

アバスチン点滴静注用100 mg/4 mL
アバスチン点滴静注用400 mg/16 mL
(ベバシズマブ（遺伝子組換え）)
[結腸・直腸癌]

第2部 CTD の概要（サマリー）

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.6 毒性試験の概要文

中外製薬株式会社

略語一覧表

略語	英名	和名
A/G	Albumin/globulin	アルブミン／グロブリン
aPTT	Activated partial thromboplastin time	活性化部分トロンボプラスチン時間
BSA	Bovine serum albumin	ウシ血清アルブミン
BUN	Blood urea nitrogen	血中尿素窒素
CPT-11	Irinotecan	塩酸イリノテカン
DG	Day of Gestation	妊娠日
5-FU	5-fluorouracil	フルオロウラシル
hCG	Human chorionic gonadotropin	ヒト絨毛性ゴナドトロピン
IFL	Irinotecan/5-fluorouracil/leucovorin (CPT-11/5-FU/LV)	
LV	Leucovorin	ホリナートカルシウム
NZW	New Zealand White	ウサギの系統／ニュージーランド白色
PT	Prothrombin time	プロトロンビン時間
VEGF	Vascular endothelial growth factor	血管内皮増殖因子

目次

頁

2.6.6	毒性試験概要文	5
2.6.6.1	まとめ	5
2.6.6.2	単回投与毒性試験	9
2.6.6.3	反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む）	9
2.6.6.3.1	カニクイザルを用いたベバシズマブの4週間投与毒性試験（4週間回復試験）	9
2.6.6.3.2	カニクイザルを用いたベバシズマブの13週間投与毒性試験（4週間回復試験）	9
2.6.6.3.3	カニクイザルを用いたベバシズマブの26週間投与毒性試験（12週間回復試験）	10
2.6.6.3.4	ベバシズマブ及びIFL（CPT-11/5-FU/LV）の併用療法	11
2.6.6.3.5	ベバシズマブ及びcisplatin/paclitaxelの併用療法	12
2.6.6.4	遺伝毒性試験	12
2.6.6.5	がん原性試験	12
2.6.6.6	生殖発生毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む）	12
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	12
2.6.6.6.2	ウサギの胚及び胎児発生に関する試験（用量設定試験）	12
2.6.6.6.3	ウサギの胚及び胎児発生に関する試験	13
2.6.6.6.4	出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験	14
2.6.6.7	局所刺激性試験	14
2.6.6.8	その他の毒性試験	14
2.6.6.8.1	ベバシズマブの溶血性及び血液適合性試験	14
2.6.6.8.2	ビオチン化ベバシズマブとウサギ組織、カニクイザル組織、ヒト組織との交差反応性	14
2.6.6.8.3	ウサギにおける抗体産生の検討	14
2.6.6.8.4	ウサギにおける骨端軟骨異形成の検討	15
2.6.6.8.5	雌ウサギにおける卵巣機能に対するベバシズマブの影響	15
2.6.6.8.6	ウサギ線形切開創傷モデルにおける創傷治癒に対するベバシズマブの影響	16
2.6.6.8.7	ウサギ円形創傷モデルにおける創傷治癒に対するベバシズマブの影響	16
2.6.6.8.8	カニクイザルにおける創傷治癒に対するベバシズマブの影響	17
2.6.6.8.9	ウサギモデルを用いた血栓症に関する検討	17
2.6.6.8.10	ベバシズマブの腎臓に対する影響及び腎臓への沈着に関する検討	18
2.6.6.8.11	cisplatin誘発腎障害モデル	18

2.6.6.8.12	ウシ血清アルブミン負荷腎障害モデル	19
2.6.6.9	新添加物の安全性評価.....	20
2.6.6.9.1	単回投与毒性試験	20
2.6.6.9.2	反復投与毒性試験	20
2.6.6.9.3	遺伝毒性試験	21
2.6.6.9.4	生殖発生毒性試験	22
2.6.6.9.5	局所刺激性試験	22
2.6.6.9.6	トレハロースの毒性のまとめ	22
2.6.6.10	考察及び結論.....	22
2.6.6.11	参考文献.....	23

2.6.6 毒性試験概要文

2.6.6.1 まとめ

ベバシズマブは遺伝子組換えヒト化 IgG1モノクローナル抗体である。血管内皮増殖因子 (VEGF) に結合して VEGF 受容体との結合を遮断することにより、血管新生を阻害すると考えられており、さまざまな悪性腫瘍の治療薬として開発が進められている。

ベバシズマブの毒性試験は、ベバシズマブが VEGF に結合し、その生物活性を中和する動物種であるカニクイザルとウサギを用いて実施した。動物種の選択は以下に基き行なった。①ベバシズマブと種々の動物の VEGF との結合実験から、親和性はヒト VEGF よりも低いものの (親和性はヒト VEGF の1/8)、ベバシズマブがウサギ VEGF に結合することが示された (2.6.2 薬理試験の概要文 2.6.2.2.1 A4.6.1抗体及びベバシズマブの作製と基本特性の解析)。②カニクイザルはヒトと VEGF のアミノ酸配列が同一と予測されており¹⁾、カニクイザルはヒトでの安全性予測に適した動物種と考えられた。③一般的に毒性試験に用いられているマウスでは VEGF とベバシズマブの結合性がなく、マウス VEGF との配列の相同性からラット VEGF にも結合性はないと推察された (2.6.2 薬理試験の概要文 2.6.2.2.1 A4.6.1抗体及びベバシズマブの作製と基本特性の解析, 2.4 非臨床試験に関する概括評価 2.4.2.1 ベバシズマブと VEGF の結合)。

カニクイザルを用いた毒性試験は、連投可能な投与容量 (5 mL/kg) を考慮し、臨床用量とほぼ同程度又は、それを上回ると推定される用量 (2, 10, 50 mg/kg) を用いて行い、投与経路は臨床投与経路と同じ静脈内投与とした。4及び13週間試験では dose intensity をあげるため、推定される臨床投与頻度を超える週2回投与とし、26週間試験は週1回 (2, 10, 50 mg/kg) 又は2回投与 (10 mg/kg のみ) とした。反復投与試験の用量は週間投与量で比較した場合、結腸・直腸癌におけるベバシズマブの一次治療に対する臨床推奨用量 (5 mg/kg, 2週ごとに投与) の0.8~40倍、二次治療に対する臨床推奨用量 (10 mg/kg, 2週間ごとに投与) の0.4~20倍に相当する。ウサギを用いた試験は、親和性の低さ及び抗ベバシズマブ抗体産生を考慮し、高用量で短期間の投与を行った。

表 2.6.6.1-1 に実施した毒性試験を一覧表にて示した。

毒性試験プログラムは、臨床におけるベバシズマブの対象患者集団及び投与期間を考慮して計画し、反復投与毒性試験としてカニクイザルの4, 13, 26週間投与試験を実施した。また、化学療法剤との併用投与時における安全性について、カニクイザルを用いて検討し、更に、妊娠する可能性のある女性に対してベバシズマブが投与される場合を考慮して、ウサギを用いた生殖発生毒性試験を実施した。

これら4, 13, 26週間投与試験、化学療法剤の併用投与試験 (2試験)、生殖発生毒性試験 (2試験) のほか、組織交差反応性試験 (2試験)、溶血性及び血液適合性試験を GLP に準拠して実施した。

ベバシズマブ投与に関連した薬理学的作用の評価と毒性試験及び臨床試験でみられた有害事象の発現機序の検討のため、一連の探索毒性試験を実施した。カニクイザルを用いた毒性試験では、成長期長骨の血管新生阻害による骨端軟骨異形成及び卵巣機能の変化が認められた。これらの所見については、ウサギを用いて更に検討した。また、ベバシズマブの薬理学的作用から創傷治癒の遅延が予想され、この作用についてウサギ及びカニクイザルを用いて検討した。更に、いくつかの臨床試験において、蛋白尿及び血栓塞栓症が認められたことから、これらの所見とベバシズマブ投与との関連性についてウサギを用いて検討した。これらの探索毒性試験は non-GLP 試験として実施したが、十分な科学的信頼性をもって行った。

抗原性、免疫毒性、依存性、代謝物・不純物に関する試験はベバシズマブが VEGF を標的としたヒト化抗体製剤であること及び実施した毒性試験結果から懸念される所見が得られていないことから実施しなかった。

ベバシズマブの毒性試験において、忍容性は総じて50 mg/kg まで良好であった。投与に起因した毒性は、ベバシズマブの薬理学的作用である VEGF 依存性血管新生阻害作用に一致し、骨端軟骨異形成、卵巣機能に対する影響、生殖発生毒性及び創傷治癒の遅延であった。

化学療法剤との併用による毒性の増強、溶血性・血清及び血漿成分との反応性（沈降及び凝固）及びカニクイザル、ウサギ及びヒト組織との組織交差反応性は認められず、正常動物及びモデル動物へのベバシズマブの投与で腎機能及び血液凝固に対する影響はなかった。

