

細胞内取り込み活性試験は、本薬が体内において細胞内に取り込まれることにより細胞内に蓄積した CTH を減少させるものであることを考慮して設定されている。試験では細胞としてヒト [REDACTED] 細胞を用い、原薬及び [REDACTED] をそれぞれ添加して一定時間培養した後、[REDACTED] の酵素活性を測定している。機構は、細胞としてヒト [REDACTED] 細胞を用いた理由について説明を求め、申請者は以下のとおり回答した。

本薬の細胞内への取り込みについて、ヒト [REDACTED] 細胞とファブリー病患者の体内で CTH の蓄積が認められている血管内皮・外皮、平滑筋細胞等と比較した試験は実施していないが、ヒト [REDACTED] 細胞はM6P受容体を介してM6P型糖鎖を有するたんぱく質を取り込む細胞であること、また分離培養が容易であり、セルバンクを調製して本薬の品質試験に必要とされる量を確保できることから選択したと回答した。

機構は、ヒト [REDACTED] 細胞のセルバンクの調製及び培養条件についても申請書への記載を求め、適切に対応されたのでこれを了承した。

機構は、低分子量グリコフォームについて、位置づけとして目的物質関連物質と捕らえているか申請者の見解を求めるとともに、ヒト [REDACTED] 細胞への取り込みが低いことから限度値を設定する必要はないか、検討を求めた。申請者は、低分子量グリコフォームについて細胞内への取り込みが低いことから目的物質関連不純物と考えるとし、純度試験を設定して管理することとすると回答した。試験法として、純度試験の SDS-PAGE を準用し、デンシトメーターにより測定したとき高分子量グリコフォームは [REDACTED] %以上とすると設定されたので、機構はこれを了承した。

機構は、本薬の細胞内への取り込みに必須とされる M6P について、C\*原薬と D\*原薬について比較して説明するよう求め、また含量規格を設定する必要はないか申請者に尋ねた。申請者は、D\*原薬について M6P 含量を測定していないが、糖鎖マップにおいて M6P が結合した糖鎖のピークグループの構成比は両者でほぼ一致していると考えるとし、また、糖鎖マップにより糖鎖の構成比を管理していること、ヒト [REDACTED] 細胞内への取り込み活性試験を設定していることから、M6P の含量を規格化して管理しなくとも M6P 含量の恒常性は管理されていると回答した。機構は回答を了承した。

## ⑤ 標準物質について

D\*原薬への変更に伴い、D\*製法で調製された自家標準物質が新たに立てられ、純度及び特性に関する試験結果より、C\*製法による標準物質と同様であると判断されている。

自家標準物質の規格として原薬と同一の規格が設定されていたことから、機構は、標準物質は原薬及び製剤の試験の際の対照標準として使用されることから、アミノ酸配列、糖組成分析等の直接構造を確認できる試験法を設定するよう求めた。申請者はたんぱく質の一次構造を確認するために、N 末端アミノ酸配列に関する規格を設定し、また糖鎖についても糖鎖マップの規格に各ピークグループの面積百分率を設定すると回答した。機構はこれを了承した。

## (2) 製剤

### ① 製剤について

製剤は、原薬に安定剤であるポリソルベート 20 を添加した注射用製剤である。米国第 I 相試験では安定剤として [REDACTED] を添加した製剤が使用されたが、その後安定剤はポリソルベート 20 に変更された。ポリソルベート 20 には、加速条件下で本薬の生物活性低下と重合体

形成を抑制する効果が確認されている。製剤は 5mL のホウ珪酸ガラスバイアルに [ ] mL を無菌的に充填しブチルゴム栓を施したものである。

国内臨床試験を開始する以前に、製剤を冷所保存（2～8°C）すると 6 カ月目以降にわずかな微粒子の発生が認められたことから、国内における臨床試験製剤は -65°C 以下で保存したものを使用した。その後、この微粒子は遊離脂肪酸であることが確認され、ポリソルベート 20 が分解されて生じたものと推定されたことから、申請者は遊離脂肪酸等ポリソルベート 20 の分解物の安全性について文献調査を行い、製剤の安全性に影響を与えないことを確認したとしている。また、米国及び英国で実施された臨床試験では、微粒子が発生すると考えられる期間 2～8°C で保存した製剤をインラインフィルター使用のもと患者に投与しているが、臨床効果や安全性は -65°C 以下で保存した製剤を使用した国内臨床試験と同様であったことから、-65°C 以下と 2～8°C に保存した製剤は同等であると申請者は判断しており、欧米と同様に国内においても貯法は 2～8°C として申請されている。

機構は、両条件で保存した製剤を比較した臨床試験が実施されていないため、両者が同等であるか直接的に判断することはできないが、微粒子が発生していたと推定される欧米での試験においてインラインフィルターの目詰まり等が報告されていないこと、国内の治験においてもインラインフィルターを使用して投与を実施していたこと、またインラインフィルターによるろ過前後で製剤の酵素活性及びたんぱく質濃度に変化が認められていないとの試験結果があること、さらには安定性試験の結果を踏まえ、2～8°C 保存条件下で遊離脂肪酸の微粒子が発生したとしても、インラインフィルターを使用することにより、同様に使用することができるとする申請者の見解を了承した（安定性の項も参照）。

