目次

表一覧
略号及び用語の定義
2.6.6　毒性試験の概要文
2.6.6.1　まとめ
2.6.6.2　単回投与毒性試験
2.6.6.3　反復投与毒性試験
2.6.6.3.1　CByB6F1/Tg rasH2ヘミ接合マウスを用いた28日間反復経口投与毒性試験（TT #[redacted]-9012）
2.6.6.3.2　雄 SD ラットを用いた探索的28日間反復経口投与毒性試験（65日間の回復期間を含む）（TT #[redacted]-7823）
2.6.6.3.3　Wistar Han ラットを用いた探索的28日間反復経口投与毒性及び TK 試験（TT #[redacted]-1032）
2.6.6.3.4　SD ラットを用いた28日間反復経口投与毒性試験（28日間及び90日間の回復期間を含む）（TT #[redacted]-7820）
2.6.6.3.5　SD ラットを用いた13週間反復経口投与毒性試験（28日間及び26週間の回復期間を含む）（TT #[redacted]-7809）
2.6.6.3.6　Wistar Han ラットを用いた13週間反復経口投与毒性試験　（TT #[redacted]-9011）
2.6.6.3.7　ビーグル犬を用いた28日間反復経口投与毒性試験（28日間及び90日間の回復期間を含む）（TT #[redacted]-7821）
2.6.6.3.8　ビーグル犬を用いた13週間反復経口投与毒性試験（28日間の回復期間を含む）（TT #[redacted]-7808）
2.6.6.4　遺伝毒性試験
2.6.6.4.1　In vitro 遺伝毒性試験
2.6.6.4.1.1　細菌を用いた復帰突然変異試験（非 GLP 試験）（TT #[redacted]-7842）
2.6.6.4.1.2　細菌を用いた復帰突然変異試験（GLP 試験）（TT #[redacted]-7825）
2.6.6.4.1.3　哺乳類細胞である TK6細胞を用いた in vitro 小核試験（TT #[redacted]-7843）
2.6.6.4.1.4　哺乳類細胞であるヒト末梢血リンパ球を用いた in vitro 小核試験（TT #[redacted]-7826）
2.6.6.4.2　In vivo 遺伝毒性試験
2.6.6.4.2.1　ラットを用いた2日間経口投与による in vivo 哺乳類骨髄赤血球小核試験（TT #[redacted]-9018）
2.6.6.5　がん原性試験
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
2.6.6.6.2　胚・胎児発生に関する試験
2.6.6.6.2.1　ラットを用いた経口投与胚・胎児発生毒性及びトキシコキネティクス予備試験（TT#[redacted]-7004）

2.6.6.6.2.2 非妊娠ウサギを用いた9日間経口投与による探索的忍容性及び TK 試験（TT#[redacted]-7003）
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
2.6.6.6.4 新生児（幼若動物）を用いた試験
2.6.6.7 局所刺激性試験
2.6.6.7.1 ウシ摘出角膜の混濁度及び透過性試験（TT #[redacted]-7811）
2.6.6.7.2 MatTek EpiDerm™ MTT 皮膚刺激性試験（TT #[redacted]-7812）
2.6.6.8 その他の毒性試験
2.6.6.8.1 抗原性／免疫原性試験
2.6.6.8.2 免疫毒性試験
2.6.6.8.2.1 マウス局所リンパ節試験（TT #[redacted]-7813）
2.6.6.8.3 作用機序
2.6.6.8.4 依存性
2.6.6.8.5 代謝物
2.6.6.8.6 不純物
2.6.6.8.6.1 不純物評価
2.6.6.8.6.2 SD ラットを用いた13週間（BID）反復経口投与不純物評価試験（TT #[redacted]-9010）
2.6.6.8.7 その他の試験
2.6.6.8.7.1 光毒性試験
2.6.6.8.7.2 予備 TK 試験
2.6.6.9 考察及び結論
2.6.6.10 参考文献

表一覧

表 2.6.6-1　MK-6482の毒性評価プログラム
表 2.6.6-2　CByB6F1/Tg rasH2ヘミ接合マウスを用いた28日間反復経口投与毒性試験：試験デザイン（TT #[redacted]-9012）
表 2.6.6-3　MK-6482を経口投与したマウスにおける MK-6482平均血漿中 TK パラメータ（TT #[redacted]-9012）：試験28日（雌雄合算値）
表 2.6.6-4　MK-6482の雄 SD ラットにおける28日間反復経口投与毒性試験（65日間の回復期間を含む）：試験デザイン（TT #[redacted]-7823）
表 2.6.6-5　MK-6482を経口投与した雄ラットにおける MK-6482平均血漿中 TK パラメータ（TT #[redacted]-7823）：試験1、14及び28日
表 2.6.6-6　MK-6482を経口投与した雄ラットにおける PT3317平均血漿中 TK パラメータ（TT #[redacted]-7823）：試験1、14及び28日
表 2.6.6-7　MK-6482を経口投与したラットにおける MK-6482平均血漿中 TK パラメータ（TT #[redacted]-1032）：試験14日
表 2.6.6-8　MK-6482を経口投与したラットにおける MK-6482平均血漿中 TK パラメータ（TT #[redacted]-1032）：試験28日
表 2.6.6-9　SD ラットを用いた28日間反復経口投与毒性試験（28日及び90日間の回復期間を含む）：試験デザイン（TT #[redacted]-7820）
表 2.6.6-10　MK-6482を経口投与したラットにおける MK-6482平均血漿中 TK パラメータ（TT #[redacted]-7820）：試験1日及び28日（雌雄合算値）
表 2.6.6-11　MK-6482を経口投与したラットにおける PT3317平均血漿中 TK パラメータ（TT #[redacted]-7820）：試験1日及び28日（雌雄合算値）
表 2.6.6-12　SD ラットを用いた13週間反復経口投与毒性試験（28日間及び26週間の回復期間を含む）：試験デザイン（TT #[redacted]-7809）
表 2.6.6-13　MK-6482を経口投与したラットにおける MK-6482の平均血漿中 TK パラメータ（TT #[redacted]-7809）：試験1日及び91日（雌雄合算値）
表 2.6.6-14　MK-6482を経口投与したラットにおける PT3317平均血漿中 TK パラメータ（TT #[redacted]-7809）：試験1日及び91日（雌雄合算値）
表 2.6.6-15　Wistar Han ラットを用いた13週間反復経口投与毒性試験：試験デザイン（TT #[redacted]-9011）本試験
表 2.6.6-16　Wistar Han ラットを用いた13週間反復経口投与毒性試験：試験デザイン（TT #[redacted]-9011）TK 試験
表 2.6.6-17　MK-6482を経口投与したラットにおける MK-6482及び PT3317の平均血漿中 TK パラメータ（TT #[redacted]-9011）：試験91日
表 2.6.6-18　ビーグル犬を用いた28日間反復経口投与毒性試験（28日間及び90日間の回復期間を含む）：試験デザイン（TT #[redacted]-7821）
表 2.6.6-19　MK-6482を経口投与したビーグル犬における MK-6482の平均血漿中 TK パラメータ（TT #[redacted]-7821）：試験1日及び28日（雌雄合算値）

表 2.6.6-20　MK-6482を経口投与したビーグル犬における PT3317の
平均血漿中 TK パラメータ（TT #[redacted]-7821）：試験1日及び28日（雌雄合算値）
表 2.6.6-21　ビーグル犬を用いた13週間反復経口投与毒性試験
（28日間の回復期間を含む）：試験デザイン（TT #[redacted]-7808）
表 2.6.6-22　MK-6482を経口投与したビーグル犬における MK-6482の
平均血漿中 TK パラメータ（TT #[redacted]-7808）：試験1日及び91日（雌雄合算値）
表 2.6.6-23　MK-6482を経口投与したビーグル犬における PT3317の
平均血漿中 TK パラメータ（TT #[redacted]-7808）：試験1日及び91日（雌雄合算値）
表 2.6.6-24　沈殿及び細胞毒性の結果（TT #[redacted]-7842）
表 2.6.6-25　細菌を用いた復帰突然変異試験の結果（TT #[redacted]-7842）
表 2.6.6-26　TK6細胞を用いた in vitro 小核試験の結果　（TT #[redacted]-7843）
表 2.6.6-27　MK-6482を経口投与したラットにおける平均血漿中 TK パラメータ（TT
#[redacted]-7004）：妊娠7日
表 2.6.6-28　MK-6482を経口投与した非妊娠ウサギにおける
MK-6482の平均血漿中 TK パラメータ（TT #[redacted]-7003）：試験1日
表 2.6.6-29　MK-6482を経口投与した非妊娠ウサギにおける
PT3317の平均血漿中 TK パラメータ（TT #[redacted]-7003）：試験1日
表 2.6.6-30　MK-6482の不純物及びその用量比
表 2.6.6-31　SD ラットを用いた13週間反復経口投与不純物評価試験
：試験デザイン（TT #[redacted]-9010）
表 2.6.6-32　MK-6482を経口投与したラットにおける
平均血漿中 TK パラメータ（TT #[redacted]-9010）：試験13週
表 2.6.6-33　MK-6482を3日間経口投与した有色ラットにおける光毒性及び TK 評価：試験デ
ザイン
表 2.6.6-34　MK-6482を経口投与した雄マウスにおける
平均血漿中 TK パラメータ（TT #[redacted]-1033）：試験1日
表 2.6.6-35　SD ラット及び Wistar Han ラットを用いた探索的単回経口投与 TK 試験：試験デ
ザイン（TT #[redacted]-1023）
表 2.6.6-36　100 mg/kg の MK-6482を経口投与したラットにおける
平均血漿中 TK パラメータ（TT #[redacted]-1023）：試験1日
表 2.6.6-37　300 mg/kg の MK-6482を経口投与したラットにおける
平均血漿中 TK パラメータ（TT #[redacted]-1023）：試験1日
表 2.6.6-38　MK-6482の曝露量比

略号及び用語の定義

略号	定義	
APTT	Activated partial thromboplastin time	活性化部分トロンボプラスチン時間
ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator	アリール炭化水素受容体核内輸送体
AUC	Area under the plasma concentration-time curve	血漿中濃度-時間曲線下面積
AUC0-12	Area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 12 hours	投与後0時間から12時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積
AUC0-24	Area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 24 hours	投与後0時間から24時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積
AUC0-inf	Area under the plasma concentration-time curve from time 0 to infinity	投与後0時間から無限大時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積
BCS	Biopharmaceutics Classification System	—
BID	Twice daily	1日2回
BrdU	5-bromo-2'-deoxy-uridine	5-ブロモ-2'-デオキシウリジン
CBPI	Cytokinesis-blocked proliferation index	細胞分裂阻害増殖指数
Cmax	Maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
DMF	N,N-Dimethylformamide	ジメチルホルムアミド
DMSO	Dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
ET_{50}	The time of exposure needed for a test article to reduce the viability of treated tissues to 50% of control tissues	被験物質処理組織の生存率が対照組織と比較して50%となる曝露時間
FOB	Functional Observational Battery	機能観察総合評価
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
HIF	Hypoxia-inducible factor	低酸素誘導因子
HIF-1α	Hypoxia-inducible factor-1 alpha	低酸素誘導因子-1α
HIF-1β	Hypoxia-inducible factor-1 beta	低酸素誘導因子-1β
HIF-2α	Hypoxia-inducible factor-2 alpha	低酸素誘導因子-2α
HPMCAS-HF	Hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate-HF	ヒドロキシプロピルメチルセルロース酢酸エステルコハク酸エステル-HF
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
LNC	Lymph node cells	リンパ節細胞
MC	Methylcellulose	メチルセルロース
MTD	Maximum tolerated dose	最大耐量
MTT	Methyl thiazole tetrazolium	メチルチアゾールテトラゾリウム
NOAEL	No-observed-adverse-effect level	無毒性量