表 2.6.6.1-1 ベバシズマブの毒性試験一覧表

試験項目	動物種	投与経路・期間 又は試験方法	投与量 (mg/kg) 又は処理濃度	試験成績 (mg/kg)	GLP 適合性
反復投与毒性					
	カニクイザル	静脈内・4週間 2回/週	0 (溶媒*), 2, 10, 50	無毒性量 : 2	GLP
	カニクイザル	静脈内・13週間 2回/週	0 (溶媒*), 2, 10, 50	無毒性量 : <2	GLP
	カニクイザル	静脈内・26週間 1回/週 (2, 10, 50 mg/kg) 又は2回/週 (10 mg/kg)	0 (溶媒*), 2, 10, 50	無毒性量 : <2	GLP
	カニクイザル	静脈内 (併用)・ 2週間, 1回/週	ベバシズマブ: 10 CPT-11: 100/125 mg/m ² 5-FU: 500 mg/m ² LV: 20 mg/m ²	併用による毒性の 増強なし	GLP
	カニクイザル	静脈内 (併用) 3週間, 2回/週	ベバシズマブ: 0 (溶媒*), 10 cisplatin: 1 paclitaxel: 4	併用による毒性の 増強なし	GLP
生殖発生毒性					
胚・胎児発生 (用量設定試験)	ウサギ	静脈内 DG 6~12又は DG 12~18	0 (溶媒**), 10, 30, 100	100 : DG 12~18投与で母 動物・胎児体重↓	GLP
胚・胎児発生	ウサギ	静脈内 DG 6~18	0 (溶媒**), 10, 30, 100	無毒性量 母動物 : 10 胚・胎児 : <10	GLP
その他の毒性					
溶血性・適合性	カニクイザル・ ヒト全血・血清/ 血漿	<i>In vitro</i>	0 (溶媒*), 5 mg/mL (最終濃度)	陰性	GLP
組織交差反応性	カニクイザル・ ウサギ組織	<i>In vitro</i>	10, 400 µg/mL	組織交差反応性なし	GLP
	ヒト組織	<i>In vitro</i>	10, 400 µg/mL	組織交差反応性なし	GLP
抗体産生の検討	ウサギ	静脈内 Day 1, 4, 8, 11	0 (溶媒*), 10	投与開始8~11日に 抗体産生	nonGLP
骨端軟骨異形成 の検討	ウサギ	静脈内 Day 1, 4, 7, 10	0 (溶媒*), 10, 50, 75	極軽度の影響	nonGLP
卵巣機能への影 響	ウサギ	静脈内 Day -3, 1, 4, 7又は Day -4, 0, 4	0 (溶媒*), 2, 10, 50	50 : 卵巣機能阻害	nonGLP
創傷治癒モデル (線形切開)	ウサギ	静脈内 Day -2, 1, 3	0 (溶媒*), 0.5, 1, 2	≥0.5 : 創傷治癒の遅 延	nonGLP
創傷治癒モデル (円形創傷)	ウサギ	静脈内 Day 1, 3, 5, 7, 10又 は Day 1, 4, 8, 11	0 (溶媒*), 2, 10, 50	≥2 : 創傷治癒の遅 延	nonGLP
創傷治癒モデル	カニクイザル	静脈内 Day -2, 1, 3, 5	0 (溶媒*), 0.5, 2	≥0.5 : 創傷治癒の遅 延 (用量依存性なし)	nonGLP
血栓症モデル	ウサギ	静脈内・8日間 連日投与	0 (溶媒**), 75	影響なし	nonGLP

溶媒* : 10 mM ヒスチジン, pH5.5, 100 mg/mL トレハロース, 0.02% ポリソルベート 20

溶媒** : 51 mM リン酸ナトリウム, pH6.2, 60 mg/mL トレハロース, 0.04% ポリソルベート 20

DG : 妊娠日

表 2.6.6.1-1 ベバシズマブの毒性試験一覧表（続）

試験項目	動物種	投与経路・期間 又は試験方法	投与量 (mg/kg) 又は処理濃度	試験成績 (mg/kg)	GLP 適合性
その他の毒性					
腎組織への沈着	ウサギ	静脈内 Day 1, 3	0 (溶媒*), 2, 10, 100	腎組織への沈着なし	nonGLP
cisplatin 腎障害モデル	ウサギ	静脈内 Day 8, 10, 12	0 (溶媒**), 50	腎傷害の悪化なし	nonGLP
BSA 負荷腎障害モデル	ウサギ	静脈内・1週間 1日おきに4回	0 (溶媒**), 50	腎傷害の悪化なし	nonGLP

溶媒*：10 mM ヒスチジン，pH5.5，100 mg/mL トレハロース，0.02% ポリソルベート 20

溶媒**：51 mM リン酸ナトリウム，pH6.2，60 mg/mL トレハロース，0.04% ポリソルベート 20

ベバシズマブ製剤にはトレハロースが添加物として含有されている。ベバシズマブの臨床推奨用量におけるトレハロース摂取量（1日（1回）投与量：12～36 mg/kg）は、医薬品添加物としてのトレハロースの使用前例を上回ることから、新添加物に該当する。トレハロースの静脈内投与による安全性について評価を行った。

トレハロースの毒性試験一覧表を表 2.6.6.1-2 に示した。

表 2.6.6.1-2 トレハロース毒性試験一覧表

試験項目	動物種	投与経路・期間 又は試験方法	投与量 (mg/kg) 又は処理濃度	試験成績 (mg/kg)	資料
単回投与毒性					
	マウス ラット	静脈内，単回	0, 1000	概略の致死量： >1000	参考文献10), 11)
反復投与毒性					
	マウス	静脈内・2週間 連日	0, 10, 100, 1000	無毒性量：1000	4.2.3.7.7-17 [§]
	カンクイザル	静脈内・26週間 1回又は2回/週	500	無毒性量：500	4.2.3.2-3 ^{§§}
遺伝毒性					
復帰突然変異試験	ネisseria 大腸菌	プレート法	0, 312.5～5000 µg/plate	陰性	参考文献10), 11) [§]
染色体異常試験	CHO 細胞	直接法 代謝活性化法	0, 1250～5000 µg/mL	陰性	参考文献10), 11) [§]
小核試験	マウス	腹腔内，単回	0, 1250～5000 mg/kg	陰性	参考文献10), 11) [§]

[§] 平成25年に医薬品添加物調査会にて審議済み

^{§§} ベバシズマブのカンクイザル26週間試験成績。トレハロース100 mg/mL を含有する溶媒を，5 mL/kg で投与した。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

ベバシズマブの単回投与毒性試験は実施していない。実施しない理由を2.4.4.1に記載した(2.4 非臨床総括 2.4.4.1 単回投与毒性)。

2.6.6.3 反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

2.6.6.3.1 カニクイザルを用いたベバシズマブの4週間投与毒性試験（4週間回復試験）

(4.2.3.2-1)

ベバシズマブの4週間静脈内投与における毒性を、カニクイザルを用いて検討した。更に4週間の回復期間を設け毒作用の持続性、可逆性及び遅延毒性について評価した。

1群雌雄各4～6例の若齢から成熟雌雄カニクイザル（2～7才）に、溶媒又はベバシズマブ2, 10, 50 mg/kg を週2回、4週間静脈内投与した。投与終了後、対照群及び高用量群の雌雄各2例を4週間の回復試験へ割り当てた。

試験方法及び成績を「表 2.6.7.6.1-1」に示した(2.6.7 毒性試験概要表 2.6.7.6.1 カニクイザルを用いたベバシズマブの4週間投与毒性試験（4週間回復試験））。

全例が剖検予定日まで生存し、一般症状、体重、摂餌量、血圧、生理学的検査（直腸温、呼吸数）、心電図、眼科学的検査、網膜電位図、臨床検査（血液生化学的検査、血液学的検査、尿検査）、臓器重量に著変はなく、明らかな肉眼的所見もみられなかった。

病理組織学的検査では、10及び50 mg/kg 群雄の大腿骨遠位端に骨端軟骨異形成がみられた。主な病理組織学的特徴は成長板軟骨（骨端軟骨）の肥厚、過形成性軟骨細胞の集塊、軟骨下骨板形成、成長板への血管侵入の阻害であり、更に、軟骨基質部の変性が認められた。骨端軟骨異形成の程度は、雄では10 mg/kg 投与で軽度から中等度、50 mg/kg 投与で中等度から重度であったが、雌ではいずれの投与群においても骨端軟骨に異常はみられなかった。高用量雄の回復群では、2例とも4週間の休薬後になお骨端軟骨異形成を認めたが、その程度は軽微1例、重度1例であり、休薬による回復傾向が示唆された。休薬後に重度の骨端軟骨異形成を示した高用量群の雄動物では、骨幹端の骨髄に軽微な瀰漫性の変性と壊死がみられた。その他、ベバシズマブ投与に伴う病理組織学的な異常所見はみられなかった。

ベバシズマブに対する抗体はいずれの時点においても検出されなかった。

無毒性量は2 mg/kg であった。

2.6.6.3.2 カニクイザルを用いたベバシズマブの13週間投与毒性試験（4週間回復試験）

(4.2.3.2-2)

