KW-3357

第 2 部（モジュール 2）：
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

協和発酵キリン株式会社

CONFIDENTIAL

略号及び用語の定義一覧

略号

略号	略していない用語
APTT	Activated partial thromboplastin time（活性化部分トロンボプラスチン時間）
AT	Antithrombin（アンチトロンビン）
CAD	Congenital antithrombin deficiency（先天性アンチトロンビン欠乏症）
DIC	Disseminated intravascular coagulation（汎発性血管内凝固症候群）
PT	Prothrombin time（プロトロンビン時間）

用語の定義

用語	定義
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
$AUC_{0\text{-}24}$	投与後 24 時間までの血漿中薬物濃度－時間曲線下面積
BUN	血中尿素窒素
C_{10min}	投与後 10 分の血漿中薬物濃度
C_{30min}	投与後 30 分の血漿中薬物濃度
C_{24h}	投与後 24 時間における血漿中薬物濃度
DNA	デオキシリボ核酸
ELISA	固相酵素結合免疫測定法
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
ICH	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
IU	国際単位

目次

略号及び用語の定義一覧 2
目次 3
2.6.6 毒性試験の概要文 5
2.6.6.1 まとめ 5
2.6.6.1.1 反復投与毒性試験 6
2.6.6.1.1.1 ラット 6
2.6.6.1.1.2 サル 6
2.6.6.1.2 生殖発生毒性試験 7
2.6.6.1.2.1 ラット 7
2.6.6.1.2.2 ウサギ 7
2.6.6.1.3 局所刺激性試験 7
2.6.6.2 単回投与毒性試験 7
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） 7
2.6.6.3.1 ラットを用いた 2 週間反復静脈内投与毒性試験（予備試験）（参考 4.2.3.2-1） 8
2.6.6.3.2 ラットを用いた 2 週間反復静脈内投与毒性試験及び 2 週間回復性試験（4.2.3.2-2） 8
2.6.6.3.3 ラットを用いた 2 週間反復静脈内投与毒性試験及び 2 週間回復性試験（追加試験）（4.2.3.2-3） 9
2.6.6.3.4 カニクイザルを用いた 1 週間又は 2 週間反復静脈内投与毒性試験（予備試験）（参考 4.2.3.2-4、参考 4.2.3.2-5） 9
2.6.6.3.5 カニクイザルを用いた 2 週間反復静脈内投与毒性試験及び 6 週間回復性試験（4.2.3.2-6） 10
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（用量設定試験及び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
2.6.6.6.1.1 ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験−雌動物投与試験−（4.2.3.5.1-1） 12
2.6.6.6.1.2 ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験−雄動物投与試験−（4.2.3.5.1-2） 13
2.6.6.6.2 胚・胎児発生に関する試験 14
2.6.6.6.2.1 ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験（4.2.3.5.2-1） 14
2.6.6.6.2.2 ウサギを用いた胚・胎児発生に関する予備試験（参考 4.2.3.5.2-2、参考 4.2.3.5.2-3） 15
2.6.6.6.2.3 ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験（4.2.3.5.2-4） 15
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 17

2.6.6.6.3.1 ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する予備試験（参考 4.2.3.5.3-1、参考 4.2.3.5.3-2） 17
2.6.6.6.3.2 ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（4.2.3.5.3-3） 17
2.6.6.7 局所刺激性試験 18
2.6.6.7.1 KW-3357 製剤のウサギにおける静脈内及び静脈周囲投与による局所刺激性試験（4.2.3.6-1） 18
2.6.6.8 その他の毒性試験 18
2.6.6.9 考察及び結論 19
2.6.6.9.1 出血の種差について 19
2.6.6.9.2 生殖に及ぼす影響 19
2.6.6.9.3 抗薬物抗体の産生による KW-3357 の曝露及び内因性 AT 活性への影響 20
2.6.6.9.4 局所刺激性について 20

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6.1 まとめ

KW-3357 の毒性プロファイルを検討するために、ラット及びカニクイザルを用いた反復投与毒性試験、ラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験、ウサギを用いた局所刺激性試験を実施した。急性毒性は、原薬濃度と投与可能容量から最大投与可能量と判断した用量を最高用量とする反復投与毒性試験を実施し、反復投与毒性試験から評価可能であると判断したため、単回投与毒性試験は実施しなかった。遺伝毒性試験は、本剤が遺伝子組換え技術により製造した組換えタンパク質であり、DNA 及び他の染色体成分に直接相互作用しないと考えられることから、「「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」について（薬食審査発 0323 第 1 号、平成 24 年 3 月 23 日）」に基づき実施しなかった。がん原性試験については、本剤の適応症である汎発性血管内凝固症候群（DIC）が急性で致死率の高い疾患であり、臨床での投与期間が最長 5 日間を想定していること、また、先天性アンチトロンビン欠乏症（CAD）においては妊娠又は手術時等、血栓症発生リスクがある場合に 5 日間程度投与することを想定していること、並びに本剤が遺伝毒性を有している可能性がごく低いことから、「医薬品のがん原性試験に関するガイドラインの改正について（薬食審査発 1127001 号、平成 20 年 11 月 27 日）」に基づき、必要ないと判断したため、実施しなかった。

投与経路は、臨床での投与経路に合わせて静脈内投与とした。反復投与毒性試験における投与回数は臨床での投与頻度に合わせて 1 日 1 回連日投与とし、投与期間は臨床での投与期間が 5 日間程度であることから、「「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」について（薬食審査発 0323 第 1 号、平成 24 年 3 月 23 日）」に従い 2 週間とした。主要な毒性試験は GLP に適合した試験であり、ICH ガイドラインに準拠して実施した。

実施した毒性試験の一覧を表 2.6.6.1-1に示す。

表2.6.6.1-1 実施した毒性試験の一覧

試験の種類及び期間		投与経路	動物種/系統	GLP 適用
反復投与毒性試験	2 週間（予備試験）	静脈内投与	ラット/Crl:CD(SD)	非適用
	2 週間	静脈内投与	ラット/Crl:CD(SD)	適用
	2 週間（商業生産設備で製造された原薬を用いた試験）	静脈内投与	ラット/Crl:CD(SD)	適用
	1 又は 2 週間（予備試験）	30 分間静脈内持続投与	カニクイザル	非適用
	2 週間	30 分間静脈内持続投与	カニクイザル	適用
生殖発生毒性試験	受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験	静脈内投与	ラット/Crl:CD(SD)、雌性	適用
	受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験	静脈内投与	ラット/Crl:CD(SD)、雄性	適用
	胚・胎児発生に関する試験	静脈内投与	ラット/Crl:CD(SD)	適用
	胚・胎児発生に関する試験（予備試験）	30 分間静脈内持続投与	ウサギ/Kbs:NZW	非適用
	胚・胎児発生に関する試験	30 分間静脈内持続投与	ウサギ/Kbs:NZW	適用
	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（予備試験）	静脈内投与	ラット/Crl:CD(SD)	非適用
	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	静脈内投与	ラット/Crl:CD(SD)	適用
その他	局所刺激性試験	静脈内投与 静脈周囲投与	ウサギ/Kbl:JW	適用

2.6.6.1.1 反復投与毒性試験

2.6.6.1.1.1 ラット

雌雄 Crl:CD（SD）ラットに KW-3357 を最高 2000 IU/kg（最大投与可能量に相当）の用量で 1 日 1 回、2 週間反復静脈内投与した。0（対照）及び 2000 IU/kg/日投与群では 2 週間の休薬期間を設けた。

その結果、死亡は認められなかった。2 週間投与後のアンチトロンビン（AT）活性は KW-3357 投与群で高値を示したが、その他の検査において、KW-3357 投与による影響は認められなかった。したがって、ラット 2 週間反復静脈内投与試験における KW-3357 の無毒性量は 2000 IU/kg/日と考えられた。

2.6.6.1.1.2 サル

雄性カニクイザルに 180 及び 1800 IU/kg の用量で 2 週間又は 1 週間、1 日 1 回反復静脈内投与した。180 IU/kg/日投与群では 5 週間の休薬期間を設けた。その結果、1800 IU/kg/日投与群では 7 回投与翌日に、過剰な薬理作用（血液凝固抑制作用）に起因した出血により 2/2 例が瀕死となった。180 IU/kg/日投与群では投与期間中、貧血が認められたが、休薬により回復した。

雌雄カニクイザルに 0（対照）、100、300 及び 1000 IU/kg の用量で 2 週間、1 日 1 回反復静脈内投与した。全群で 6 週間の休薬期間を設けた。その結果、KW-3357 投与群では、投与期間中の AT 活性は用量依存的に高値を示し、薬理作用に起因した出血、貧血が認められた。出血、貧血が最も重篤であった 1000 IU/kg/日投与群の動物では、一般状態への影響、体重及び摂餌量

の減少等も認められた。100 及び 300 IU/kg/日投与群においても軽微な貧血又は出血が認められたが、一般状態及び摂餌量への影響は認められなかったことから、毒性とは捉えなかった。投与期間中に認められた出血及び貧血等の二次的変化は、休薬により回復した。以上の結果から、本試験における KW-3357 の無毒性量は 300 IU/kg/日と考えられた。

2.6.6.1.2 生殖発生毒性試験

2.6.6.1.2.1 ラット

雌雄 Crl:CD（SD）ラットに KW-3357 を最高 2000 IU/kg の用量で反復静脈内投与し、受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、胚・胎児発生に関する試験及び出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験を実施した。その結果、いずれの試験においても、親動物の一般毒性及び生殖能、胚・胎児の発生に KW-3357 の影響は認められず、無毒性量は 2000 IU/kg/日と考えられた。

2.6.6.1.2.2 ウサギ

雌性 Kbs:NZW ウサギを用いた胚・胎児発生に関する予備試験では、KW-3357 を 0（対照）、100 及び 1000 IU/kg の用量で、妊娠 6 から 18 日の間、1 日 1 回反復静脈内投与した。その結果、1000 IU/kg/日投与群において、膣からの出血、子宮内の血液貯留及び流産（妊娠 24 日）が認められ、着床後死亡率の増加及び生存胎児数の減少が認められた。

雌性 Kbs:NZW ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験では、KW-3357 を 0（対照）、50、150 及び 500 IU/kg の用量で、妊娠 6 から 18 日の間、1 日 1 回反復静脈内投与した。その結果、500 IU/kg/日投与群で膣からの出血、子宮内の血液貯留が認められた。同群では生存胎児数及び着床後死亡率に影響は認められなかったが、胎児体重の低値及び手指骨（中手骨及び前肢中節骨）で骨化遅延が認められた。外表異常、内臓異常、骨格異常及び骨格変異の発現頻度の増加は認められず、本剤に催奇性はないと判断した。以上の結果から、本試験における KW-3357 の母動物への一般毒性学的影響に関する無毒性量は 500 IU/kg/日、母動物の生殖及び胚・胎児の発生に関する無毒性量は 150 IU/kg/日であると考えられた。

2.6.6.1.3 局所刺激性試験

雄性 Kbl:JW ウサギを用いて、KW-3357 製剤の耳介静脈内及び静脈周囲の皮下投与による局所刺激性を検討した。その結果、いずれの投与経路においても KW-3357 投与に起因した毒性学的に意義のある変化は認められず、血管刺激性、血管周囲刺激性の可能性はないと考えられた。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

急性毒性は、ラット 2 週間反復静脈内投与毒性試験、カニクイザル 1 週間（1800 IU/kg/日）及び 2 週間（180 IU/kg/日）反復静脈内投与毒性試験を用いて評価した。

ラットに 500 及び 2000 IU/kg/日を 2 週間反復静脈内投与した結果、死亡例は認められなかったことから、概略の致死量は 2000 IU/kg/日を超えると考えられる。

カニクイザルに 1800 IU/kg/日を 1 週間反復静脈内投与した。1800 IU/kg/日投与群で 7 回投与翌日に 2/2 例で瀕死が認められたことより概略の致死量は 1800 IU/kg/日であった。

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）

KW-3357 を反復静脈内投与したときの毒性を、ラット及びカニクイザルを用いて検討した。

2.6.6.3.1 ラットを用いた 2 週間反復静脈内投与毒性試験（予備試験）（参考 4.2.3.2-1）

雌性 Crl:CD（SD）ラットに KW-3357 を 0（対照）又は 1800 IU/kg の用量で 1 日 1 回、2 週間反復静脈内投与した（5 例/群）。対照群には媒体（[redacted] mmol/L クエン酸ナトリウム、[redacted] mmol/L 塩化ナトリウム溶液）を投与した。一般状態観察、体重及び摂餌量測定、血液学的検査、血液生化学的検査及び剖検を実施した。

投与 2 日に 1800 IU/kg/日投与群の 1 例で前肢の指に皮下出血が認められたが、投与期間中に治癒した。体重、摂餌量及び血液学的検査の結果は、対照群と KW-3357 投与群で差は認められなかった。2 週間投与後の AT 活性は、1800 IU/kg/日投与群で対照群と比較して高値であった。

2.6.6.3.2 ラットを用いた 2 週間反復静脈内投与毒性試験及び 2 週間回復性試験（4.2.3.2-2）

雌雄 Crl:CD（SD）ラットに KW-3357 を 0（対照）、500 及び 2000 IU/kg（最大投与可能量に相当）の用量で、1 日 1 回、2 週間反復静脈内投与した（10 例又は 15 例/性/群）。0 及び 2000 IU/kg/日投与群の雌雄各 5 例について 2 週間の休薬期間を設け、回復性を検討した。対照群には媒体（[redacted] mmol/L クエン酸ナトリウム、[redacted] mmol/L 塩化ナトリウム溶液）を投与した。一般状態観察、体重及び摂餌量測定、眼科学的検査、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。また、全群でサテライト群を設け、全身曝露及び抗 KW-3357 抗体の産生について評価した。

瀕死及び死亡は認められなかった。また、いずれの検査項目においても、試験期間を通して KW-3357 の影響は認められなかった。

トキシコキネティクス解析の結果を表 2.6.6.3.2-1に示す。雌雄ともに用量の増加に伴って $AUC_{0\text{-}24}$ が増加した。いずれの用量においても、$AUC_{0\text{-}24}$ に明らかな性差は認められなかった。投与 14 日の C_{24h}、$AUC_{0\text{-}24}$ は、投与 1 日の 1.3 から 2.0 倍であった。KW-3357 投与群では、対照群と比較して AT 活性の高値が認められたが、2 週間の休薬により、対照群の AT 活性と同程度になった。試験期間を通して、いずれの KW-3357 投与群においても、抗 KW-3357 抗体は検出されなかった。

表2.6.6.3.2-1 ラットを用いた 2 週間反復静脈内投与毒性試験におけるトキシコキネティクスパラメータ

Dose (IU/kg/日)	C_{24h} (IU/mL)[a), b)]				$AUC_{0\text{-}24}$ (IU·h/mL)[a), b)]			
	投与 1 日		投与 14 日		投与 1 日		投与 14 日	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
500	0.254±0.030	0.238±0.054	0.504±0.062	0.438±0.061	49.6±5.1	49.3±7.2	82.5±7.9	64.1±3.2
2000	1.22±0.06	1.01±0.10	2.20±0.27	1.86±0.14	227±10	202±11	329±32	274±19

a) 4 例の平均値±標準偏差

b) ELISA により測定した血漿中 KW-3357 タンパク質濃度に、試験に使用した被験物質の抗トロンビン活性を乗じて算出した換算値

以上のように、500 及び 2000 IU/kg/日投与群で雌雄とも毒性学的に意義のある変化が認められなかったため、本試験における KW-3357 の無毒性量は 2000 IU/kg/日と考えられた。

2.6.6.3.3 ラットを用いた 2 週間反復静脈内投与毒性試験及び 2 週間回復性試験（追加試験）（4.2.3.2-3）

雌雄 Crl:CD（SD）ラットに KW-3357（商業生産設備で製造された原薬）を 0（対照）及び 2000 IU/kg（最大投与可能量に相当）の用量で、1 日 1 回、2 週間反復静脈内投与した（15 例/性/群）。全群の雌雄各 5 例について 2 週間の休薬期間を設け、回復性を検討した。対照群には媒体（[redacted] g/L グリシン、[redacted] g/L クエン酸三ナトリウム二水和物溶液（pH[redacted]））を投与した。一般状態観察、体重及び摂餌量測定、眼科学的検査、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。また、全群でサテライト群を設け、全身曝露及び抗 KW-3357 抗体の産生について評価した。

瀕死及び死亡は認められなかった。また、いずれの検査項目においても、試験期間を通して KW-3357 の影響は認められなかった。

トキシコキネティクス解析の結果を表 2.6.6.3.3-1に示す。$AUC_{0\text{-}24}$ に明らかな性差は認められなかった。投与 14 日の C_{24h}、$AUC_{0\text{-}24}$ は、投与 1 日の 1.40 から 1.91 倍であった。KW-3357 投与群では、対照群と比較して AT 活性の高値が認められたが、2 週間の休薬により、対照群の AT 活性と同程度になった。2000 IU/kg/日投与群の雌 1 例で休薬 14 日に抗 KW-3357 抗体が検出された。