## ② 製剤の管理について

製剤の規格及び試験方法として、性状、確認試験（SDS-PAGE のウェスタンプロット法による検出）、pH、純度試験（RP-HPLC 法、SE-HPLC）、比活性、定量法（紫外可視吸光度測定法）のほか、注射剤の製剤試験が設定されている。ただし、保存中に安定剤のポリソルベートが分解されて遊離脂肪酸が微粒子として発生することが確認されていることから、不溶性異物検査及び不溶性微粒子試験は出荷時に参考試験として実施することとされており、規格としては設定されていない。機構は、製剤の投与時に 0.2 μm のインラインフィルターの使用を義務付けることを前提に、これら 2 項目を規格として設定しないこともやむを得ないと判断した。

純度試験の RP-HPLC について、D\*原薬の実測値も踏まえて規格値を厳密に設定するよう求め、対応されたのでこれを了承した。

## ハ. 安定性に関する資料

### ① 原薬の安定性について

D\*原薬の安定性試験は、プラスチック容器（本体：ポリエチレンテレフタレート共重合体、蓋：高密度ポリエチレン）に入れたものについて、長期保存試験（-65～-85°C、12 カ月（[ ] カ月まで継続中）、加速試験（5±3°C、6 カ月間）及び苛酷試験（25±2°C/60±5%RH、3 カ月間）が実施されている。長期保存試験（12 カ月間）、加速試験及び苛酷試験において、純度、生物活性、比活性等に経時変化は認められず、これらの条件下では安定であることが示された。

## ② 製剤の安定性について

D\*原薬で製造された製剤の安定性試験として、長期保存試験（5±3°C、18 カ月（■カ月まで継続中））及び加速試験（25±2°C/60±5%RH、6 カ月）が実施されている。

長期保存試験 12 カ月までの試験成績及び加速試験において、純度、生物活性、比活性等に経時変化は認められず、これらの条件下では安定であるとされた。しかしながら、長期保存試験の 9 カ月以降、細胞内取り込み活性試験、IEF、RP-HPLC 等の試験項目が外されたことについて、機構は安定性を評価するうえで重要と考えられるこれらの項目をはずした理由を申請者に尋ねた。申請者は、糖鎖マップ試験により細胞内への取り込み活性に影響する M6P を含有する糖鎖の変化を迅速かつ明確に検出できること、IEF に反映される糖鎖の不均一性も糖鎖マップで検出できること、RP-HPLC は C\*製剤の安定性試験で変化を認めなかつたことから試験項目から削除したと説明した。しかしながら、これらの項目は安定性を確認するうえで有用な項目であると考えられることから、今後測定を行う 18 カ月以降については試験を行うとしたため、機構はこれを了承した。その後 18 カ月時点の試験成績が提出された。

このほか、C\*原薬により調製された製剤について、苛酷試験が実施されている。高温条件下（38～42°C/70～80%RH、6 カ月）では、1 カ月後より重合体の著しい増加を認め、6 カ月後には IEF の泳動パターンに変化が認められた。光照射（25°C/総照度 120 万 lux・hr、総近紫外放射エネルギー 200W・h/m<sup>2</sup>、25°C/総照度 140 万 lux・hr、総近紫外放射エネルギー 252W・h/m<sup>2</sup>）では、一次包装品で重合体の著しい増加と細胞内取り込み活性の減少を認めたが、2 次包装品（紙箱入り）では変化は認められなかった。また、振盪（5°C 又は 25°C にて毎分 150 回、24 時間）による品質の低下は認められなかった。

製剤は用時生理食塩液にて希釈して投与されることから、希釈後の安定性についても検討された。生理食塩液 100mL に本薬の 14mg 相当量を添加した液について 24 時間まで酵素活性及び総たんぱく質量に変化は認められなかった。

機構は、製剤を 2～8°C で保存することにより経時的に脂肪酸微粒子が発生することが確認されているものの、その他の項目については少なくとも 18 カ月まで変化は認められていないことから、臨床成績において 2～8°C で保存した製剤を使用した海外試験と -65°C で保存した製剤を使用した国内試験との間に有効性及び安全性の差異が指摘されていないのであれば、投与時にインラインフィルターによる脂肪酸微粒子の除去がなされることを条件に、貯法を 2～8°C とすることは可能と考えている。有効期間についてはこれまでに提出された試験成績に基づき、18 カ月の安定性は確認されていると判断した。また、光による品質の劣化が認められたことから貯法として「遮光」とすることが必要であると考え、申請者に求めたところ、貯法に追加されたのでこれを了承した。

## 二. 毒性に関する資料

### 1) 提出された資料の概要

#### (1) 単回投与毒性試験

単回投与毒性試験は静脈内投与により、ラット及びサルで検討されている。試験には 1mg/mL 浓度の製剤を用いていることから、高用量は投与可能な上限量である 10.0mg/kg に設定されている。ラットでは 9 週齢の SD 系ラット雌雄各群 10 匹に、1.0 及び 10.0mg/kg を単回静脈内投与し、各群雌雄各 5 匹を投与 24 時間後、残り雌雄各 5 匹を 14 日間の観察期間終了時に解剖している。

いずれの群も死亡例はなく、致死量は 10.0mg/kg を上回ると判断された。サルでは 69 カ月齢のカニクイザル雌雄各 1 頭/群に、1.0 又は 10.0mg/kg を単回静脈内投与し 14 日間観察している。いずれの群でも死亡例はなく、致死量は 10.0mg/kg を上回ると判断されている。ラット、サルいずれの動物でも投与に起因する毒性学的影響は認められていない。