略号	定義	
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
PAS	Per-ARNT-Sim	—
PK	Pharmacokinetics	薬物動態
PT3317	—	MK-6482のグルクロン酸抱合体
QD	Once daily	1日1回
SD	Sprague Dawley	—
Tmax	Time at maximum plasma concentration	最高濃度到達時間
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
TRIS	Tromethamine	トリスヒドロキシメチルアミノメタン
USA	United States of America	米国
VHL	von Hippel-Lindau	フォン・ヒッペル・リンドウ
w/v	Weight/volume	重量／体積比

2.6.6　毒性試験の概要文

2.6.6.1　まとめ

MK-6482は、HIF-2α に結合し HIF-2α の機能を直接阻害する。MK-6482は「ベルズチファン」の名称で本邦における日本医薬品一般的名称（JAN）に登録済みである。

HIF-1α 及び HIF-2α は腫瘍の低酸素応答経路において主要な働きをする転写因子である。HIF-2α は HIF-1β（別称 ARNT）とヘテロ二量体を形成し、その後、標的遺伝子の低酸素応答領域に結合する。HIF の PAS ドメインは、標的遺伝子の誘導前に必要な HIF-2α と ARNT のヘテロ二量体化に必須である。HIF-2α の PAS-B ドメインには特異的なリガンド結合ポケットが存在することが明らかになっている[4.3: 059L97]。MK-6482はこのポケットに結合し、HIF-2α と ARNT のヘテロ二量体化を阻害することにより、HIF-2α の機能を直接阻害する。非臨床薬理試験では、MK-6482の HIF-2α に対する特異性及び選択性が確認されている。また、マウス異種移植モデルにおいて MK-6482は抗腫瘍効果を示し、0.3 mg/kg BID の用量で経口投与した際、定着した腫瘍はほぼ完全に退縮した。MK-6482は腎細胞癌及び VHL 病関連腫瘍を適応として開発が進められている。

ICH S9（抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン）に準拠して、MK-6482の非臨床毒性試験として反復経口投与毒性試験（ラット及びイヌ、最長13週間）、in vitro 及び in vivo 遺伝毒性試験、ラット胚・胎児発生毒性予備試験、非妊娠ウサギ忍容性試験、ラット光毒性試験を実施した。その後、げっ歯類のがん原性試験の試験デザイン及び用量設定のため、種々の MK-6482の処方を評価する探索的ラット TK 試験及びげっ歯類を用いた毒性試験を実施した。さらに、潜在的な不純物を含む MK-6482の毒性及び TK プロファイルの予備的評価のため、SD ラットを用いた13週間経口投与不純物評価試験を実施した。MK-6482の毒性評価プログラムの概要を[表 2.6.6-1]及び[2.6.7.1 項]に示す。なお、医薬品[redacted]（#[redacted]）にて非臨床試験パッケージに関して相談を実施し、げっ歯類を用いたがん原性試験成績は、試験の結果、特段の懸念が認められない場合には当該試験成績を本邦における MK-6482の承認取得後に提出することを機構と合意しており、承認取得後に提出予定である。

重要な反復投与毒性試験（GLP 原則に準拠）は[redacted], Canada）[redacted]（[redacted] USA）及び[redacted]（[redacted], Canada）、遺伝毒性試験（非 GLP 及び GLP）は[redacted]（[redacted], USA）及び[redacted]（[redacted], Canada）、生殖発生毒性試験（非 GLP）は Merck Research Laboratories（West Point, Pennsylvania, USA）、光毒性試験（GLP）は[redacted]（[redacted], USA）にて実施した。米国及びカナダは OECD 加盟国であるため、OECD データ相互受け入れ制度が適用される。GLP 遵守の陳述書はすべての GLP 試験報告書に含まれている。すべての重要な試験は、同試験内又は同一投与液を用いて同一の用量を投与し本試験と同じ条件下で実施された MK-6482の TK 評価によって支持された[2.6.7.2 項][2.6.7.3 項]。非臨床試験で使用した被験物質のバッチは[2.6.7.4 項]に示した。

ラット及びイヌは現在の臨床試験実施のためのガイダンス［ICH M3（R2）医薬品の臨床試験及

び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス］で認められている動物種である。ラット及びイヌにおいて MK-6482の PK 及び代謝物プロファイルの結果が良好であったため、毒性評価に用いる主要なげっ歯類及び非げっ歯類として両動物種を選択した。さらに、HIF 経路を介した酸素感知の仕組みは進化の過程で種を超えて保存されており[4.3: 05FQDJ]、HIF-2α のアミノ酸配列はヒトとラット又はイヌの間で高度に保存されている（85%を上回る相同性、PubMed Protein Blast Analysis より）[4.3: 05M5ZR]。

ラット（SD 及び Wistar Han）を用いた経口投与毒性試験は MK-6482の2種の異なる処方及び媒体を用いて実施した。初期の SD ラットを用いた毒性試験では MK-6482（[redacted]処方を0.5%MC/0.5%Tween 80水溶液を用いて調製）を BID（12時間間隔）投与した。イヌを用いた毒性試験では、同じ処方及び媒体の MK-6482を QD 投与した。ラットではイヌに比べて MK-6482の半減期が短く、バイオアベイラビリティも低いことから[2.6.4.3.2 項][2.6.4.3.3 項]、SD ラットの試験では BID 投与が選択された。

毒性試験の高用量選択は、使用媒体での MK-6482の調製可能な最高濃度（20 mg/mL）並びに雄ラット探索的毒性試験[2.6.7.6 項]及びイヌ PK 試験[2.6.4.3.3.1 項]の結果に基づいて決定した。SD ラットを用いた探索的反復経口投与試験（非 GLP）では3、10、30及び100 mg/kg BID（6、20、60及び200 mg/kg/日）の用量を28日間投与し、その後65日間の回復期間を設けた。本試験の用量での MK-6482の SD ラットにおける忍容性は良好であったが、200 mg/kg/日群では有害で回復性のない精巣毒性が認められた。また、60及び200 mg/kg/日の用量間で全身曝露は用量比を下回る増加であった（用量は3.3倍の増加に対し、AUC0-24は約1.5倍の増加）。これらの結果から SD ラット28日間反復経口投与毒性試験（GLP）の高用量群として200 mg/kg/日を選択した。イヌでの MK-6482の全身曝露は30及び100 mg/kg/日の用量間で用量比を下回る増加であり、用量では3.3倍の増加に対し、100 mg/kg/日の AUC0-24は30 mg/kg/日と比較して約1.3倍の増加であったことから、30 mg/kg/日以上の用量では意味のある全身曝露の増加は認められなかった。そのため、イヌを用いた28日間反復経口投与毒性試験（GLP）の高用量群として30 mg/kg/日を選択した。SD ラット及びイヌでみられた MK-6482の用量比を下回る曝露は、非線形の吸収及び BCS クラスII化合物（低溶解性及び高膜透過性）として分類される MK-6482の溶解性によるものと考えられた[2.7.1.1.3.1 項]。また、げっ歯類のがん原性試験の試験デザイン及び用量設定のため、異なる処方の MK-6482と種々の媒体の組合せを評価するラット単回経口投与 TK 試験（TT #[redacted]-1023）[2.6.7.17.A 項]を新たに実施した。本試験では、従来使用していた MK-6482の[redacted]又は新しい[redacted]処方を3種類の媒体を用いて、100又は300 mg/kg/日の用量に調製し、投与した。その結果、0.5%（w/v）MC/0.1%（w/v）HPMCAS-HF/20 mM TRIS 水溶液（pH 7.2）を用いて調製した[redacted]処方の MK-6482がラットで最も高い曝露量を示したことから、以降のげっ歯類を用いたがん原性試験の試験デザイン及び用量設定のための毒性試験（TT #[redacted]-1033、TT #[redacted]-9012、TT #[redacted]-1032及び TT #[redacted]-9011）ではこの処方を使用した。

表 2.6.6-1　　MK-6482 の毒性評価プログラム

Duration/ Study Type	Route	Species	Dose Levels (mg/kg/day)	NOAEL (mg/kg/day)	Study No./ GLP Status
Repeat-Dose Toxicity					
28-day toxicity and TK [a]	Oral (gavage)	Mouse / CByB6F1/Tg rasH2	0, 30, 60, 150, 600	Males: 60 Females: ≥600	TT #[redacted]-9012 GLP
Exploratory 28-day toxicity and TK with 65-day recovery period [b, c]	Oral (gavage)	Rat / Sprague Dawley	0, 3, 10, 30, 100 BID (0, 6, 20, 60, 200)	MTD = ≥200 (100 BID)	TT #[redacted]-7823 (DEV-129) / Non-GLP
Exploratory 4-week toxicity and TK [a]	Oral (gavage)	Rat / Wistar Han	0, 100, 300	Males: <100 Females: ≥300	TT #[redacted]-1032 Non-GLP
28-day toxicity and TK with 28- and 90-day recovery periods, FOB, and respiratory function [b, d]	Oral (gavage)	Rat / Sprague Dawley	0, 3, 10, 100 BID (0, 6, 20, 200)	Females: ≥200 (100 BID) Males: 6 (3 BID)	TT #[redacted]-7820 (DEV-135) / GLP
13-week toxicity and TK with 28-day and 26-week recovery periods [b]	Oral (gavage)	Rat / Sprague Dawley	0, 1[c], 3, 10, 100 BID (2[c], 6, 20, 200)	Females: ≥200 (100 BID) Males: 2 (1 BID)	TT #[redacted]-7809 (DEV-207) / GLP
13-week toxicity and TK [a]	Oral (gavage)	Rat / Wistar Han	0, 30, 100, 300	Males: <30 Females: ≥300	TT #[redacted]-9011 GLP
28-day toxicity and TK with 28- and 90-day recovery periods and ECG and BP assessments [b, d]	Oral (gavage)	Dog / Beagle	0, 1, 5, 30	≥30	TT #[redacted]-7821 (DEV-136) / GLP
13-week toxicity and TK with a 28-day recovery period and ECG and BP assessments [b, d]	Oral (gavage)	Dog / Beagle	0, 1, 5, 30	≥30	TT #[redacted]-7808 (DEV-206) / GLP
Genotoxicity					
Microbial mutagenesis assay	In vitro	*Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*	1.5, 5, 15, 50, 150, 500, 1500, 5000 µg/plate ±S9	NA	TT #[redacted]-7842 (DEV-085) / Non-GLP
Microbial mutagenesis assay	In vitro	*Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*	50, 150, 500, 1500, 5000 µg/plate ±S9	NA	TT #[redacted]-7825 (DEV-138) / GLP
Micronucleus assay	In vitro	TK6 human lymphoblastoid cells	92, 188, 383 µg/mL (4 hr +S9); 31.5, 131, 383 µg/mL (27 hr -S9)	NA	TT #[redacted]-7843 (DEV-102) / Non-GLP
Micronucleus assay	In vitro	HPBL	100, 150, 383 µg/mL (4 hr ±S9); 10, 50, 80 µg/mL (24 hr -S9)	NA	TT #[redacted]-7826 (DEV-139) / GLP