表2.6.6.3.3-1 ラットを用いた 2 週間反復静脈内投与毒性試験におけるトキシコキネティクスパラメータ

Dose (IU/kg/日)	C_{24h} (IU/mL)[a),b)]				$AUC_{0\text{-}24}$ (IU·h/mL)[a),b)]			
	投与 1 日		投与 14 日		投与 1 日		投与 14 日	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
2000	1.42±0.25	1.19±0.17	2.06±0.11	2.23±0.29	213±11	181±25	299±13	326±13

a) 4 例の平均値±標準偏差

b) ELISA により測定した血漿中 KW-3357 タンパク質濃度に、試験に使用した被験物質の抗トロンビン活性を乗じて算出した換算値

以上のように、2000 IU/kg/日投与群で雌雄とも毒性学的に意義のある変化が認められなかったため、本試験における KW-3357 の無毒性量は 2000 IU/kg/日と考えられた。

2.6.6.3.4 カニクイザルを用いた 1 週間又は 2 週間反復静脈内投与毒性試験（予備試験）（参考 4.2.3.2-4、参考 4.2.3.2-5）

雄性カニクイザルに KW-3357 を 180 及び 1800 IU/kg の用量でそれぞれ 2 週間又は 1 週間、1 日 1 回 30 分間静脈内持続投与した（2 例/群）。180 及び 1800 IU/kg/日の両群について、一般状態観察、体重測定、血液学的検査、血液生化学的検査を実施し、全身曝露及び抗 KW-3357 抗体の産生について評価した。更に、1800 IU/kg/日投与群について、剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。180 IU/kg/日投与群では 5 週間の休薬期間を設け、回復性を評価した。

1800 IU/kg/日投与群では 2/2 例で 7 回投与翌日に瀕死となったため、切迫屠殺した。瀕死となった 1 例では、投与 4 日から摂餌量の減少及び口腔粘膜の蒼白化、投与 5 日から顔面の蒼白化、投与 7 日に自発運動の低下が認められ、投与 8 日に横臥位を示し瀕死となった。他の 1 例では、投与 6 日に前腕（投与部位）及び後肢（採血部位）の腫脹が認められ、投与 7 日に自発運動の低下、投与 8 日の採血後に嘔吐、横臥位を示し瀕死となった。瀕死例の血液学的検査では、2/2 例で、赤血球数、ヘマトクリット値及びヘモグロビン濃度の減少、網状赤血球率の増加、プロト

ロンビン時間（PT）及び活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）の延長が認められた。また、好中球、単球及び大型非染色球の増加を伴う白血球数の増加が認められた。1/2 例では、フィブリノーゲンの増加及び血小板数の減少も認められた。血液生化学的検査では、2/2 例で投与 8 日にコリンエステラーゼ、リン脂質及び総コレステロールの低下、総ビリルビン、BUN 及び α2-グロブリンの増加を認め、1/2 例では ALT、血糖、中性脂肪、クレアチニン及びカルシウムの低下、AST の増加も認められた。剖検では 1 例で腹腔内、他の 1 例で投与、採血部位に多量の出血が認められ、病理組織学的検査の結果、消化管の粘膜下組織筋層、腹壁、膵臓及び腎臓の結合組織でも出血が確認された。腹腔内で多量の出血が認められた 1 例では腎臓で遠位尿細管の拡張（両側）及び腎盂の閉塞（左側）が認められたが、これらの所見は腎臓周囲での血腫形成による物理的圧力に起因すると考えられた。

180 IU/kg/日投与群では一般状態の異常は認められなかった。血液学的検査では、投与期間中、2/2 例で赤血球数、ヘマトクリット値及びヘモグロビン濃度が減少、網状赤血球率及びフィブリノーゲンが増加した。また、好中球数の増加を伴う白血球数の増加が認められたが、これらの変化はいずれも休薬期間中に回復した。

トキシコキネティクス解析の結果を表 2.6.6.3.4-1に示す。C_{24h}及び $AUC_{0\text{-}24}$は投与 7 日及び投与 14 日で投与 1 日より増加した。投与 7 日の AT 活性は、投与終了時点で 180 IU/kg/日投与群では 756%、1800 IU/kg/日投与群では 5740 %、投与開始後 24 時間時点でそれぞれ 374%、2540%であり、投与前の活性と比較して約 8.3、53、4.0、23 倍であった。180 IU/kg/日投与群の AT 活性は、休薬 14 日で投与開始前値と同程度になった。休薬 28 日以降、180 IU/kg/日投与群の 1 例で抗 KW-3357 抗体が検出された。

表2.6.6.3.4-1　カニクイザルを用いた 1 週間又は 2 週間反復静脈内投与毒性試験（予備試験）におけるトキシコキネティクスパラメータ

Dose (IU/kg/日)	C_{24h} (IU/mL)[a)、b)]			$AUC_{0\text{-}24}$ (IU·h/mL)[a)、b)]		
	投与 1 日	投与 7 日	投与 14 日	投与 1 日	投与 7 日	投与 14 日
180	0.985	2.60	2.27	45.6	87.6	96.6
1800	12.7	27.0	NA	590	873[c)]	NA

NA：Not applicable

a) 2 例の平均値

b) ELISA により測定した血漿中 KW-3357 タンパク質濃度に、試験に使用した被験物質の抗トロンビン活性を乗じて算出した換算値

c) 1 例は横臥位となり瀕死状態となったため、投与開始後 24 時間の採血を投与開始後 22.5 時間で行ったため、$AUC_{0\text{-}22.5}$を算出、平均値の計算に使用した。

以上のように、カニクイザルにおいて、KW-3357 の 1800 IU/kg は致死用量であり、180 IU/kg は軽度に貧血及びフィブリノーゲンの増加を惹起する用量であった。

2.6.6.3.5　カニクイザルを用いた 2 週間反復静脈内投与毒性試験及び 6 週間回復性試験（4.2.3.2-6）

雌雄カニクイザルに KW-3357 を 0（対照）、100、300 及び 1000 IU/kg の用量で 2 週間、1 日 1 回 30 分間静脈内持続投与した（5 例/性/群）。各群雌雄 2 例について 6 週間の休薬期間を設け、回復性を評価した。対照群には媒体（[redacted] mmol/L クエン酸ナトリウム、[redacted] mmol/L 塩化ナトリウム溶液）を投与した。一般状態観察、体重及び摂餌量測定、眼科学的検査、心電図検査、血圧及び体温測定、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、器官重量及び病理組織学的検査を実施した。また、全身曝露及び抗 KW-3357 抗体の産生について評価した。

瀕死又は死亡は認められなかった。1000 IU/kg/日投与群で、主に投与 7 日以降に口腔粘膜の蒼白化及び大腿部（採血部位及び眼科学的検査のための麻酔薬の投与部位）の腫脹が認められた。また、300 及び 1000 IU/kg/日投与群では、投与部位（前腕）の一時的な腫脹が散見された。その他、1000 IU/kg/日投与群では、体重及び摂餌量の減少が認められ、雄 1 例では投与 12 日に体温及び血圧の低下、投与 13 日以降に自発運動の低下が、他の 1 例で黒色便（潜血陽性）が認められた。

眼科学的検査及び心電図検査では、KW-3357 に起因した変化は認められなかった。

赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の減少、網状赤血球率の増加が、投与期間中の 1000 IU/kg/日投与群の雄 3 例及び雌 3 例（うち雌 1 例は休薬期間中）、300 IU/kg/日投与群の雌 1 例で認められた。血液凝固系パラメータでは、投与期間中、雌雄とも 300 IU/kg/日投与群で PT が、1000 IU/kg/日投与群で PT 及び APTT が延長した。その他、投与期間中、1000 IU/kg/日投与群では尿検査で pH の低下、Na 及び Cl 排泄量の減少、ケトン体、タンパク質量及び尿沈査の上皮円柱の増加、血液学的検査で血小板数及びリンパ球数の減少、好中球数及びフィブリノーゲンの増加、血液生化学的検査で総タンパク質、アルブミン/グロブリン比及びカルシウムの減少、総ビリルビン、α2-グロブリン分率及び β-グロブリン分率の増加が認められた。1000 IU/kg/日投与群の雄 1 例では、中性脂肪、BUN 及びクレアチニンの増加、コリンエステラーゼ及び総コレステロールの減少も認められた。100 及び 300 IU/kg/日投与群では、尿及び血液生化学的検査で特記すべき変化は認められなかった。

投与終了時点の剖検及び病理組織学的検査で、100 及び 300 IU/kg/日投与群の各雌 1 例及び 1000 IU/kg/日投与群の全例（雌雄 3 例）で、大腿部又は背部（投与、採血等の実験操作時に保定器と接触する部位）の骨格筋、皮下組織で出血が認められた。300 IU/kg/日投与群の雌 1 例では投与部位で赤色巣が認められた。1000 IU/kg/日投与群では、出血部位で線維化、筋組織の壊死、筋線維の再生及び炎症性細胞の浸潤、脾臓で髄外造血の亢進、骨髄で赤芽球造血の亢進が認められた。更に、同群の雄 1 例では、陰嚢で出血及び浮腫、腹腔内臓器の退色、肝臓で小葉構造の明瞭化、炎症性細胞の浸潤及び壊死、リンパ組織でリンパ球数の減少も認められた。

投与期間中に認められた上記の変化は、休薬期間中に回復した。

トキシコキネティクス解析の結果を表 2.6.6.3.5-1に示す。雌雄ともに用量の増加に伴って $AUC_{0\text{-}24}$ が増加した。いずれの用量においても、$AUC_{0\text{-}24}$ に明らかな性差は認められなかった。投与 14 日の C_{24h}、$AUC_{0\text{-}24}$ は、投与 1 日の 2.2 から 3.7 倍であった。投与 7 及び 14 日（投与前）の KW-3357 投与群の AT 活性は用量の増加に伴って高値を示し、休薬 28 日には投与開始前値と同程度になった。100 IU/kg/日投与群の雄 1 例、1000 IU/kg/日投与群の雄 2 例及び雌 1 例で、抗 KW-3357 抗体が検出された。

表2.6.6.3.5-1 カニクイザルを用いた 2 週間反復静脈内投与毒性試験におけるトキシコキネティクスパラメータ

Dose (IU/kg/日)	C_{24h} (IU/mL)[a), b)]				AUC_{0-24} (IU·h/mL)[a), b)]			
	投与 1 日		投与 14 日		投与 1 日		投与 14 日	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
100	0.564±0.053	0.509±0.011	1.62±0.16	1.47±0.18	25.4±2.0	24.6±1.0	61.0±3.1	58.2±8.8
300	1.53±0.20	1.34±0.16	5.39±0.46	4.67±0.53	80.8±18.1	73.6±17.7	189±14	152±8
1000	5.07±0.52	4.80±0.63	18.9±5.4	14.6±3.8	233±29	226±17	611±113	550±75

a) 5 例の平均値±標準偏差

b) ELISA により測定した血漿中 KW-3357 タンパク質濃度に、試験に使用した被験物質の抗トロンビン活性を乗じて算出した換算値

以上のように、1000 IU/kg/日投与群では KW-3357 の抗凝固作用による重度の出血に起因した一般状態の悪化、体重の低下及び貧血が認められた。100 及び 300 IU/kg/日投与群においても貧血又は出血が認められたが、いずれも軽微な変化であり、一般状態及び摂餌量への影響が認められなかったことから、毒性とは捉えなかった。以上の結果から、本試験における KW-3357 の無毒性量は 300 IU/kg/日と考えられた。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

遺伝毒性試験は、本剤が遺伝子組換え技術により製造した組換えタンパク質であり、DNA 及び他の染色体成分に直接相互作用しないと考えられることから、「「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」について（薬食審査発 0323 第 1 号、平成 24 年 3 月 23 日）」に基づき実施しなかった。

2.6.6.5 がん原性試験

本剤の適応症である DIC が急性で致死率の高い疾患であり、臨床での投与期間が最長 5 日間を想定していること、また、CAD においては妊娠や手術時等血栓症発生リスクがある場合に 5 日間程度投与することを想定していること、並びに本剤が遺伝毒性を有している可能性がごく低いことから、「医薬品のがん原性試験に関するガイドラインの改正について（薬食審査発 1127001 号、平成 20 年 11 月 27 日）」に基づき、必要ないと判断したため、実施しなかった。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験（用量設定試験及び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

2.6.6.6.1.1 ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験−雌動物投与試験−（4.2.3.5.1-1）

Crl:CD（SD）雌性ラットに KW-3357 を 0（対照）、200、600 及び 2000 IU/kg（最大投与可能量に相当）の用量で交配前（2 週間）から交配期間（最長 2 週間）を通して妊娠 7 日まで、1 日 1 回反復静脈内投与した（20 例／群）。対照群には媒体（[redacted] mmol/L クエン酸ナトリウム、[redacted] mmol/L 塩化ナトリウム溶液）を投与した。雌性ラットは無処置の雄性ラットと交配させ、妊娠 13 日に帝王切開した。全群で各 5 例のサテライト群を設け、全身曝露、AT 活性及び抗 KW-3357 抗体の産生の有無を評価した。

死亡は認められなかった。一般状態の異常は認められず、体重、摂餌量、卵巣重量、剖検所見に KW-3357 の影響は認められなかった。雌性動物の生殖能（交配前投与期間中の発情回数、性周期の長さ、交尾率、受胎率、交尾までに要した同居日数及び黄体数）、胚・胎児の発生（着床数、着床前死亡率、着床後死亡率及び生存胚数）のいずれも KW-3357 の影響は認められなかった。

トキシコキネティクス解析の結果を表 2.6.6.6.1.1-1に示す。用量の増加に伴って C_{10min}、C_{24h} 及び AUC_{0-24} が増加した。妊娠 7 日の C_{10min} は投与 1 日と同程度であった。妊娠 1 及び 7 日の C_{24h} は、投与 1 日の 1.25 から 1.46 倍であった。投与 1 日及び妊娠 7 日の AT 活性は、KW-3357 投与群で用量の増加に伴って増加し、妊娠 13 日（最終投与後 6 日）には対照群の AT 活性と同程度になった。いずれの KW-3357 投与群においても、妊娠 13 日時点で抗 KW-3357 抗体は検出されなかった。

表2.6.6.6.1.1-1 ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験−雌動物投与試験−におけるトキシコキネティクスパラメータ

Dose	C_{10min} (IU/mL)[a)、b)]		C_{24h} (IU/mL)[a)、b)]			AUC_{0-24} (IU·h/mL)[a)、b)]	
(IU/kg/日)	投与 1 日	妊娠 7 日	投与 1 日	妊娠 1 日	妊娠 7 日	投与 1 日	妊娠 7 日
200	3.18±0.18	3.46±0.25	0.114±0.010	0.164±0.019	0.164±0.025	39.5±2.1	43.5±3.1
600	9.31±0.89	9.99±0.48	0.350±0.058	0.486±0.044	0.455±0.064	116±11	125±6
2000	30.0±2.7	29.8±1.3	1.34±0.07	1.87±0.22	1.67±0.10	376±34	378±15

a) 5 例の平均値±標準偏差

b) ELISA により測定した血漿中 KW-3357 タンパク質濃度に、試験に使用した被験物質の抗トロンビン活性を乗じて算出した換算値

以上より、2000 IU/kg/日投与群において雌性動物の一般毒性、雌性動物の生殖能及び胚・胎児の発生に KW-3357 の影響は認められなかった。したがって、本試験における KW-3357 の無毒性量はいずれも 2000 IU/kg/日であると考えられた。

2.6.6.6.1.2 ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験−雄動物投与試験−（4.2.3.5.1-2）

Crl:CD（SD）雄性ラットに KW-3357 を 0（対照）、500 及び 2000 IU/kg（最大投与可能量に相当）の用量で交配前（15 日間）から交配期間中（最長 13 日間）、1 日 1 回反復静脈内投与した（20 例／群）。雄性ラットを無処置の雌性ラットと交配させ、交配 4 日（投与 19 日）までに交配が認められた雄性ラットはその翌日に、それ以外の雄性ラットは交配期間終了（投与 28 日）翌日に剖検した。雌性ラットは妊娠 13 日に帝王切開した。対照群には媒体（[redacted] mmol/L クエン酸ナトリウム、[redacted] mmol/L 塩化ナトリウム溶液）を投与した。交配 4 日までに交尾の認められた動物のうち、各群 4 例について、全身曝露、AT 活性及び抗 KW-3357 抗体の産生の有無を評価した。

死亡は認められなかった。一般状態の異常は認められず、体重、摂餌量、精巣及び精巣上体重量に KW-3357 の影響は認められなかった。剖検で所見は認められなかった。雄性生殖能（交尾率、授胎率及び交尾までに要した同居日数）、胚・胎児の発生（着床数、着床前死亡率、着床後死亡率及び生存胚数）のいずれも KW-3357 の影響は認められなかった。

トキシコキネティクス解析の結果を表 2.6.6.6.1.2-1に示す。用量の増加に伴って交配 4 日の C_{24h} は増加した。また、同時点の AT 活性は、KW-3357 投与群で対照群と比較して高値であり、

用量の増加に伴って増加した。いずれの KW-3357 投与群においても、交配 4 日時点で抗 KW-3357 抗体は検出されなかった。

表2.6.6.6.1.2-1 ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験−雄動物投与試験−におけるトキシコキネティクスパラメータ