## (2) 反復投与毒性試験

反復投与毒性試験はラット、イヌ及びサルを用いて検討されている。高用量として設定した投与量の 1.0 mg/kg は臨床予定用量の 5 倍、2 週間あたりの投与では 10 倍量に相当する。ラットの反復投与及び回復試験は 7 週齢 SD 系ラット雌雄各群 20 匹に、0.0625、0.25 及び 1.0mg/kg を 1 週間に 1 回、13 週間反復静脈内投与を行い、各群雌雄各 10 匹を 4 週間の回復試験に供している。全期間を通じ死亡例や毒性学的影響は認められず無毒性量は 1.0mg/kg を上回ると判断されている。血清中  $\alpha$  GAL 活性について、投与 1、4、8、13 週時の  $C_{max}$  及び AUC は雌雄とも投与量に応じた曝露が認められたが、反復投与による蓄積は認められないとしている（ヘ項参照）。なお、抗  $\alpha$  GAL 抗体の產生が認められている（参ニ・1 参照）が、抗体產生に起因すると考えられる毒性は認められていない。

イヌの 4 週間反復静脈内投与及び 4 週間回復試験は 5 カ月齢のビーグル犬雄 6 頭/群に 0.0625、0.25 及び 1.0mg/kg を当初 1 週間に 1 回 13 週間にわたり反復静脈内投与を行う予定で開始したが、投与群の約半数例の動物（18 例中 8 例）に激しい嘔吐、呼吸促迫、下痢等の重篤なアナフィラキシー反応が発現したため、投与を 4 週間（4 回）で中止し各群 2 例の動物は 4 週間の回復試験に、残りの動物は血液学的、血液生化学的検査を行った後剖検し病理組織学的検査を実施している。認められた症状は 3 ないし 4 回目の投与中あるいは投与直後に発現し、これら所見は通常イヌで認められるアナフィラキシー症状と同質で、病理学的検査では消化管の出血や血中ヒスタミン濃度が上昇し、さらに抗体の產生を伴っていることより、異種たんぱくに対する免疫反応が強く発現した典型的なアナフィラキシー症状であると考えられた。単回投与での  $C_{max}$  及び AUC は投与量に伴い上昇することが確認されている一方、1.0mg/kg の 4 週間（4 回）投与後では単回投与と比べ  $C_{max}$  は低下したが、AUC は上昇（蓄積）する傾向が認められている。本試験で投与に起因する直接的な毒性はみられなかったものの、異種たんぱくに対する非特異的な免疫反応が強く発現しアナフィラキシーにより約半数例の動物が死亡し、イヌを用いた非げっ歯類の反復投与毒性の評価は困難として、サルを用いた反復投与毒性試験を実施している。

サルでの 13 週間反復投与及び 4 週間回復試験は 2~3 年齢のカニクイザル雄 5 頭/群に 0.063、0.25 及び 1.0mg/kg を 1 週間に 1 回、13 週間の反復静脈内投与を行った後、各 2 頭/群は 4 週間の回復性試験に供している。投与及び休薬期間を通じ死亡例は認められずサルでの無毒性量は 1.0mg/kg を上回ると判断されている。

本薬の保存条件の変更（冷蔵→冷凍）に伴い発生する重合体の安全性評価は、通常製剤と重合体を高濃度に含む製剤（以下、重合体エンリッチ品）との比較で行っている。実験は、6 週齢の Crj:CD(SD) 雄性ラット各群 10 匹に、通常製剤及び重合体エンリッチ品それぞれ 0.25 及び 1.0mg/kg を 1 週間に 1 回、4 週間（4 回）反復静脈内投与している。高投与量はラット 13 週間並びに 26 週間投与試験で用いた高投与量を設定している。重合体エンリッチ品の重合体含有量は 1.55%（規格：1.0%以下）である。いずれの投与群においても、死亡動物や通常製剤及び重合体エンリッチ品に起因した毒性は認められていない。血清中  $\alpha$  GAL 活性については、初回投与日

(1週) 及び最終投与日 (4週) の C<sub>max</sub> 及び AUC で雌雄ともに投与量に伴って上昇したが、反復投与による蓄積性は認められていない (参ニ-2参照)。

### (3) 慢性毒性試験

慢性毒性は、ラット及びサルの 13 週間反復投与試験の結果において、血中動態や曝露の程度に種差がなく蓄積性を認めなかつたこと、ラットの 26 週間反復投与試験では高用量 (1.0mg/kg) においても毒性を認めなかつたこと等から、ラットでのみ慢性毒性試験で検討している。

26 週間反復静脈内投与及び 4 週間回復試験は 7 週齢 SD 系ラット雌雄各群 20 匹に、0.063、0.25 及び 1.0mg/kg を 1 週間に 1 回、26 週間静脈内投与で行い各群雌雄各 10 匹を 4 週間回復試験に供している。0.063mg/kg 群の雌雄各 1 匹、0.25mg/kg 群の雌 1 匹は状態が悪化したため切迫殺、1.0mg/kg 群の雌雄各 1 匹が死亡している。状態が悪化した原因として 0.063mg/kg 群の雄は変形肋骨が原因と考えられる呼吸困難、雌は眼窩静脈叢からの採血時における傷害、0.25mg/kg 群の雌は乳腺の腺癌が考えられた。1.0mg/kg 群の死亡原因は雄が前立腺の腫瘍、雌は腎芽腫であった。また、腎芽腫は回復群の 1.0mg/kg 群の雌 1 匹にも発生した。認められた腫瘍について、乳腺の腺癌は組織型などから同系統で好発する自然発生性であると考えられ、腎芽腫の発生についても偶発性の可能性が高いと考えられた (腎に対する影響は後述)。したがって、状態の悪化や死亡に被験物質の直接的な関連性は認められなかつたことから、無毒性量は 1.0mg/kg を上回ると判定されている。