ベバシズマブの13週間静脈内投与における毒性を、カニクイザルを用いて検討した。更に4週間の回復期間を設け毒作用の持続性、可逆性及び遅延毒性について評価した。

1群雌雄各4～6例の若齢から成熟雌雄カニクイザル（3～6才）に、溶媒又はベバシズマブ2, 10, 50 mg/kg を週2回、13週間静脈内投与した。投与終了後、対照群及び高用量群の雌雄各2例を4週間の回復試験へ割り当てた。

試験方法及び成績を「表 2.6.7.6.2-1」に示した(2.6.7 毒性試験概要表 2.6.7.6.2 カニクイザルを用いたベバシズマブの13週間投与毒性試験（4週間回復試験））。

全例が剖検予定日まで生存し、一般症状、体重、摂餌量、血圧、心電図、生理学的検査（直腸温、呼吸数）、眼科学的検査、臨床検査（血液学的検査、凝固検査、尿検査）に著変はなく、明らかな肉眼的所見も認められなかった。

50 mg/kg 群の雄1例に、血清総たん白質及びアルブミンの著明な減少とコレステロールの増加が13週目にみられ、病理組織学的検査において膜性増殖性糸球体腎炎が認められた。しかし

ながら、カニクイザルにおいては特発性糸球体腎炎は比較的好くみられることが報告されており²⁾、本所見も自然発生性の変化と推察された。なお、最長26週間までの反復投与試験では、合計92匹の雌雄カニクイザルに2～50 mg/kg のベバシズマブが週1回又は2回の頻度で投与されたが、糸球体腎炎が認められた例は他になかった。

卵巣及び子宮重量が10及び50 mg/kg 群の雌で減少し、この変化に一致して黄体数の減少あるいは欠失がみられた。50 mg/kg 群の雌では、4週間の休薬後にも黄体減少がみられたが、卵巣及び子宮重量の減少は認められなかった。回復試験の結果より、雌生殖器に対するベバシズマブの影響が、休薬により回復傾向を示すことが示唆された。

4週間試験の成績と同様に、ベバシズマブの投与量の増加に伴い、骨端軟骨異形成の程度と発現頻度が用量依存的に増加し、更に軟骨成長板の線状亀裂が散見された。骨端軟骨異形成はベバシズマブを投与した雄全例でみられ、その程度は2 mg/kg 群で軽微から重度、10及び50 mg/kg 群で軽度から重度であった。10及び50 mg/kg 群の雌全例で軽微から軽度の骨端軟骨異形成が認められたが、2 mg/kg 群雌ではみられなかった。4週間の休薬後に剖検した回復群動物においても骨端軟骨異形成がみられたが、その程度は投与終了時に比べて軽減されており、回復傾向が示された。骨端軟骨異形成が雄でより高頻度に見られたが、雌で成熟個体が多かったことによるものであり、性差に関連した変化ではないと考えられた³⁾。

ベバシズマブに対する抗体はいずれの時点においても検出されなかった。

無毒性量は2 mg/kg 未満であった。

2.6.6.3.3 カニクイザルを用いたベバシズマブの26週間投与毒性試験（12週間回復試験）

(4.2.3.2-3)

ベバシズマブの26週間静脈内投与における毒性を、カニクイザルを用いて検討した。更に12週間の回復期間を設け毒作用の持続性、可逆性及び遅延毒性について評価した。

1群雌雄各4～6例の成熟雌雄カニクイザル（4～7才）に、溶媒又はベバシズマブ2, 10, 50 mg/kg を週1回、又は、10 mg/kg を週2回、それぞれ26週間静脈内投与した。投与終了後、対照群及び高用量群の雌雄各2例を12週間の回復試験に割り当てた。

試験方法及び成績を「表 2.6.7.6.3-1」に示した（2.6.7 毒性試験概要表 2.6.7.6.3 カニクイザルを用いたベバシズマブの26週間投与毒性試験（12週間回復試験））。

全例が剖検予定日まで生存し、生理学的検査（直腸温、呼吸数）、心電図、血圧、X線検査、眼科学的検査、臨床検査（血液学的検査、凝固検査、尿検査）に著変はなく、明らかな肉眼的所見も認められなかった。

平均体重（投与開始時の体重を共変量として調節）は、対照群に比べて、10 mg/kg（週2回）群の雄では投与24週より5～10%、50 mg/kg 群の雄では投与14週より8～13%低下し、いずれも統計学的な有意差がみられた。また、50 mg/kg 群の雄1例で投与24週時に消瘦がみられ、消瘦に一致して摂食量が減少した。2及び10 mg/kg を週1回投与した群では平均体重に対照群との比較で有意差が認められたが、5～7%の軽度な体重低下であった。10 mg/kg（週2回）及び50 mg/kg 群の雄では体重低下に一致して、摂餌量も減少したが、その他の群の摂餌量は対照群とほぼ同様であった。12週間の休薬後には、体重及び摂餌量に対するベバシズマブの影響は認められなかった。

10 mg/kg（週2回）群と50 mg/kg 群の雄で対照群に比較して血清アルブミン及び A/G 比が減少し、グロブリンが増加した。しかしながら、いずれも生理的変動内であり、臨床使用において問題となる可能性は低いと考えられた。12週間の休薬後の検査では、これらのパラメータに有意差はみられなかった。また、その他の血液生化学検査値に、ベバシズマブ投与による影響はなかった。

10 mg/kg 以上群では、投与頻度に関わらず、雌で月経周期の異常（月経の減少）がみられ、子宮重量及び子宮内膜の増殖が減少した。10 mg/kg（週2回）群及び50 mg/kg 群では更に、卵

胞の成熟が阻害（早期グラーフ卵胞期で停止）され、黄体が欠失した。12週間の休薬後には、50 mg/kg 群の雌2例中1例のみに黄体欠失がみられ、その他の変化はなかったことから、これらの変化は休薬により回復傾向が認められることが示唆された。

ベバシズマブ投与により、骨端軟骨異形成の程度と発現頻度が用量依存的に増加した。更に線状亀裂が、雄10 mg/kg（週2回）群及び雄50 mg/kg 群のそれぞれ1例にみられた。骨端軟骨異形成の程度は雄では2 mg/kg で軽微から軽度、10 mg/kg（週1回）で軽微から中等度、50 mg/kg で軽度から中等度であった。10 mg/kg 週2回投与群の雄では、全例で中等度の骨端軟骨異形成が発現した。一方、雌では、2 mg/kg の4例中1例が軽微、10（週1回）及び50 mg/kg の各4例中2例が軽度であった。10 mg/kg 週2回投与群の雌では1例のみで中等度の骨端軟骨異形成が発現し、同群の他の例では異常は認められなかった。著しい体重変化が認められた10 mg/kg（週2回）群及び50 mg/kg 群の雄では、体重に著変がなかった雄2、10 mg/kg（週1回）群及び雌全投与群に比べて骨端軟骨異形成がより重篤であり、雄の10 mg/kg（週2回）及び50 mg/kg 群の体重低下は骨端軟骨異形成により成長が遅延したことによる可能性が推察された。12週間の回復期間後には骨端軟骨異形成は認められなかった。

なお、13週間試験の50 mg/kg 群で膜性増殖性糸球体腎炎が1例に認められたことから、対照群、10 mg/kg（週2回投与）、50 mg/kg 群の雌雄腎臓について、過ヨウ素酸メセナミン銀染色（periodic acid-Schiff-methenamine silver staining）を行い精査したが、いずれの群においても異常は認められなかった。

ベバシズマブに対する抗体価測定では対照群1例が Day 15に、50 mg/kg 群1例が Day 183に陽性となったが、いずれも最小検出限界をわずかに上回る極めて弱い陽性反応であった。対照群で抗体が陽性となった1例は他の測定ポイント（Week 4, 13, 27, 39）では陰性であり、Day 15（Week 3）は擬陽性の可能性が示唆された。

無毒性量は2 mg/kg 未満であった。

2.6.6.3.4 ベバシズマブ及び IFL（CPT-11/5-FU/LV）の併用療法

(4.2.3.2-4/5)

大腸がん患者では、塩酸イリノテカン（CPT-11）、フルオロウラシル（5-FU）、ホリナートカルシウム（LV）を併用投与する化学療法（IFL）がしばしば用いられる。IFL をベバシズマブと併用投与する場合の安全性についてカニクイザルを用いて検討した（投与開始日を Day 1と規定した）。

1群3～5例の雄カニクイザル（2～3.5才）に IFL（CPT-11：100又は125 mg/m²、5-FU：500 mg/m²、LV：20 mg/m²）として単独（CPT-11の用量を変えた2群を設置）、又はベバシズマブ 10 mg/kg と併用（併用時の CPT-11の用量は125 mg/m²のみ）でいずれも静脈内投与した。投与はいずれの薬剤も週1回（Day 1及び8）とし、最終投与から1週間後（Day 15）に剖検を行った。

試験方法及び成績を「表 2.6.7.5-1」に示した（2.6.7 毒性試験概要表 2.6.7.5 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験）。