Dose (IU/kg/日)	交配 4 日の C_{24h} (IU/mL)[a)、b)]
500	0.518±0.058
2000	2.83±0.42

a) 4 例の平均値±標準偏差

b) ELISA により測定した血漿中 KW-3357 タンパク質濃度に、試験に使用した被験物質の抗トロンビン活性を乗じて算出した換算値

以上より、2000 IU/kg/日投与群において雄性動物の一般毒性、雄性動物の生殖能及び胚・胎児の発生に KW-3357 の影響は認められなかった。したがって、本試験における KW-3357 の無毒性量はいずれも 2000 IU/kg/日であると考えられた。

2.6.6.6.2 胚・胎児発生に関する試験

2.6.6.6.2.1 ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験（4.2.3.5.2-1）

各群 20 例の Crl:CD（SD）妊娠ラットに KW-3357 を 0（対照）、200、600 及び 2000 IU/kg（最大投与可能量に相当）の用量で妊娠 7 から 17 日の間、1 日 1 回反復静脈内投与し、妊娠 20 日に帝王切開した。対照群には媒体（[redacted] mmol/L クエン酸ナトリウム、[redacted] mmol/L 塩化ナトリウム溶液）を投与した。全群で各 5 例のサテライト群を設け、全身曝露、AT 活性及び抗 KW-3357 抗体の産生の有無を評価した。

死亡は認められなかった。一般状態に異常は認められず、体重、摂餌量、卵巣重量、剖検所見に KW-3357 の影響は認められなかった。胚・胎児の発生（生存胎児数及び着床後死亡率、性比、生存胎児体重、胎盤重量、胎盤所見）に KW-3357 の影響は認められなかった。対照群と 2000 IU/kg/日投与群で、骨化進行度に差は認められなかった。外表異常、内臓異常、骨格異常及び骨格変異の発現頻度の増加は認められず、本剤に催奇性はないと判断した。

トキシコキネティクス解析の結果を表 2.6.6.6.2.1-1に示す。用量の増加に伴って、C_{10min}、C_{24h} 及び AUC_{0-24} が増加した。妊娠 17 日の C_{10min} 及び C_{24h} は妊娠 7 日と比較して低値であった。妊娠 7 及び 17 日の AT 活性は、KW-3357 投与群で用量の増加に伴って高値を示したが、妊娠 20 日（最終投与後 3 日）には対照群の AT 活性と同程度まで回復した。妊娠 17 日の AT 活性は妊娠 7 日よりも低かった。いずれの KW-3357 投与群においても、妊娠 20 日時点で抗 KW-3357 抗体は検出されなかった。

表2.6.6.6.2.1-1 ラットを用いた胚･胎児発生に関する試験におけるトキシコキネティクスパラメータ

Dose (IU/kg/日)	C_{10min} (IU/mL)[a)、b)]		C_{24h} (IU/mL)[a)、b)]		AUC_{0-24} (IU·h/mL)[a)、b)]	
	妊娠 7 日	妊娠 17 日	妊娠 7 日	妊娠 17 日	妊娠 7 日	妊娠 17 日
200	4.15±0.35	2.27±0.19	0.163±0.040	0.0794±0.0095	51.7±4.1	28.2±2.4
600	12.4±1.0	7.21±0.43	0.447±0.061	0.179±0.024	155±12	88.6±5.3
2000	37.3±1.7	25.5±3.3	1.85±0.28	0.828±0.101	469±22	316±41

a) 5 例の平均値±標準偏差

b) ELISA により測定した血漿中 KW-3357 タンパク質濃度に、試験に使用した被験物質の抗トロンビン活性を乗じて算出した換算値

以上より、2000 IU/kg/日投与群において母動物への一般毒性、母動物の生殖能及び胚・胎児の発生に KW-3357 の影響は認められなかった。したがって、本試験における KW-3357 の無毒性量はいずれも 2000 IU/kg/日であると考えられた。

2.6.6.6.2.2 ウサギを用いた胚・胎児発生に関する予備試験（参考 4.2.3.5.2-2、参考 4.2.3.5.2-3）

KW-3357 を 0（対照）、100 及び 1000 IU/kg の用量で、各群 6、6 及び 4 例の妊娠 Kbs:NZW ウサギに妊娠 6 から 18 日の間、1 日 1 回反復静脈内投与し、妊娠 29 日に帝王切開した。対照群には媒体（[redacted] mmol/L クエン酸ナトリウム、[redacted] mmol/L 塩化ナトリウム溶液）を投与した。全妊娠動物について、全身曝露、AT 活性及び抗 KW-3357 抗体の産生の有無を評価した。

死亡は認められなかった。1000 IU/kg/日投与群で腟からの出血及び子宮内の血液貯留が認められ、同群の 1 例が妊娠 24 日に流産した。また、1000 IU/kg/日投与群では、着床後死亡率の増加及び生存胎児数の減少が認められた。100 IU/kg/日投与群の 1 例が妊娠 28 日に流産したが、当該動物では妊娠 18 日以降摂餌の廃絶が認められていることから、流産は KW-3357 の影響ではなく栄養状態の悪化に起因した変化であると判断した。

トキシコキネティクス解析の結果を表 2.6.6.6.2.2-1に示す。妊娠 6 日と比較して妊娠 18 日では C_{24h} 及び AUC_{0-24} が増加した。1000 IU/kg/日投与群の AT 活性は、妊娠 21 日まで 100 IU/kg/日投与群と比較して高値を示した。AT 活性は妊娠 6 日よりも妊娠 18 日において高値であった。100 IU/kg/日投与群において、妊娠 28 日（流産時）又は 29 日時点に各 1 例で抗 KW-3357 抗体が検出された。

表2.6.6.6.2.2-1 ウサギを用いた胚・胎児発生に関する予備試験におけるトキシコキネティクスパラメータ

Dose (IU/kg/日)	C_{24h} (IU/mL)[a), b)]		AUC_{0-24} (IU·h/mL)[a), b)]	
	妊娠 6 日	妊娠 18 日	妊娠 6 日	妊娠 18 日
100	0.514±0.0526	1.02±0.501	28.3±3.12	39.7±22.3
1000	5.56±0.283	12.0±2.52	254±21.2	451±58.1

a) 100 IU/kg/日投与群は 6 例、1000 IU/kg/日投与群は 4 例の平均値±標準偏差

b) ELISA により測定した血漿中 KW-3357 タンパク質濃度に、試験に使用した被験物質の抗トロンビン活性を乗じて算出した換算値

以上の結果から、1000 IU/kg/日投与群では子宮内の血液貯留、腟からの出血及び流産が認められ、更に着床後死亡率の増加及び生存胎児数の減少が認められたことから、本剤の催奇性作用を評価するには高すぎる用量であると判断した。

2.6.6.6.2.3 ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験（4.2.3.5.2-4）

KW-3357 を 0（対照）、50、150 及び 500 IU/kg の用量で、各群 19、18、20 及び 19 例の妊娠 Kbs:NZW ウサギに妊娠 6 から 18 日の間、1 日 1 回反復静脈内投与し、妊娠 29 日に帝王切開した。対照群には媒体（[redacted] mmol/L クエン酸ナトリウム、[redacted] mmol/L 塩化ナトリウム溶液）を投与した。0、50 及び 150 IU/kg/日投与群では各 5 例、500 IU/kg/日投与群では 4 例の動物について、全身曝露、AT 活性及び抗 KW-3357 抗体の産生の有無を評価した。

被験物質に起因した死亡は認められなかった。150 IU/kg/日投与群の 1 例が妊娠 16 日に死亡した。当該動物は、妊娠 12 日から体重減少を認め、妊娠 15 日に摂餌が廃絶、妊娠 16 日の投与終了直後に横臥位、呼吸緩徐となって投与後 1 時間に死亡した。死亡動物は当該動物のみであ

ること、Kbl:NZW ウサギの妊娠期間中の死亡の自然発生率が [redacted]%（[redacted]）であり、その他の動物では同様な異常は認められていないことから、被験物質投与に起因した死亡発現ではないと判断した。

体重、摂餌量及び卵巣重量に KW-3357 の影響は認められなかった。500 IU/kg/日投与群の 1 例で膣からの出血、8 例で剖検時に子宮内の血液貯留が認められたが、生存胎児数及び着床後死亡率に KW-3357 の影響は認められなかった。500 IU/kg/日投与群では、胎児体重の低値及び一部の手指骨（中手骨及び前肢中節骨）に骨化遅延が認められた。外表異常、内臓異常、骨格異常及び骨格変異の発現頻度の増加は認められず、本剤に催奇性はないと判断した。500 IU/kg/日投与群で複合奇形を有する胎児が認められたが、1 胎児のみの変化であり、KW-3357 の影響ではないと判断した。500 IU/kg/日投与群では、胎盤の一部灰白色化（絨毛膜側の胎盤葉の壊死）の発現頻度が増加したが、本変化の有無は胎児体重に影響を及ぼさなかった。

トキシコキネティクス解析の結果を表 2.6.6.6.2.3-1に示す。投与終了直前の血漿中濃度（C_{30min}、投与開始後 28.5 から 30 分の間に採血）、C_{24h} 及び AUC_{0-24} は用量の増加に伴って増加した。C_{30min} はすべての KW-3357 投与群で、妊娠 6 日と妊娠 18 日で同程度であった。50 及び 150 IU/kg/日投与群では妊娠 18 日の C_{24h} は妊娠 6 日よりも低値を示したが、500 IU/kg/日投与群では高値（1.3 から 1.4 倍）であった。妊娠 6 及び 18 日の AT 活性は、KW-3357 投与群で用量の増加に伴って高値を示したが、妊娠 29 日（最終投与後 11 日）には対照群の AT 活性と同程度となった。妊娠 29 日時点で、50、150 及び 500 IU/kg/日投与群の各 4/5、5/5 及び 3/4 例で抗 KW-3357 抗体が検出され、これらの動物での血漿中 KW-3357 濃度は、妊娠 6 日と比較して妊娠 18 日で速やかに減少した。

表2.6.6.6.2.3-1　ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験におけるトキシコキネティクスパラメータ

Dose (IU/kg/日)	C_{30min} (IU/mL)[a), b)]		C_{24h} (IU/mL)[a), b)]		AUC_{0-24} (IU·h/mL)[a), b)]	
	妊娠 6 日	妊娠 18 日	妊娠 6 日	妊娠 18 日	妊娠 6 日	妊娠 18 日
50	0.881±0.107	0.705±0.195	0.191±0.013	0.0856±0.1614	10.4±0.8	7.77±4.07
150	2.75±0.23	2.65±0.51	0.637±0.071	0.375±0.288	31.9±2.4	30.9±8.6
500	9.28±0.84	10.5±1.1	2.81±0.75	3.92±1.33	121±10	158±31

a) 50 及び 150 IU/kg/日投与群は 5 例、500 IU/kg/日投与群は 4 例の平均値±標準偏差

b) ELISA により測定した血漿中 KW-3357 タンパク質濃度に、試験に使用した被験物質の抗トロンビン活性を乗じて算出した換算値

以上のように、KW-3357 は母動物に一般毒性学的な影響を及ぼさなかったが、母動物の生殖に及ぼす影響として、500 IU/kg/日投与群で膣からの出血、子宮内の血液貯留、胎盤変異の発現頻度の増加、胚・胎児の発生に及ぼす影響として、500 IU/kg/日投与群で胎児体重の低値、骨化遅延が認められた。したがって、本試験における KW-3357 の母動物への一般毒性学的影響に関する無毒性量は 500 IU/kg/日、母動物の生殖及び胚・胎児の発生に関する無毒性量は 150 IU/kg/日であると考えられた。

2.6.6.6.3 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

2.6.6.6.3.1 ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する予備試験（参考 4.2.3.5.3-1、参考 4.2.3.5.3-2）

各群 6 例の Crl:CD（SD）妊娠ラットに KW-3357 を 0（対照）、600 及び 2000 IU/kg（最大投与可能量に相当）の用量で妊娠 7 日から分娩後 7 日（授乳 7 日）までの間、1 日 1 回反復静脈内投与し、最終投与翌日に母児動物を剖検した。対照群には媒体（[redacted] mmol/L クエン酸ナトリウム、[redacted]mmol/L 塩化ナトリウム溶液）を投与した。600 及び 2000 IU/kg/日投与群では、各群 3 例のサテライト群を設け、全身曝露、AT 活性及び抗 KW-3357 抗体の産生の有無を評価した。

母動物の死亡は認められなかった。2000 IU/kg/日投与群では、対照群と比較して体重増加量及び摂餌量の軽度な減少が認められたが、分娩状態、出産率、妊娠期間及び哺育状況、出生児数、出生児の性比及び体重に KW-3357 の影響は認められなかった。出生児の 4 日生存率及び腹児数調整後の 8 日生存率はすべての KW-3357 投与群で 100%であり、外表異常及び剖検で異常所見は認められなかった。

トキシコキネティクス解析の結果を表 2.6.6.6.3.1-1に示す。妊娠 7 日（初回投与日）と授乳 7 日（最終投与日）の $AUC_{0\text{-}24}$ は同程度若しくは授乳 7 日の方がわずかに低い値であった。最終投与後 24 時間の血漿中 AT 活性は 600 IU/kg/日投与群で 136.3%、2000 IU/kg/日投与群で 202.0%（各群 3 例の平均値）であった。試験期間中、いずれの KW-3357 投与群においても、抗 KW-3357 抗体は検出されなかった。

表2.6.6.6.3.1-1 ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する予備試験におけるトキシコキネティクスパラメータ

Dose (IU/kg/日)	C_{24h} (IU/mL)[a), b)]		$AUC_{0\text{-}24}$ (IU·h/mL)[a), b)]	
	妊娠 7 日	授乳 7 日	妊娠 7 日	授乳 7 日
600	0.261±0.0304	0.239±0.0119	119±4.04	115±8.19
2000	1.23±0.0208	0.951±0.0710	466±28.7	375±9.07

a) 3 例の平均値±標準偏差

b) ELISA により測定した血漿中 KW-3357 タンパク質濃度に、試験に使用した被験物質の抗トロンビン活性を乗じて算出した換算値

以上の結果から、本試験は最高用量を 2000 IU/kg/日で実施することとした。

2.6.6.6.3.2 ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（4.2.3.5.3-3）

各群 20 例の Crl:CD（SD）妊娠ラットに KW-3357 を 0（対照）、200、600 及び 2000 IU/kg（最大投与可能量に相当）の用量で妊娠 7 日から分娩後 21 日までの間、1 日 1 回反復静脈内投与し、その翌日に剖検した。出生児の一部は成熟させ、生殖能も評価した。対照群には媒体（[redacted] mmol/L クエン酸ナトリウム、[redacted]mmol/L 塩化ナトリウム溶液）を投与した。全群で各 5 例のサテライト群を設け、全身曝露、AT 活性及び抗 KW-3357 抗体の産生の有無を評価した。

母動物の死亡及び一般状態の異常は認められなかった。体重及び摂餌量に KW-3357 の影響は認められず、特記すべき剖検所見は認められなかった。母動物の生殖能（分娩状態、出産率、妊娠期間、及び哺育状況）、胚・胎児の発生（出生児数、性比、4 日生存率、離乳率、一般状態、体重、発育分化、機能、学習能力、情動性、生殖能（F_2 世代の発生含む））のいずれも KW-3357 の影響は認められなかった。なお、200 IU/kg/日投与群の 1 例で、母動物が出生児の世話をしな

かったため、分娩後 3 日に全児死亡したが、当該動物 1 例のみの変化であり、また用量依存性が認められなかったことから、本変化は被験物質の影響ではないと判断した。

トキシコキネティクス解析の結果を表 2.6.6.6.3.2-1に示す。用量の増加に伴って C_{10min}、C_{24h} 及び AUC_{0-24} が増加した。妊娠 7 日、分娩後 4 及び 21 日の C_{24h} は同程度であった。母動物の分娩後 35 日及び出生後 4 日の出生児の血漿中濃度は、全動物で定量下限（[redacted]mIU/mL）未満であった。妊娠 7 日及び分娩後 21 日の AT 活性は、KW-3357 投与群で用量の増加に伴って高値を示したが、分娩後 35 日（最終投与後 14 日）には対照群の AT 活性と同程度になった。いずれの KW-3357 投与群においても、分娩後 35 日時点で抗 KW-3357 抗体の産生は認められなかった。

表2.6.6.6.3.2-1 ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験におけるトキシコキネティクスパラメータ

Dose (IU/kg/日)	C_{10min} (IU/mL)[a), b)]		C_{24h} (IU/mL)[a), b)]			AUC_{0-24} (IU·h/mL)[a), b)]	
	妊娠 7 日	分娩後 21 日	妊娠 7 日	分娩後 4 日	分娩後 21 日	妊娠 7 日	分娩後 21 日
200	4.16±0.88	3.35±0.30	0.136±0.016	0.123±0.010	0.143±0.017	51.5±10.6	41.9±3.6
600	11.3±1.7	9.62±0.59	0.403±0.058	0.359±0.031	0.410±0.060	141±21	120±6
2000	35.7±1.0	32.0±3.2	1.45±0.27	1.41±0.13	1.52±0.18	446±14	402±40

a) 5 例の平均値±標準偏差

b) ELISA により測定した血漿中 KW-3357 タンパク質濃度に、試験に使用した被験物質の抗トロンビン活性を乗じて算出した換算値

以上より、2000 IU/kg/日投与群において母動物への一般毒性、生殖能及び次世代の発生に KW-3357 の影響は認められなかった。したがって、本試験における KW-3357 の無毒性量はいずれも 2000 IU/kg/日であると考えられた。