Duration/ Study Type	Route	Species	Dose Levels (mg/kg/day)	NOAEL (mg/kg/day)	Study No./ GLP Status
Micronucleus assay [b]	Oral (gavage)	Rat / Sprague Dawley	10, 30, 100 BID (20, 60, and 200)	NA	TT #[redacted]-9018 GLP
Reproductive and Developmental Toxicity					
Preliminary embryo-fetal development with TK [b]	Oral (gavage)	Rat / Sprague Dawley	0, 3, 30, 100 BID (0, 6, 60, 200)	NA	TT #[redacted]-7004 Non-GLP
Tolerability in nonpregnant rabbits with TK [b]	Oral (gavage)	Rabbit/ Dutch Belted	3, 30, 100 and 0, 100 BID (0, 200)	NA	TT #[redacted]-7003 Non-GLP
Local tolerance					
Bovine Corneal Opacity and Permeability Test	In vitro	Isolated bovine corneas	0.75 mL of a 20% MK-6482 formulation	NA	TT #[redacted]-7811 GLP
MatTek EpiDerm™ MTT Viability Assay	In vitro	MatTek EpiDerm™ tissue samples	100 mg	NA	TT #[redacted]-7812 GLP
Other Toxicity Studies / Other Studies					
Screening Local Lymph Node Assay in Mice	Topical, ear	Mouse / CBA/J	25% (w/v) MK-6482 in DMF	NA	TT #[redacted]-7813 GLP
Phototoxicity with TK [b]	Oral (gavage)	Rat / Long-Evans	0, 100 BID (0, 200)	NA	TT #[redacted]-9011 GLP
13-week impurity qualification study [b]	Oral (gavage)	Rat / Sprague Dawley	0, 0.4, 1 BID (0, 0.8, 2)	1 BID (2)	TT #[redacted]-9010 GLP
Exploratory single-dose TK [a, c]	Oral (gavage)	Mouse / CD1(ICR)	60, 200, 600	NA	TT #[redacted]-1033 Non-GLP
Exploratory single-dose TK [c, e]	Oral (gavage)	Rat / Wistar Han and Sprague Dawley	100, 300	NA	TT #[redacted]-1023 Non-GLP

BID = Twice daily; BP = Blood pressure; DMF = N,N-Dimethylformamide; ECG = Electrocardiography; FOB = Functional observational battery; GLP = Good Laboratory Practices; HPBL = Human peripheral blood lymphocytes; HPMCAS-HF =Hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate-HF; hr = hour; MTD = Maximum tolerated dose; MTT = Methyl thiazole tetrazolium; NA = Not Applicable, TK = Toxicokinetics

a [redacted] form was used for each dose level in 0.5% (w/v) methylcellulose/0.1% HPMCAS-HF with 20 mM tromethamine in deionized water, pH 7.2 ± 0.1.

b [redacted] form was used for each dose level in a vehicle: 0.5% (w/v) Tween 80/0.5% (w/v) methylcellulose in deionized water

c Males only

d Results from the safety pharmacology assessments (FOB and respiratory function in rats, and ECG and BP assessments in dogs) are discussed in [Sec. 2.6.2.4]

e [redacted] and [redacted] forms were used for each dose level in 3 different vehicles: 0.5% (w/v) Tween 80/0.5% (w/v) methylcellulose in deionized water, 10% (w/w) Tween 80 in deionized water, and 0.5%(w/v) methylcellulose/0.1% (w/v) HPMCAS-HF with 20 mM tromethamine in deionized water, pH 7.2 ± 0.1.

ラット（SD）及びイヌ（ビーグル犬）を用いた28日間及び13週間の反復投与毒性試験（所見の回復性を評価するための回復期間を含む）を実施し、MK-6482（[redacted]処方）を評価した。

すべての試験でMK-6482の忍容性は良好であった。13週間試験で200 mg/kg/日群のラット1匹が試験18日に安楽殺されたが、MK-6482の投与とは関連がないと考えられた。

SD ラット及びイヌでみられた MK-6482に関連した所見は、赤血球パラメータ（例：赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット値）の可逆的な減少であり、MK-6482の薬理作用と一致していた。ラット及びイヌの赤血球系への影響は、所見のみられた動物で一般状態所見及び骨髄の病理組織学的所見に持続的な変化がみられなかったことから、有害ではないと考えられた。しかしながら、赤血球パラメータの減少の程度は特にイヌで大きく、最大50%の赤血球数及び網状赤血球数の減少がみられた。有害な一般状態所見がみられなかったことは、毒性試験の限られた環境では身体活動が制限されることに起因すると考えられた。特に、ラット及びイヌでみられた赤血球量への影響は臨床試験データと一致しており、貧血は MK-6482を投与した患者で最も一般的にみられた有害事象であった[2.5.5.2 項]。

28日間及び13週間の SD ラットの毒性試験では、MK-6482に関連した毒性は雄生殖器（精巣及び精巣上体）に認められた。詳細を[2.6.6.3.4 項]及び[2.6.6.3.5 項]に示す。両方の試験での精巣及び精巣上体における変性性の変化は顕著であり、最長26週間の回復期間後も回復がみられなかった。一方で、MK-6482の全身曝露は雌雄で同程度であったにもかかわらず、28日間及び13週間試験の雌ラットでは毒性及び病理組織学的な変化は認められなかった。6 mg/kg/日以上の群でみられた精巣及び精巣上体の変性性の変化に基づいて、SD ラットの28日間及び13週間試験での雄の NOAEL はそれぞれ6 mg/kg/日及び2 mg/kg/日であった。SD ラットの28日間及び13週間試験での雌の NOAEL はともに高用量の200 mg/kg/日以上であった。

Wistar Han ラットを用いた13週間試験（GLP）では、[redacted]処方の MK-6482の忍容性はすべての用量において良好であり、ヒトに関連した新たな毒性所見は認められなかった。試験22日及び／又は92日において MK-6482に関連した用量依存性のある赤血球系及び網状赤血球数の減少（30 mg/kg/日以上の群）、血小板数の増加（100 mg/kg/日以上の群の雄及び30 mg/kg/日以上の群の雌）、並びにクロールの減少（100 mg/kg/日以上の群）が認められた。これらの変化は一般状態の変化及び病理組織学的所見は伴わなかった。投与期間終了時の MK-6482に関連した病理組織学的所見は、30 mg/kg/日以上の群の精巣（精細管変性）、精巣上体（精子減少）及びハーダー腺（単細胞壊死）に認められた。精巣及び精巣上体の変化は剖検所見（小型化）及び臓器重量の変化（減少）と関連していた。100 mg/kg/日以上の群では心臓重量の増加がみられ、300 mg/kg/日群では剖検又は病理組織学的所見を伴わない肝臓重量の増加がみられた。以上の結果から、Wistar Han ラットを用いた13週間試験（GLP）における NOAEL は雄で30 mg/kg/日未満、雌で300 mg/kg/日以上であった。

28日間及び13週間のイヌを用いた毒性試験では、MK-6482に関連した毒性は認められず、両方の試験での NOAEL は高用量の30 mg/kg/日以上であった。

MK-6482は遺伝毒性及び光毒性を示さず、労働安全プログラムのために実施された局所忍容性及び皮膚刺激性評価においても影響はみられなかった。

MK-6482の生殖発生毒性は一般毒性試験及びラットを用いた胚・胎児発生毒性予備試験の結果に基づいて評価された。ラット（最高用量：300 mg/kg/日）及びイヌ（最高用量：30 mg/kg/日）の

一般毒性試験での生殖器の病理組織学的検査結果に基づくと、28日間及び13週間試験のいずれにおいても雌生殖器への影響は認められなかった。同様に、28日間及び13週間のイヌの一般毒性試験（精子の評価及び生殖器の病理組織学的検査を含む）において雄生殖器に影響は認められなかった。一方で、雄ラットでは精巣及び精巣上体への影響として低精子形成、精上皮変性及び多核巨細胞（精巣）並びに精子減少（精巣上体）が認められ、6 mg/kg/日以上の群（ヒトに120 mg QDを投与した際のAUC0-24の約0.1倍）での精子運動性及び精子数の低下並びに異常精子数の増加と関連していた。

SDラットを用いた胚・胎児発生毒性予備試験では、妊娠ラットの妊娠6～17日にMK-6482（[redacted]処方）を6、60及び200 mg/kg/日で投与した。発生毒性はすべての用量の投与群でみられ、60 mg/kg/日以上の群では胚・胎児致死の増加（120 mg QD を投与した際のヒト AUC0-24の約0.4倍）、6及び60 mg/kg/日群では胎児体重及び骨化の減少並びに奇形（200 mg/kg/日群には100%の胚・胎児致死により検査できる胎児はいなかった）が認められた。さらに、ラットに反復投与した一般毒性試験結果から想定されたとおり、60及び200 mg/kg/日群では赤血球量の減少（同時対照群の平均値と比べてヘモグロビン及びヘマトクリット値で最大約-23%）がみられた。SDラットにおける発生毒性に関するNOAELは特定できなかった。HIF-2α遺伝子をノックアウトしたマウス胚では、心血管系障害及び胚・胎児致死が報告されており[4.3: 05FRRV][4.3: 05FRS2]、ラットの試験で認められた胚・胎児毒性はMK-6482の作用機序に関連する可能性が示唆された。

MK-6482を用いた非臨床毒性試験の詳細は[2.6.6.2 項]から[2.6.6.8 項]に示す。結論として、MK-6482の毒性プロファイルからMK-6482が臨床用量でがん患者の治療に安全に使用できることが支持された。

2.6.6.2　単回投与毒性試験

独立した単回投与毒性試験は行わなかったが、マウス（30～600 mg/kg/日）、ラット（2～300 mg/kg/日）及びイヌ（1～30 mg/kg/日）を用いた反復投与毒性試験において単回投与後の評価を実施した[2.6.6.3 項]。いずれの動物種でも、急性毒性を示唆する変化は認められなかった。

2.6.6.3　反復投与毒性試験

2.6.6.3.1　CByB6F1/Tg rasH2ヘミ接合マウスを用いた28日間反復経口投与毒性試験（TT #[redacted]-9012）

MK-6482をCByB6F1/Tg rasH2ヘミ接合マウス（以下rasH2 Tgマウス）に反復投与した際の毒性及びTK評価のため、本GLP試験を行った[2.6.7.7.A 項]。

MK-6482［[redacted]処方を0.5%（w/v）MC/0.1%（w/v）HPMCAS-HF/20 mM TRIS水溶液（pH 7.2）を用いて調製］又は0.5%（w/v）MC/0.1%（w/v）HPMCAS-HF/20 mM TRIS水溶液のみを28日間（QD）、経口投与した。試験デザインは[表 2.6.6-2]に示した。

表 2.6.6-2　CByB6F1/Tg rasH2 ヘミ接合マウスを用いた
28 日間反復経口投与毒性試験：試験デザイン（TT #[redacted]-9012）

Group No.	Test Material	Dose Level[a] (mg/kg/day)	Dose Volume[b] (mL/kg)	Dose Concentration (mg/mL)	Adjusted Dose Concentration[c] (mg/mL)	No. of Animals			
						Main Study		Toxicokinetic Study	
						Males	Females	Males	Females
1	Control Article[d]	0	10	0	0	10	10	3	3
2	MK-6482	30	10	3	12	10	10	18	18
3	MK-6482	60	10	6	24	10	10	18	18
4	MK-6482	150	10	15	60	10	10	18	18
5	MK-6482	600	10	60	240	10	10	18	18

HPMCAS-HF =Hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate-HF; TRIS = Tromethamine
a　Dosed once daily via oral gavage for 28 days.
b　Based on the most recent body weight measurement.
c　Dose concentrations were adjusted (based on BioRatio) by a correction factor of 4.
d　180 mg/mL HPMCAS-HF in 20 mM pH 7.2 TRIS buffered 0.5% Methyl Cellulose/0.1% HPMCAS-HF.