なお、抗  $\alpha$  GAL 抗体の産生が認められたが、抗体の産生に起因すると考えられる毒性は認められていない。

腎臓の影響に対するエキスパートレポートとしてラット 26 週間反復静脈内投与及び 4 週間回復試験での腎臓を病理組織学的に精査し、発現した腎腫瘍と投与の関連性について、病理専門家によるレビューを実施している。全動物の腎臓の病理組織標本を光学顕微鏡的に精査した結果、高用量投与群と回復群の雌各 1 例で典型的な腎芽腫が認められたが、その他の腎腫瘍は認められていない。腫瘍以外の所見として加齢性の自然発生性の病変が認められたのみで、前腫瘍性病変を含む腎臓のいかなる構成組織にも投与の影響は認められていない。

腎芽腫は胎児性の腫瘍であり、化学物質等によるラット実験的誘発では腎臓組織が未発達な胎児や未熟な個体の感受性が高いことが報告されている。腫瘍の発生には通常前病変が伴い、ラット腎芽腫の場合の前腫瘍性病変は、尿細管間に芽細胞の小集簇として見られるが、本レビューでは認められていない。また本薬は生物学的たんぱく産物であり非遺伝毒性物質と考えられ、通常腎芽腫を誘発する化学物質は強い遺伝障害性を有し多臓器に対する発癌物質でもある。これら化学物質による腎芽腫の誘発には胎児発生後期での経胎盤投与、卵巣摘出若齢ラットへの投与あるいは免疫抑制下での投与など特殊な状況下での報告が多い。さらに米国 National Toxicology Program (NTP) あるいは National Cancer Institute (NCI) program で試験された約 400 の化合物中 39 種類がラットあるいはマウスに腎臓腫瘍を誘発したが、組織型はいずれも腎芽腫ではなかった。以上の理由から本薬と腎芽腫発生の関連性は極めて低く、さらにある種の系統のラットでは腎芽腫が高率に発現し、遺伝的要因も発生に重要な関わりが考えられる。このうち、Upjohn Sprague-Dawley 系の亜系統では雄よりも雌でより発現するとの報告があり、本薬の 26 週間投与試験に用いた Sprague-Dawley ラットは同腹児の履歴はないものの、腫瘍が発現した 2 例の雌ラットが近い関係にある可能性は否定できない。結論として本試験で発現した腎芽腫の発現は自

然発生的なものと考えられる。

#### (4) 生殖発生毒性試験

生殖発生毒性試験として、ラットを用いた生殖機能及び次世代の発生に及ぼす影響について「雄ラットにおける授胎能に関する試験」及び「雌ラットにおける受胎能及び催奇形性に関する試験」が実施されている。また、ウサギを用いた母動物及び次世代の発生に及ぼす影響は「ウサギにおける催奇形性に関する試験」が実施されている。

雄ラットにおける授胎能に関する試験は雄ラットに交配前 28 日間及び交配期間から剖検まで、0、0.0625、0.25 及び 1.0mg/kg を 3 回/週、投与し無処置雌と交配後、受胎した雌は妊娠 13 日に帝王切開を行い雄の生殖機能及び次世代の発生に及ぼす影響を検討している。いずれの投与量においても投与に起因すると考えられる一般毒性、雄の生殖能や生殖器官重量、精子検査及び精巢の病理組織学的検査で影響はなかった。さらに、胎児に対しても胚児致死作用はみられず、雄動物の一般毒性及び生殖並びに次世代の発生に対する無毒性量は 1.0mg/kg を上回ると判定されている。

雌ラットにおける受胎能及び催奇形性に関する試験は雌ラットに交配 14 日前から妊娠 17 日まで 0、0.0625、0.25 及び 1.0mg/kg を 1 日 1 回投与し無処置の雄と交配させている。妊娠した雌は妊娠 20 日目に帝王切開し、生殖機能及び次世代の発生に及ぼす影響を検討している。いずれの群でも投与に起因すると考えられる一般毒性や雌の生殖能に影響はなかった。また胎児についても胚・児致死作用及び催奇形作用は認められず雌動物の一般毒性及び生殖及び次世代の発生に対する無毒性量は 1.0mg/kg を上回ると判定されている。

催奇形性に関する試験として雌のウサギに 1 日 1 回の頻度で妊娠 7 日から 19 日まで 0、0.0625、0.25 及び 1.0mg/kg を投与し、母動物及び次世代の発生に及ぼす影響を検討している。いずれの投与量においても、投与に起因すると考えられる一般毒性及び妊娠維持に対する影響は見られていない。また、胎児についても胚・児致死作用及び催奇形作用は認められず雌動物の一般毒性及び生殖並びに次世代の発生に対する無毒性量は 1.0mg/kg を上回ると判定されている。

#### (5) 抗原性試験

抗原性試験としては原薬中に含まれる不純物である BIgG、BSA 及びウシトランスフェリンの抗原性を評価するために、本薬及び不純物 (BIgG : 2.0 μ g/mg, BSA : 300ng/mg, ウシトランスフェリン : 200ng/mg) を添加した本薬のモルモットを用いた能動的全身性アナフィラキシー (以下、ASA) 及び受身皮膚アナフィラキシー (以下、PCA) 試験を実施している。

Hartley 系雌性モルモットを用い感作は 0.2mg/kg の本薬 (不純物無添加品及び不純物添加品) を週 1 回、3 週間静脈内投与した。感作動物に本薬を含まない不純物混合液を静脈内投与して ASA 反応を惹起した。また、感作動物より得た血清を皮内投与した動物に、エバンスブルーと不純物混合液を静脈内投与して PCA 反応を惹起した。いずれの抗体検出系においても不純物に対する反応は認められていない。一方、これらの感作動物又は感作血清を用いて本薬で惹起した場合には、アナフィラキシー反応が認められた。