全例が剖検予定日まで生存した。IFL 投与により下痢、体重・摂餌量の減少が認められ、白血球数・血小板数減少、貧血、コレステロール・総たん白質・カリウムの減少などの血液学的及び血液生化学的検査値の変動がみられた。また、リンパ球枯渇を伴う胸腺縮小が IFL 単独投与7例中2例、IFL + ベバシズマブの併用投与の5例中2例で認められ、ほとんどの動物の胸骨骨髓で、主に赤血球系細胞の過形成あるいは骨髓系細胞の低形成がみられた。ベバシズマブと IFL 併用群でみられた変化は IFL 単独群と同様であり、併用投与による毒性の増強は認められなかった。

2.6.6.3.5 ベバシズマブ及び cisplatin/paclitaxel の併用療法

(4.2.3.2-6)

cisplatin と paclitaxel の併用投与はがん治療に用いられている化学療法の1つである。両剤をベバシズマブと併用投与する場合の安全性についてカニクイザルで検討した。

1群5例の雄カニクイザル（4～10才）に、cisplatin（1 mg/kg）/paclitaxel（4 mg/kg）を単独又はベバシズマブ10 mg/kg と併用で投与した（投与開始日を Day 1と規定）。ベバシズマブは週2回、3週間静脈内投与（Day 1, 4, 8, 11, 15, 18）とし、cisplatin 及び paclitaxel はベバシズマブ投与最終日（Day 18）に単回静脈内投与とした。別途、対照群及びベバシズマブ単独群を設置し、それぞれ、ベバシズマブの溶媒及びベバシズマブを週2回、3週間静脈内投与した後、投与最終日に生理食塩液を単回静脈内投与した。Day 48に全動物を飼育コロニーに戻した。

試験方法及び成績を「表 2.6.7.5-1」に示した（2.6.7 毒性試験概要表 2.6.7.5 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験）。

全例が試験終了まで生存した。ベバシズマブ単独群では、一般症状、体重、摂餌量、臨床検査（血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査）に著変はみられなかった。また、ベバシズマブ単独群及び cisplatin/paclitaxel 投与群（単独及び併用群）に生理学的検査（直腸温、呼吸数）や心電図への影響はみられなかった。

cisplatin/paclitaxel 群（単独及び併用群）では嘔吐が認められ、対照群に比べて体重が低下した。更に、白血球数及び好中球数も一過性に減少した。ベバシズマブと cisplatin/paclitaxel の併用群でみられた変化は、cisplatin/paclitaxel 単独群の変化と同様であり、併用投与による毒性の増強は認められなかった。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

in vitro 及び *in vivo* の遺伝毒性試験は実施していない。実施しない理由を2.4.4.4に記載した（2.4 非臨床に関する概括評価 2.4.4.4 遺伝毒性・がん原性試験）。

2.6.6.5 がん原性試験

がん原性試験は実施していない。実施しない理由を2.4.4.4に記載した（2.4 非臨床に関する概括評価 2.4.4.4 遺伝毒性・がん原性試験）。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

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

受胎能及び着床までの初期発生に関する試験は実施していない。実施しない理由を2.4.4.5に記載した（2.4 非臨床に関する概括評価 2.4.4.5 生殖発生毒性）。

2.6.6.6.2 ウサギの胚及び胎児発生に関する試験（用量設定試験）

(4.2.3.5.2-1)

胚・胎児発生に関する用量設定試験を雌 New Zealand White（NZW）ウサギを用いて実施した。

1群5例の妊娠 NZW ウサギ（5～5.5カ月齢）に、ベバシズマブを10, 30, 100 mg/kg の用量で、器官形成期（妊娠6～18日、以下妊娠日を DG と記載）の DG 6, 9, 12又は DG 12, 15, 18に静脈内投与した。対照群には DG 6, 9, 12, 15, 18に溶媒を静脈内投与した。ベバシズマブ群及び対照群とも DG 29に帝王切開を行った。投与レジメンは平均血清中ベバシズマブ濃度がヒトの臨床曝露量とほぼ同様に維持され、かつ、器官形成期における抗ベバシズマブ抗体及び抗原抗体複合体の曝露量が最小限になるよう計画された。本試験は用量設定試験であることから、

胎児の骨格及び内臓検査は行わなかった。交尾確認日を DG 0 と規定した。

試験方法及び成績を「表 2.6.7.10-1」に示した（2.6.7 毒性試験概要表 2.6.7.10 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験）。

全例が剖検予定日まで生存し、一般症状に著変はみられなかった。100 mg/kg 群（DG 12, 15, 18投与）では、母動物の体重及び体重増加量が妊娠期間を通じて対照群に比べて低下し、投与終了後の妊娠期間（DG 19～29）には摂餌量が減少した。また、平均胎児体重が100 mg/kg 投与群（DG 12, 15, 18投与）で減少した。帝王切開時の検査では、DG 6, 9, 12にベバシズマブを投与した動物の47%, DG 12, 15, 18にベバシズマブを投与した動物の33%で抗ベバシズマブ抗体の産生が認められた。

2.6.6.6.3 ウサギの胚及び胎児発生に関する試験

(4.2.3.5.2-2)

用量設定試験の結果に基づき、ウサギ胚・胎児発生に関する試験を実施した。

1群20例の妊娠 NZW ウサギ（5～6カ月齢）に溶媒又はベバシズマブ10, 30, 100 mg/kg を DG 6, 9, 12, 15, 18に静脈内投与し、DG 29に帝王切開した。別途、薬物動態用サンプル採取群としてサテライト群を設定した。サテライト群（1群5例で4群）はベバシズマブ10又は100 mg/kg を DG 18に投与して DG 21に剖検（サテライト A 群）、あるいは10又は100 mg/kg を DG 6, 9, 12, 15, 18に投与して DG 29に剖検（サテライト B 群）とした。サテライト群の胎児は観察対象とはしなかった。交尾確認日を DG 0 とした。

試験方法及び成績を「表 2.6.7.12.1-1」に示した（2.6.7 毒性試験概要表 2.6.7.12.1 ウサギの胚及び胎児発生に関する試験）。

全例が剖検予定日まで生存し、ベバシズマブ投与に起因する一般症状はみられなかった。30, 100 mg/kg 群では、DG 6から7に母動物の体重増加量が減少したが、その他の時点では、体重に対する影響は、いずれのベバシズマブ投与群でも認められなかった。摂餌量にはベバシズマブ投与による影響はみられなかった。

100 mg/kg 群では、総吸収胚数、吸収胚を有する母動物数、母動物あたりの死亡胚数又は吸収胚率が増加したが、これらは主として後期吸収胚の増加によるものであった。胎児体重は、10, 30, 100 mg/kg 群で用量依存的に減少した。異常/変異胎児を有する母動物数は、30 mg/kg 群及び100 mg/kg 群で増加した。更に異常/変異胎児総数及び母動物あたりの異常/変異胎児率も100 mg/kg で増加した。100 mg/kg では胎児で外形及び骨格異常が増加した。また、中手骨の骨化数が10 mg/kg 以上群で減少し、尾椎、前肢・後肢趾節骨の平均骨化数も100 mg/kg 群で減少した。

抗ベバシズマブ抗体が、対照群で1例、10 mg/kg 群で1例、30 mg/kg 群で4例、100 mg/kg 群で2例の母動物血清中に検出された。サテライト群のうち、DG 18にベバシズマブを1回投与した群では母動物の血清中には、いずれの測定点（DG 18, 19, 20, 21）でも抗体は検出されなかったが、DG 6, 9, 12, 15, 18に10 mg/kg 又は100 mg/kg を5回投与した群では、DG 29にそれぞれ1例ずつ抗体が検出された。毒性試験群 + サテライト群全体では、ベバシズマブ投与群母動物の12%（9/73）で血清中に抗ベバシズマブ抗体が検出され、ベバシズマブ投与群母動物の13%（9/71）及び対照群母動物の5%（1/19）で、胎児血清中に抗体が検出された。また、ベバシズマブ投与群母動物の10%（7/73）及び対照群母動物の5%（1/19）で、羊水中に抗体が検出された。対照群1例における抗体陽性は擬陽性である可能性も推察されるが、原因の詳細は不明である。

母動物の一般毒性に対する無毒性量は10 mg/kg、胎児発生に対する無毒性量は10 mg/kg 未満であった。

2.6.6.6.4 出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験

出生前及び出生後の発生並びに母動物機能に対する影響に関する試験は実施していない。実施しない理由を2.4.4.5に示した（2.4 非臨床に関する概括評価 2.4.4.5 生殖発生毒性）。

2.6.6.7 局所刺激性試験

ベバシズマブの局所刺激性試験は実施していないが、カニクイザルを用いた26週間までの、週1回又は週2回の静脈内投与試験において投与部位に薬物に関連した所見は認められず、ベバシズマブの局所忍容性は良好と考えられた。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 ベバシズマブの溶血性及び血液適合性試験

(4.2.3.7.7-1)