毒性の評価は死亡、一般状態、体重、体重増加量、臨床検査（血液学及び血液生化学）、TK パラメータ、臓器重量、剖検及び病理組織学的検査に基づいて行った。

いずれの用量でも MK-6482の忍容性は良好であった。試験期間を通して MK-6482に関連した死亡、一般状態、体重変化及び剖検所見は認められなかった。

30 mg/kg/日以上の群で MK-6482に関連した臨床検査パラメータへの影響がみられた。

MK-6482に関連した血液学的検査への影響は赤血球パラメータに認められた。30 mg/kg/日以上の群の雌雄で、用量依存的な軽度から中等度の赤血球数、ヘモグロビン及びヘマトクリット値の減少、並びにごく軽度から軽度の平均赤血球ヘモグロビン量の減少が認められた。また、600 mg/kg/日群の雄でごく軽度の網状赤血球数の減少がみられた。

MK-6482に関連した血液生化学的検査への影響は、600 mg/kg/日群の雌雄でのごく軽度のアルカリフォスファターゼ活性の増加、及び600 mg/kg/日群の雌でのごく軽度のリン濃度の増加に限定された。これらの血液生化学パラメータの変化に関連した一般状態及び病理組織学的変化は認められなかった。

MK-6482に関連した病理組織学的所見は、150 mg/kg/日以上の群でのごく軽度の精細管変性のみであり、本所見に一致して平均精巣重量の減少がみられた。MK-6482に関連すると考えられる臓器重量の変化は、60 mg/kg/日以上の群での平均精巣重量の減少、600 mg/kg/日群の雌雄での平均心臓重量の増加、及び600 mg/kg/日群の雌での平均肝臓重量の増加であった。心臓重量の増加はヘモグロビンの減少に対する二次的な適応反応であり、可逆的と予想されることから毒性学的意義は乏しいと考えられた。雌の肝臓重量の増加に関しても増加の程度は僅かであり、病理組織学的変化を伴っていなかったことから毒性学的意義は乏しいと考えられた。

rasH2 Tg マウス（雌雄）に MK-6482（[redacted]処方）を30、60、150及び600 mg/kg/日の用量で投与した際の試験28日の TK 評価から、MK-6482の平均血漿中 AUC0-24及び Cmax に明確な性差は認められなかった。平均血漿中 AUC0-24及び Cmax（雌雄合算値）は30 mg/kg/日群及び60 mg/kg/日群の用量間では用量比例性がみられたが、60 mg/kg/日群及び600 mg/kg/日群の用量間では用量比を下回った。TK パラメータを[表 2.6.6-3]に示す。

表 2.6.6-3　MK-6482 を経口投与したマウスにおける MK-6482 平均血漿中 TK パラメータ（TT #[redacted]-9012）：試験 28 日（雌雄合算値）

		Dose (mg/kg/day)							
		30		60		150		600	
		Group		Group		Group		Group	
		2		3		4		5	
Parameter	Units	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
AUC0-24hr	µg*hr/mL	102	3.55	186	16.7	250	22.8	573	54.5
Cmax	µg/mL	9.65	0.537	17.4	1.51	27.3	1.68	38.2	5.12
Tmax	hr	2.00	NC	1.00	NC	2.00	NC	7.00	NC

AUC0-24hr=area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 24 hours; Cmax=maximum plasma concentration; NC = not calculated; SE=standard error; TK=toxicokinetic; Tmax=time at maximum plasma concentration
MK-6482 concentrations in plasma from all control group animals at 1 hour postdose were below the LLQ of the bioanalytical method.

結論として、rasH2 Tg マウスに MK-6482（[redacted]処方）を30、60、150及び600 mg/kg/日（QD）の用量で28日間経口投与した際の忍容性は良好であった。MK-6482に関連した病理組織学的変化は、150 mg/kg/日以上の群の精巣（ごく軽度の精細管変性）でみられ、臓器重量の変化は60 mg/kg/日以上の群の精巣（減少）、600 mg/kg/日群（雌雄）の心臓（増加）及び600 mg/kg/日群（雌のみ）の肝臓（増加）で認められた。さらに、MK-6482に関連した血液学パラメータへの影響が30 mg/kg/日以上の群（赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット値及び平均赤血球ヘモグロビン量の減少、雌雄）及び600 mg/kg/日群（網状赤血球数の減少、雄のみ）でみられたが、毒性学的意義は乏しく、MK-6482の薬理作用に起因するものと考えられた。また、MK-6482に関連した血液生化学パラメータへの影響が600 mg/kg/日群［アルカリフォスファターゼ活性の増加（雌雄）、リン濃度の増加（雌のみ）］で認められた。

以上の結果から、NOAEL は雄で60 mg/kg/日、雌で600 mg/kg/日以上であった。

2.6.6.3.2　雄 SD ラットを用いた探索的28日間反復経口投与毒性試験（65日間の回復期間を含む）（TT #[redacted]-7823）

MK-6482を SD ラットに反復投与した際の毒性及び TK 並びにその回復性（65日間）を評価するため、本試験（非 GLP）を実施した[2.6.7.6 項]。

MK-6482 [■■■■■処方を0.5%MC/0.5%Tween 80水溶液に懸濁] 又は0.5%MC/0.5%Tween 80水溶液のみを28日間 BID で SD ラットに強制経口投与した。試験デザインは[表 2.6.6-4]に示した。毒性の評価は死亡、一般状態、体重、摂餌量、臨床検査（血液学、電解質、凝固系、血液生化学）及び病理検査（精巣、精巣上体、肝臓のみ）に基づいて行った。血液サンプルは試験1、14、28日に採取し TK 評価に用いた。

表 2.6.6-4　MK-6482 の雄 SD ラットにおける 28 日間反復経口投与毒性試験（65 日間の回復期間を含む）：試験デザイン（TT #■■-7823）

Treatment Groups	Dose Level (mg/kg/dose)	Dose Level (mg/kg/day)	Dose Conc. (mg/mL) [a]	Number of Animals [b]
Toxicokinetic Animals				
1	3	6	0.6	3
2	10	20	2	3
3	30	60	6	3
4	100	200	20	3
Toxicity Animals				
5	0	0	0	8 [c]
6	3	6	0.6	8 [c]
7	10	20	2	8 [c]
8	30	60	6	8 [c]
9	100	200	20	8 [c]

a　Volume = 5 mL/kg
b　Male rats only
c　Includes 5 main group and 3 recovery group animals

投与期間及び回復期間を通してすべての動物は計画剖検まで生存した。MK-6482に関連した一般状態、体重及び摂餌量の変化はみられなかった。

20 mg/kg/日以上の群において、ヘモグロビン及びヘマトクリット値の有意な減少（$p<0.05$、同時対照群の平均値と比べて最大-17%）が認められ、また200 mg/kg/日群において、有意な赤血球数の減少（同時対照群の平均値と比べて-14%）がみられた。回復期間では、20 mg/kg/日群において有意な血小板数の増加（同時対照群の平均値と比べて+15%）がみられ、また60 mg/kg/日以上の群において平均赤血球容積と平均赤血球ヘモグロビン量の有意な低下（同時対照群の平均値と比べて最大-6.5%）がみられた。また200 mg/kg/日群において血小板分布幅の有意な増加（同時対照群の平均値と比べて+12%）がみられた。ヘモグロビン、ヘマトクリット値及び赤血球数は回復期間終了後に同時対照群の平均値と同程度まで回復したため、完全な回復性が示唆された。これらの赤血球パラメータにおける影響は投与に関連した MK-6482の薬理作用に起因するものであり、有害でないと考えられた。

血液生化学検査では、6 mg/kg/日以上の群でリン（同時対照群の平均値と比べて最大-31%）、20 mg/kg/日以上の群で AST（同時対照群の平均値と比べて最大-31%）及びクレアチニンキナーゼ（同時対照群の平均値と比べて最大-79%）の有意な減少（p<0.05）がみられた。さらに、60 mg/kg/日以上の群において、総タンパク量（同時対照群の平均値と比べて最大+13%）及びグロブリン（同時対照群の平均値と比べて最大+17%）の有意な増加（p<0.05）がみられた。用量依存性のない散発的な値の上昇が、ナトリウム、カリウム及び／又はクロールで投与期間中及び／又は回復期間中にみられた。6、60及び200 mg/kg/日群において、用量依存性のない APTT の有意な延長（P<0.05、最大+16%）がみられた。本試験で認められた血液生化学検査値の変化は、同程度の用量をより長い期間投与（最長13週）し、一群あたりより多くの動物を使用した検出力の高い GLP 試験[2.6.6.3.4 項][2.6.6.3.5 項]において再現されなかったため、偶発的な変化であると考えられた。

高用量の200 mg/kg/日群では、精巣の精細管における精母細胞及び精子の変性、並びに精巣上体管における剥離精細胞がみられた。60 mg/kg/日以下の群では、精巣及び精巣上体における被験物質に関連した病理組織学的な所見はみられなかった。65日間の回復期間終了後では、被験物質に関連した所見として200 mg/kg/日群で精巣における精細管の萎縮、精巣上体管における精子減少及び剥離精細胞がみられた。

雄における MK-6482とその代謝物である PT3317の TK プロファイルを[表 2.6.6-5]及び[表 2.6.6-6]にそれぞれ示した。MK-6482は急速に吸収され、Tmax は0.5から1.67時間であった。MK-6482の全身曝露（Cmax 及び AUC）は、用量の増加に伴い低用量では線形に増加したが、高用量では用量比を下回る増加であった。試験1日及び28日の曝露の差はすべての用量において約2倍の範囲内であり、MK-6482及び PT3317の蓄積を示唆する意味のある差ではないと考えられる。半減期には明らかな傾向は認められなかった。本試験では、試験1日及び28日に MK-6482を3、10、30及び100 mg/kg BID の用量で投与した際の PT3317 AUC0-inf/MK-6482 AUC0-inf の最大比は0.033であった。

表 2.6.6-5　MK-6482 を経口投与した雄ラットにおける MK-6482 平均血漿中 TK パラメータ（TT #[redacted]-7823）：試験 1、14 及び 28 日

Day	Dose Level [a]		AUC0-12hr (µg*hr/mL)	AUC0-24hr [b] (µg*hr/mL)	Cmax (µg/mL)	Tmax (hr)
	(mg/kg/dose)	(mg/kg/day)				
1	3	6	0.41	0.82	0.12	0.50
	10	20	1.45	2.90	0.34	0.67
	30	60	3.33	6.66	0.66	0.67
	100	200	6.39	12.8	0.96	1.00
14	3	6	0.50	1.00	0.14	1.00
	10	20	1.78	3.56	0.34	1.00
	30	60	4.07	8.14	0.73	1.00

Day	Dose Level [a]		AUC0-12hr (µg*hr/mL)	AUC0-24hr [b] (µg*hr/mL)	Cmax (µg/mL)	Tmax (hr)
	(mg/kg/dose)	(mg/kg/day)				
	100	200	6.91	13.8	1.66	1.67
28	3	6	0.80	1.60	0.16	0.83
	10	20	2.39	4.78	0.42	0.67
	30	60	4.51	9.02	0.75	1.67
	100	200	7.03	14.1	1.64	1.33

AUC0-12hr =area under the plasma concentration-time curve 0 to 12 hours; AUC0-24hr = area under the plasma concentration-time curve 0 to 24 hours; Cmax = maximum plasma concentration; Tmax = Time at maximum plasma concentration
a　Doses were administered twice daily.
b　AUC0-24hr was calculated by AUC0-12hr multiplied by two.