以上の結果から、本薬はヒトたんぱくであることからモルモットで抗原性を示すものの、本試験条件下では本薬に含まれる不純物の抗原性は認められないとしている。

本薬の保存条件変更 (冷蔵→冷凍) に伴い発生する重合体と本薬の抗原性の異同についてモル

モット血清を用いたゲル内沈降反応（Ouchterlony 法）で検討している（参考資料ニ-4）。

Hartley 系雄性モルモットを用い本薬重合体エンリッチ品感作群として、臨床用量である 0.2 mg/kg を静脈内に 2 回あるいは 3 回投与する群、陽性対照群として 2 mg/kg の卵白アルブミン（以下、EA）を皮下投与する群、対照群として無処置群を設けている。最終感作 2 週間後に血清を採取してゲル内沈降反応（Ouchterlony 法）を実施した結果、本薬重合体エンリッチ品感作群及び EA 感作群より得られた血清はいずれも抗原である本薬重合体エンリッチ品あるいは EA と沈降線を形成せず、本感作条件で得られた血清では抗原性の異同を評価できていない。陽性対照である EA 投与群でも沈降線は形成されなかつたが、同時期に実施した EA を Freund's complete adjuvant（以下、FCA）とともに投与した試験では沈降線が形成されたことから、抗原性を評価するためには FCA を用いた検討が適切と考え、追加検討を実施している。

Hartley 系雄性モルモットを用い、臨床用量（0.2 mg/kg）の約 3 倍量である 0.58 mg/kg の本薬重合体エンリッチ品を免疫増強剤である FCA とともに週 1 回、3 週間皮下投与して感作し、非感作群として生理食塩液と FCA の等量乳化物を投与する群、陽性対照群として 2 mg/kg の EA を FCA とともに感作する群を設けている。

最終感作 2 週間後に血清を採取してゲル内沈降反応（Ouchterlony 法）を実施した結果、本薬重合体エンリッチ品感作群より得られた血清はいずれも抗原として用いた本薬重合体エンリッチ品及び本薬と沈降線を形成し、かつ 2 本の沈降線はいずれも融合したため、本薬重合体エンリッチ品と本薬の抗原性に異同はないとしている。一方、非感作群より得られた血清はいずれも本薬重合体エンリッチ品及び本薬とは沈降線を形成しなかつた。EA 感作群より得られた血清は EA を抗原とした場合、明かな沈降線を生じ非感作群より得られた血清は EA と沈降線を形成しなかつた。

以上の結果から、本試験条件下では本薬 重合体エンリッチ品と本薬の抗原性に異同は認められないとしている。

機構は、臨床使用における本薬中に含まれる BIgG に対する抗体産生の可能性について説明を求めた。

米国第Ⅱ相試験及び継続投与試験において本薬が投与された被験者 25 例の血清中の抗体を部分精製した宿主細胞たんぱく質及びウシ血清たんぱく質（BIgG を含む）を抗原として ELISA 法で測定したところ、25 例中 8 例において当該抗原に対する抗体が陽性であった。投与時反応が認められた被験者は、陽性 8 例中 4 例、陰性 17 例中 8 例であり、当該抗原に対する抗体発現と投与時反応の間に関連は認められなかつた。また、ドイツにおける女性患者を対象とした臨床試験においては、本薬が投与された被験者 15 例中 2 例で当該抗原に対する抗体が陽性であったが、この 2 例を含め 15 例全例で投与時反応は認められなかつた。以上のことから臨床試験において投与時反応との関連性は認められず、モルモットを用いた抗原性試験においてもアナフィラキシー反応は認められなかつたことから、含有される BIgG が安全性上の問題となる可能性は低いと考えられる旨申請者は回答した。

機構は、回答を了承した。

## （6）遺伝毒性試験

遺伝毒性試験は本薬がたんぱく製剤であることより実施されていない。

#### (7) 局所刺激性試験

局所刺激性試験は実施されていない。しかしラット及びカニクイザルで実施した一般毒性試験いずれの試験でも投与部位に異常は認められず、さらに、カニクイザルの試験では病理組織学的検査においても投与部位に異常は認められていない。

#### (8) がん原性試験

本薬はヒト細胞内リソソーム中に存在する加水分解酵素であり、がん原性を指摘する報告もなく、ラットの 26 週間反復投与毒性試験において腫瘍性病変が認められたものの、いずれも自然発生的なものとされたことから、がん原性試験は実施されていない。

#### (9) 依存性試験

各種毒性試験及び一般薬理試験において中枢への影響を示唆する変化が認められなかつたことから、依存性試験は実施されていない。

#### (10) 併用毒性試験

本薬はヒト型酵素たんぱくで遺伝的に本酵素活性が低い患者に対し補充療法として直接血液中に投与され、投与後は機能を発揮する場所である臓器組織に速やかに分布し、血中からは速やかに消失、投与後 3 時間には投与前のレベルまで活性が低下するとの理由により併用毒性に関する試験は実施されていない。

### 2) 機構における審査の概略

機構はラット 13 週間反復静脈内投与時の血清中  $\alpha$  GAL 活性及び  $C_{max}$  が、測定時期と雌雄により差（10 倍）が認められた要因について申請者に説明を求めた。