ベバシズマブの溶血性及び血液適合性をヒト及びカニクイザルの全血及び血清/血漿を用いて検討した。

試験方法及び成績を「表 2.6.7.16-1」に示した（2.6.7 毒性試験概要表 2.6.7.16 その他の毒性試験）。

溶媒又はベバシズマブ（最終濃度5 mg/mL）をヒト及びカニクイザルの全血と混合し、上清中のヘモグロビン濃度を測定して溶血性を評価した。また、溶媒又はベバシズマブ（最終濃度5 mg/mL）をヒト及びカニクイザルの血清又は血漿と混合し、沈降及び凝固の有無を肉眼的に観察した。

溶媒及びベバシズマブに溶血作用は認められず、沈降及び凝固などの反応もみられなかった。

2.6.6.8.2 ビオチン化ベバシズマブとウサギ組織、カニクイザル組織、ヒト組織との交差反応性

(4.2.3.7.7-2/3)

ウサギ及びカニクイザルの正常組織並びにヒト正常組織をビオチン化ベバシズマブ10, 400 µg/mLを用いて免疫組織染色し、ベバシズマブの組織特異性を検討した。

試験方法及び成績を「表 2.6.7.16-1」に示した（2.6.7 毒性試験概要表 2.6.7.16 その他の毒性試験）。

染色したウサギ9組織、カニクイザル30組織、ヒト36組織において、特異的な陽性反応は認められなかった。

2.6.6.8.3 ウサギにおける抗体産生の検討

(4.2.3.7.7-4)

ウサギは一般的に毒性試験に用いられる動物種であるとともに、VEGF に対するベバシズマブの結合も認められる。しかしながら、ベバシズマブ投与により抗ベバシズマブ抗体が産生されることから、抗体が産生されずに投与できる期間を確認する目的で、抗体産生の経時的変化を調べた。

試験方法及び成績を「表 2.6.7.16-1」に示した（2.6.7 毒性試験概要表 2.6.7.16 その他の毒性試験）。

1群2例の雄 NZW ウサギ（体重：2.5～2.8 kg）に溶媒又はベバシズマブ10 mg/kg を Day 1, 4, 8, 11に計4回静脈内投与し、投与期間中から投与終了後の Day 50まで血中の抗体を測定した。

Day 8ではいずれの群においても抗ベバシズマブ抗体は検出されなかったが、Day 11ではベバシズマブ投与群全例（2/2例）に抗ベバシズマブ抗体が検出された。その内、1例は Day 36まで、残りの1例は Day 50の剖検時まで抗体測定が可能であった。これらの成績より、ウサギで

は投与開始8から11日の間に抗ベバシズマブ抗体が産生されることが確認された。

2.6.6.8.4 ウサギにおける骨端軟骨異形成の検討

(4.2.3.7.7-5)

カニクイザルの26週間までの試験では、長骨成長板の血管形成阻害の結果、骨端軟骨異形成が認められた。本試験では、骨端軟骨異形成の検討にウサギを用いることの妥当性について検討した。

1群3例の幼若雌 NZW ウサギ（42日齢）に、溶媒又はベバシズマブ10, 50, 75 mg/kg を Day 1, 4, 7, 10に静脈内投与し、Day 14に剖検を行った。投与開始日を Day 1と規定した。

試験方法及び成績を「表 2.6.7.16-1」に示した（2.6.7 毒性試験概要表 2.6.7.16 その他の毒性試験）。

全例が剖検予定日まで生存した。全群で一般症状に著変はなく、体重に対するベバシズマブの影響も認められなかった。ベバシズマブ投与群では、成長板軟骨にわずかな肥厚がみられたものの、カニクイザルとは異なり、最高用量の75 mg/kg まで血管侵入の阻害及び軟骨下骨板形成の惹起はなかった。ウサギでは、投与開始8から11日に抗ベバシズマブ抗体が産生されることが確認されていることから、カニクイザルに比べて投与期間を短縮している。ウサギの長骨骨端における変化が軽度であった原因としては、投与期間が短く暴露が十分でなかった可能性が推察された。

2.6.6.8.5 雌ウサギにおける卵巣機能に対するベバシズマブの影響

(4.2.3.7.7-6/7)

カニクイザルを用いた反復投与試験において、卵巣・子宮重量及び黄体数の減少が認められ、雌生殖機能に対するベバシズマブの影響が示唆された。本探索毒性試験では、卵巣機能に対する影響を体重、血清中プロゲステロン、子宮・卵巣重量、黄体の有無を指標に精査した。

試験方法及び成績を「表 2.6.7.16-1」に示した（2.6.7 毒性試験概要表 2.6.7.16 その他の毒性試験）。

(1) 試験1

黄体プロゲステロンの産生のために1群8例の雌 NZW ウサギ（約6カ月齢）にヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG）を単回静脈内投与して排卵を惹起した（Day 1）。溶媒又はベバシズマブ50 mg/kg を hCG 投与3日前、Day 1, 4, 7に計4回静脈内投与した。各群4例を Day 8に剖検した。残り各群4例には約1カ月間の休薬を設定（回復群）して hCG を再投与し、Day 48に剖検した。

試験期間中、体重にベバシズマブ投与による影響は認められなかった。hCG 投与により血清中プロゲステロン濃度が上昇したが、ベバシズマブ投与群では、血清中プロゲステロン濃度の上昇が抑制された。Day 8の剖検時にはベバシズマブ投与群で、対照群に比べて卵巣及び子宮重量が減少し、表層卵胞数及び黄体数が減少した。

約1カ月間の休薬後 hCG を再投与したところ、血清中プロゲステロン濃度が対照群、ベバシズマブ投与群ではほぼ同程度上昇した。Day 48の剖検例では、子宮重量に変化がみられたが、子宮及び子宮頸に対応する病理組織学的所見はみられなかった。

このように、ウサギにベバシズマブ50 mg/kg を3日に1回投与することにより卵巣機能が阻害されたが、休薬により回復する可逆的な変化であった。これらの所見はカニクイザルにおける所見と一致した。

(2) 試験2

試験2では、卵巣機能に対するベバシズマブ作用の用量反応性について、血清中プロゲステロン、卵巣重量、黄体の有無を指標に検討した。

黄体プロゲステロンの産生のために1群5例の雌 NZW ウサギ（約5カ月齢）に hCG を単回投与（Day 0）して排卵を惹起した。溶媒又はベバシズマブ2, 10, 50 mg/kg を hCG 投与4日前、

Day 0, 4に計3回静脈内投与した。Day 6に剖検を行った。

2及び10 mg/kg 群では血清中プロゲステロン濃度に著変は認められなかったが、50 mg/kg 群では溶媒群に比べて著明に低下した。また、卵巢重量が用量依存的に減少した。黄体数は50 mg/kg 群で対照群に比べて減少した。

これらの結果は、雌カニクイザルでみられたベバシズマブの雌生殖器に対する影響と同様であり、ベバシズマブの高用量投与により、黄体形成とその後にみられるプロゲステロン分泌が阻害されることが示唆された。

2.6.6.8.6 ウサギ線形切開創傷モデルにおける創傷治癒に対するベバシズマブの影響

(4.2.3.7.7-8/9)

VEGF は、創傷治癒過程に関与することが知られている⁴⁾⁻⁶⁾。手術実施時にはベバシズマブにより創傷治癒が遅延する可能性が懸念されることから、創傷治癒に対するベバシズマブの影響について、ウサギ線形切開創傷モデルを用いて検討した。

試験方法及び成績を「表 2.6.7.16-1」に示した(2.6.7 毒性試験概要表 2.6.7.16 その他の毒性試験)。

1群4～11例の雌 NZW ウサギ(約42日齢)に、手術時の切開創を模した直線状の全層切開創(2.5 cm)を背部左右に1カ所ずつ作製し(Day 1)、滅菌縫合した後保護用ポリウレタン膜で被覆した。溶媒又はベバシズマブ0.5, 1, 2 mg/kg を創傷作製の2日前, Day 1, 3に計3回静脈内投与した。創傷作製5日後に剖検を行った。

全例が剖検予定日まで生存した。一般症状及び体重に著変は認められなかったが、ベバシズマブ投与群では創傷の抗張力(tensile strength)が用量に依存して減少し、ベバシズマブが創傷治癒を阻害することが示された。

2.6.6.8.7 ウサギ円形創傷モデルにおける創傷治癒に対するベバシズマブの影響

(4.2.3.7.7-4)

ウサギ線形切開創傷モデルを用いた試験では、ベバシズマブによる創傷治癒の阻害作用が示された。本試験では円形創傷モデルを用いて、線形切開創傷モデルで得られた試験結果を確認した。円形創傷モデルは潰瘍病変を模したものであり、線形切開創傷モデルとは異なるモデルと考えられる。

(1) 試験1

1群3例の雄 NZW ウサギ(2.3～2.8 kg)に直径8 mm の円形創傷を右耳内側に作製し(Day 1)、溶媒又はベバシズマブ50 mg/kg を Day 1, 3, 5, 7, 10に計5回静脈内投与した。また、創傷治癒の遅延作用が知られているメチルプレドニゾロン35 mg/kg を陽性対照とし、創傷作製2日前, Day 1, 3, 5, 7, 11に計6回筋肉内投与した。Day 12に剖検を行った。