表 2.6.6-6　MK-6482 を経口投与した雄ラットにおける PT3317 平均血漿中 TK パラメータ（TT #[redacted]-7823）：試験 1、14 及び 28 日

Day	Dose Level [a]		AUC0-12hr (µg*hr/mL)	AUC0-24hr [b] (µg*hr/mL)	Cmax (µg/mL)	Tmax (hr)
	(mg/kg/dose)	(mg/kg/day)				
1	3	6	0.008	0.016	0.003	1.00
	10	20	0.037	0.074	0.018	1.17
	30	60	0.062	0.124	0.015	1.83
	100	200	0.105	0.210	0.018	1.67
14	3	6	0.006	0.012	0.002	2.00
	10	20	0.019	0.038	0.005	0.83
	30	60	0.067	0.134	0.027	0.83
	100	200	0.092	0.184	0.021	1.50
28	3	6	0.010	0.020	0.006	1.33
	10	20	0.038	0.076	0.011	1.67
	30	60	0.098	0.196	0.024	2.33
	100	200	0.176	0.352	0.047	1.67

AUC0-12hr = area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 12 hours; AUC0-24hr = area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 24 hours; Cmax = maximum plasma concentration;
Tmax = time at maximum plasma concentration
a　Doses were administered twice daily.
b　AUC0-24hr was calculated by AUC0-12hr multiplied by two.

本試験の結果から、MK-6482を28日間BIDで雄SDラットに経口投与した際のMTDは200 mg/kg/日（100 mg/kg BID）以上であると考えられ、その際のAUC0-24及びCmaxはそれぞれ14.1 µg•hr/mL、1.64 µg/mL であった。

2.6.6.3.3　Wistar Han ラットを用いた探索的28日間反復経口投与毒性及び TK 試験（TT #[redacted]-1032）

MK-6482を Wistar Han ラットに28日間（QD）、経口投与した際の毒性及び TK 評価のために本試験（非 GLP）を行った。

Crl:WI(Han)ラットを3グループ(雌雄各6匹)に群分けし、100又は300 mg/kg/日の用量の MK-6482 [[redacted]処方を0.5%（w/v）MC/0.1%（w/v）HPMCAS-HF/20 mM TRIS 水溶液（pH7.2）を用いて調製]、又は0.5%（w/v）MC/0.1%（w/v）HPMCAS-HF/20 mM TRIS 水溶液のみを5 mL/kg の投与容量で投与した。[redacted]処方の組成は[redacted]（[redacted]%）と[redacted]（[redacted]%）からなる。対照群の投与液中の HPMCAS の量は300 mg/kg/日群の投与液と同量とした。

毒性の評価は死亡、一般状態、体重、臨床検査及び病理検査に基づいて行った。血漿中薬物濃度を投与群及び対照群のサンプルを用いて測定した。

被験物質に関連した計画外の死亡及び一般状態の変化は認められなかった。100及び300 mg/kg/日群の雄では、平均体重増加量の減少（同時対照群と比較して投与前及び投与4週でそれぞれ-14%及び-9%）が認められた。また、被験物質に関連した臨床検査値の変化として、血液学パラメータ［時に赤血球大小不同及び／又は小赤血球を伴う赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット値及び網状赤血球数の減少、並びに血小板数の増加］及び血液生化学パラメータ（カリウム、カルシウム及びリン濃度の増加）の変化が両群の雌雄に認められた。臨床検査パラメータの変化は一般状態又は病理検査所見と関連するものではなく、毒性学的意義は乏しいと考えられた。TK パラメータを[表 2.6.6-7]及び[表 2.6.6-8]に示す。

表 2.6.6-7　MK-6482 を経口投与したラットにおける MK-6482 平均血漿中 TK パラメータ（TT #[redacted]-1032）：試験 14 日

				Sex					
				Female		Male		Sex-Combined	
Dose (mg/kg/day)	Group	Parameter	Units	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
100	2	AUC0-24 hr	µg*hr/mL	188	17.0	265	9.46	227	20.1
		Cmax	µg/mL	33.3	6.45	22.4	3.81	27.9	4.13
		Tmax	Hr	1.00	NC	1.00	NC	1.00	NC
300	3	AUC0-24 hr	µg*hr/mL	477	71.9	502	50.8	489	40.0
		Cmax	µg/mL	54.9	15.2	52.8	2.63	53.9	6.89
		Tmax	Hr	1.00	NC	1.00	NC	1.00	NC

AUC0-24hr= area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 24 hours; Cmax= maximum plasma concentration; NC = not calculated; SE=standard error; TK=toxicokinetic; Tmax=time at maximum plasma concentration

表 2.6.6-8　MK-6482 を経口投与したラットにおける MK-6482 平均血漿中 TK パラメータ（TT #[redacted]-1032）：試験 28 日

				Sex					
				Female		Male		Sex-Combined	
Dose (mg/kg/day)	Group	Parameter	Units	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
100	2	AUC0-24 hr	µg*hr/mL	208	30.9	248	16.0	228	19.5
		Cmax	µg/mL	37.4	4.94	24.1	2.41	30.3	4.18
		Tmax	Hr	1.00	NC	2.00	NC	1.00	NC
300	3	AUC0-24 hr	µg*hr /mL	439	55.5	361	51.2	400	40.7
		Cmax	µg/mL	41.1	9.28	42.1	3.63	41.6	4.46
		Tmax	Hr	1.00	NC	1.00	NC	1.00	NC

AUC0-24hr= area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 24 hours; Cmax= maximum plasma concentration; NC = not calculated; SE=standard error; TK=toxicokinetic; Tmax=time at maximum plasma concentration

MK-6482を反復経口投与した際の MK-6482の平均血漿中 AUC0-24及び Cmax に明らかな性差は認められなかった。平均血漿中 AUC0-24及び Cmax には用量比例性がみられ、試験28日の値は試験14日の値と同等であり、試験14日に定常状態に達したことが示唆された。

被験物質に関連した精巣の病理組織学的変化として、100及び300 mg/kg/日群のすべての雄で精細管変性が認められ、300 mg/kg/日群ではより程度が重かった。また、100及び300 mg/kg/日群の数例で甲状腺（両側性）の淡色化がみられた。所見の認められた300 mg/kg/日の動物で関連する病理組織学的変化がみられなかったことから、この剖検所見は毒性学的意義が乏しいと考えられた。

結論として、HIF-2α 阻害薬である MK-6482を Wistar Han ラットに28日間（QD）、経口投与したところ、被験物質に関連した投与期間中検査所見として、両群の雄のみで軽度の平均体重増加量の減少（投与前から投与4週）が認められた。さらに、臨床検査値（血液学及び血液生化学）の変化として、両群の雄及び／又は雌で時に赤血球大小不同及び／又は小赤血球を伴う赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット値及び網状赤血球数の減少、血小板数の増加、並びにカリウム、カルシウム及びリン濃度の増加が認められた。臨床検査パラメータの変化は一般状態又は病理検査所見と関連するものではなく、毒性学的意義は乏しいと考えられた。被験物質に関連した病理検査所見は、100及び300 mg/kg/日群のすべての雄で病理組織学的変化として認められた精巣の精細管変性に限られ、300 mg/kg/日群ではより程度が重かった。

以上の結果から、NOAEL は雄で100 mg/kg/日未満、雌で300 mg/kg/日以上であった。

2.6.6.3.4　SD ラットを用いた28日間反復経口投与毒性試験（28日間及び90日間の回復期間を含む）（TT #[redacted]-7820）

MK-6482を SD ラットに28日間経口投与した際の毒性及び TK、並びに28日間及び90日間の回復期間後の回復性を評価するため、本 GLP 試験を行った[2.6.7.7.B 項]。また、呼吸機能及び中枢神経系（FOB）への影響（安全性薬理パラメータ）についても評価した（結果はそれぞれ[2.6.2.4.1.4 項]及び[2.6.2.4.1.5 項]に述べる）。

MK-6482［[redacted]処方を0.5%MC/0.5%Tween 80水溶液に懸濁］又は0.5%MC/0.5%Tween 80水溶液のみを28日間 BID（12時間±30分間隔）で強制経口投与した。試験デザインは[表 2.6.6-9]に示した。毒性の評価は死亡、一般状態、体重、摂餌量、眼科検査、FOB 及び呼吸機能検査（[2.6.2.4.1.4 項]及び[2.6.2.4.1.5 項]）、臨床検査［血液学、凝固系、血液生化学（重炭酸塩などの通常では検査しない項目を含む）、尿検査］並びに病理検査に基づいて行った。さらに、雄の生殖パラメータ（精子の運動性及び数、異常精子数並びに精子形成段階）についても評価した。血液サンプルは試験1日及び28日の TK 評価のために採取した。

表 2.6.6-9　SD ラットを用いた 28 日間反復経口投与毒性試験
（28 日及び 90 日間の回復期間を含む）：試験デザイン（TT #[redacted]-7820）

Treatment Group	Dose Level (mg/kg/dose)	Dose Level (mg/kg/day)	Dose Conc. (mg/mL)	Dose Volume (mL/kg/dose)	Number of Animals							
					Main		Recovery (28-day)		Recovery (90-day)		TK	
					M	F	M	F	M	F	M	F
1. Control [a]	0	0	0	5	10	10	5	5	5	5	3	3
2. Low Dose	3	6	0.6		10	10	5	5	5	5	9	9
3. Mid Dose	10	20	2		10	10	5	5	5	5	9	9
4. High Dose	100	200	20		10	10	5	5	5	5	9	9

F = female; M = male; TK = toxicokinetics; Conc. = concentration
a　Control animals received the vehicle (0.5% methylcellulose and 0.5% Tween 80 in water).

本試験の結果から、MK-6482の SD ラットにおける忍容性はすべての用量で良好であった。MK-6482に関連した死亡、一般状態所見、体重、体重増加量及び摂餌量の変化、眼科検査所見並びに凝固系及び尿検査パラメータへの影響は認められなかった。

MK-6482の投与に関連した変化として、複数の赤血球パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット値、平均赤血球容積、平均赤血球ヘモグロビン量及び網状赤血球数）の減少（最大-37%）が認められた。これらの変化はすべての用量の雄及び20 mg/kg/日以上の群の雌で認められ、おおむね用量依存性がみられた。これらの赤血球量の変化は、ごく軽度で統計学的に有意ではあるが必ずしも用量依存性のない、20 mg/kg/日以上の群での平均赤血球容積の減少（対照群と比べて-3%～-5%）、200 mg/kg/日群の雌での平均赤血球ヘモグロビン量の減少（対照群と比べて-4%）及び

200 mg/kg/日群の雌雄での平均赤血球分布幅の増加（対照群と比べて+5%～+7%）を伴っていた。

さらに、20 mg/kg/日以上の群の片性あるいは雌雄で血小板数のごく軽度の増加、すべての用量の雌で白血球数（主に好中球数）の減少がみられた。骨髄の病理組織学的検査では関連した変化はみられなかった。骨髄塗抹標本検査では、主試験群の高用量の雌でごく軽度の平均骨髄球系／赤芽球系比率の高値がみられたが、それ以外の群の骨髄球系／赤芽球系比率はおおむね同程度であった。これは赤血球前駆細胞及び平均リンパ球比率のごく軽度の低下によるものであった。赤血球系の変化（恐らく白血球系や血小板の変化も含む）は、MK-6482の薬理作用であるHIF-2α阻害作用を介したエリスロポエチン産生の阻害と一致したものであり、有害ではないと考えられた[4.3: 05BTDF]。