申請者は以下のように回答した。血清中  $\alpha$  GAL 活性の  $C_{max}$  は、投与後最初の 2 時点である投与後 5 分の濃度（以下、 $C_{(5)}$ ）と投与後 10 分の濃度（以下、 $C_{(10)}$ ）を用い、 $C_{(5)}$  が  $C_{(10)}$  より高い濃度を示した場合は  $C_{(5)}$  及び  $C_{(10)}$  の対数を時間に対してプロットし、これらを結ぶ直線式から、投与直後の濃度（以下、 $C_{(0)}$ ）として外挿して算出、 $C_{(10)}$  が  $C_{(5)}$  より高い濃度を示した場合は  $C_{(10)}$  を、 $C_{(5)}$  及び  $C_{(10)}$  が同じ濃度を示した場合は  $C_{(5)}$  及び  $C_{(10)}$  をそれぞれ  $C_{max}$  として提示した。さらに  $C_{max}$  の測定時期差に異種たんぱくに対する抗体産生が影響している可能性を検討し、血清中  $\alpha$  GAL 活性と抗  $\alpha$  GAL 抗体陽性の動物数の関係については、試験に用いた動物が同一個体でないため明確な関連は不明であるものの、抗体陽性の動物数と血清中  $\alpha$  GAL 活性の変動との間に明確な傾向が認められず、血中濃度と抗体産生の機序については解明できなかつたが、抗体の産生が  $\alpha$  GAL の体内動態に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。また投与量の違いや雌雄を用いた複数の試験において、血清中  $\alpha$  GAL 活性に一定の傾向が認められないため、測定時期の違いや性差によって差が生じた可能性は低いと考えられる。

単回投与後と反復投与後を比較したときの  $C_{max}$  に大きなばらつきが認められた要因としては、本薬は消失が速やかであり、特に静脈内投与直後という薬物濃度が変化しやすい時期の測定であったこと、一時点ごとに別動物から採血したため  $C_{(5)}$  と  $C_{(10)}$  は、異なる動物であること、さらに実測値から外挿して算出した値を用いたためであると考えられた。なお、AUC については大きなばらつきは認められていない。

機構は回答を了承した。

機構はイヌで強いアナフィラキシー反応が認められたことから、種差による反応性の違いについて申請者に説明を求めた。

申請者は以下のように回答した。一般に動物種によりアナフィラキシーに対する反応性は異なり、イヌはラットに比べてアナフィラキシー反応を起こしやすい動物であることが知られているが、その種差のメカニズムについての詳細は明らかではない。アナフィラキシー反応時に血管透過性を亢進させるヒスタミン閾値濃度がイヌはラットと比較して 100~1,000 倍感度が高いことがその一因となった可能性は考えられる。本薬投与によるイヌでのアナフィラキシー反応は、異種たんぱくに対する免疫反応に起因したものであると考え、ヒトで起こる可能性は低いと考えられる。

機構は回答を了承した。

機構は局所刺激性試験を実施せず、ヒトでの安全性を確保出来るとした理由について申請者に説明を求めた。

申請者は以下のように回答した。ラットやサルへのいずれの反復投与試験においても一般症状観察及び剖検の結果、投与部位には何ら所見が認められておらず、また近接した部位に複数回投与した場合でも投与部位における傷害は認められなかった。臨床試験での投与部位についての詳細な記録はないが、投与頻度は 2 週間に 1 回であり、かつ完全に同一部位に投与する可能性は低いことから、臨床での局所刺激性は類推可能であり、本薬の局所刺激性には問題ないと考えられる。なお、本邦での第Ⅱ相臨床試験では、投与部位の刺激性に起因する有害事象は報告されていない。

機構は回答を了承した。

機構は、反復投与毒性試験における最大投与量や反復期間について、一般の薬物に比べると必ずしも十分とはいえないが、本薬はヒト細胞を用いて生産されるスフィンゴ糖脂質の加水分解酵素  $\alpha$  GAL であり、臨床投与量が (0.2mg/kg/2week) であり、それと比べて約 10 倍の用量まで試験されていることを考慮すると、提出された資料からは大きな問題はないと考えた。

## ホ. 薬理作用に関する資料

### 1) 提出された資料の概要

#### (1) 効力を裏付ける薬理試験

ファブリー病患者と同様に肝臓、心臓及び腎臓で CTH が蓄積することが知られている雄性ヘミ接合体  $\alpha$  GAL ノックアウトマウスを用いて本薬の CTH に対する効果について検討された。

約 5~10 カ月齢の雄性ヘミ接合体  $\alpha$  GAL ノックアウトマウスにおいて、本薬 (0.27 及び 0.78 mg/kg) を週 3 回 3 週間（計 7 回）間歇静脈内投与すると、肝臓の CTH 蓄積が減少した（減少率 : 97.7 及び 97.5%、CTH 量 : 対照群  $7.32 \pm 1.87$  nmol/mg protein (平均値  $\pm$  SD)、本薬群  $0.17 \pm 0.04$  及び  $0.18 \pm 0.10$  nmol/mg protein)。各用量での CTH 減少率は、心臓では 73.2% 及び 76.1%

(CTH 量 : 対照群  $2.72 \pm 0.53$  nmol/mg protein、本薬群  $0.73 \pm 0.17$  及び  $0.65 \pm 0.26$  nmol/mg protein)、腎臓では 21.0% 及び 24.2% (CTH 量 : 対照群  $41.29 \pm 8.58$  nmol/mg protein、本薬群  $32.62 \pm 7.75$  及び  $31.30 \pm 9.06$  nmol/mg protein) であった。また、週 1 回 8 週間（計 8 回）間歇静脈内投与した時には、いずれの投与量でも肝臓の CTH は減少し（減少率 : 98.5 及び 99.1%、CTH 量 : 対照群  $11.49 \pm 2.55$  nmol/mg protein、本薬群  $0.23 \pm 0.09$  及び  $0.14 \pm 0.04$  nmol/mg protein）、心臓では 64.9% 及び 86.6% (CTH 量 : 対照群  $1.34 \pm 0.33$  nmol/mg protein、本薬群