2.6.6.7 局所刺激性試験

2.6.6.7.1 KW-3357 製剤のウサギにおける静脈内及び静脈周囲投与による局所刺激性試験（4.2.3.6-1）

雄性 Kbl:JW ウサギに、生理食塩液（陰性対照）又は KW-3357 製剤を耳介静脈内又は静脈周囲の皮下に単回投与した。投与量は、静脈内投与の場合は 3 mL/部位、静脈周囲の皮下投与は 0.3 mL/部位とした。KW-3357 製剤のタンパク質濃度は[redacted] mg/mL であった。投与 2 日後及び投与 14 日後に解剖を行い、投与部位の肉眼的観察及び病理組織学的検査を実施した。

その結果、静脈内投与では、投与 2 日後及び投与 14 日後のいずれにおいても、肉眼的観察で所見は認められなかった。静脈周囲皮下投与では投与 2 日後に、病理組織学的検査で皮下組織に出血及び炎症性細胞の浸潤が認められたが、KW-3357 製剤投与群と生理食塩液投与群で同程度の頻度、重篤度であった。以上のことから、いずれの投与経路においても、KW-3357 投与に起因した毒性学的に意義のある変化は認められず、血管刺激性、血管周囲刺激性の可能性はないと考えられた。

2.6.6.8 その他の毒性試験

原薬又は製剤に含まれる不純物の安全性を、商業生産設備で製造された原薬を用いたラット反復投与毒性試験の中で評価した（2.6.6.3.3）。ラットに投与された 2000 IU/kg 中に含有される

不純物量の算出は、KW-3357 の規格試験法を用いた。その結果、無毒性量で投与された不純物量は、不純物 A*が [redacted] mg/kg/日、不純物 B*が [redacted] mg/kg/日、不純物 C*が [redacted] mg/kg/日、不純物 D*が [redacted] μg/kg/日であった。

2.6.6.9 考察及び結論

2.6.6.9.1 出血の種差について

KW-3357 の毒性プロファイルを検討するために、ラット及びカニクイザルを用いた反復投与毒性試験、ラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験を実施した。この結果、カニクイザル及び妊娠ウサギを用いた試験では、特徴的な毒性として、本剤の薬理作用に起因した出血が認められた。一方、ラットを用いた試験では、一般毒性試験、生殖発生毒性試験のいずれにおいても AT 活性の上昇は認められたが、出血等の毒性は認められず、KW-3357 による出血の発現には種差が認められた。

ラット及びカニクイザルを用いた反復投与毒性試験において、カニクイザルを用いた試験では、投与部位や採血部位、保定具と接触する部位で出血が認められた。カニクイザルは、ラットよりも、最終投与後の C_{24h} 及び $AUC_{0\text{-}24}$ が高値であり、AT 活性の高値、PT 及び APTT の延長も認められたことから、カニクイザルではラットに比べ、KW-3357 の薬理作用である血液凝固抑制作用の持続により、投与部位や採血部位、保定具と接触する部位で出血が認められたものと考えられた。

ラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験（胚・胎児発生に関する試験）において、ウサギを用いた試験では、膣からの出血及び子宮内の血液貯留が認められた。ウサギは、ラットよりも、最終投与後の C_{24h}、$AUC_{0\text{-}24}$ 及び最終投与後 24 時間の AT 活性が高値であったことから、KW-3357 の薬理作用である血液凝固抑制作用の持続により、膣及び子宮内の出血につながったものと考えられた。

2.6.6.9.2 生殖に及ぼす影響

雌性 Kbs:NZW ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験では、500 IU/kg/日以上の投与群で胎盤からの出血に起因すると考えられる膣からの出血、子宮内の血液貯留が認められ、1000 IU/kg/日投与群では 1 例が流産した。また、500 IU/kg/日投与群で胎盤の灰白色化（病理組織学的に絨毛膜側の胎盤葉の壊死であることを確認）、子宮内の血液貯留に起因すると考えられる胎児の発育遅延（胎児体重の低値及び一部の手指骨（中手骨及び前肢中節骨）に骨化遅延）が、1000 IU/kg/日投与群で着床後死亡率の増加及び生存胎児数の減少が認められた。150 IU/kg 以下の用量ではこれらの変化は認められなかった。

Crl:CD（SD）ラットに KW-3357 を最高 2000 IU/kg の用量で投与し、受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、胚・胎児発生に関する試験及び出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験を実施した。その結果、いずれの試験においても、KW-3357 投与群では投与期間中の AT 活性は対照群と比べ高値を示したが、親動物に対する KW-3357 の一般毒性的影響は認められなかった。また、生殖能及び胚・胎児の発生に対する KW-3357 の影響も認められなかった。

2.6.6.9.3 抗薬物抗体の産生による KW-3357 の曝露及び内因性 AT 活性への影響

ラット、カニクイザル、ウサギを用いた KW-3357 の毒性試験における抗 KW-3357 抗体産生の種差について解析した。また、産生した抗 KW-3357 抗体が KW-3357 の動態及び内因性 AT 活性に及ぼす影響についても評価した。

ラットでは、反復投与毒性試験の 2000 IU/kg/日投与群の雌 1 例で抗 KW-3357 抗体が検出された（抗 KW-3357 抗体が検出された動物数 / 全検査動物数、陽性率：1/83 例、1.2%）。カニクイザルでは、100 IU/kg/日投与群の雄 1/5 例、180 IU/kg/日投与群の雄 1/2 例、1000 IU/kg/日投与群の雄 2/5 例及び雌 1/5 例で抗 KW-3357 抗体が検出された（5/34 例、14.7%）。ウサギでは、50、100、150 及び 500 IU/kg/日投与群の各雌 4/5、2/6、5/5 及び 3/4 例で抗 KW-3357 抗体が検出された（14/24 例、58.3%）。抗 KW-3357 抗体の陽性率は、ウサギで高かった。

ラット及びウサギでは、抗 KW-3357 抗体陽性の動物で血漿中 KW-3357 の消失が速かった。この結果から、ラット及びウサギで検出された抗 KW-3357 抗体は KW-3357 の動態に影響を及ぼす可能性が考えられた。カニクイザルでは、評価可能な例数は少ないものの、抗 KW-3357 抗体陽性の動物の最終投与後の血漿中濃度推移は抗 KW-3357 抗体陰性動物と同程度であったことから、これらのサルで検出された抗 KW-3357 抗体は動態に影響を及ぼさなかった可能性が考えられた。

ラット、カニクイザル及びウサギのいずれの動物種においても、抗 KW-3357 抗体の検出時点（ラット：休薬 14 日、カニクイザル：主に休薬 28 日以降、ウサギ：投与終了後 10 又は 11 日）の AT 活性は、投与前値又は対照群と同程度であった。以上のことから、ラット、カニクイザル及びウサギで検出された抗 KW-3357 抗体は、動物の内因性 AT 活性には影響を及ぼさないと考えられた。

2.6.6.9.4 局所刺激性について

ラット、カニクイザルを用いた反復投与毒性試験において、KW-3357 の反復投与後の投与部位（ラット：尾静脈、カニクイザル：前腕橈側皮静脈）の病理組織学的検査の結果、いずれの動物種においても血管周囲への出血、炎症性細胞の浸潤及び線維化が認められたが、KW-3357 投与群と対照群で同程度の頻度、重篤度であった。

ウサギを用いた局所刺激性試験において、KW-3357 製剤の単回投与後の投与部位を病理組織学的検査した結果、静脈内投与では刺激性を示唆する病理所見は認められなかった。静脈周囲皮下投与では皮下組織にごく軽度から軽度の出血及び軽度の炎症性細胞の浸潤が認められたが、KW-3357 製剤投与群と生理食塩液投与群で同程度の頻度であった。

以上の結果から、KW-3357 原薬、製剤ともに局所刺激性はないと考えられた。

KW-3357

第 2 部（モジュール 2）：
CTD の概要（サマリー）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.7　毒性試験概要表

協和発酵キリン株式会社

CONFIDENTIAL

目次

目次 2
2.6.7 毒性試験概要表 3
2.6.7.1 毒性試験：一覧表 3
2.6.7.2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス 試験の一覧表 4
2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス 試験成績の一覧 5
2.6.7.4 毒性試験：使用ロット 6
2.6.7.5 反復投与毒性試験 –重要な試験以外の試験 8
2.6.7.6 反復投与毒性試験 9
2.6.7.6.1 ラットを用いた 2 週間反復静脈内投与毒性試験及び 2 週間回復性試験 9
2.6.7.6.2 ラットを用いた 2 週間反復静脈内投与毒性試験及び 2 週間回復性試験 (追加試験) 11
2.6.7.6.3 カニクイザルを用いた 2 週間反復静脈内投与毒性試験及び 6 週間回復性試験 13
2.6.7.7 遺伝毒性試験 22
2.6.7.8 がん原性試験 22
2.6.7.9 生殖発生毒性試験 –重要な試験以外の試験 23
2.6.7.9.1 生殖発生毒性試験 –ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 –雌動物投与試験– 24
2.6.7.9.2 生殖発生毒性試験 –ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 –雄動物投与試験– 27
2.6.7.9.3 生殖発生毒性試験 –ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験 30
2.6.7.9.4 生殖発生毒性試験 –ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験 34
2.6.7.9.5 生殖発生毒性試験 –ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 38
2.6.7.10 その他の試験 45
2.6.7.10.1 局所刺激性試験 45

2.6.7 毒性試験概要表

2.6.7.1 毒性試験：一覧表

被験物質：KW-3357

試験の種類		動物種/系統	投与方法	投与期間	投与量 (IU/kg)[a]	GLP適用	実施施設	試験番号	CTDにおける記載箇所
反復投与毒性試験		ラット/Crl:CD(SD)、雌性	静脈内	2週間	0, 1800	非適用	協和発酵工業	d-[redacted]-311	参考 4.2.3.2-1
		ラット/Crl:CD(SD)、雌雄	静脈内	2週間	0, 500, 2000	適用	[redacted]	[redacted]08	4.2.3.2-2
		ラット/Crl:CD(SD)、雌雄	静脈内	2週間	0, 2000	適用	[redacted]	[redacted]32	4.2.3.2-3
		カニクイザル、雄性	静脈内	1又は2週間	180, 1800	非適用	協和発酵工業	d-[redacted]-224	参考 4.2.3.2-4
		カニクイザル、雌雄	静脈内	2週間	0, 100, 300, 1000	適用	[redacted]	[redacted]07	4.2.3.2-6
生殖発生毒性試験	受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験	ラット/Crl:CD(SD)、雌性	静脈内	23～33日間	0, 200, 600, 2000	適用	[redacted]	[redacted]29	4.2.3.5.1-1
		ラット/Crl:CD(SD)、雄性	静脈内	19又は28日間	0, 500, 2000	適用	[redacted]	[redacted]02	4.2.3.5.1-2
	胚・胎児発生に関する試験	ラット/Crl:CD(SD)	静脈内	妊娠7から17日	0, 200, 600, 2000	適用	[redacted]	[redacted]27	4.2.3.5.2-1
		ウサギ/Kbs:NZW	静脈内	妊娠6から18日	0, 100, 1000	非適用	[redacted]	[redacted]97	参考 4.2.3.5.2-2
		ウサギ/Kbs:NZW	静脈内	妊娠6から18日	0, 50, 150, 500	適用	[redacted]	[redacted]28	4.2.3.5.2-4
	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	ラット/Crl:CD(SD)	静脈内	22～23日間	0, 600, 2000	非適用	[redacted]	[redacted]96	参考 4.2.3.5.3-1
		ラット/Crl:CD(SD)	静脈内	36～37日間	0, 200, 600, 2000	適用	[redacted]	[redacted]24	4.2.3.5.3-3
局所刺激性試験		ウサギ/Kbl:JW、雄性	静脈内 皮下	単回	3 mL / site[b] 0.3 mL / site[b]	適用	[redacted]	[redacted]32	4.2.3.6-1

協和発酵工業（現 協和発酵キリン）、[redacted]（現 [redacted]） a)下線は反復投与毒性試験（GLP適応試験）の無毒性量 b) KW-3357製剤 (KW-3357タンパク質濃度として[redacted]mg/mL) 又は生理食塩液を投与

2.6.7.2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス 試験の一覧表

被験物質：KW-3357

試験の種類		動物種 /系統	投与方法	投与量 (IU/kg)	GLP 適用	試験番号	CTD における記載箇所
反復投与毒性試験		ラット/Crl:CD(SD)	静脈内	0, 500, 2000	適用	[redacted]08	4.2.3.2-2
		ラット/Crl:CD(SD)	静脈内	0, 2000	適用	[redacted]32	4.2.3.2-3
		カニクイザル	静脈内	180, 1800	非適用	d-[redacted]-235 (d-[redacted]-224)	参考 4.2.3.2-5 (参考 4.2.3.2-4)
		カニクイザル	静脈内	0, 100, 300, 1000	適用	[redacted]07	4.2.3.2-6
生殖発生毒性試験	受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験	ラット/Crl:CD(SD) 雌性	静脈内	0, 200, 600, 2000	適用	[redacted]29	4.2.3.5.1-1
		ラット/Crl:CD(SD) 雄性	静脈内	0, 500, 2000	適用	[redacted]02	4.2.3.5.1-2
	胚・胎児発生に関する試験	ラット/Crl:CD(SD)	静脈内	0, 200, 600, 2000	適用	[redacted]27	4.2.3.5.2-1
		ウサギ/Kbs:NZW	静脈内	0, 100, 1000	非適用	d-[redacted]-363 ([redacted]97)	参考 4.2.3.5.2-3 (参考 4.2.3.5.2-2)
		ウサギ/Kbs:NZW	静脈内	0, 50, 150, 500	適用	[redacted]28	4.2.3.5.2-4
	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	ラット/Crl:CD(SD)	静脈内	0, 600, 2000	非適用	d-[redacted]-358 ([redacted]96)	参考 4.2.3.5.3-2 (参考 4.2.3.5.3-1)
		ラット/Crl:CD(SD)	静脈内	0, 200, 600, 2000	適用	[redacted]24	4.2.3.5.3-3

2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス 試験成績の一覧

被験物質：KW-3357

投与量 (IU/kg/日)	反復投与後の AUC_{0-24} (IU·h/mL)							
	ラット [a)]		サル [a)]		妊娠ラット [a)]	妊娠ウサギ [a)]	ヒト	投与期間/試験番号
	雄	雌	雄	雌				
180			96.6					2 週間 / d[redacted]−224、d[redacted]−235
1800			873					1 週間 / d[redacted]−224、d[redacted]−235
500	82.5	64.1						2 週間 / [redacted]08
2000	329	274						
2000	299	326						2 週間 / [redacted]32
100			61.0	58.2				2 週間 / [redacted]07
300			189	152				
1000			611	550				
200					43.5			23～33 日間 / [redacted]29
600					125			
2000					378			
200					28.2			妊娠 7 から 17 日/ [redacted]27
600					88.6			
2000					316			
200					41.9			36～37 日間 / [redacted]24
600					120			
2000					402			
100						39.7		妊娠 6 から 18 日/ [redacted]97、d-[redacted]-363
1000						451		
50						7.77		妊娠 6 から 18 日/ [redacted]28
150						30.9		
500						158		
72							42.78	3 日間 / 臨床薬理学的解析報告書 [b)]

a) ELISA により測定した血漿中 KW-3357 タンパク質濃度に、試験に使用した被験物質の抗トロンビン活性を乗じて算出した換算値

b) 1 日 1 回 3 日間投与時のデータから算出した 1 日 1 回 5 日間投与した時の AUC_{0-24} のシミュレーション値

2.6.7.4 毒性試験：使用ロット

被験物質：KW-3357	規格設定された不純物：[redacted] a)、[redacted] b)、[redacted] c)、[redacted]

バッチ番号	純度			規格設定された不純物				試験番号	試験の種類
分析法：	[redacted] (%)	[redacted] (%)	[redacted] (%)	[redacted] (%)	[redacted] (%)	[redacted] (%)	[redacted] (ng/mg)		
[redacted]	[redacted]	[redacted]	NA	NA	NA	NA	NA	d[redacted]−311	ラット 2 週間反復投与毒性試験 (予備試験)
								d[redacted]−224	カニクイザル 1 又は 2 週間反復投与毒性試験 (予備試験)
								[redacted]96	ラット出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する予備試験
[redacted]	[redacted]	[redacted]	NA	NA	NA	NA	NA	[redacted]08	ラット 2 週間反復投与毒性試験
								[redacted]07	カニクイザル 2 週間反復投与毒性試験

NA : 適応外

a) [redacted] を評価

b) [redacted] ([redacted] に対して、[redacted] に [redacted] な [redacted] を持つ [redacted]) を評価

c) [redacted] ([redacted] に [redacted] する [redacted] の [redacted] の一つ、主成分に対して [redacted] を [redacted] している) を評価

2.6.7.4 毒性試験：使用ロット（続き）

被験物質：KW-3357	規格設定された不純物：[redacted] a)、[redacted] b)、[redacted] c)、[redacted]