試験方法及び成績を「表 2.6.7.16-1」に示した(2.6.7 毒性試験概要表 2.6.7.16 その他の毒性試験)。

メチルプレドニゾロン群の1例が、Day 12に大腸菌性腸炎で死亡したが、他の動物は全例、最終投与後2日の剖検時まで生存した。ベバシズマブ投与に起因する一般症状の変化は認められず、全群で体重が Day 1から Day 10まで総じて一定に推移した。Day 12までに、対照群では創傷の78%の部分(創傷の直径から算出した面積を基に計算)が閉鎖したが、メチルプレドニゾロン群では33%、ベバシズマブ群では46%の創傷閉鎖率であった。病理組織学的検査で完全な上皮再形成が認められた割合は対照群で67%、メチルプレドニゾロン群で50%、ベバシズマブ投与群で17%であった。これらの結果より、ウサギ円形創傷モデルにおいて、ベバシズマブ50 mg/kg の投与により創傷の治癒が阻害されることが示された。

(2) 試験2

創傷治癒阻害の用量反応性について更に検討を行った。

試験方法及び成績を「表 2.6.7.16-1」に示した (2.6.7 毒性試験概要表 2.6.7.16 その他の毒性試験)。

1群3例の雄 NZW ウサギ (2.8~3 kg) に直径8 mm の円形創傷を右耳内側に作製し (Day 1), 溶媒又はベバシズマブ2, 10 mg/kg を Day 1, 4, 8, 11に計4回静脈内投与した。投与終了後10日間の休薬期間を設定し, Day 21に剖検を行った。

全例が剖検予定日まで生存した。ベバシズマブ投与に起因する一般症状の変化は認められず, 体重は概ね一定に推移した。Day 12の創傷閉鎖率は, 対照群69%, 2 mg/kg 群47%, 10 mg/kg 群36%であり, ベバシズマブ投与群では対照群に比較して創傷閉鎖率が低下した。2 mg/kg 群と10 mg/kg 群の間には有意差はなかったものの, 用量の増加に伴い創傷治癒率が低下する傾向がみられた。休薬により, 2及び10 mg/kg 群ともに円形創傷は完全に閉鎖したが, 対照群に比較して創傷閉鎖は3日から5日間遅延した。

円形創傷モデルの結果は, 線形切開創傷モデルを用いた試験結果と一致し, これらの結果はベバシズマブによる創傷治癒の遅延を示した。創傷治癒遅延作用は, ウサギに対して2 mg/kg の低用量を週2回, 2週間投与した場合にも認められたが, 休薬により回復した。

2.6.6.8.8 カニクイザルにおける創傷治癒に対するベバシズマブの影響

(4.2.3.7.7-10/11)

ウサギの線形切開創傷モデル及び円形創傷モデルを用いた試験では, ベバシズマブにより創傷治癒が遅延することが示されたことから, 同様の実験をカニクイザルの線形切開創傷モデルを用いて実施した。

試験方法及び成績を「表 2.6.7.16-1」に示した (2.6.7 毒性試験概要表 2.6.7.16 その他の毒性試験)。

1群1~3例の雄カニクイザル (約3~7才, 2~4 kg) に全層線形切開創傷 (2 cm) を肩甲骨部付近に作製し (Day 1), ベバシズマブ0.5, 2 mg/kg を創傷作製2日前, Day 1, 3, 5に計4回静脈内投与した。Day 7に剖検を行った。

全例が剖検予定日まで生存し, 一般症状に著変は認められなかった。ベバシズマブ投与群で創傷の抗張力 (tensile strength) が減少するなど, ウサギ同様, 創傷治癒に対する影響が認められた。しかしながら, 個体間のばらつきが大きく, 明らかな用量反応性は認められなかった。使用動物の月齢や体重がほぼ同様であったウサギの実験とは異なり, カニクイザルの年齢は約3~7才, 体重は2~4 kg と個体差があり, 動物の年齢や体重のばらつきが原因の1つと考えられた。

2.6.6.8.9 ウサギモデルを用いた血栓症に関する検討

(4.2.3.7.7-12)

臨床試験において血栓塞栓症の発現率がベバシズマブ投与群で増加したが, カニクイザルの反復投与試験では血液学的検査及び凝固検査に著変はみられなかった。血栓症発現に対するベバシズマブの影響について, 急性血栓症ウサギモデルを用いて検討した。

試験方法及び成績を「表 2.6.7.16-1」に示した (2.6.7 毒性試験概要表 2.6.7.16 その他の毒性試験)。

1群7例の雄 NZW ウサギ (3.8~4.2 kg) に, 溶媒又はベバシズマブ75 mg/kg を8日間連続静脈内投与した。8回目の投与終了後, 頸静脈を露出させて血液循環閉鎖用クランプではさみ, 軽度の損傷を起こすことにより血栓を惹起した。血餅生成までの時間及び血餅重量を指標に血栓形成に対する影響を評価した。更に, これらに加えて, 表皮出血時間の測定, 血液学的検査及び凝固検査 (プロトロンビン時間 [PT], 活性化部分トロンボプラスチン時間 [aPTT], 血球数, d-Dimer, カルシウム再加凝固時間, 血小板凝集能, 活性化血液凝固時間) も実施した。

全例が剖検予定日まで生存した。一般症状、体重、血液学的検査及び凝固検査、血餅生成時間、血餅重量及び表皮出血時間に著変は認められなかった。本試験の結果より、機械的操作により惹起した血栓症モデルに対しベバシズマブを投与した時、血栓症の悪化がないことが示された。

2.6.6.8.10 ベバシズマブの腎臓に対する影響及び腎臓への沈着に関する検討

(4.2.3.7.7-13)

臨床試験において、蛋白尿の発現率がベバシズマブ投与群で増加したが、カニクイザルを用いた反復投与試験の血液生化学検査及び尿検査では腎機能障害を示唆する変化はみられなかった。これより、ベバシズマブの腎機能への影響について精査するため、ベバシズマブの腎臓への沈着について探索毒性試験を実施した。

試験方法及び成績を「表 2.6.7.16-1」に示した (2.6.7 毒性試験概要表 2.6.7.16 その他の毒性試験)。

1群2例の雌 NZW ウサギ (3~3.5 kg) に溶媒又はベバシズマブ2, 10, 100 mg/kg を Day 1 及び Day 3 に静脈内投与し、Day 5 に剖検した。

全例が剖検予定日まで生存した。一般状態及び体重にベバシズマブ投与による影響はなかった。光学顕微鏡及び電子顕微鏡観察による腎臓の病理組織学的所見には、対照群とベバシズマブ投与群に差異は認められず、また、抗ベバシズマブ抗体による免疫組織染色でもベバシズマブの腎臓への沈着は確認されなかった。

2.6.6.8.11 cisplatin 誘発腎障害モデル

(4.2.3.7.7-14)

カニクイザルを用いた反復投与試験では、ベバシズマブ投与に起因した腎障害を示唆する所見はみられなかった。そのため、近位尿細管に対する腎毒性が知られている cisplatin 投与で腎障害を誘発したウサギモデル^{7,8)}を用いて、既存の腎障害に対するベバシズマブの影響を検討した。

試験方法及び成績を「表 2.6.7.16-1」に示した (2.6.7 毒性試験概要表 2.6.7.16 その他の毒性試験)。

1群7例の雄 NZW ウサギ (2.1~2.9 kg) に、cisplatin 1 mg/kg 又は生理食塩液を Day 1, 3, 5, 8, 10, 12 に計6回静脈内投与し、2週目からは溶媒又はベバシズマブ50 mg/kg を Day 8, 10, 12 に計3回静脈内投与した。Day 14 に剖検を行った。

全例が剖検予定日まで生存した。cisplatin 及びベバシズマブ投与に関連した一般症状は認められず、尿中蛋白質濃度及び血液学的検査に著変はみられなかった。

ベバシズマブ単独群では体重、血中尿素窒素 (BUN)、クレアチニン及び尿比重に変化は認められなかった。cisplatin 単独群及び cisplatin + ベバシズマブ併用群では、対照群 (生理食塩液 + 溶媒投与) に比較して体重が減少した。また、BUN 及びクレアチニンが上昇し、尿比重が投与前値及び対照群に比べて減少した。しかしながら、cisplatin 単独群と cisplatin + ベバシズマブ併用群の比較では、いずれの項目にも有意差は認められなかった。

病理組織学的検査では腎臓病変 (髓質尿細管の拡張、間質に炎症散見) が cisplatin 単独群及び cisplatin + ベバシズマブ併用群に観察された。発現頻度と程度は両群ほぼ同様であり、cisplatin 投与でみられる腎臓病変と一致した変化であった。

このように、ウサギ cisplatin モデルを用いた試験では、ベバシズマブ50 mg/kg の投与による腎障害の悪化はみられなかった。

2.6.6.8.12 ウシ血清アルブミン負荷腎障害モデル

(4.2.3.7.7-15/16)

たん白質負荷により誘発される腎障害は cisplatin 誘発腎障害とは異なっていることから、cisplatin 誘発腎障害モデルを補完する目的で、ウシ血清アルブミン (BSA) 負荷ウサギモデル⁹⁾を用いてベバシズマブの影響を検討した。