$0.47 \pm 0.27$  及び  $0.18 \pm 0.06$  nmol/mg protein)、腎臓では 29.1% 及び 63.5% (CTH 量 : 対照群  $40.95 \pm 4.63$  nmol/mg protein、本薬群  $29.02 \pm 6.90$  及び  $14.93 \pm 2.58$  nmol/mg protein) であった。最終投与 7 日後に肝臓、心臓及び腎臓を採取し、抗  $\alpha$  GAL 抗体を用いて免疫組織化学的染色を行ったところ、本薬投与群での肝臓に強い陽性所見が認められた。

また、以下の資料が参考資料として提示された。約 6.5 カ月齢の雌性ホモ接合体  $\alpha$  GAL ノックアウトマウスに本薬 (0.2 及び 1.0 mg/kg) を単回静脈内投与あるいは本薬 (0.1 及び 1.0 mg/kg) を週 3 回 (計 7 回) 静脈内投与したところ、肝臓、心臓及び腎臓で CTH 減少が認められた。

以上のことから、本薬は肝臓、心臓及び腎臓において CTH 蓄積を軽減させることが示唆された。

## (2) 作用機序

機構は、本薬の作用機序について申請者に説明を求め、申請者は以下のように説明した。

ファブリー病では、細胞内リソソーム中の加水分解酵素である  $\alpha$  GAL の活性が先天的に欠損あるいは低下しているため、本酵素により分解されるべきスフィンゴ糖脂質の蓄積がみられ、主として CTH が様々な細胞や組織内に進行性に蓄積する。ヒト体内において、細胞外に分泌された  $\alpha$  GAL は、その糖鎖部分の M6P 残基が細胞表面の M6P レセプターに結合することによって捕獲され、細胞内に取り込まれてリソソームに輸送されることが知られている (Kornfeld,S. and Mellman, I. Ann. Rev. Cell Biology 1989; 5: 483-525)。このことから、 $\alpha$  GAL を静脈内投与することにより、ファブリー病患者の細胞内リソソームに到達させることができると考えられ、 $\alpha$  GAL の補充療法が検討されてきた。

本薬は、 $\alpha$ -ガラクトース残基を加水分解により切り離す酵素活性を有するとともに、糖鎖には M6P 残基が存在し、これが細胞表面の M6P レセプターに結合することにより細胞内に取り込まれ、リソソームに輸送されて細胞及び組織内に蓄積するスフィンゴ糖脂質を分解することにより効力を発揮するものと考えられる。

## (3) 一般薬理試験

本薬の一般薬理試験として、一般症状及び行動、中枢神経系、呼吸・循環器系、自律神経系・平滑筋、消化器系、泌尿器系、血液系に及ぼす影響が検討され、*in vivo* 試験では 10 mg/kg (i.v.)、*in vitro* 試験では  $3 \times 10^{-5}$  g/mL まで特記すべき事項は認められていない。

## 2) 機構における審査の概略

### (1) モデル動物の妥当性について

機構は、CTH を指標として  $\alpha$  GAL ノックアウトマウスをファブリー病のモデル動物との妥当性について、ファブリー病患者と  $\alpha$  GAL ノックアウトマウスとの病態の相違点及びその理由について、公表論文等での考察もまとめた上で申請者としての考え方を示すよう求めた。

申請者は以下のように回答した。ファブリー病患者と  $\alpha$  GAL ノックアウトマウスでの病態との間には以下のような差がある。

$\alpha$  GAL ノックアウトマウスでは、加齢に伴い、ファブリー病患者で障害を受ける主要臓器とされる腎臓、心臓等で CTH が蓄積する。しかしながら、脂質蓄積パターンについては、血管内皮細胞において、ファブリー病患者では CTH 蓄積が認められるのに対し、ノックアウトマウスで

は軽度である。また、寿命を含めファブリー病患者でみられる臨床症状や臓器障害は、 $\alpha$ GALノックアウトマウスの80週齢まで認められていない(T. Ohshima et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997; 94: 2540-2544, T. Ohshima et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999; 96: 6423-6427)。

$\alpha$ GALノックアウトマウスとファブリー病患者で病態が異なる主な理由としては、糖脂質の代謝系の違いによる可能性が考えられる。ファブリー病患者で蓄積する CTH の供給源は十分には解明されていないが、血管の内皮細胞や平滑筋細胞においては、血中の CTH 取り込みが寄与しており(RJ. Desnick et al., In: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease (ed by CR. Scriver et al.), 7th ed, McGraw-Hill, New York, 1995; p2741-2784,)、赤血球の主要な中性糖脂質であり CTH の前駆体であるグロボシドが血中 CTH の主要な供給源と推定されている。一方、マウスではヒトに比べて赤血球におけるグロボシドの存在量が少ないとされている(T. Ohshima et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999; 96: 6423-6427)。このため、 $\alpha$ GALノックアウトマウスでは血管内皮細胞で CTH が大量に蓄積せず、ヒトの病態とは異なるものと考えられる。さらに、マウスではヒトに比べて寿命が短く臓器への CTH 蓄積期間が短いことが、 $\alpha$ GALノックアウトマウスではファブリー病患者の病態と異なっているが、 $\alpha$ GALノックアウトマウスにおいてもファブリー病患者で蓄積が認められている腎臓、肝臓、心臓等の臓器で同様の CTH 蓄積が観察されることから、外来性に投与した本薬がこれらの臓器に到達し、CTH 蓄積を軽減させることを薬理学的に確認することは可能であると考える。