MK-6482の血液生化学パラメータへの影響として、主に20 mg/kg/日以上の群で軽度な血清重炭酸塩平均値の上昇が認められた。この変化は血清電解質平均値及びプレチスモグラフィーによって評価された呼吸機能の変化を伴うものではなかった。さらに、主に200 mg/kg/日群の雌において、軽度な血清トリグリセリド平均値の低下が認められた。血液生化学検査値の変化はすべて28日間の回復期間中に回復し、変化の程度が軽度で関連する病理組織学的変化が認められなかったことから、有害ではないと考えられた。

MK-6482に関連した病理組織学的検査、剖検所見及び臓器重量の変化は、主に雄生殖器（精巣及び精巣上体）にみられた。20 mg/kg/日以上の群での雄生殖器の所見は、精巣における低精子形成、精上皮変性及び多核巨細胞、並びに精巣上体における精子減少であり、精巣の軟化及び重量減少と関連していた。低精子形成、精上皮変性及び多核巨細胞は、200 mg/kg/日（軽度から中等度）及び20 mg/kg/日（ごく軽度）群の雄の精巣で両側性にみられた。精巣上体の精子減少は20 mg/kg/日群では軽度から中等度であり、200 mg/kg/日群では顕著であった。28日及び90日間の回復期間後では、20 mg/kg/日以上の群の精巣及び精巣上体において、同程度の又は時により重度な被験物質に関連した病理組織学的所見が認められ、これらの用量群の数例では精巣重量の減少及び剖検時の精巣軟化も伴っていた。これらの所見が継続して認められたことから、90日間の休薬では回復しないことが示唆された。MK-6482に関連した精子形成への影響と相関して、20 mg/kg/日以上の群で精子運動性の低下及び精子数の減少、並びに異常精子数の増加がみられた。28日間の回復期間後には、200 mg/kg/日群において前立腺重量の低下が認められたが、関連する病理組織学的所見を伴わず、また90日間の回復期間後に前立腺重量の変化はみられなかった。

MK-6482と PT3317の TK プロファイル（雌雄合算値）を[表 2.6.6-10]及び[表 2.6.6-11]にそれぞれ示した。血漿 TK 分析の結果から、MK-6482は SD ラットに経口投与後速やかに吸収され、試験1日及び28日の Tmax は2時間以内であった。明らかな消失相が確認された群における消失半減期はおよそ2から6時間であった。投与量の増加に伴い Cmax 及び AUC0-12は増加したが、用量比を下回っていた。Cmax 及び AUC0-12の試験28日/試験1日の比から、MK-6482の28日間連続投与による血漿への明らかな蓄積はなく、動態に明らかな雌雄差は認められなかった。O-グルクロン酸抱合体である PT3317の血漿中濃度は親化合物と比較して顕著に低く、Cmax 及び AUC0-12における

PT3317/MK-6482のモル比は0.003から0.011の範囲であった。MK-6482のプロファイルと同様、PT3317の Cmax 及び AUC0-12は用量比を下回る増加を示した。

表 2.6.6-10　MK-6482 を経口投与したラットにおける MK-6482 平均血漿中 TK パラメータ（TT #[redacted]-7820）：試験 1 日及び 28 日（雌雄合算値）

Day	Dose Level [a, b]		AUC0-12hr[c] (µg*hr/mL)	AUC0-24hr[c, d] (µg*hr/mL)	Cmax [c] (µg/mL)	Tmax [c] (hr)
	(mg/kg/dose)	(mg/kg/day)				
1	3	6	1.45	2.90	0.421	0.75
	10	20	4.56	9.12	0.812	1.00
	100	200	16.8	33.6	2.42	1.50
28	3	6	1.91	3.82	0.531	1.00
	10	20	4.46	8.92	1.12	1.00
	100	200	17.7	35.4	3.40	1.50

AUC0-12hr = area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 12 hours; AUC0-24hr = area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 24 hours: Cmax = maximum plasma concentration;
Tmax = time at maximum plasma concentration

a　Doses were administered twice daily, 12 hours apart (± 30 minutes).
b　No quantifiable concentrations of MK-6482 were detected in any of the pre-dose samples on Day 1 or in any plasma samples from the control group.
c　Average of mean male and female toxicokinetic parameters.
d　AUC0-24hr was calculated by AUC0-12hr multiplied by two.

表 2.6.6-11　MK-6482 を経口投与したラットにおける PT3317 平均血漿中 TK パラメータ（TT #[redacted]-7820）：試験 1 日及び 28 日（雌雄合算値）

Day	Dose Level [a, b] (mg/kg/dose)	Dose Level [a, b] (mg/kg/day)	AUC0-12hr [c, d] (µg*hr/mL)	AUC0-24hr [c, e] (µg*hr/mL)	Cmax [c] (µg/mL)	Tmax [c] (hr)
1	3 [f]	6 [f]	-	-	0.006	1.50
	10	20	0.070	0.140	0.008	1.75
	100	200	0.183	0.366	0.032	0.75
28	3 [g]	6 [g]	-	-	0.003	1.25
	10	20	-	-	0.004	1.00
	100	200	0.085	0.170	0.019	2.00

AUC0-12hr = area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 12 hours; AUC0-24hr = area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 24 hours; Cmax = maximum plasma concentration;
Tmax = time at maximum plasma concentration; - =Not determined/not reported

a Doses were administered twice daily, 12 hours apart (± 30 minutes).
b No quantifiable concentrations of PT3317 were detected in any of the pre-dose samples on Day 1 or in any plasma samples from the control group.
c Average of mean male and female toxicokinetic parameters.
d AUC0-12hr only determined in males.
e AUC0-24hr was calculated by AUC0-12hr multiplied by two.
f Toxicokinetics parameters were not determined for 6 mg/kg/day females on Day 1 since all plasma concentrations were BLQ.
g Toxicokinetics parameters for 6 mg/kg/day males and females on Day 28 were determined with only one individual non-zero plasma concentration and consequently, presented for information only.

結論として、SD ラットに MK-6482（[redacted]処方）を6、20又は200 mg/kg/日（3、10又は100 mg/kg BID）で28日間経口投与した際の忍容性は良好であり、すべての用量群で投与に関連した軽度から中等度の赤血球量の減少がみられたが、可逆的であり有害ではないと考えられた。剖検及び病理組織学的検査での雄生殖器の変化（精巣における低精子形成、精上皮変性及び多核巨細胞並びに精巣上体における精子減少）が20 mg/kg/日以上の群で認められ、精巣重量の低下及び小型化／軟化と関連しており、90日間の回復期間での回復性は認められなかった。TK 評価では、MK-6482は速やかに吸収され、全身曝露に性差はないことが示唆された。

20 mg/kg/日以上の群の雄生殖器における変性性の組織所見に基づくと、雄の NOAEL は6 mg/kg/日（3 mg/kg BID）であり、この用量での平均 AUC0-24及び Cmax はそれぞれ3.82 µg•hr/mL 及び0.531 µg/mL であった（雌雄合算値）。MK-6482に関連した毒性学的意義のある所見は認められなかったため、雌の NOAEL は200 mg/kg/日（100 mg/kg BID）以上であり、この用量での平均 AUC0-24及び Cmax はそれぞれ35.4 µg•hr/mL 及び3.40 µg/mL であった（雌雄合算値）。

2.6.6.3.5　SD ラットを用いた13週間反復経口投与毒性試験（28日間及び26週間の回復期間を含む）（TT #[redacted]-7809）

MK-6482を SD ラットに13週間経口投与した際の毒性及び TK、並びに28日間及び26週間（雄のみ）の回復期間後の回復性を評価するため、本 GLP 試験を行った[2.6.7.7.C 項]。

MK-6482［[redacted]処方を0.5%MC/0.5%Tween 80水溶液に懸濁］又は0.5%MC/0.5%Tween 80水溶液のみを13週間 BID（12時間±30分間隔）で強制経口投与した。試験デザインは[表 2.6.6-12]に示した。毒性の評価は死亡、一般状態、体重、摂餌量、眼科検査、臨床検査［血液学、凝固系、血液生化学（重炭酸塩などの通常では検査しない項目を含む）及び尿検査］並びに病理検査に基づいて行った。さらに、雄の生殖パラメータ（精子運動性、精子数、異常精子数及び精子形成段階）についても評価した。血液サンプルを試験1日及び91日の TK 評価のために採取した。

表 2.6.6-12　SD ラットを用いた 13 週間反復経口投与毒性試験
（28 日間及び 26 週間の回復期間を含む）：試験デザイン（TT #[redacted]-7809）

Treatment Group	Dose Level (mg/kg/dose)	Dose Level (mg/kg/day)	Dose Conc. (mg/mL)	Dose Volume (mL/kg/dose)	Number of Animals							
					Main		Recovery (28-day)		Recovery (26-week)		TK	
					M	F	M	F	M	F	M	F
1. Control [a]	0	0	0	5	15	15	5	5	5	-	3	3
2. Low Dose	1	2	0.2		15	-	5	-	5	-	9	-
3. Lower Mid Dose	3	6	0.6		15	15	5	5	5	-	9	9
4. Higher Mid Dose	10	20	2		15	15	5	5	5	-	9	9
5. High Dose	100	200	20		15	15	5	5	5	-	9	9

F = female; M = male; TK = toxicokinetics; Conc. = concentration
a　Control animals received the vehicle (0.5% methylcellulose and 0.5% Tween 80 in water).

本試験の結果から、すべての用量において MK-6482はおおむね忍容性があり、MK-6482に関連した一般状態所見、体重、体重増加量、摂餌量、眼科検査、凝固系及び尿検査パラメータへの影響は認められなかった。

200 mg/kg/日群の雄1匹が試験18日に安楽殺され、脳における中等度の両側対称性の神経変性及び／又は壊死が認められた。この動物でみられた所見は孤発性［200 mg/kg/日投与群の30匹（雄15匹、雌15匹）中1例のみ］であり、投与期間の13週間にわたってより長い期間の曝露を受けたMK-6482投与群の他のラットでは全くみられなかったため、MK-6482投与には関連しない所見と考えられる。また、28日間のラット反復投与毒性試験でも200 mg/kg/日（10匹／性／群）を投与した SD ラットで神経系の所見はみられなかったことから、この評価の妥当性が裏付けられる。まとめると、2つの試験を通じて計50匹［20匹／群（28日間試験）及び30匹／群（13週間試験）、雌雄

合算］の SD ラットに200 mg/kg/日の MK-6482が投与され、中枢神経系への影響及び脳の病変は認められなかった。さらに、13週間試験で試験18日に安楽殺されたラット1匹で認められた脳の所見の病理組織学的特徴は、実験ラットで自然発生病変として知られる特発性壊死性脳症の特徴と類似していた[4.3: 05KNTF]。したがって、早期に安楽殺されたこのラットにおける脳の所見は偶発的であり、MK-6482の投与には関連しない所見と考えられた。このラットでみられた偶発的な脳の所見は、瀕死状態及びその後の早期安楽殺の原因と考えられた。このラットでは同様に偶発的な所見と考えられる中等度の肝細胞壊死もみられたが、これについては後の本試験で認められた肝臓所見の項で考察した。試験18日に安楽殺されたラットでは、このほかに精巣の病理組織学的所見として精細管変性が認められ、精巣上体では二次的な低精子形成及び細胞残渣の増加がみられたが、これらは MK-6482投与に関連した所見と考えられた。

血液学的検査における MK-6482に関連した変化として、すべての用量群で投与に関連した完全に可逆的な赤血球パラメータの変化［赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット値、平均赤血球容積、平均赤血球ヘモグロビン量（200 mg/kg/日群で最大-28%）及び／又は網状赤血球数の減少］がみられた。骨髄にはこれらの所見に関連した病理組織学的変化は認められなかった。