試験方法及び成績を「表 2.6.7.16-1」に示した (2.6.7 毒性試験概要表 2.6.7.16 その他の毒性試験)。

(1) 試験1

1群8例の雄 NZW ウサギ (2.5~3 kg) に BSA 5又は20 mg/kg を1週から2週は週5日、3週から6週は連日で静脈内投与し、腎障害を誘発した。6週時にはベバシズマブ 50 mg/kg を1日おきに計4回静脈内投与した。また、試験開始後5週間は無処置とし、6週時にベバシズマブ 50 mg/kg を1日おきに計4回静脈内投与するベバシズマブ単独群、1週から6週まで BSA 20 mg/kg を静脈内投与し、6週は無処置とする BSA 単独群を別途、設置した。

各投与群で明確な体重の差は認められなかった。また、尿比重及び尿蛋白質濃度にも一貫した変化はみられず、変化の程度もごくわずかであった。BSA 投与 (BSA 単独群及び BSA + ベバシズマブ併用群) により、ばらつきはあるものの BUN 及びクレアチニンの上昇で示される軽度の腎機能障害が認められた。BSA + ベバシズマブ併用群の2/8例は、BUN 及びクレアチニンが投与前値の4から7倍の高値を、また正常範囲の2から3倍の高値を示し、腎臓に中等度の糸球体腎炎が認められた。しかしながら、本試験では BSA に対するアナフィラキシー反応による死亡例が認められたことから各群の例数が少なく、ベバシズマブの作用について明確な結論は得られなかった。

(2) 試験2

試験1の BSA 投与による腎機能障害モデルで得られた結果に基づいて、同モデルを用いた追加試験を実施し、検討を加えた。

1群8例の雄 NZW ウサギ (2.5~3 kg) に、BSA 20 mg/kg 又は生理食塩液を6週間にわたり、連日静脈内投与した。7週目は無処置とし、8週目に溶媒又はベバシズマブ 50 mg/kg を1日おきに計4回静脈内投与した。

BSA 投与期間中、2例が BSA 投与によるアナフィラキシーなどで死亡した。また、耳の皮疹が BSA 投与群 (BSA 単独群及び BSA + ベバシズマブ併用群) の50%に発現した。この症状はベバシズマブ投与前から認められており、BSA に対するアナフィラキシー反応を回避する目的で投与した高用量の抗ヒスタミン剤に起因したものと推察された。

各群とも体重には投与による影響はみられなかった。ベバシズマブ単独群では、試験期間を通じて尿蛋白質濃度に変化はなく、腎臓の病理組織学的所見にも異常は認められなかった。

BSA 投与群 (BSA 単独群及び BSA + ベバシズマブ併用群) ではベバシズマブの併用に関わらず尿蛋白質濃度が上昇したが、個体間のばらつきが大きかった。BUN 及びクレアチニンにも軽微な変化がみられ、軽度の糸球体腎炎を特徴とする腎障害が惹起された。しかしながら、いずれの項目にもベバシズマブ併用による影響は認められなかった。

このように、本試験では BSA 投与により軽度の腎障害が誘発されたが、ベバシズマブ 50 mg/kg 併用投与による腎障害の悪化はなかった。また、ベバシズマブ 50 mg/kg 単独投与による腎障害の惹起も認められなかった。

2.6.6.9 新添加物の安全性評価

ベバシズマブ製剤に含有されるトレハロースは、その1日（1回）摂取量（12～36 mg/kg）において医薬品添加物としての使用前例を上回り新添加物に該当することから、トレハロースの静脈内投与による安全性について評価を行った。

なお、マウスを用いた2週間投与試験及び遺伝毒性試験（復帰突然変異試験，染色体異常試験，小核試験）は平成■年に医薬品添加物調査会にて審議済みである。

2.6.6.9.1 単回投与毒性試験

（引用文献10,11）

(1) マウス・ラット単回投与試験

1群雌雄各5例のマウス及びラットにトレハロースを0, 1000 mg/kg の用量で単回静脈内投与し、投与後14日間の観察を行った。

試験方法及び成績を「表 2.6.7.17-1」に示した（[2.6.7 毒性試験概要表](#) [2.6.7.17](#) [トレハロースの毒性試験](#)）。

マウス及びラットとも全群において死亡発現はなく、全身性の毒性は認められなかった。概略の致死量はマウス及びラットとも1000 mg/kg/日以上であった。

2.6.6.9.2 反復投与毒性試験

(1) マウスを用いた2週間投与試験

（4.2.3.7.7-17）

1群雌雄各10例のマウスに、0, 10, 100, 1000 mg/kg/日の用量でトレハロースの2週間連日静脈内投与を行った。投与可能な最大量を高用量とし、以下公比10で中及び低用量を設定した。試験方法及び成績を「表 2.6.7.17-2」に示した（[2.6.7 毒性試験概要表](#) [2.6.7.17](#) [トレハロースの毒性試験](#)）。

全群において死亡発現はなかった。1000 mg/kg/日群で、白血球数及びリンパ球数の軽度増加がみられたが、雄のみの変化で、また病理組織学的検査でも関連する所見は認められなかった。一般症状、体重、摂餌量、眼科学的検査、血液生化学的検査、剖検、器官重量及び病理組織学的検査に異常はみられなかった。

無毒性量は1000 mg/kg/日であった。

(2) カニクイザルを用いた26週間投与試験

（4.2.3.2-3）

慢性毒性は、トレハロース100 mg/mL を含有する溶媒を用いて実施したベバシズマブ26週間投与試験の成績を基に考察した。

1群雌雄各4～6例の成熟雌雄カニクイザル（4～7才）に、溶媒又はベバシズマブ2, 10, 50 mg/kg を週1回、又は、10 mg/kg を週2回、それぞれ26週間静脈内投与した。投与容量はいずれの群も5 mL/kg であり、トレハロース投与量は全群で500 mg/kg であった。投与終了後、対照群及び高用量群の雌雄各2例を12週間の回復試験に割り当てた。

試験方法及び成績を「表 2.6.7.6.3-1」に示した（[2.6.7 毒性試験概要表](#) [2.6.7.6](#) [反復投与毒性試験](#)）。

[2.6.6.3](#) 反復投与毒性試験に示したように、全群で死亡発現はなく、溶媒群では一般症状、体重、摂餌量、血圧、生理学的検査（直腸温、呼吸数）、心電図、眼科学的検査、臨床検査（血液生化学的検査、血液学的検査、凝固検査、尿検査）、剖検及び病理組織学的検査に著変はみられなかった。ベバシズマブ投与群では体重、摂餌量、血液生化学的検査及び病理組織学的検査にベバシズマブ投与に起因した毒性が認められた。これより、トレハロースを500 mg/kg で週2回、26週間投与した時、忍容性は良好であると結論された。

2.6.6.9.3 遺伝毒性試験

(1) 細菌を用いた復帰突然変異試験

(引用文献10), 11))

ネズミチフス菌 (TA1535, TA1537, TA98, TA100) 及び大腸菌 (WP2 uvrA) を用いて、プレート法にて実施した。

用量設定試験の結果、5000 µg/plate まで菌の生育阻害が認められなかったことから、代謝活性化存在下 (S-9mix 添加) 及び非存在下 (S-9mix 非添加) とともに、最高用量を5000 µg/plate とし、公比2で5用量 (312.5, 625, 1250, 2500, 5000 µg/plate) を設定した。実験は2回行った。試験方法及び成績は「表 2.6.7.17-3」に示した (2.6.7 毒性試験概要表 2.6.7.17 トレハロースの毒性試験)。

いずれの実験においても代謝活性化の有無に関わらず、復帰変異コロニーの増加は認められなかった。

(2) チャイニーズハムスター卵巣細胞を用いた染色体異常試験

(引用文献10), 11))

チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO 細胞) を用い、直接法 (S-9mix 非添加) 及び代謝活性化 (S-9mix 添加) 法にて試験を実施した。

用量設定試験では1250～5000 µg/mL までの用量で、直接法及び代謝活性化法とともに、薬物で3時間処理を行い、いずれの用量においても染色体異常を有する細胞の増加はみられなかった。これより、最高用量を5000 µg/mL とした、1250, 2500, 5000 µg/mL までの3用量を設定した。

実験1では、薬物による短時間処理 (3時間処理－21時間目標本作製) が行われ、標本が作製された。実験2では直接法においては長時間処理 (21時間処理) が、代謝活性化法においては短時間処理 (3時間処理－21時間目標本作製) が行われた。更に、陰性対照と高用量群では長時間処理 (直接法) 及び短時間処理 (代謝活性化法) 後、45時間目にも標本を作製し、染色体分析を行った。

試験方法及び成績は「表 2.6.7.17-4」に示した (2.6.7 毒性試験概要表 2.6.7.17 トレハロースの毒性試験)。

代謝活性化の有無に関わらず、いずれの用量においても染色体異常を有する細胞数の増加は認められなかった。また、5000 µg/mL 群の45時間目標本において、倍数体の増加もみられなかった。