さらに機構は、 $\alpha$ GALノックアウトマウスで観察している組織(肝臓・心臓・腎臓)の選択理由について、ファブリー病の病態と関連させて説明し、ファブリー病の病態等からみて、他の組織について確認する必要がなかったか申請者に説明を求めた。

申請者は以下のように回答した。ヒトにおけるファブリー病の病態を考慮すると、血管内皮細胞や血管平滑筋細胞における CTH 蓄積及び組織病理を検討することが重要と考えられる。しかしながら、 $\alpha$ GALノックアウトマウスでは血管内皮細胞や血管平滑筋細胞における CTH 蓄積が認められず、これらの細胞における本薬の薬効評価は困難と考える。ラットに<sup>125</sup>I標識した本薬を単回投与したところ、肝臓に比較的高濃度に分布し、腎臓や心臓にも分布していた(吸収・分布・代謝・排泄の項参照)ことから、肝臓、心臓及び腎臓を観察することとした。

以上について機構は、 $\alpha$ GALノックアウトマウスではファブリー病患者で認められるような臨床症状や臓器障害が認められないことから、 $\alpha$ GALノックアウトマウスがファブリー病の病態モデルとして適当であるとは言い切れないものの、本薬による CTH 蓄積の減少作用を確認することは可能であると考えている。

## (2) 投与量等の妥当性について

機構は、投与量及び投与間隔も含めた投与方法の妥当性について、申請者にヒトにおける実使用時を考慮に入れた説明を求めた。また、正常動物と比較したデータもあれば提示するよう求めた。

申請者は以下のように回答した。

### ①投与量及び投与間隔も含めた投与方法の妥当性について

本薬の用法・用量に関しては、本邦及び海外の臨床試験成績に基づき、0.2mg/kgの投与量で2週間に1回の投与頻度が設定されている。

雄性  $\alpha$  GAL ノックアウトマウスにおける本薬の投与量は 0.27 及び 0.78mg/kg であり、臨床での投与量に近い用量で薬効が認められると考えられる。本薬を単回投与した時の血中濃度の半減期は、マウス、ラット等の動物及びヒトともに 2 時間以内と短かったが、ラットに [ $^{125}$ I] 標識した本薬を単回静脈内投与した時の組織（肝臓、心臓及び腎臓）中放射能濃度の半減期は 1~2.5 日であった。また本薬ではないものの、ファブリー病患者由来の線維芽細胞内に取り込まれた  $\alpha$  GAL 活性の細胞内半減期は 4 日であることが報告されている (Mayes JS, et al., Am. J. Hum. Genet. 1982; 34: 602-610)。さらに、米国第 I 相試験において、ヒトでの本薬の肝臓中半減期は 1 日以上と推定される。これらのことから、ヒト及び動物において、本薬の血中や組織濃度の半減期に大きな差はなく、間歇投与でも効果が期待できるものと推察される。

## ② 正常動物との比較について

参考資料として提出した雌  $\alpha$  GAL ノックアウトマウスの試験では、雌正常マウスの CTH レベルも測定している。雌正常マウスの肝臓、心臓及び腎臓の CTH 含量は、それぞれ約 0.04、0.01 及び 0.37 nmol/mg protein であり、雌  $\alpha$  GAL ノックアウトマウス (4.75, 3.32 及び 20.73 nmol/mg protein) に比べて低値であった。一方、雌  $\alpha$  GAL ノックアウトマウスに本薬を投与すると、これらの臓器で CTH 蓄積が軽減され、3 週間間歇投与では肝臓で CTH 蓄積が雌正常マウスのレベル程度まで軽減されたと申請者は考えている。

機構は、回答を了承した。

## (3) 一般薬理試験について

機構は、一般薬理試験として実施された試験の妥当性について申請者に説明を求めた。

申請者は以下のように回答した。

一般症状及び行動では全身組織の障害について、鎮痛作用では後根神経節への影響、呼吸・循環器系では心筋細胞、血管系内皮・外皮、平滑筋細胞、自律神経系、摘出回腸では自律神経系、尿量・尿中電解質排泄では腎上皮細胞及びメサンギウム細胞の障害について確認している。

本薬の臨床用量 0.2mg/kg の 50 倍量に相当する 10mg/kg まで静脈内投与しており、いずれの器官系にも影響は認められていない。以上から、一般薬理試験において実施された試験項目はファブリー病における障害組織と照らして考えた場合でも問題ないものと考える。

機構は、試験で使用した動物の妥当性についても考慮する必要があると考えるもの、本薬が酵素補充療法に用いる薬物であることや毒性試験において確認された内容もあること等を考慮して、提出された資料で評価することとした。なお、実使用時の安全性については臨床の項を参照のこと。

## ヘ. 吸収、分布、代謝、排泄に関する資料

### 1) 提出された資料の概要

薬物動態の検討には、本薬の  $^{125}$ I-標識体及び非標識体が用いられた。血清中放射能濃度は液体シンチレーションカウンターにより測定し、血清中（血漿中）非標識体濃度は内因性  $\alpha$  GAL 活性のバックグラウンド値を差し引いた  $\alpha$  GAL 活性濃度として算出した。また、 $\alpha$  GAL 活性は、合成基質の 4-メチルウンベリフェリル- $\alpha$ -ガラクトピラノシドを 1 時間に 1nmol 加水分解する活性を 1U として表示した。