ロット番号	純度			規格設定された不純物				試験番号	試験の種類
分析法：	[redacted] (%)	[redacted] (%)	[redacted] (%)	[redacted] (%)	[redacted] (%)	[redacted] (%)	[redacted] (ng/mg)		
[redacted]	[redacted]	[redacted]	NA	NA	NA	NA	NA	[redacted]29	ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 (雌動物投与試験)
								[redacted]27	ラット胚・胎児発生に関する試験
								[redacted]97	ウサギ胚・胎児発生に関する予備試験
[redacted]	[redacted]	[redacted]	NA	NA	NA	NA	NA	[redacted]28	ウサギ胚・胎児発生に関する試験
								[redacted]24	ラット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
[redacted]	[redacted]	[redacted]	NA	NA	NA	NA	NA	[redacted]02	ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 (雄動物投与試験)
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted] a)	[redacted] b)	[redacted] c)	[redacted]	[redacted]32	ラット 2 週間反復投与毒性試験 (追加試験)
[redacted]	[redacted]	[redacted]	NA	NA	NA	NA	NA	[redacted]32	ウサギ局所刺激性試験

NA : 適応外

a) [redacted] を評価

b) [redacted] ([redacted] に対して、[redacted] に [redacted] な [redacted] を持つ [redacted]) を評価

c) [redacted] ([redacted] に [redacted] する [redacted] の [redacted] の一つ、主成分に対して [redacted] を [redacted] している) を評価

2.6.7.5 反復投与毒性試験 –重要な試験以外の試験

被験物質：KW-3357							
動物種/系統	投与方法 (溶媒/投与形態)	投与期間	投与量 (IU/kg/日)	性別及び一群の動物数	特記すべき所見	試験番号	CTD における記載箇所
ラット/ Crl:CD(SD)	静脈内投与 ([redacted] mmol/L sodium citrate and [redacted] mmol/L sodium chloride solution /溶液)	2 週間	0, 1800	雌性, 各群 5 例	1800 IU/kg は 2 週間投与することが可能であることを確認	d-[redacted]-311	参考 4.2.3.2-1
カニクイザル	30 分間静脈内持続投与 ([redacted]mmol/L sodium citrate and [redacted] mmol/L sodium chloride solution /溶液)	180 IU/kg：2 週間 (休薬期間 5 週間) 1800 IU/kg：1 週間	180, 1800	雄性, 各群 2 例	1800 IU/kg：薬理作用に起因すると考えられる出血により、7 回投与翌日に瀕死 180 IU/kg：軽度の貧血とフィブリノーゲンの増加を惹起する用量	d-[redacted]-224	参考 4.2.3.2-4

2.6.7.6 反復投与毒性試験

2.6.7.6.1 ラットを用いた 2 週間反復静脈内投与毒性試験及び 2 週間回復性試験

報告書の題名：Two-week repeated dose toxicity study of KW-3357 administered by intravenous injection to rats with a 2-week recovery period	被験物質：KW-3357	
動物種/系統：ラット/ Crl:CD (SD)	投与期間：2 週間	試験番号：[redacted]08
試験開始週齢：雄 5 週齢、雌 4.5 週齢	休薬期間：2 週間	CTD における記載箇所 ：4.2.3.2-2
初回投与年月日：[redacted]年[redacted]月[redacted]日（雄）、[redacted]年[redacted]月[redacted]日（雌）	溶媒/投与形態：[redacted] mmol/L sodium citrate and [redacted] mmol/L sodium chloride solution/溶液	
GLP 適用：適用	投与方法：静脈内投与	
特記事項：なし		
無毒性量：2000 IU/kg/日		

投与量 (IU/kg/日)	0 (対照)		500		2000	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
動物数 (毒性評価群)[a)]：	15	15	10	10	15	15
死亡及び屠殺動物数：	0	0	0	0	0	0
一般状態：	–	–	–	–	–	–
体重 (g、Day 14)[b)]：	291.1	187.5	298.2	188.6	296.1	190.1
摂餌量 (g、Day 13)[b)]：	25.8	19.1	27.1	19.8	27.4	19.1
眼科学的検査：	–	–	–	–	–	–
血液学的検査：	–	–	–	–	–	–
血液生化学的検査：	–	–	–	–	–	–
尿検査：	–	–	–	–	–	–
剖検：	–	–	–	–	–	–
器官重量：	–	–	–	–	–	–
病理組織学的検査：	–	–	–	–	–	–

数値：平均値又は例数 –：被験物質に関連した変化又は毒性学的に意義のある変化は認められなかった

a) 休薬期間終了時点の解剖動物 (5 例/ 群/ 性別) を含む、ただし 500 IU/kg/日投与群では休薬群は設定せず

b) 初回投与日を Day 1 として設定

2.6.7.6.1 ラットを用いた 2 週間反復静脈内投与毒性試験及び 2 週間回復性試験（続き）

試験番号：[redacted]08			被験物質：KW-3357			
投与量 (IU/kg/日)	0 (対照)		500		2000	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
AT 活性 (%)[a)]	87.96	113.88	129.12*	139.98*	291.78**	252.96**
トキシコキネティクス [b)]						
動物数 (サテライト群)	4	4	4	4	4	4
血漿中濃度 (IU/mL)						
Day 1 (初回投与日)：						
投与開始後 10 分	0.00189[c)]	0.00[d)]	8.30	8.16	35.5	32.9
投与開始後 24 時間	0.00958[c)]	NA	0.254	0.238	1.22	1.01
Day 14 (最終投与日)：						
投与開始後 10 分	0.000420[c)]	0.00[d)]	11.1	9.20	46.5	37.6
投与開始後 24 時間	0.00143[c)]	NA	0.504	0.438	2.20	1.86
$AUC_{0\text{-}24}$ (IU·h/mL)						
Day 1 (初回投与日)：	NA	NA	49.6	49.3	227	202
Day 14 (最終投与日)：	NA	NA	82.5	64.1	329	274
抗 KW-3357 抗体の産生 [e)]：	NA	NA	0/4	0/4	0/4	0/4

数値：平均値又は例数　NA：適応外

*： p<0.05 、**： p<0.01 (vs 対照群、Dunnett's 又は Miller's test)

a) Day 15 (投与終了時点)、合成基質法に基づく抗トロンビン活性を測定、無処置ラットの血漿を標準物質とし、無処置ラットの活性に対する相対活性として算出、動物由来の活性を含む

b) ELISA により測定した血漿中 KW-3357 タンパク質濃度に、試験に使用した被験物質の抗トロンビン活性を乗じて算出した換算値、検定は未実施

c) ELISA による TK 測定の際、1/4 例で吸光度が検出された。当該動物では、投与前を含めて採取したほとんどすべてのサンプルで吸光度が確認されたことから、検出されたものは KW-3357 ではないと判断した。投与開始後 24 時間の結果は、該当動物の血漿中濃度。他の 3 例は未測定

d) 全例で定量下限 (KW-3357 タンパク質濃度として 100 ng/mL、抗トロンビン活性表示では[redacted] mIU/mL) 未満であった

e) 休薬 14 日、抗 KW-3357 抗体産生が認められた動物数/ 検査した動物数

2.6.7.6.2 ラットを用いた 2 週間反復静脈内投与毒性試験及び 2 週間回復性試験（追加試験）

報告書の題名：Two-week repeated dose toxicity study of KW-3357 (Lot No. [redacted]) administered by intravenous injection to rats with a 2-week recovery period	被験物質：KW-3357	
動物種/系統：ラット/ Crl:CD (SD)	投与期間：2 週間	試験番号：[redacted]32
試験開始週齢：雄 5 週齢、雌 5 週齢	休薬期間：2 週間	CTD における記載箇所：4.2.3.2-3
初回投与年月日：[redacted]年[redacted]月[redacted]日	溶媒/投与形態：[redacted]g/L glycine[redacted] g/L trisodium citrate dihydrate solution (pH[redacted]) /溶液	
GLP 適用：適用	投与方法：静脈内投与	
特記事項：なし		
無毒性量：2000 IU/kg/日		

投与量 (IU/kg/日)	0 (対照)		2000	
	雄	雌	雄	雌
動物数 (毒性評価群)[a)]：	15	15	15	15
死亡及び屠殺動物数：	0	0	0	0
一般状態：	–	–	–	–
体重 (g、Day 14)[b)]：	270.0	184.1	274.4	184.7
摂餌量 (g、Day 13)[b)]：	23.1	16.9	24.8	16.3
眼科学的検査：	–	–	–	–
血液学的検査：	–	–	–	–
血液生化学的検査：	–	–	–	–
尿検査：	–	–	–	–
剖検：	–	–	–	–
器官重量：	–	–	–	–
病理組織学的検査：	–	–	–	–

数値：平均値又は例数 –：被験物質に関連した変化又は毒性学的に意義のある変化は認められなかった

a) 休薬期間終了時点の解剖動物 (5 例/ 群/ 性別) を含む

b) 初回投与日を Day 1 として設定

2.6.7.6.2 ラットを用いた 2 週間反復静脈内投与毒性試験及び 2 週間回復性試験（追加試験）（続き）

試験番号：[redacted]32			被験物質：KW-3357	
投与量 (IU/kg/日)	0 (対照)		2000	
	雄	雌	雄	雌
AT 活性 (%)[a)]	85.46	111.52	321.05**	284.90**
トキシコキネティクス [b)]				
動物数 (サテライト群)	4	4	4	4
投与後 24 時間の血漿中濃度 (IU/mL)				
Day 1：	NA	NA	1.42	1.19
Day 14：	NA	NA	2.06	2.23
$AUC_{0\text{-}24}$ (IU·h/mL)				
Day 1：	NA	NA	213	181
Day 14：	NA	NA	299	326
抗 KW-3357 抗体の産生 [c)]：	NA	NA	0/4	1/4

数値：平均値又は例数　NA：適応外

**：p<0.01 (vs 対照群、Student's t 又は Aspin-Welch test)

a) Day 15 (投与終了時点)、合成基質法に基づく抗 Factor Xa 活性を測定、無処置ラットの血漿を標準物質とし、無処置ラットの活性に対する相対活性として算出、動物由来の活性を含む

b) ELISA により測定した血漿中 KW-3357 タンパク質濃度に、試験に使用した被験物質の抗トロンビン活性を乗じて算出した換算値、検定は未実施

c) 休薬 14 日、抗 KW-3357 抗体産生が認められた動物数/ 検査した動物数

2.6.7.6.3 カニクイザルを用いた 2 週間反復静脈内投与毒性試験及び 6 週間回復性試験

報告書の題名：Two-week repeated dose toxicity study of KW-3357 administered by intravenous injection to cynomolgus monkeys with a 6-week recovery period	被験物質：KW-3357	
動物種/系統：カニクイザル	投与期間：2 週間	試験番号：[redacted]07
試験開始年齢：3 から 5 歳	休薬期間：6 週間	CTD における記載箇所：4.2.3.2-6
初回投与年月日：[redacted]年[redacted]月[redacted]日（雄）、[redacted]年[redacted]月[redacted]日（雌）	溶媒/投与形態：[redacted] mmol/L sodium citrate and [redacted] mmol/L sodium chloride solution /溶液	
GLP 適用：適用	投与方法：30 分間静脈内持続投与	
特記事項：なし		
無毒性量：300 IU/kg/日		

投与量 (IU/kg/日)	0 (対照)		100		300		1000	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
動物数 (毒性評価群)[a)]	5	5	5	5	5	5	5	5
死亡及び屠殺動物数	0	0	0	0	0	0	0	0
一般状態 [b)]								
口腔粘膜の蒼白化 [c)]：	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	4/5	3/5
大腿部の腫脹 [c)] ：	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1[d)]/5	3/5
黒色便 (潜血陽性)[e)]：	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5
前腕 (投与部位) の腫脹：	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5	1/5	1/5

数値：例数

a) 休薬期間終了時点の解剖動物 (各群 2 例/性別) を含む

b) 変化のあった動物数/ 当該群の全動物数

c) Day 7 (初回投与日を Day 1 として設定) 以降に発現、雌動物の 1 例は休薬期間中 (休薬 4 から 7 日) のみで発現

d) 本動物では、投与 13 日以降に自発運動の低下、投与 14 日に低体温が認められた

e) Day 7、8 及び 10 に発現

2.6.7.6.3 カニクイザルを用いた 2 週間反復静脈内投与毒性試験及び 6 週間回復性試験（続き）

試験番号：[redacted]07			被験物質：KW-3357					
投与量 (IU/kg/日)	0 (対照)		100		300		1000	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
体重 (g)[a)] 投与前：	3.506	2.636	3.718	2.528	3.554	2.534	3.546	2.530
Day 14：	3.484	2.584	3.744	2.476	3.654	2.492	3.434	2.492
摂餌量 (g)[a), b)] 投与前：	105.6	78.0	92.4	91.2	108.0	90.0	97.2	74.4
Day 12：	108.0	82.8	98.4	91.2	108.0	81.6	79.2	78.0
眼科学的検査 (Day 10)：	–	–	–	–	–	–	–	–
心電図 (Day 12、投与前)：	–	–	–	–	–	–	–	–
血圧 (Day 12) (mmHg)								
投与前 収縮期血圧：	105.4	104.0	108.6	109.8	102.2	101.6	95.2	107.0
拡張期血圧：	52.6	53.0	56.2	56.4	54.0	54.4	54.4	53.6
投与終了直後 収縮期血圧：	107.2	116.0	108.6	118.0	107.4	106.0	110.8	113.0
拡張期血圧：	58.6	62.0	59.4	61.0	55.0	56.2	57.8	59.2
体温 (Day 12) (°C)								
投与前：	38.46	38.28	39.18	38.84*	39.22	38.94**	39.10	38.88*
投与終了直後：	38.44	38.20	38.88	38.54	38.94	38.78*	38.62	38.46

数値：平均値 –：被験物質に関連した変化なし

*：p<0.05 、**：p<0.01 (vs 対照群、Dunnett's 又は Miller's test)

a) 初回投与日を Day 1 として設定、 投与前は投与前日 (Day −1) のデータを使用

b) 1 日当たり約 108 g (約 12 g/個の固型飼料を 9 個) 給餌、翌日に残量を計測し一日当たりの摂餌量を算出

2.6.7.6.3 カニクイザルを用いた 2 週間反復静脈内投与毒性試験及び 6 週間回復性試験（続き）

試験番号：[redacted]07		被験物質：KW-3357							
投与量 (IU/kg/日)		0 (対照)		100		300		1000	
		雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
尿検査 (Day 13)									
pH の低下 [a)] :		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5
ケトン体の増加 [a)] :		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5
タンパク質 (mg/dL) :		3.52	8.34	2.82	8.10	4.44	10.24	9.30	19.26
Na 排泄量 (mEq) :		6.6	4.8	9.2	5.0	8.2	5.4	4.6	4.4
Cl 排泄量 (mEq) :		8.4	5.8	11.4	6.2	11.6	7.0	5.6	5.4
上皮円柱の増加 [b)] :		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5	0/5
血液学的検査 :									
赤血球数 ($\times 10^6/mm^3$)	投与前 [c)]	5.774	5.576	5.280	5.756	5.358	5.492	5.340	5.658
	Day 7	5.620	5.196	5.254	5.532	5.230	4.994	4.444	4.498
	Day 14	5.646	5.178	4.976	5.362	5.064	4.766	3.358**	3.880*
ヘモグロビン濃度 (g/dL)	投与前 [c)]	13.76	13.10	13.42	13.16	13.34	12.54	13.50	13.04
	Day 7	12.98	12.40	12.70	12.78	12.38	11.80	10.48	11.00
	Day 14	13.22	12.40	12.30	12.30	12.26	11.08*	8.34**	9.14*
ヘマトクリット値 (%)	投与前 [c)]	40.68	40.46	39.50	41.46	39.38	40.12	39.40	40.70
	Day 7	39.42	38.18	39.80	39.86	38.78	36.36	32.96	33.00
	Day 14	39.30	37.48	37.22	38.18	37.46	34.42	25.52**	29.02*
血小板数 ($\times 10^3/mm^3$)	投与前 [c)]	525.4	465.0	505.8	467.0	580.6	466.8	485.2	540.0
	Day 7	490.4	516.4	504.2	471.6	508.6	438.6	434.6	437.2
	Day 14	485.8	492.2	488.6	480.8	501.8	440.0	455.0	486.0

