.2 µg/mL	96-well plate, 2 definitive assays	MMB demonstrated no phototoxic potential.	20054979[a]

a Indicates GLP compliant.

2.6.7.17. その他の試験

2.6.7.17.1. In Vitro 試験

Test Article: MMB

Type of Study	Species/Strain	Administration (Vehicle)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study Number
Bacterial Reverse Mutation Assay (GS-642109)	*S. typhimurium* and *E. coli*	In vitro (DMSO)	52 ± 4 hours	5–5000 µg/plate	GS-642109 positive in *E. coli* strain WP2uvrA in the absence and presence of S9 at the highest dose tested (5000 µg/plate). GS-642109 negative in all *S. typhimurium* tester strains tested up to 5000 µg/plate in the presence and absence of S9.	8340103[a]
Bacterial Reverse Mutation Assay (GS-652153, GS-652157)	*S. typhimurium* and *E. coli*	In vitro (DMSO)	52 ± 4 hours	5–5000 µg/plate	GS-652153 positive in *S. typhimurium* strain TA98 in the presence of S9 when tested up to 5000 µg/plate. GS-652157 positive in *S. typhimurium* strains TA98 and TA100 in the presence of S9 when tested up to 5000 µg/plate.	8347289[a]
Bacterial Reverse Mutation Assay (GS-030865, GS-072388, GS-713902)	*S. typhimurium* and *E. coli*	In vitro (DMSO)	66 hours	GS-030865 15-5000 µg/plate GS-072388 50-5000 µg/plate GS-713902 15-1500 µg/plate	GS-030865 and GS-072388 negative in all strains up to 5000 µg/plate. GS-713902 positive in *S. typhimurium* strains TA1535, TA1537, and TA100 in the absence of S9.	YDF0001[a]

[a] Indicates GLP compliant.

2.6.7.17.2. In Vivo 試験

Test Article: MMB

Type of Study	Species / Strain	Administration (Vehicle/Salt Form)	Duration of Dosing	Dose (mg/kg)	Sex and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Antigenicity (Local lymph node assay)	Mouse / CBA/Ca	Topical (Acetone: olive oil [4:1 v/v] / dihydrochloride monohydrate)	3 days	0, 10, 25, 50% (w/v)	5F	MMB did not show potential to induce skin sensitization.	EUN0029[a]
Impurities Repeat-dose toxicity	Rat / Sprague-Dawley	Oral Gavage (0.05 M HCl in sterile water at final pH of 1.35 to 1.80 / dihydrochloride monohydrate)	25 days (TK animals) or 29 days (main study animals)	0 (vehicle), 17 (Lot No. [redacted]; 96.1% pure), 10 and 17 (Lot No. [redacted]; 91.9% pure)	10/sex/group for main study 9/sex/group (3/sex controls) for TK	No adverse effects for either lot. TK exposure parameters generally similar between lots.	8287290[a]
Impurities Repeat-dose toxicity	Rat / Sprague-Dawley	Oral Gavage (0.05 M HCl in sterile water at final pH of 1.35 to 1.80 / dihydrochloride monohydrate)	28 days	0 (vehicle), 17 (Lot No. [redacted]; 99.5% pure), 10 and 17 (Lot No. [redacted]; 91.1% pure)	10/sex/group for main study 9/sex/group (3/sex controls) for TK	No discernible differences between the 2 lots of MMB on mortality, clinical observations, body weight, food consumption, ophthalmic examinations, and clinical and anatomic pathology findings. TK exposure parameters generally similar between lots.	8336287[a]

[a] Indicates GLP compliant.