血液生化学検査における MK-6482に関連した可逆的な変化として、6 mg/kg/日以上の群の雄及び200 mg/kg/日群の雌における血清重炭酸塩平均値の軽度な増加がみられた。この変化は血清電解質の変化を伴っていなかった。また、血清中トリグリセリド平均値の軽度な減少が主に200 mg/kg/日群の雌で認められた。血液生化学パラメータのすべての変化は28日間の回復期間後に回復し、変化の程度が軽度で関連する病理組織学的変化が認められなかったことから、有害ではないと考えられた。

MK-6482に関連した病理組織検査、剖検及び臓器重量における主な変化は、2 mg/kg/日以上の群の雄生殖器（精巣及び精巣上体）における所見であり、以降に詳細を述べる。6 mg/kg/日以上の群の精巣上体では、低精子形成及び／又は細胞残渣の増加がみられ、精巣の変化に伴う二次的な所見であると考えられた。さらに、20 mg/kg/日以上の群では間質細胞（ライディッヒ細胞）の過形成／肥大が認められた。

6 mg/kg/日以上の群においてごく軽度から重度の精細管の萎縮が認められた。萎縮した精細管では、精細管の内腔がセルトリ細胞のみ又はほぼセルトリ細胞のみで覆われ、精原細胞を含む精上皮細胞が完全にあるいはほぼ消失している状態であった。

6 mg/kg/日以上の群においてごく軽度から重度の精細管の変性が認められた。精細管の変性は、精巣における様々な変性性の変化を総称したものであり、上皮の内部又は表面での精子細胞の残存、基底膜での精子頭部の残存、大型の残存体、多核巨細胞、精子細胞核の空胞化、精細管内腔への生殖細胞の脱落、パキテン期／減数分裂期の生殖細胞のアポトーシス、伸長精子細胞のアポトーシス／配列の乱れ、伸長精子細胞の減少、生殖細胞の脱落、セルトリ細胞の空胞化がみられた。また、20 mg/kg/日以上の群においてごく軽度の間質細胞の過形成／肥大がみられた。

2 mg/kg/日群での精細管の変性は、精細管上皮の内部又は表面のごく軽度の精子細胞の残存に限られ、14例中3例では大型の残存体がみられた。表面での精子細胞の残存あるいは基底膜での精子頭部の残存は精子形成過程での異常を示唆している。

28日間回復期間終了時の MK-6482に関連した病理組織学的所見は主に6 mg/kg/日以上の群の精巣及び／又は精巣上体でみられたが、2 mg/kg/日群では所見が認められなかったため、2 mg/kg/日群における MK-6482による所見の回復性が示唆された。より長期の26週間の回復期間後であっても、6 mg/kg/日以上の群では精巣及び／又は精巣上体に MK-6482による所見がみられた。これらの所見は、ごく軽度から重度の精細管の変性及び／又は萎縮であった。精細管変性の所見は主に「精原細胞の限局的な脱落」及び「精細管内腔への精上皮細胞の脱落」であり、全体として投与期間終了時及び28日間の回復期間終了時にみられた所見よりも軽度であり、変性の程度は概して軽減していたが、26週間の回復期間後にも完全には回復していなかった。6 mg/kg/日以上の群でみられた精巣上体の所見は低精子形成（軽度から重度）及び／又は細胞残渣の増加（ごく軽度から軽度）であった。

精子検査では、6 mg/kg/日以上の群で MK-6482に関連した精子形態及び精子数への影響、並びに20 mg/kg/日以上の群では精子運動性への影響がみられ、これらの所見は精巣及び精巣上体の病理組織学的所見と一致していた。20 mg/kg/日以上の群ではこれらの雄生殖器に対する影響が回復期間を通じて継続して認められたが、6 mg/kg/日群では28日間の回復期間後に完全な回復がみられた。2 mg/kg/日群では、投与期間及び回復期間終了時の剖検における精子運動性、精子形態及び精子数は対照群と総じて同程度であった。

主試験群の20 mg/kg/日以上の動物では、運動精子量の顕著な減少がみられた。運動性の欠如及び運動性のある精子数の減少が20 mg/kg/日以上の群の精子サンプルでみられた。精子数の減少は6、20及び200 mg/kg/日群でみられたが（対照群と比較して-29%～-84%）、統計学的に有意な減少を示したのは20 mg/kg/日以上の群のみであった。異常精子の比率は6、20及び200 mg/kg/日群で対照群と比較して有意に増加し（それぞれ+392%、+1195%及び+1299%）、最も頻繁に観察された所見は鞭毛から分離した正常頭部であった。

28日間の回復期間後、20 mg/kg/日以上の群ではすべての雄で運動性のある精子は認められなかった。2及び6 mg/kg/日群では、回復群の雄の精子運動性は対照群と同程度であった。20及び200 mg/kg/日群での精子数の減少（同時対照群と比較して-73%及び-80%）は継続してみられたが、200 mg/kg/日群における精子の絶対数の平均値は投与期間終了時の値と比べて高値（投与期間及び回復期間終了時の精巣上体における精子数はそれぞれ約8.90×10^7及び1.35×10^8/g）であった。20及び200 mg/kg/日群での異常精子比率は依然として高値を示し、回復期間の対照群と比較して有意に増加しており（それぞれ+3094%及び+3090%）、最も頻繁に観察された所見は鞭毛から分離した正常頭部であった（20及び200 mg/kg/日群で観察された精子のそれぞれ約92%及び85%）。

6 mg/kg/日群では、28日間回復期間終了時の平均精子数は同時対照群に比べ低値を示したが（精巣上体における精子数はそれぞれ約5.55×10^8及び6.75×10^8/g）、投与期間終了時の対照群の平均精子

数（約5.47×10^8/g）と同程度であり、投与期間終了時の平均精子数（約3.89×10^8/g）と比較して高値であった。したがって、28日間回復期間終了時の精子運動性、精子数及び精子形態への影響がみられなかったことから、6 mg/kg/日群における雄生殖器機能の回復性が示唆された。

26週間の回復期間後、6、20及び200 mg/kg/日群において運動性のある精子は認められなかった。20及び200 mg/kg/日群では、平均精子数の減少が持続してみられた（同時対照群と比較してそれぞれ-62%、-38%）。6 mg/kg/日群では、26週間回復期間終了時の平均精子数は同時対照群と比べて同程度（-9%）であったが、1匹の動物では、精巣上体における精子数が対照群の平均値（6.97×10^8/g）と比較して低値（2.74×10^8/g 、-61%）であった。

20及び200 mg/kg/日群の異常精子比率は、26週間の回復期間後も対照群と比べて増加しており（それぞれ+1450%及び+714%）、依然として最も頻繁に観察された所見は鞭毛からの分離した正常頭部であった（20及び200 mg/kg/日群で観察された精子のそれぞれ約76%及び36%）。200 mg/kg/日群では、約半数（5例中3例）の動物では概して精子は正常であったが、残りの2例では精子の約80%に異常が観察された。6 mg/kg/日群では、精子の100%に異常（鞭毛からの分離した正常頭部）が観察された1例を除き、すべての動物で26週間回復期間終了時の精子形態は正常であった。

2 mg/kg/日群の雄では、26週間回復期間終了時の精子運動性、精子数及び精子形態は概して対照群と同程度であった。

本試験ではその他の病理組織学的所見として、投与期間終了時の剖検において200 mg/kg/日群の29例中1例に中等度の肝細胞壊死が認められ、これは剖検時にみられた多数の暗赤色巣と関連していた。これらの変化は試験18日に安楽殺された動物の肝臓でみられた所見と類似していた。しかしながら、試験18日に安楽殺された動物では、肝細胞壊死は剖検でみられた暗赤色巣とともに尾状葉にしか認められなかった。実験動物のラットやウサギでは、肝臓の尾状葉は偶発的な捻転あるいはそれに後続した梗塞による葉の壊死が起こりやすい部位として知られている[4.3: 05FQ79][4.3: 05KZBN]。さらに、この動物でみられた肝臓の限局的な所見は、通常肝葉をまたいで全体的に発現がみられる薬剤誘発性の肝臓の変化とは一致しない[4.3: 05FMZS][4.3: 05FQC6]。したがって、この動物でみられた尾状葉に限局した中等度の肝細胞壊死は、捻転に起因した可能性があり偶発的な所見であると考えられた。投与期間終了時の剖検において1例にみられた中等度の肝細胞壊死は、特にげっ歯類において偶発的所見として様々な発生頻度及び程度で観察される限局性又は多巣性の肝細胞壊死に類似していた[4.3: 05FMZS][4.3: 05FQC6]。また、200 mg/kg/日群ではこのほかにも一部のラットにごく軽度の肝細胞壊死がみられ、200 mg/kg/日群での肝細胞壊死の発現頻度は約13%（30例中4例）であった（ただし葉捻転の可能性により、尾状葉に限局して壊死がみられた動物を除く）。この発現頻度は、[redacted] 社（13週間試験で0%～13%、6ヵ月以内の試験で0%～40%）及び Merck 社（13週間以内の試験で0%～17.5%）の背景データの範囲内であった。したがって、本試験でみられた肝細胞壊死の発現頻度は、溶媒を投与した背景データの動物でもみられる通常の変動の範囲内であり、偶発的な生物学的変化を反映していると考えられた。

200 mg/kg/日群の主試験群の雄では腎尿細管上皮における硝子滴の発現頻度の増加がみられた

が、雄ラットの腎臓でみられる硝子滴は通常 α2u-グロブリンである。ヒトでは α2u-グロブリンに相当するタンパクは存在しないことから[4.3: 05M54D]、雄ラットでみられた腎臓での硝子滴の発現頻度の増加は、ヒトには外挿されないと考えられた。26週間の回復期間終了時には、200 mg/kg/日群において下垂体腺腫（雄5例中2例、40%）、又は限局性過形成（雄5例中1例、20%）の発現頻度の増加がみられた。しかしながら、これらの下垂体の所見は SD ラットでは非常に一般的な所見であり[4.3: 05KTQP]、所見の発現頻度は[redacted]社における同程度の週齢のラット（60週齢未満の雄ラット）の背景データ（下垂体腺腫で0%～50%、過形成で0%～19%）の範囲内あるいは同等の頻度であった [4.3: 05L7QV]。したがって、下垂体の所見は MK-6482投与には関連がないと考えられる。

MK-6482及び PT3317の TK プロファイル（雌雄合算値）を [表 2.6.6-13]及び[表 2.6.6-14]にそれぞれ示した。血漿 TK 分析の結果から、MK-6482はラットに経口投与後速やかに吸収され、試験1日の高用量の雌の Tmax 4時間を除いて、試験1日及び91日における Tmax はいずれも2時間以内であった。試験1日の消失相の半減期はすべての投与群でおよそ2～2.5時間であり、試験91日ではすべての投与群でおよそ2～5.5時間であった。Cmax 及び AUC0-12は、試験1日の1回目投与及び試験91日の2回目投与のいずれの時点においても、1～100 mg/kg/日 BID の用量範囲で用量の増加に伴い増加したが、用量比を下回る増加であった。低用量（1及び3 mg/kg/回）においては、MK-6482の反復経口投与による非常に軽度な蓄積（2倍以下）が示唆された一方で、高用量（10及び100 mg/kg/回）では反復投与による明らかな蓄積は認められなかった。グルクロン酸抱合体である PT3317の血漿中濃度は親化合物と比較して顕著に低く、試験1日及び試験91日投与時点における Cmax 及び AUC0-12の PT3317/MK-6482のモル比は、それぞれ6%以下及び3%以下であった。

表 2.6.6-13　MK-6482 を経口投与したラットにおける MK-6482 の平均血漿中 TK パラメータ（TT #[redacted]-7809）：試験 1 日及び 91 日（雌雄合算値）

Day	Dose Level [a, b] (mg/kg/dose)	Dose Level [a, b] (mg/kg/day)	AUC0-12hr [c] (µg*hr/mL)	AUC0-24hr [c, d] (µg*hr/mL)	Cmax [c] (µg/mL)	Tmax [c] (hr)
1	1 [e]	2 [e]	0.408	0.816	0.120	1.00
	3	6	1.22	2.44	0.307	1.25
	10	20	3.74	7.48	0.744	1.50
	100	200	10.3	20.6	1.37	3.00
91	1[e]	2[e]	0.822	1.64	0.211	1.00
	3	6	1.58	3.16	0.454	1.00
	10	20	4.04	8.08	0.905	1.50
	100	200	8.89	17.8	1.37	1.50

AUC0-12hr = area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 12 hours; AUC0-24hr = area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 24 hours; Cmax = maximum plasma concentration;
Tmax = time at maximum plasma concentration
a Doses were administered twice daily, 12 hours apart (± 30 minutes).
b There were no quantifiable MK-6482 plasma concentrations in any samples from the vehicle control group.
c Average of mean male and female toxicokinetic parameters.
d AUC0-24hr was calculated by AUC0-12hr multiplied by two.
e Males only.