(3) マウスを用いた小核試験

(引用文献10), 11))

1群雌雄各10例のマウスにトレハロースを1250, 2500及び5000 mg/kg を単回腹腔内投与し、投与後24及び48時間目に雌雄各5例ずつを屠殺して骨髓標本を作製し、多染性赤血球中の小核を有する細胞数及び赤血球中の多染性赤血球の出現数を計測した。

トレハロースは低毒性であることが予想され、毒性がない場合の最高用量として用いられることが多い5000 mg/kg を最高用量として設定した。

試験方法及び成績は「表 2.6.7.17-5」に示した (2.6.7 毒性試験概要表 2.6.7.17 トレハロースの毒性試験)。

試験期間中、トレハロース群で死亡発現はなく、体重変化も認められなかった。いずれの用量、標本作製時間においても、小核を有する多染性赤血球数の増加はみられなかった。

2.6.6.9.4 生殖発生毒性試験

トレハロースの静脈内投与による生殖発生毒性試験は実施していない。生殖発生毒性についての考察を2.4.4.10に記載した（2.4 非臨床に関する概括評価 2.4.4.10 [トレハロースの毒性](#)）。

2.6.6.9.5 局所刺激性試験

トレハロースの局所刺激性試験は実施していない。マウスにおける2週間静脈内投与試験では1, 10, 100 mg/mL の濃度のトレハロースを10 mL/kg で投与（投与用量は各々10, 100, 1000 mg/kg）し、投与部位に局所刺激性を示唆する所見は認められなかった。したがって、100 mg/mL の濃度まで、局所刺激性はないと考えられる。

2.6.6.9.6 トレハロースの毒性のまとめ

トレハロースの静脈内投与による毒性試験としては、マウス及びラットの単回投与試験、マウスの連日投与による2週間試験、トレハロースを含有する溶媒を用いたカニクイザル26週間投与試験（ベバシズマブ毒性試験）及び遺伝毒性試験（復帰突然変異試験、染色体異常試験、小核試験）が実施された。

マウス及びラットを用いた単回投与試験（1000 mg/kg）及びマウス2週間試験（1000 mg/kg/日）において忍容性は良好であり、全身性の毒性は認められなかった。トレハロースを含有する溶媒を用いたカニクイザル26週間投与試験では500 mg/kg のトレハロースが週1回又は2回の頻度で26週間まで投与されたが、トレハロースに起因した毒性は認められなかった。遺伝毒性試験はいずれも陰性であった。

2.6.6.10 考察及び結論

ベバシズマブの忍容性は良好であり、50 mg/kg までの投与で死亡例は認められなかった。カニクイザルを用いた反復投与試験及びウサギを用いた探索毒性試験において、骨端軟骨異形成及び卵巣機能の低下が認められ、ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験において、胚・胎児毒性、催奇形性などの生殖発生毒性がみられた。また、ウサギ及びカニクイザルの創傷モデルでは創傷治癒の遅延が示された。これらはいずれもベバシズマブの薬理学的作用である血管新生阻害に起因した変化であった。

カニクイザルへの反復投与により長骨成長板で血管新生阻害に続発した骨端軟骨異形成が認められ、程度と発現頻度は、投与量と投与期間に依存して増加した。骨端軟骨異形成は4週間投与（週2回）では10 mg/kg 以上、13週間又は26週間投与（週1回又は2回）では2 mg/kg 以上で認められた。ウサギを用いた探索毒性試験（75 mg/kg までの用量で週2回、2週間投与）では成長板軟骨の軽微な変化が認められたのみであり、一因として、カニクイザルに比べて投与期間が短かったことが推察された。

10 mg/kg 以上を週1回又は2回の頻度で13週間又は26週間投与した雌カニクイザルにおいて、卵巣及び子宮重量の減少、黄体数の減少/欠失、子宮内膜増殖の抑制、卵胞の成熟阻害などの雌生殖器に対する影響がみられた。50 mg/kg を8又は10日間で3又は4回投与したウサギ探索毒性試験においても、hGC 投与に誘発される血清中プロゲステロンの上昇が抑制され、卵巣・子宮重量が減少し、黄体数が減少した。このように、反復毒性試験及び探索毒性試験の結果からは雌生殖能に対する影響が示唆された。

その他、反復投与試験では体重・摂餌量に対する影響及びアルブミン及びグロブリン値の変化が認められたが、以下に示すようにいずれも臨床への外挿性はないと推察された。

カニクイザル26週間試験の10 mg/kg（週2回）群及び50 mg/kg 群で、摂餌量の減少を伴う体重低下が認められた。この変化は、より程度の重い骨端軟骨異形成を伴う雄動物のみに投与14週以降にみられ、骨端軟骨異形成による成長遅延に起因するものと考えられた。本剤が適用さ

れる患者は成人であり、骨端軟骨異形成が発現する可能性は低いことから、臨床的に意味のある変化とは考えられなかった。

また、同試験の10 mg/kg（週2回）群及び50 mg/kg 群雄でアルブミン及び A/G 比が減少し、グロブリンが増加した。これらの変化はいずれも生理的変動内の変化であり、休薬により回復した。

ベバシズマブを妊娠ウサギの器官形成期に投与したところ、10 mg/kg 以上で胎児体重の減少及び骨化遅延が認められた。30 mg/kg 以上では異常/変異胎児を有する母動物数が増加し、母動物の体重増加量が一過性に減少した。更に、100 mg/kg では吸収胚が増加し、胎児の外形及び骨格異常が増加した。生殖発生毒性試験の結果及び反復投与試験の結果から、ベバシズマブの胚・胎児毒性、催奇形性作用及び卵巣機能への影響が示された。

ベバシズマブ投与による創傷治癒遅延がウサギ創傷モデルで0.5 mg/kg から認められた。創傷治癒遅延作用は休薬により回復する変化であったが、創傷の完全治癒は対照群に比べて3日から5日遅延した。カニクイザルにおいてはこのような用量に依存した創傷治癒の遅延は明確にはされなかったが、用いたカニクイザルの年齢及び体重にばらつきがあったことが一因として推察された。

ベバシズマブの臨床試験でみられた所見に基づき、腎機能と血液凝固に対する影響について、ウサギを用いた探索毒性試験を行った。正常動物に50 mg/kg までの用量で週1回又は2回の頻度で最長26週間投与した毒性試験では、腎機能及び血液凝固に対するベバシズマブの影響はみられなかった。そのため、腎臓及び血管に障害を惹起させたモデル動物を用いてベバシズマブの影響を更に検討した。ベバシズマブ50 mg/kg の投与では cisplatin 及び BSA 惹起腎障害モデルで腎パラメータの悪化はみられなかった。また、急性血栓症モデル動物を用いた探索毒性試験において、血液凝固パラメータに対する影響は認められなかった。

2.6.6.11 参考文献

- 1) Shima DT, Gougos A, Miller JW, Tolentino M, Robinson G, Adamis AP et al. Cloning and mRNA expression of vascular endothelial growth factor in ischemic retinas of *Macaca fascicularis*. Invest Ophthalmol Vis Sci 1996;37:1334-1340.
- 2) Ford EW, Roberts JA and Southers JL Chapter 8 Urogenital System. III Renal Disease. In: Nonhuman Primates in Biomedical Research: Diseases. Academic Press 1998. p315-319.
- 3) Ryan AM, Eppler DB, Hagler KE, Bruner RH, Thomford PJ, Hall RL et al. Preclinical safety evaluation of rhuMAbVEGF, an antiangiogenic humanized monoclonal antibody. Toxicol Pathol 1999;27:78-86.
- 4) Howdieshell TR, Riegner C, Gupta V, Callaway D, Grembowicz K, Sathyanarayana et al. Normoxic wound fluid contains high levels of vascular endothelial growth factor. Ann Surg 1998;228:707-715.
- 5) Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE, Volin MV, Gamelli RL, DiPietro LA et al. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. Am J Pathol 1998;152:1445-1452.
- 6) Tonnesen MG, Xiaodong F, Clark RAF. Angiogenesis in wound healing. J Invest Dermatol Symp Proc 2000;5:40-46.
- 7) Dobyan DC, Levi J, Jacobs C, Kosek J, Weiner MW. Mechanism of cis-platinum nephrotoxicity : II Morphologic observations. J Pharmacol Exp Ther 1980;213:551-556.
- 8) Kim YK, Byun HS, Kim YH, Woo JS Lee SH. Effect of cisplatin on renal function in rabbits: Mechanism of reduced glucose reabsorption. Toxicol Appl Pharmacol 1995;130:19-26.
- 9) Dixon FJ, Feldman JD, Vazquez JJ. Experimental glomerulonephritis. The pathogenesis of a laboratory model resembling the spectrum of human glomerulonephritis. J Exp Med 1961;113:899-937.

- 10) Richards AB, Krakowka S, Dexter LB, Schmid H, Wolterbeek APM, Waalkens-Berendsen DH et al. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. Food Chem Toxicol 2002;40:871-898.
- 11) Bär A. Trehalose produced by a novel enzymatic process UK Advisory Committee on Novel Foods and Processes. 2000.