数値：平均値又は例数

*：$p<0.05$ 、**：$p<0.01$ (vs 対照群、Dunnett's 又は Miller's test)

a) 試験紙を用いた検査、変化のあった動物数 / 当該群の全動物数

b) 尿沈査検査、変化のあった動物数 / 当該群の全動物数

c) 投与前の検査は Day −3 (投与開始前日を Day −1 と設定)に実施

2.6.7.6.3 カニクイザルを用いた 2 週間反復静脈内投与毒性試験及び 6 週間回復性試験（続き）

試験番号：[redacted]07		被験物質：KW-3357							
投与量 (IU/kg/日)		0(対照)		100		300		1000	
		雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
血液学的検査 （続き） :									
網状赤血球率 (%)	投与前 a)	1.50	1.06	1.10	1.00	1.24	1.02	1.34	1.04
	Day 7	2.24	2.36	2.18	1.84	1.78	2.28	3.38	5.68
	Day 14	2.02	2.24	2.30	2.10	2.06	2.54	8.38	7.68
リンパ球数 ($\times10^3/mm^3$)	投与前 a)	7.992	6.418	5.536	6.486	7.210	5.462	7.054	5.936
	Day 7	7.050	7.056	5.190	6.518	7.050	5.186	6.226	5.434
	Day 14	5.648	4.634	4.394	5.672	7.134	3.972	6.050	4.912
好中球数 ($\times10^3/mm^3$)	投与前 a)	5.506	5.892	3.184	5.212	5.594	3.506	2.340	4.150
	Day 7	3.952	5.592	3.540	4.128	4.890	2.836	2.318	4.390
	Day 14	4.732	4.072	3.640	3.910	5.138	3.694	5.654	7.046
PT (s)	投与前 a)	9.74	9.92	9.74	9.60	9.66	9.66	9.54	9.82
	Day 7	9.64	10.00	10.02	9.92	10.36*	10.34	11.62**	11.46**
	Day 14	9.70	9.96	10.12	9.94	10.54**	10.46	11.62**	11.68**
APTT (s)	投与前 a)	20.42	18.88	20.64	19.10	18.32	19.40	19.46	18.98
	Day 7	20.12	19.24	20.62	20.42	18.92	21.18	24.82*	24.02**
	Day 14	20.22	19.52	20.80	20.46	19.70	21.56	26.02**	24.70*
フィブリノーゲン (mg/dL)	投与前 a)	227.10	211.12	197.26	166.08	205.56	178.32	164.92*	158.56
	Day 7	229.82	219.52	201.08	177.70	231.50	192.68	211.52	233.12
	Day 14	216.60	204.58	195.66	178.00	218.70	193.48	292.96	237.70

数値：平均値

*：$p<0.05$ 、**：$p<0.01$ (vs 対照群、Dunnett's 又は Miller's test)

a) 投与前の検査は Day −3 (投与開始前日を Day −1 と設定) に実施

2.6.7.6.3 カニクイザルを用いた 2 週間反復静脈内投与毒性試験及び 6 週間回復性試験（続き）

試験番号：[redacted]07		被験物質：KW-3357							
投与量 (IU/kg/日)		0 (対照)		100		300		1000	
		雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
血液生化学的検査：									
総タンパク質 (g/dL)	投与前 a)	7.26	7.38	7.20	7.18	7.14	7.50	6.78	7.30
	Day 7	7.10	7.32	7.14	7.12	6.94	7.14	6.46	7.12
	Day 14	7.10	7.28	7.10	7.12	7.10	7.16	6.64	7.24
アルブミン濃度 (g/dL)	投与前 a)	4.02	3.82	3.98	3.96	3.86	4.20**	3.88	3.92
	Day 7	3.92	3.84	3.96	3.88	3.76	4.04	3.58*	3.68
	Day 14	4.00	3.82	3.90	3.82	3.82	3.98	3.46**	3.48
アルブミン (%)	投与前 a)	59.88	58.20	60.38	61.46	59.38	61.54	62.30	59.36
	Day 7	61.14	58.14	59.94	59.62	58.22	61.90*	58.00	55.36
	Day 14	62.04	60.16	61.22	59.32	58.72	61.12	54.34**	53.00**
A/G 比	投与前 a)	1.500	1.398	1.534	1.602	1.464	1.604	1.658	1.462
	Day 7	1.582	1.394	1.500	1.480	1.396	1.632*	1.386	1.248
	Day 14	1.642	1.516	1.588	1.464	1.434	1.578	1.210**	1.138**
α2−グロブリン (%)	投与前 a)	4.82	4.88	5.80	5.16	4.78	5.48	4.46	5.70
	Day 7	4.76	5.28	6.02	5.62	4.98	5.32	4.58	5.86
	Day 14	4.70	4.64	4.76	5.04	4.66	5.60	6.30	6.56*
β−グロブリン (%)	投与前 a)	19.26	19.80	18.84	15.92**	19.58	17.04	18.10	17.90
	Day 7	18.04	20.14	18.06	17.22**	19.78	17.82*	21.98**	23.00*
	Day 14	17.48	19.32	18.18	16.96	19.70	18.86	22.08**	23.56**

数値：平均値

*：p<0.05 、**：p<0.01 (vs 対照群、Dunnett’s 又は Miller’s test)

a) 投与前の検査は Day −3 (投与開始前日を Day −1 と設定) に実施

2.6.7.6.3 カニクイザルを用いた 2 週間反復静脈内投与毒性試験及び 6 週間回復性試験（続き）

試験番号：[redacted]07		被験物質：KW-3357							
投与量 (IU/kg/日)		0 (対照)		100		300		1000	
		雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
血液生化学的検査（続き）：									
AST (IU/L)	投与前 a)	40.2	42.6	33.8	43.0	39.8	41.0	30.0	38.2
	Day 7	51.8	36.6	34.6	29.8	39.6	34.8	46.6	44.2
	Day 14	32.2	34.4	29.4	31.0	33.4	37.4	53.2	39.0
ALT (IU/L)	投与前 a)	55.8	64.8	59.2	55.6	61.8	40.6	54.0	52.2
	Day 7	49.0	48.0	51.2	55.2	61.0	35.4	46.6	40.0
	Day 14	39.4	42.6	37.8	58.6	48.0	36.0	56.0	33.8
総ビリルビン (mg/dL)	投与前 a)	0.274	0.230	0.236	0.308	0.256	0.316	0.268	0.242
	Day 7	0.262	0.284	0.224	0.290	0.218	0.372	0.276	0.392
	Day 14	0.294	0.266	0.224	0.308	0.262	0.278	0.446	0.376
Ca (mg/dL)	投与前 a)	10.42	10.02	10.00	10.22	10.20	10.38	9.90	9.82
	Day 7	10.22	10.26	9.98	10.14	10.24	9.76	9.60	9.42**
	Day 14	10.08	10.06	9.78	10.00	10.08	10.06	8.88**	9.48*
K (mEq/L)	投与前 a)	4.80	4.50	4.64	4.62	4.90	4.62	4.60	4.56
	Day 7	5.14	4.36	4.70	4.42	4.92	4.32	4.38*	4.22
	Day 14	4.62	4.04	4.22	4.34	4.32	4.32	4.00	4.00

数値：平均値

*：$p<0.05$ 、**：$p<0.01$ (vs 対照群、Dunnett's 又は Miller's test)

a) 投与前の検査は Day −3 (投与開始前日を Day −1 と設定) に実施

2.6.7.6.3 カニクイザルを用いた 2 週間反復静脈内投与毒性試験及び 6 週間回復性試験（続き）

試験番号：[redacted]07		被験物質：KW-3357							
投与量 (IU/kg/日)		0 (対照)		100		300		1000	
		雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
剖検所見 (投与終了時点)[a]									
赤色巣	骨格筋：	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	1/3	3/3	3/3
	皮下組織：	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	3/3	0/3
	投与部位：	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3
大腿部の腫脹：		0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1[b]/3	1/3
蒼白 (口腔粘膜、結膜、皮膚)：		0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	2/3	0/3
器官重量 (投与終了時点)：		–	–	–	–	–	–	–	–
病理組織学的検査 (投与終了時点)[c]									
背部 骨格筋 [d]	出血	NA	NA	NA	NA	NA	1/1	1/1	1/1
	線維化	NA	NA	NA	NA	NA	0/1	1/1	0/1
背部 皮下組織 [d]	出血	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1/1	NA
大腿部 (左) 骨格筋 [d]	出血	NA	NA	NA	NA	NA	1/1	2/2	2/2
	線維化	NA	NA	NA	NA	NA	0/1	1/2	2/2
	壊死	NA	NA	NA	NA	NA	1/1	NA	0/2
	筋線維の再生	NA	NA	NA	NA	NA	0/1	NA	2/2
大腿部 (左) 皮下組織 [d]	出血	NA	NA	NA	1/1	NA	NA	1/1	NA
	線維化	NA	NA	NA	0/1	NA	NA	0/1	NA
	壊死	NA	NA	NA	0/1	NA	NA	0/1	NA
	筋線維の再生	NA	NA	NA	0/1	NA	NA	0/1	NA

数値：例数　–：被験物質に関連した変化なし　NA：適応外

a) 変化のあった動物数 / 投与終了時点で解剖を行った当該群の全動物数

b) 本動物は最も出血、貧血が重篤な動物であり、その他の剖検所見として胸腹部組織の退色、肝臓で小葉構造の明瞭化、陰嚢の皮下組織で浮腫が認められ、病理組織学的検査では本動物のみで副腎束状帯の 肥大、脂肪の減少、膵臓でチモーゲン顆粒の減少、回腸、リンパ節、脾臓で濾胞リンパ球数の減少、陰嚢で出血、浮腫が認められた

c) 変化のあった動物数/ 検査対象の当該群の動物数

d) 剖検異常部位、所見のあった動物のみ検査

2.6.7.6.3 カニクイザルを用いた 2 週間反復静脈内投与毒性試験及び 6 週間回復性試験 （続き）

試験番号：[redacted]07		被験物質：KW-3357							
投与量 (IU/kg/日)		0 (対照)		100		300		1000	
		雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
病理組織学的検査 (投与終了時点、続き)[a]									
大腿部 (右) 骨格筋[b]	出血	NA	NA	NA	1/1	NA	NA	2/2	2/2
	線維化	NA	NA	NA	0/1	NA	NA	1/2	1/2
	炎症性細胞の浸潤	NA	NA	NA	0/1	NA	NA	0/2	1/2
	壊死	NA	NA	NA	0/1	NA	NA	1/2	1/2
大腿部 (右) 皮下組織[b]	出血	NA	NA	NA	1/1	NA	NA	2/2	NA
	線維化	NA	NA	NA	0/1	NA	NA	1/2	NA
甲状腺	出血	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1[c]/3	1[c]/3
骨髄	赤芽球造血の亢進	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	2/3	2/3
脾臓	髄外造血の亢進	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	1/3
肝臓	壊死	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1[d]/3	0/3
	空胞化	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	1/3

数値：例数　NA：適応外

a) 変化のあった動物数 / 投与終了時点で解剖を行った当該群の全動物数

b) 剖検異常部位、所見のあった動物のみ検査

c) フィブリン滲出、線維化、単核球細胞の浸潤を伴う

d) 炎症性細胞の浸潤を伴う

2.6.7.6.3 カニクイザルを用いた 2 週間反復静脈内投与毒性試験及び 6 週間回復性試験 （続き）

試験番号：[redacted]07			被験物質：KW-3357					
投与量 (IU/kg/日)	0 (対照)		100		300		1000	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
AT 活性 (%)[a] 投与前	96.52	116.26	93.94	112.82	103.04	117.04	91.24	106.86
Day 7	91.44	102.76	185.60	181.50	461.20*	541.20*	1370.00**	1291.60**
Day 14	96.20	108.22	177.90	201.90	408.20*	451.60*	1464.20**	1273.80**
トキシコキネティクス [b]								
血漿中濃度 (IU/mL)								
Day 1 (初回投与日） 投与終了直前 [c]	0.00[d]	0.00[d]	2.12	2.07	7.18	7.08	19.4	21.8
投与開始後 24 時間	NA	NA	0.564	0.509	1.53	1.34	5.07	4.80
Day 14 (最終投与日） 投与終了直前 [c]	0.00[d]	0.00[d]	3.84	3.77	10.4	9.12	35.6	34.5
投与開始後 24 時間	NA	NA	1.62	1.47	5.39	4.67	18.9	14.6
AUC_{0-24} (IU·h/mL)								
Day 1 (初回投与日）	NA	NA	25.4	24.6	80.8	73.6	233	226
Day 14 (最終投与日）	NA	NA	61.0	58.2	189	152	611	550
抗 KW-3357 抗体の産生 [e]	NA	NA	1/2	0/2	0/2	0/2	2/2	1/2

数値：平均値又は例数 NA：適応外

*：p<0.05 、**：p<0.01 (vs 対照群、Dunnett’s 又は Miller’s test)

a) 合成基質法に基づく抗トロンビン活性を測定、無処置サルの血漿を標準物質とし、無処置サルの活性に対する相対活性として算出、動物由来の活性を含む

b) ELISA により測定した血漿中 KW-3357 タンパク質濃度に、試験に使用した被験物質の抗トロンビン活性を乗じて算出した換算値、検定は未実施

c) 投与開始後 28.5~30 分の間

d) 全例で定量下限 (KW-3357 タンパク質濃度として 10 µg/mL、抗トロンビン活性表示では[redacted] mIU/mL) 未満であった

e) 抗 KW-3357 抗体産生が認められた動物数 / 当該群の全動物数、回復終了 (回復 42 日) 時点

2.6.7.7 遺伝毒性試験

該当する試験は実施していない。

2.6.7.8 がん原性試験

該当する試験は実施していない。

2.6.7.9 生殖発生毒性試験 –重要な試験以外の試験

被験物質：KW-3357							
動物種/系統	投与方法 (溶媒/投与形態)	投与期間	投与量 (IU/kg/日)	一群の動物数	特記すべき所見	試験番号	CTD における記載箇所
ラット/ Crl:CD (SD)	静脈内投与 ([redacted] mmol/L sodium citrate and [redacted] mmol/L sodium chloride solution /溶液)	妊娠 7 日から授乳 7 日、計 22～23 日間	0, 600, 2000	全群 6 例 (妊娠動物)	投与期間中、2000 IU/kg/日投与群で軽度な体重増加量及び摂餌量の減少が認められた	[redacted]96	参考 4.2.3.5.3-1
ウサギ/ Kbs:NZW	静脈内投与 ([redacted] mmol/L sodium citrate and [redacted] mmol/L sodium chloride solution /溶液)	妊娠 6 から 18 日	0, 100, 1000	0, 100 及び 1000 IU/kg でそれぞれ 6, 6, 4 例 (妊娠動物)	1000 IU/kg/日投与群で膣からの出血、膣及び子宮内の血液貯留、流産 (1 例、妊娠 24 日)、着床後死亡率の増加 (対照群で 1.67%に対し 1000 IU/kg/日投与群で 56.08%) 及び生存胎児数の減少 (対照群で 8.00 に対し 1000 IU/kg/日投与群で 3.67) が認められた	[redacted]97	参考 4.2.3.5.2-2

2.6.7.9.1 生殖発生毒性試験 –ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 –雌動物投与試験–

報告書の題名：Study for Effects of KW-3357 on Fertility and Early Embryonic Development to Implantation in Female Rats Administered by Intravenous Injection		被験物質：KW-3357
試験計画 ：ICH 4.1.1 準拠		
動物種/系統：ラット/Crl:CD(SD)	投与期間：交配前 (2 週間) から交配期間 (最長 2 週間) を通して妊娠 7 日まで、計 22～33 日間	試験番号：[redacted]29
試験開始週齢：8 週齢	交尾成立日：妊娠 0 日	CTD における記載箇所 ：4.2.3.5.1-1
初回投与年月日：[redacted]年[redacted]月[redacted]日	帝王切開日：妊娠 13 日	
投与方法：静脈内投与	溶媒/投与形態：[redacted] mmol/L sodium citrate and [redacted] mmol/L sodium chloride solution/溶液	GLP 適用：適用
特記事項：無処置雄と投与雌を 1:1 で交配		
無毒性量： F_0 雌 (一般毒性学的影響)：2000 IU/kg/日 F_0 雌 (生殖に及ぼす影響)：2000 IU/kg/日 F_1 胎児 (次世代の発生に及ぼす影響)：2000 IU/kg/日		

投与量 (IU/kg/日)	0 (対照)	200	600	2000
雌動物/母動物				
評価雌動物数：	20	20	20	20
母動物数	19	19	20	20
死亡及び瀕死屠殺雌動物数：	0	0	0	0
一般状態：	–	–	–	–
体重 (g) 妊娠 13 日：	329.3	333.0	325.3	330.4
摂餌量 (g) 妊娠 13 日：	26.5	26.3	25.3	26.0
剖検：	-	-	-	-
卵巣重量 (mg)[a)]：	95.1	100.2	93.5	92.8

数値：平均値又は例数 –：異常所見又は KW-3357 による影響なし

a)各群の値は妊娠動物の左右合算の平均値

2.6.7.9.1 生殖発生毒性試験 –ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 –雌動物投与試験– （続き）

試験番号：[redacted]29		被験物質：KW-3357		
投与量 (IU/kg/日)	0 (対照)	200	600	2000
母動物				
AT 活性 (%)[a)、b)]				
投与 1 日 [c)] 投与開始後 10 分	116	417*	964*	2840*
投与開始後 24 時間	136	142	170**	289**
妊娠 1 日 投与開始後 24 時間	134	146*	187*	374*
妊娠 7 日投与開始後 10 分	109	435*	924*	3048*
投与開始後 24 時間	124	136*	172*	340*
血漿中濃度 (IU/mL)[a)、d)]				
投与 1 日 投与開始後 10 分	BLQ	3.18	9.31	30.0
投与開始後 24 時間	NA	0.114	0.350	1.34
妊娠 1 日 投与開始後 24 時間	BLQ	0.164	0.486	1.87
妊娠 7 日投与開始後 10 分	BLQ	3.46	9.99	29.8
投与開始後 24 時間	NA	0.164	0.455	1.67
AUC_{0-24} (IU·h/mL)[a)]				
投与 1 日	NA	39.5	116	376
妊娠 7 日	NA	43.5	125	378
抗 KW-3357 抗体の産生 [a)、e)、f)]	NA	0/5	0/5	0/5