表 2.6.6-14　MK-6482 を経口投与したラットにおける PT3317 平均血漿中 TK パラメータ（TT #[redacted]-7809）：試験 1 日及び 91 日（雌雄合算値）

Day	Dose Level [a, b] (mg/kg/dose)	Dose Level [a, b] (mg/kg/day)	AUC0-12hr [c] (µg*hr/mL)	AUC0-24hr [c, d] (µg*hr/mL)	Cmax [c] (µg/mL)	Tmax [c] (hr)
1	1 [e, f]	2 [e, f]	-	-	0.003	1.00
	3	6	0.051	0.102	0.013	0.50
	10	20	0.053	0.106	0.023	1.25
	100	200	0.254	0.508	0.071	1.00
91	1 [e, g]	2 [e, g]	-	-	-	-
	3 [f]	6 [f]	-	-	0.003	0.50
	10	20	0.031	0.062	0.015	1.00
	100	200	0.045	0.090	0.009	1.00

AUC0-12hr = area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 12 hours; AUC0-24hr = area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 24 hours; Cmax = maximum plasma concentration;
Tmax = time at maximum plasma concentration; -=Not determined/not reported
a Doses were administered twice daily, 12 hours apart (± 30 minutes).
b There were no quantifiable PT3317 plasma concentrations in any samples from the vehicle control group.
c Average of mean male and female toxicokinetic parameters.
d AUC0-24hr was calculated by AUC0-12hr multiplied by two.
e Males only.
f Toxicokinetic parameters for the 2 mg/kg/day males on Day 1 and for the 6 mg/kg/day males and females on Day 91 were determined with only one individual non-zero plasma concentration and consequently, presented for information only.
g Toxicokinetic parameters were not determined for the 2 mg/kg/day males on Day 91 since all plasma concentrations were BLQ.

結論として、ラットに MK-6482を2（雄のみ）、6、20及び200mg/kg/日［1（雄のみ）、3、10及び100 mg/kg BID］の用量で13週間経口投与した際の忍容性は良好であった（ただし、MK-6482には関連しないと考えられる試験18日に安楽殺した200 mg/kg/日群の1例を除く）。MK-6482の投与に関連する所見は、すべての用量でみられた可逆的な軽度から中等度の赤血球量の減少であった。雄生殖器における病理組織学的所見は、6 mg/kg/日以上の群における精巣での精細管変性／萎縮及び精巣上体での低精子形成／細胞残渣の増加であり、これに関連して精巣及び精巣上体の重量の減少、及び／又は小型化／軟化がみられ、これらの所見は28日間及び26週間の回復期間内に回復が認められなかった。2 mg/kg/日群のごく軽度な精細管の変性は完全に回復し、有害ではないと考えられた。

6 mg/kg/日以上の群の病理組織学的検査で認められた雄生殖器の変性性の所見に基づき、雄の NOAEL は2 mg/kg/日（1 mg/kg BID）であり、この用量での平均 AUC0-24及び Cmax はそれぞれ1.64 µg•hr/mL 及び0.211 µg/mL であった（雌雄合算値）。雌では有害な組織所見が認められなかったことから、NOAEL は200 mg/kg/日（100 mg/kg BID）以上であり、この用量での平均 AUC0-24及び Cmax はそれぞれ17.8 µg•hr/mL 及び1.37 µg/mL であった（雌雄合算値）。

2.6.6.3.6　Wistar Han ラットを用いた13週間反復経口投与毒性試験（TT #[redacted]-9011）

MK-6482を Wistar Han ラットに反復投与した際の毒性及び TK 評価のために本 GLP 試験を行った[2.6.7.7.D 項]。

MK-6482［[redacted]処方を0.5%（w/v）MC/0.1%（w/v）HPMCAS-HF/20 mM TRIS 水溶液（pH 7.2）を用いて調製］又は0.5%（w/v）MC/0.1%（w/v）HPMCAS-HF/20 mM TRIS 水溶液のみを13週間（QD）、経口投与した。試験デザインは[表 2.6.6-15]及び[表 2.6.6-16]に示した。

表 2.6.6-15　Wistar Han ラットを用いた 13 週間反復経口投与毒性試験
：試験デザイン（TT #[redacted]-9011）本試験

Group No.	Test Material	Dose Level[a] (mg/kg/day)	Dose Volume[b] (mL/kg)	Dose Concentration (mg/mL)	Adjusted Dose Concentration[c] (mg/mL)	No. of Animals Main Study	
						Males	Females
1	Control Article[d]	0	5	0	0	10	10
2	MK-6482	30	5	6	24	10	10
3	MK-6482	100	5	20	80	10	10
4	MK-6482	300	5	60	240	10	10

HPMCAS-HF =Hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate-HF; TRIS = Tromethamine
a　Dosed once daily via oral gavage for 91 days.
b　Based on the most recent body weight measurement.
c　Dose concentrations were adjusted (based on BioRatio) by a correction factor of 4.
d　180 mg/mL HPMCAS-HF in 20 mM pH 7.2 TRIS buffered 0.5% MC/0.1% HPMCAS-HF.

表 2.6.6-16　Wistar Han ラットを用いた 13 週間反復経口投与毒性試験
：試験デザイン（TT #[redacted]-9011）TK 試験

Group No.	Test Material	Dose Level[a] (mg/kg/day)	Dose Volume[b] (mL/kg)	Dose Concentration (mg/mL)	Adjusted Dose Concentration[c] (mg/mL)	No. of Animals Toxicokinetic Study	
						Males	Males
1	Control Article[d]	0	5	0	0	6	6
2	MK-6482	30	5	6	24	6	6
3	MK-6482	100	5	20	80	6	6
4	MK-6482	300	5	60	240	6	6

HPMCAS-HF =Hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate-HF; TRIS = Tromethamine
a　Dosed once daily via oral gavage for 91 days.
b　Based on the most recent body weight measurement.
c　Dose concentrations were adjusted (based on BioRatio) by a correction factor of 4.
d　180 mg/mL HPMCAS-HF in 20 mM pH 7.2 TRIS buffered 0.5% MC/0.1% HPMCAS-HF.

毒性の評価は死亡、一般状態、体重、体重増加量、摂餌量、眼科検査、臨床検査（血液学、凝固系、血液生化学及び尿検査）、TK パラメータ、臓器重量、剖検並びに病理組織学的検査に基づいて行った。

いずれの用量でも MK-6482の忍容性は良好であった。試験期間を通して MK-6482に関連した死亡、一般状態、体重、摂餌量、凝固系及び尿検査パラメータに変化は認められず、MK-6482に関連した眼科検査所見もみられなかった。

MK-6482に関連した血液学的パラメータの変化には用量依存性がみられ、試験22日及び92日の30 mg/kg/日以上の群で認められた軽度から中等度の赤血球量（赤血球数、ヘモグロビン及びヘマトクリット値）及び網状赤血球数の減少（30 mg/kg/日群の雌の網状赤血球数を除く）、並びに試験22日及び／又は92日でのごく軽度から軽度の血小板数の増加（100 mg/kg/日以上の群の雄、

30 mg/kg/日以上の群の雌）が認められた。血液生化学パラメータの変化は、100 mg/kg/日以上の群（雌雄）で認められた試験22日及び／又は92日のごく軽度から軽度のクロールの減少に限定された。

試験終了時の剖検（試験92日）における MK-6482に関連した所見は、30 mg/kg/日以上の群での精巣及び精巣上体の剖検所見及び臓器重量の変化、並びに精巣、精巣上体及びハーダー腺の病理組織学的所見であった。また、MK-6482に関連した臓器重量の変化として、100 mg/kg/日以上の群での心臓重量及び300 mg/kg/日群での肝臓重量の増加がみられた。

精巣では30 mg/kg/日以上の群でごく軽度から重度の精細管変性が認められ、この所見は30及び300 mg/kg/日群の各動物でみられた精巣の小型化及び30 mg/kg/日以上の群での平均精巣重量の減少と一致していた。関連した変化として、精巣上体ではごく軽度から重度の精子減少がみられ、この所見は30 mg/kg/日群の1匹でみられた精巣上体の小型化及び30 mg/kg/日以上の群での平均精巣上体重量の減少と一致していた。

ハーダー腺では、30 mg/kg/日以上の群の雄で用量依存性のあるごく軽度から軽度の腺房細胞の単細胞壊死の発生頻度の増加（対照群との比較）が認められた。この変化と関連する眼の病理組織学的変化はみられなかった。所見の程度が軽いこと、ヒトにはハーダー腺がないことを考慮すると、本所見のヒトでの毒性学的意義は乏しいと考えられた。

MK-6482に関連した臓器重量の変化は、100 mg/kg/日以上の群での用量依存性のある平均心臓重量［絶対重量及び相対重量（体重比及び脳重量比）］の増加、及び300 mg/kg/日群での肝臓重量の増加（病理組織学的変化を伴わない）であった。肝臓重量の増加は病理組織学的所見を伴わなかったことから、毒性学的意義は乏しいと考えられた。また、心臓重量の増加はヘモグロビンの減少に対する二次的な適応反応であり、可逆的と予想されることから毒性学的意義は乏しいと考えられた。

Wistar Han ラット（雌雄）に MK-6482を30、100及び300 mg/kg/日の用量で投与した際、MK-6482及び PT3317（MK-6482のグルクロン酸抱合体）の平均血漿中 AUC0-24及び Cmax に明らかな性差は認められなかった。MK-6482の平均血漿中 AUC0-24は30 mg/kg/日群及び100 mg/kg/日群の用量間では用量比例性がみられたが、100 mg/kg/日群及び300 mg/kg/日群の用量間では用量比をやや下回った。また、Cmax はすべての用量間で概して用量比を下回った。PT3317の平均血漿中 AUC0-24はすべての用量間で概して用量比を上回り、平均血漿中 Cmax は30 mg/kg/日群及び100 mg/kg/日群の用量間では用量比を上回ったが、100 mg/kg/日群及び300 mg/kg/日群の用量間では用量比通りの増加であった。まとめると、PT3317の平均全身曝露値は MK-6482より低く、PT3317の平均血漿中 AUC0-24及び Cmax 値は MK-6482の8%又はそれ以下であった。平均 TK パラメータを[表2.6.6-17]に示す。