数値：平均値又は例数　BLQ：定量下限 (KW-3357 タンパク質濃度として 100 ng/mL、抗トロンビン活性表示では[redacted] mIU/mL)未満　NA：適応外

*：p<0.05、**：p<0.01 (vs 対照群、Dunnett’s multiple comparison test 又は Steel’s multiple comparison test)

a) サテライト群を用いて評価、妊娠動物数は各群 5 例

b) 合成基質法に基づく抗 Factor Xa 活性を測定、既知濃度のヒト標準血漿を標準物質とし、ヒト標準活性に対する相対活性として算出、動物由来の活性を含む

c) 交配前投与期間の初回投与日

d) ELISA により測定した血漿中 KW-3357 タンパク質濃度に、試験に使用した被験物質の抗トロンビン活性を乗じて算出した換算値、検定は未実施

e) 抗 KW-3357 抗体産生が認められた雌動物数/ 当該群の全検査動物数

f) 妊娠 13 日 (帝王切開日) の剖検前

2.6.7.9.1 生殖発生毒性試験 –ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 –雌動物投与試験– （続き）

試験番号：[redacted]29		被験物質：KW-3357		
投与量 (IU/kg/日)	0 (対照)	200	600	2000
母動物				
交配前投与期間中の発情回数	3.80	3.50	3.55	3.90
交配前投与期間中の性周期の日数 (日)	4.00	4.07	4.03	4.05
交尾までに要した同居日数 (日)	2.50	2.55	3.60	2.80
交尾率 a)	20/20 (100.00)	20/20 (100.00)	20/20 (100.00)	20/20 (100.00)
受胎率 b)	19/20 (95.00)	19/20 (95.00)	20/20 (100.00)	20/20 (100.00)
胎児				
流産又は全胚吸収母体数	0	0	0	0
黄体数	14.42	14.84	15.15	14.40
着床数	13.74	14.11	14.65	14.15
着床前死亡率 (%)	6.59	4.96	2.91	1.64
生存胚数	12.95	13.37	13.30	13.25
着床後死亡率 (%)	9.81	5.13	8.54	6.14

数値：平均値又は例数

a) 交尾が確認された雌動物数/交尾に供した雌動物数、括弧内の数値はその比率 (%)

b) 受胎能力の確認された雌動物数/交尾が確認された雌動物数、括弧内の数値はその比率 (%)

2.6.7.9.2 生殖発生毒性試験 –ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 –雄動物投与試験–

報告書の題名：Study for Effects of KW-3357 on Fertility and Early Embryonic Development to Implantation in Male Rats Administered by Intravenous Injection		被験物質：KW-3357
試験計画 ：ICH 4.1.1 準拠		
動物種/系統：ラット/Crl:CD (SD)	投与期間：交配前 (15 日間) から交配期間中 (最長 13 日間) 、計 19 又は 28 日	試験番号：[redacted]02
試験開始週齢：8 週齢	交尾成立日：妊娠 0 日	CTD における記載箇所：4.2.3.5.1-2
初回投与年月日：[redacted]年[redacted]月[redacted]日	帝王切開日：妊娠 13 日	
投与方法：静脈内投与	溶媒/投与形態：[redacted]mmol/L sodium citrate and [redacted]mmol/L sodium chloride solution/溶液	GLP 適用：適用
特記事項：無処置雌と投与雄を 1:1 で交配		
無毒性量： F_0 雄 (一般毒性学的影響)：2000 IU/kg/日 F_0 雄 (生殖に及ぼす影響)：2000 IU/kg/日 F_1 胎児 (次世代の発生に及ぼす影響)：2000 IU/kg/日		

投与量 (IU/kg/日)	0 (対照)	500	2000
雄動物			
評価雄動物数：	20	20	20
死亡及び瀕死屠殺雄動物数：	0	0	0
一般状態：	–	–	–
体重 (g) 投与 14 日：	410.5	406.3	403.5
摂餌量 (g) 投与 14 日：	26.7	25.6	26.0
剖検 [a]：	–	–	–
精巣重量 (g)[b]：	3.16	3.16	3.27
精巣上体重量 (g)[b]：	1.00	0.99	1.04

数値：平均値又は例数 –：異常所見又は KW-3357 による影響なし

a) 交配 4 日までに交尾が確認された動物は交配 5 日の投与前、交配 4 日までに交尾が確認されなかった動物は交配期間終了翌日に剖検

b)各群の値は妊娠動物の左右合算の平均値

2.6.7.9.2 生殖発生毒性試験 –ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 –雄動物投与試験– （続き）

試験番号：[redacted]		被験物質：KW-3357	
投与量 (IU/kg/日)	0 (対照)	500	2000
雄動物			
AT 活性 (%)[a)]：	124	186[*]	431[*]
血漿中濃度 (IU/mL)[a)、b)]：	BLQ	0.518	2.83
抗 KW-3357 抗体の産生[a)、c)]：	NA	0/4	0/4

数値：平均値又は例数　BLQ：定量下限 (KW-3357 タンパク質濃度として 100 ng/mL、抗トロンビン活性表示では[redacted] mIU/mL) 未満　NA：適応外

*：p<0.05 (vs 対照群、Dunnett's multiple comparison test 又は Steel's multiple comparison test)

a) 各群の動物番号の若い方から 4 例を用いて評価、交配 4 日の投与開始後 24 時間、合成基質法に基づく抗 Factor Xa 活性を測定、既知濃度のヒト標準血漿を標準物質とし、ヒト標準活性に対する相対活性として算出、動物由来の活性を含む

b) ELISA により測定した血漿中 KW-3357 タンパク質濃度に、試験に使用した被験物質の抗トロンビン活性を乗じて算出した換算値、検定は未実施

c) 抗 KW-3357 抗体産生が認められた雄動物数/当該群の検査雄動物数

2.6.7.9.2 生殖発生毒性試験 –ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 –雄動物投与試験– （続き）

試験番号：[redacted]02		被験物質：KW-3357	
投与量 (IU/kg/日)	0 (対照)	500	2000
雄動物			
交尾までに要した同居日数 (日)：	3.00	2.75	3.25
交尾率 [a]：	20/20 (100.00)	20/20 (100.00)	20/20 (100.00)
授胎率 [b]：	20/20 (100.00)	20/20 (100.00)	18/20 (90.00)
胎児			
流産又は全胚吸収母体数：	0	0	0
黄体数：	15.55	15.95	15.72
着床数：	14.80	15.40	15.44
着床前死亡率 (%)：	5.01	3.44	1.78
生存胚数：	13.75	14.10	14.06
着床後死亡率 (%)：	6.79	8.26	9.01

数値：平均値又は例数

a) 交尾が確認された雄動物数/交尾に供した雄動物数、括弧内の数値はその比率 (%)

b) 授精能力の確認された雄動物数/交尾が確認された雄動物数、括弧内の数値はその比率 (%)

2.6.7.9.3 生殖発生毒性試験 –ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験

報告書の題名：Study for Effects of KW-3357 on Embryo-fetal Development in Rats Administered by Intravenous Injection		被験物質：KW-3357	
試験計画 ：ICH 4.1.3 に準拠			
動物種/系統：ラット/Crl:CD(SD)	投与期間：妊娠 7 から 17 日	試験番号：[redacted]27	
試験開始週齢：8 から 10 週齢	交尾成立日：妊娠 0 日	CTD における記載箇所 ：4.2.3.5.2-1	
初回投与年月日：[redacted]年[redacted]月[redacted]日	帝王切開日：妊娠 20 日		
投与方法：静脈内投与	溶媒/投与形態：[redacted] mmol/L sodium citrate and [redacted] mmol/L sodium chloride solution/溶液	GLP 適用：適用	
特記事項： なし			
無毒性量： F_0 雌 (一般毒性学的影響)：2000 IU/kg/日 F_0 雌 (生殖に及ぼす影響)：2000 IU/kg/日 F_1 胎児 (次世代の発生に及ぼす影響)：2000 IU/kg/日			

投与量 (IU/kg/日)	0 (対照)	200	600	2000
母動物				
妊娠動物数：	20	20	20	20
死亡及び瀕死屠殺動物数：	0	0	0	0
流産又は全胚吸収母体数：	0	0	0	0
一般状態：	–	–	–	–
体重 (g) 妊娠 17 日：	372.6	373.0	373.3	367.9
摂餌量 (g) 妊娠 17 日：	27.9	28.8	28.1	26.6
剖検：	–	–	–	–
卵巣重量 (mg)[a)]	126.5	124.5	120.8	123.3

数値：平均値又は例数 –：異常所見又は KW-3357 による影響なし

a) 各群の値は妊娠動物の左右合算の平均値

2.6.7.9.3 生殖発生毒性試験 –ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験 （続き）

試験番号：[redacted]27		被験物質：KW-3357		
投与量 (IU/kg/日)	0 (対照)	200	600	2000
母動物				
AT 活性 (%)[a)、b)]				
妊娠 7 日 投与開始後 10 分	113	437*	940*	3304*
投与開始後 24 時間	127	138*	154*	280*
妊娠 17 日 投与開始後 10 分	132	387*	872*	2808*
投与開始後 24 時間	138	136	149	218**
血漿中濃度 (IU/mL)[a)、c)]				
妊娠 7 日 投与開始後 10 分	BLQ	4.15	12.4	37.3
投与開始後 24 時間	NA	0.163	0.447	1.85
妊娠 17 日 投与開始後 10 分	BLQ	2.27	7.21	25.5
投与開始後 24 時間	NA	0.0794	0.179	0.828
$AUC_{0\text{-}24}$(IU·h/mL)[a)]				
妊娠 7 日	NA	51.7	155	469
妊娠 17 日	NA	28.2	88.6	316
抗 KW-3357 抗体の産生 [a)、d)、e)]	NA	0/5	0/5	0/5

数値：平均値又は例数　BLQ：定量下限 (KW-3357 タンパク質濃度として 100 ng/mL、抗トロンビン活性表示では[redacted] mIU/mL)未満　NA：適応外

*：p<0.05、**：p<0.01 (vs 対照群、Dunnett’s multiple comparison test 又は Steel’s multiple comparison test)

a) サテライト群を用いて評価、妊娠動物数は各群 5 例

b) 合成基質法に基づく抗 Factor Xa 活性を測定、既知濃度のヒト標準血漿を標準物質とし、ヒト標準活性に対する相対活性として算出、動物由来の活性を含む

c) ELISA により測定した血漿中 KW-3357 タンパク質濃度に、試験に使用した被験物質の抗トロンビン活性を乗じて算出した換算値、検定は未実施

d) 抗 KW-3357 抗体産生が認められた雌動物数/ 当該群の全検査動物数

e) 妊娠 20 日 (帝王切開日) の剖検前

2.6.7.9.3 生殖発生毒性試験 –ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験 （続き）

試験番号：[redacted]27		被験物質：KW-3357		
投与量 (IU/kg/日)	0 (対照)	200	600	2000
胎児				
評価母体数	20	20	20	20
黄体数：	16.05	15.65	15.60	16.15
着床数：	15.40	15.00	15.30	15.60
着床前死亡率 (%)：	4.14	3.93	1.92	3.30
生存胎児数：	14.35	13.95	14.65	14.75
早期吸収胚 (%)：	6.57	5.78	3.68	5.17
後期吸収胚 (%)：	0.00	1.01	0.72	0.31
死亡胎児 (%)：	0.00	0.00	0.00	0.00
着床後死亡率 (%)：	6.57	6.79	4.40	5.48
胎児体重 (g)：				
雄：	3.66	3.77	3.79	3.65
雌：	3.47	3.59	3.56	3.44
胎盤重量 (g)：				
雄：	0.45	0.49	0.47	0.45
雌：	0.44	0.48	0.45	0.45
胎盤所見：肥大 (%)	0.00	3.82	0.00	0.00
胎児の性比 [a)]：	145/142 (1.02)	130/149 (0.87)	151/142 (1.06)	145/150 (0.97)

数値：平均値又は例数

a) 生存雄胎児数/生存雌胎児数、括弧内の数値はその比

2.6.7.9.3 生殖発生毒性試験 –ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験 （続き）

試験番号：[redacted]27		被験物質：KW-3357		
投与量 (IU/kg/日)	0 (対照)	200	600	2000
胎児				
胎児の異常 [a)]：				
外表異常：	0/287	0/279	0/293	0/295
内臓異常 [b)]：	6/148 (4)	NA	NA	9/151 (6)
骨格異常 [c)]：	1/139 (1)	NA	NA	1/144 (1)

数値：例数　NA：適応外

a) 異常が認められた生存胎児数/評価した全生存胎児数、括弧内の数値は異常が認められた胎児を有した母動物数

b) 認められた異常は、心室中隔欠損、腎盂拡張、尿管拡張、胸腺頚部遺残

c) 認められた異常は、胸椎体半椎体、肋骨の欠損、胸椎椎弓の癒合

2.6.7.9.4 生殖発生毒性試験 –ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験

報告書の題名：Study for Effects of KW-3357 on Embryo-fetal Development in Rabbits Administered by Intravenous Injection		被験物質：KW-3357		
試験計画 ：ICH 4.1.3 に準拠				
動物種/系統：ウサギ/Kbs:NZW		投与期間：妊娠 6 から 18 日	試験番号：[redacted]28	
試験開始週齢：4 ヵ月齢		交尾成立日：妊娠 0 日	CTD における記載箇所：4.2.3.5.2-4	
初回投与年月日：[redacted]年[redacted]月[redacted]日		帝王切開日：妊娠 29 日		
投与方法：静脈内投与		溶媒/投与形態：[redacted] mmol/L sodium citrate and [redacted] mmol/L sodium chloride solution/溶液	GLP 適用：適用	
特記事項： なし				
無毒性量： F_0 雌 (一般毒性学的影響)：500 IU/kg/日 F_0 雌 (生殖に及ぼす影響)：150 IU/kg/日 F_1 胎児 (次世代の発生に及ぼす影響)：150 IU/kg/日				
投与量 (IU/kg/日)	0 (対照)	50	150	500
母動物				
妊娠動物数：	19	18	20	19
死亡及び瀕死屠殺動物数：	0	0	1[a)]	0
流産又は全胚吸収母体数：	0	0	0	0
一般状態[b)]：腟からの出血	0	0	0	1[c)]
体重 (g) 妊娠 18 日：	3624	3685	3683	3709
摂餌量 (g) 妊娠 18 日：	114	117	112	128
剖検[b)]：子宮内の血液貯留	0	0	0	8
卵巣重量 (mg)[d)]	756.2	818.2	869.3	848.6

数値：平均値又は例数

a) 妊娠 16 日に死亡。本動物は、妊娠 12 日から体重が減少し、妊娠 15 日で摂餌量が 0 g となった。死亡日は、投与終了直後に呼吸緩徐を示し、横臥位となり、投与後約 1 時間に死亡した。剖検では異常所見は認められなかった。500 IU/kg/日投与群では死亡が認められていないこと、無処理 Kbl:NZW の妊娠時における自然発症の死亡率は[redacted]%であることから、本動物の死亡は被験物質に関連がないと判断した

b) 所見の認められた動物数

c) 妊娠 22 から 29 日の間に発現

d) 左右合算

2.6.7.9.4 生殖発生毒性試験 –ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験 （続き）

試験番号：[redacted]28		被験物質：KW-3357		
投与量 (IU/kg/日)	0 (対照)	50	150	500
母動物				
AT 活性、血漿中濃度及び抗 KW-3357 抗体測定の対象妊娠動物数	5	5	5	4
AT 活性 (%)[a)、b)]				
妊娠 6 日 投与終了直後[c)]	83	178*	337*	1033*
投与開始後 24 時間	88	122*	165*	338*
妊娠 18 日 投与終了直後[c)]	101	196*	395*	1085*
投与開始後 24 時間	110	141*	154*	550*
血漿中濃度 (IU/mL)[a)、d)]				
妊娠 6 日 投与終了直後[c)]	BLQ	0.881	2.75	9.28
投与開始後 24 時間	NA	0.191	0.637	2.81
妊娠 18 日 投与終了直後[c)]	BLQ	0.705	2.65	10.5
投与開始後 24 時間	NA	0.0856	0.375	3.92
$AUC_{0\text{-}24}$ (IU·h/mL)[a)]				
妊娠 6 日	NA	10.4	31.9	121
妊娠 18 日	NA	7.77	30.9	158
抗 KW-3357 抗体の産生[a)、e)、f)]	NA	4/5	5/5	3/4

数値：平均値又は例数　BLQ：定量下限 (KW-3357 タンパク質濃度として 10 ng/mL、抗トロンビン活性表示では[redacted] mIU/mL)未満　NA：適応外

*：$p<0.05$ (vs 対照群、Dunnett's multiple comparison test 又は Steel's multiple comparison test)

a) 動物番号の若い方から 5 例を TK 評価用動物として採血、評価は妊娠動物について実施

b) 合成基質法に基づく抗 Factor Xa 活性を測定、既知濃度のヒト標準血漿を標準物質とし、ヒト標準活性に対する相対活性として算出、動物由来の活性を含む

c) 投与開始後 28.5～30 分の間

d) ELISA により測定した血漿中 KW-3357 タンパク質濃度に、試験に使用した被験物質の抗トロンビン活性を乗じて算出した換算値、検定は未実施

e) 抗 KW-3357 抗体産生が認められた雌動物数/ 当該群の全検査動物数

f) 妊娠 29 日 (帝王切開日) の剖検前

2.6.7.9.4 生殖発生毒性試験 –ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験 （続き）

試験番号：[redacted]28		被験物質：KW-3357		
投与量 (IU/kg/日)	0 (対照)	50	150	500
胎児				
評価母体数：	19	18	19	19
黄体数：	8.95	7.67	8.47	8.63
着床数：	8.11	6.78	7.63	6.95
着床前死亡率 (%)：	9.60	15.17	9.84	19.25
生存胎児数：	7.37	6.11	6.84	6.26
早期吸収胚 (%)：	7.29	5.83	6.22	10.68
後期吸収胚 (%)：	0.53	1.85	3.33	1.72
死亡胎児 (%)：	0.00	0.00	0.00	0.00
着床後死亡率 (%)：	7.82	7.69	9.56	12.39
胎児体重 (g)：				
雄：	38.99	38.28	35.35	34.30
雌：	37.31	37.90	34.35	33.47
胎盤重量 (g)：				
雄：	2.99	2.93	2.68	2.60
雌：	2.86	2.88	2.47	2.53
胎児の性比 [a)]：	68/72 (0.94)	50/60 (0.83)	73/57 (1.28)	59/60 (0.98)

数値：平均値又は例数

a) 生存雄胎児数/生存雌胎児数、括弧内の数値はその比

2.6.7.9.4 生殖発生毒性試験 –ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験 （続き）

試験番号：[redacted]28		被験物質：KW-3357			
投与量 (IU/kg/日)		0 (対照)	50	150	500
胎児					
胎盤所見：					
肉眼的観察　一部灰白色化 (%)：		3.40	3.44	3.50	16.09
胎盤割面 (絨毛膜側)の灰白色化の広がり [a]：	グレード [b]				
	−：	134	107	125	101
	+：	5	3	4	13
	++：	0	0	0	4
	+++：	1	0	1	1
胎児の異常 [c]：					
外表異常：		0/140	0/110	0/130	1[d]/119 (1)
内臓異常 [e]、[f]：		3/140 (3)	2/110 (2)	1/130 (1)	2/119 (2)
骨格異常 [g]：		6/140 (6)	NA	7/130 (4)	8/119 (5)
骨化進行度検査：					
中手骨 骨化度 (%)	右：	98.65	NA	97.68	96.65
	左：	98.80	NA	97.81	96.71
前肢中節骨 骨化度 (%)	右：	98.34	NA	98.02	93.49
	左：	98.45	NA	97.83	93.15

数値：平均値又は例数　NA：適応外

a) 胎盤割面 (絨毛膜側) の灰白色化の広がりに対応して、病理組織学的検査で絨毛膜側胎盤葉の中等度から重度の壊死が認められた

b) −：胎盤割面 (絨毛膜側) に灰白色化なし、+：灰白色部分の面積が割面の約 30%未満、++：灰白色部分の面積が割面の約 30%以上 60%未満、+++：灰白色部分の面積が割面の約 60%以上、数値は異常が認められた胎盤数

c) 異常が認められた生存胎児数/評価した全生存胎児数、括弧内の数値は異常が認められた胎児を有した母動物数

d) 髄膜瘤、眼瞼開裂及び臍帯ヘルニアの複合奇形

e) 帝王切開時の固定前標本を用いた内臓検査 (頭部の外観及び胸腹部器官の肉眼観察) は、全群について実施。固定標本を用いた脳、心臓及び腎臓の内臓検査は対照群と 500 IU/kg/日投与群のみ実施

f) 認められた異常は、大血管転換、大型の心臓、食道背方鎖骨下動脈、頚部胸腺遺残

g) 対照群、150 及び 500 IU/kg/日投与群について実施。認められた異常は、肋骨の結節形成、癒合、分岐又は欠損、胸骨の癒合、腰骨又は胸骨の椎体又は椎弓の癒合、腰骨又は胸骨の椎弓の欠損、胸椎体半椎体、腰椎体半椎体、頭頂骨の欠損、腰骨弓の小型

2.6.7.9.5 生殖発生毒性試験 –ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

報告書の題名：Study for Effects of KW-3357 on Pre- and Postnatal Development, including Maternal Function in Rats Administered by Intravenous Injection			被験物質：KW-3357	
試験計画 ：ICH 4.1.2 に準拠				
動物種/系統：ラット/Crl:CD (SD)		投与期間：妊娠 7 日から分娩後 21 日まで、計 36～37 日間	試験番号：[redacted]24	
試験開始週齢：8 から 10 週齢		交尾成立日：妊娠 0 日	CTD における記載箇所：4.2.3.5.3-3	
初回投与年月日：[redacted]年[redacted]月[redacted]日		投与方法：静脈内投与		
溶媒/投与形態：[redacted]mmol/L sodium citrate and [redacted] mmol/L sodium chloride solution/溶液		同腹児数の調整/非調整：出生後 4 日に調整	GLP 適用：GLP 適用	
特記事項： なし				
無毒性量： F_0 雌 (一般毒性学的影響)：2000 IU/kg/日 F_0 雌 (生殖に及ぼす影響)：2000 IU/kg/日 F_1 出生児 (次世代の発生に及ぼす影響)：2000 IU/kg/日				

投与量 (IU/kg/日)	0 (対照)	200	600	2000
F_0 母動物：				
妊娠動物数：	20	20	20	20
死亡及び瀕死屠殺動物数：	0	0	0	0
流産又は全児死亡母体数：	0	1[a)]	0	0
一般状態：	–	–	–	–
体重 (g) 妊娠 21 日：	414.0	411.0	410.3	403.6
分娩後 21 日：	311.9	311.5	313.7	303.5
摂餌量 (g) 妊娠 21 日：	20.5	19.1	19.7	19.2
分娩後 21 日：	72.5	69.7	74.5	73.4

数値：平均値又は例数 –：異常所見なし

a) 母動物が出生児の世話をしなかったため、分娩後 3 日に全児死亡した。そのため、当該母動物は分娩後 3 日に剖検。本変化は、当該動物 1 例のみの変化であり、また用量依存性が認められなかったことから、被験物質の影響ではないと判断した

2.6.7.9.5 生殖発生毒性試験 –ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 （続き）

試験番号：[redacted]24		被験物質：KW-3357		
投与量 (IU/kg/日)	0 (対照)	200	600	2000
F_0 母動物：				
評価母体数：	20	20	20	20
妊娠期間 (日数)：	21.85	21.70	21.85	21.85
分娩状態：	–	–	–	–
出産率 (%)：	100	100	100	100
哺育状態：	–	–	–	–
着床痕数：	14.95	15.05	14.35	14.05
剖検 [a)]：	–	–	–	–

数値：平均値 －：KW-3357 の影響又は特記すべき所見なし

a) 分娩後 22 日。全児死亡の認められた 200 IU/kg/日投与群の 1 例は分娩後 3 日に剖検を実施し、異常所見は認められなかった

2.6.7.9.5 生殖発生毒性試験 –ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 （続き）

試験番号：[redacted]24		被験物質：KW-3357		
投与量 (IU/kg/日)	0 (対照)	200	600	2000
F_0 母動物				
AT 活性 (%)[a)、b)]				
妊娠 7 日 投与開始後 10 分：	104	413*	904*	3024*
投与開始後 24 時間：	115	132*	156*	274*
分娩後 4 日 投与開始後 24 時間：	125	138*	162*	287*
分娩後 21 日 投与開始後 10 分：	103	370*	780*	2808*
投与開始後 24 時間：	116	125	155**	285**
血漿中濃度 (IU/mL)[a)、c)]				
妊娠 7 日 投与開始後 10 分：	BLQ	4.16	11.3	35.7
投与開始後 24 時間：	NA	0.136	0.403	1.45
分娩後 4 日 投与開始後 24 時間：	NA	0.123	0.359	1.41
分娩後 21 日 投与開始後 10 分：	BLQ	3.35	9.62	32.0
投与開始後 24 時間：	NA	0.143	0.410	1.52
$AUC_{0\text{-}24}$ (IU·h/mL)				
妊娠 7 日	NA	51.5	141	446
分娩後 21 日	NA	41.9	120	402
抗 KW-3357 抗体の産生[a)、d)、e)]：	NA	0/5	0/5	0/5
F_1 出生児				
血漿中濃度 (IU/mL)[f)] 出生後 4 日：	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ

数値：平均値又は例数　BLQ：定量下限 (KW-3357 タンパク質濃度として 100 ng/mL、抗トロンビン活性表示では[redacted] mIU/mL) 未満　NA：適応外

*：p<0.05、**：p<0.01 (vs 対照群、Dunnett’s multiple comparison test 又は Steel’s multiple comparison test)

a) サテライト群を用いて評価、妊娠動物数は全群で 5 例

b) 合成基質法に基づく抗 Factor Xa 活性を測定、既知濃度のヒト標準血漿を標準物質とし、ヒト標準活性に対する相対活性として算出、動物由来の活性を含む

c) ELISA により測定した血漿中 KW-3357 タンパク質濃度に、試験に使用した被験物質の抗トロンビン活性を乗じて算出した換算値、検定は未実施

d) 抗 KW-3357 抗体産生が認められた雌動物数/ 当該群の全検査動物数

e) 分娩 35 日の剖検前

f) 生後 4 日の同腹児調整時の淘汰児から採血

2.6.7.9.5 生殖発生毒性試験 –ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 （続き）

試験番号：[redacted]24		被験物質：KW-3357		
投与量 (IU/kg/日)	0 (対照)	200	600	2000
F_1 出生児 (離乳前)：				
評価母動物数	20	20	20	20
出生児数：	14.20	14.05	13.25	12.95
死亡産児率 (%)：	0.74	1.78	0.38	0.72
生存出生児数：	14.10	13.80	13.20	12.85
出生率 (%)：	94.30	91.63	92.08	91.72
性比 [a]：	141/141 (1.00)	153/123 (1.24)	130/134 (0.97)	124/133 (0.93)
外表異常児数：	0	0	0	0
出生児生存率 (%)出生後 4 日：	98.51	94.64	98.81	98.63
離乳率 (%)[b]	100.00	100.00	100.00	100.00
体重 (g)　生後 0 日　雄：	6.4	6.4	6.7	6.7
雌：	6.1	6.0	6.3	6.3
生後 21 日　雄：	58.3	57.2	59.0	59.2
雌：	56.7	55.7	57.8	57.0
剖検 [c]：	–	–	–	–

数値：平均値又は例数　–：KW-3357 に起因する異常なし

a) 生存雄胎児数/生存雌胎児数、括弧内の数値はその比

b) (離乳時の生児数/腹児数調整後の生児数)×100

c) 出生後 22 日 (離乳時)

2.6.7.9.5 生殖発生毒性試験 –ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 （続き）

試験番号：[redacted]24		被験物質：KW-3357		
投与量 (IU/kg/日)	0 (対照)	200	600	2000
F_1 雄 (離乳後)：				
評価動物数 a)：	20	19	20	20
死亡及び屠殺動物数：	0	0	0	0
一般状態 b)：	–	–	–	–
体重 (g)　　生後 84 日：	522.1	514.0	529.0	549.1
摂餌量 (g)　生後 84 日：	32.9	32.4	32.9	33.9
発育分化検査 c)：	–	–	–	–
機能検査 d)：	–	–	–	–
学習能力検査 e)：	–	–	–	–
情動性検査 f)：	–	–	–	–
剖検 g)：	–	–	–	–
交配までの平均所要日数：	4.31	3.39	3.24	3.06
交尾率 (%) h)：	16/20 (80.00)	18/19 (94.74)	17/20 (85.00)	18/20 (90.00)
授胎率 (%) i)：	15/16 (93.75)	18/18 (100.00)	16/17 (94.12)	17/18 (94.44)

数値：平均値又は例数　－：KW-3357 の影響なし

a) 母動物ごとに 1 例の離乳児を選択

b) 200 IU/kg/日投与群の 1 例で出生後 65～67 日に緩徐呼吸が、出生後 65～86 日に自発運動の低下が認められた。本動物では、体重、体重増加量、摂餌量は対照群と比較して低値であり、陰茎亀頭包皮分泌腺開裂の遅れが認められ、交配は確認されなかった。剖検では心臓の肥大が認められたことから、本動物で認められた変化は、先天的な心臓の欠陥によるものである可能性が考えられた。また、2000 IU/kg/日投与群の 1 例で出生後 68～110 日まで精巣の小型が認められた。いずれも、1 例のみの変化であることから、被験物質の影響ではないと判断した

c) 耳介展開 (生後 4 日)、切歯萌出 (生後 10 日)、眼瞼開裂 (生後 15 日)、陰茎亀頭包皮分泌腺開裂 (生後 42 日、情動性・学習能力検査及び生殖能力検査に供する動物のみ)

d) 面上正向反射及び同側屈筋反射 (生後 5 日)、視覚性踏み直り反射 (生後 16 日)、耳介反射 (生後 28 日、行動・学習能力検査及び生殖能力検査に供する動物のみ)

e) 水迷路テスト (生後 42 から 45 日)

f) オープンフィールドテスト (生後 56 日)

g) 交配期間終了翌日 (12～13 週齢で交配開始、交配期間は最長 2 週間)

h) 交尾の確認された雄動物数/同居した雄動物数、括弧内の数値はその比率 (%)

i) 授胎能力の確認された雄動物数/交尾の確認された雄動物数、括弧内の数値はその比率 (%)

2.6.7.9.5 生殖発生毒性試験 –ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 （続き）

試験番号：[redacted]24		被験物質：KW-3357		
投与量 (IU/kg/日)	0 (対照)	200	600	2000
F_1 雌 (離乳後)：				
評価動物数 a)：	20	19	20	20
死亡及び屠殺動物数：	0	0	0	0
一般状態：	–	–	–	–
体重 (g)　出生後 84 日：	298.2	285.8	288.4	300.6
妊娠 13 日：	361.2	363.8	363.6	379.4
摂餌量 (g)　出生後 84 日：	21.7	21.4	21.1	21.9
発育分化検査 b)：	–	–	–	–
機能検査 c)：	–	–	–	–
学習能力検査 d)：	–	–	–	–
情動性検査 e)：	–	–	–	–
剖検 f)：	–	–	–	–
交尾率 (%) g)：	16/20 (80.00)	18/19 (94.74)	17/20 (85.00)	18/20 (90.00)
受胎率 (%) h)：：	15/16 (93.75)	18/18 (100.00)	16/17 (94.12)	17/18 (94.44)

数値：平均値又は例数　－：KW-3357 の影響なし

a) 母動物ごとに 1 例の離乳児を選択

b) 耳介展開 (生後 4 日)、切歯萌出 (生後 10 日)、眼瞼開裂 (生後 15 日)、腟開口 (生後 42 日、行動・学習能力検査及び生殖能力検査に供する動物のみ)

c) 面上正向反射及び同側屈筋反射 (生後 5 日)、視覚性踏み直り反射 (生後 16 日)、耳介反射 (生後 28 日、行動・学習能力検査及び生殖能力検査に供する動物のみ)

d) 水迷路テスト (生後 42 から 45 日)

e) オープンフィールドテスト (生後 56 日)

f) 交尾が確認された動物は、交尾成立日を妊娠 0 日として妊娠 13 日に剖検及び帝王切開、交尾が確認されなかった動物は交配期間終了翌日 (12～13 週齢で交配開始、交配期間は最長 2 週間)

g) 交尾の確認された雌動物数/同居した雌動物数、括弧内の数値はその比率 (%)

h) 受胎した雌動物数/交尾の確認された雌動物数、括弧内の数値はその比率 (%)

2.6.7.9.5 生殖発生毒性試験 –ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 （続き）

試験番号：[redacted]24		被験物質：KW-3357		
投与量 (IU/kg/日)	0 (対照)	200	600	2000
F_2 胎児				
評価母体数：	15	18	16	17
黄体数：	14.27	15.00	15.00	15.24
着床数：	11.87	14.33*	13.94	13.71
着床前死亡率 (%)：	17.52	4.64	7.12	9.22
死胚率 (%)：	7.71	8.25	7.41	7.96
生存胎児数：	11.07	13.11	12.81	12.65

数値：平均値又は例数

* $p<0.05$ (vs 対照群、Dunnett’s multiple comparison test 又は Steel’s multiple comparison test)

2.6.7.10 その他の試験

2.6.7.10.1 局所刺激性試験

被験物質：KW-3357						
動物種/系統	投与方法	投与量 (mL/site)[a)]	性別及び一群の動物数[b)]	特記すべき所見	試験番号	CTD における記載箇所
ウサギ/Kbl:JW	静脈内	3	雄性/6 例/群	いずれの投与経路においても、KW-3357 投与に起因した毒性学的に意義のある変化は認められず、血管刺激性、血管周囲刺激性の可能性はないと考えられた	[redacted]32	4.2.3.6-1
	皮下（静脈周囲）	0.3	雄性/6 例/群			

a) KW-3357 製剤 (KW-3357 タンパク質濃度として [redacted]mg/mL) 又は生理食塩液を投与

b) 各群 3 例を投与 2 日後、残りの 3 例を投与 14 日後に解剖