目次

2.4 非臨床試験の概括評価 4
2.4.1 緒言 4
2.4.1.1 非臨床試験計画概略 5
2.4.1.2 被験物質 7
2.4.2 薬理試験 11
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 11
2.4.2.2 副次的薬理試験 12
2.4.2.3 安全性薬理試験 13
2.4.2.3.1 中枢神経系安全性薬理 13
2.4.2.3.2 心血管系安全性薬理 13
2.4.2.3.3 呼吸器系安全性薬理 13
2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用 13
2.4.3 薬物動態試験 14
2.4.3.1 分析法 14
2.4.3.1.1 セベリパーゼ　アルファの ELISA 14
2.4.3.1.2 セベリパーゼ　アルファの酵素活性測定法 14
2.4.3.1.3 抗薬物抗体（ADA）検出法 14
2.4.3.2 単回投与後の薬物動態 15
2.4.3.3 反復投与後の薬物動態 17
2.4.4 毒性試験 21
2.4.4.1 単回投与毒性試験 21
2.4.4.2 反復投与毒性試験 22
2.4.4.2.1 SD ラット 22
2.4.4.2.2 カニクイザル 23
2.4.4.2.2.1 サルの 4 週間静脈内持続投与毒性試験及び 2 週間回復性試験 23
2.4.4.2.2.2 サルの 6 ヵ月間静脈内持続投与毒性試験及び 2 週間回復性試験 24
2.4.4.3 遺伝毒性試験 25

2.4.4.4 がん原性試験 25
2.4.4.5 生殖発生毒性試験 26
2.4.4.5.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 26
2.4.4.5.2 胚・胎児発生に関する試験 28
2.4.4.5.2.1 ラットの胚・胎児発生に関する試験 28
2.4.4.5.2.2 ウサギの胚・胎児発生に関する試験 29
2.4.4.5.3 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 30
2.4.4.6 局所刺激性試験 32
2.4.4.7 幼若動物を用いた試験 33
2.4.4.8 免疫原性 33
2.4.4.9 不純物 34
2.4.4.10 安全域 34
2.4.5 総括及び結論 36
2.4.6 参考文献 39
2.4.7 試験を実施しなかった理由 43

表目次

表 2.4-1 セベリパーゼ アルファの非臨床試験に使用した被験物質に関する情報 8
表 2.4-2 セベリパーゼ アルファ単回投与後の薬物動態及びトキシコキネティクスパラメータ（平均値） 16
表 2.4-3 セベリパーゼ アルファ反復投与における最終投与後のトキシコキネティクスパラメータ（平均値） 18
表 2.4-4 反復投与毒性試験における無毒性量及びヒト等価用量並びに安全域 35
表 2.4-5 生殖発生毒性試験における無毒性量及びヒト等価用量並びに安全域 36
表 2.4-6 実施しなかった試験の一覧 43

図目次

図 2.4-1 カニクイザルにセベリパーゼ アルファを静脈内持続投与したときの初回投与時（投与 1 日目、パネル A）及び最終投与時（投与 176 日目、パネル B）の血清中セベリパーゼ アルファ濃度推移 20

略語一覧

略語	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
4MUO	4-methylumbelliferyl oleate	4-メチルウンベリフェリルオレアート
4MU	4-methylumbelliferone	4-メチルウンベリフェロン
ADA	Anti-drug antibody	抗薬物抗体
ALP	Alkaline phosphatase	アルカリホスファターゼ
ALT	Alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AUC_{last}	Area under concentration-time curve from start of dose administration (0 hour) to the time after dosing at which the last quantifiable concentration was observed	投与開始（0 時間）から定量可能な血清中濃度が観測された最終時間までの濃度–時間曲線面積
CDER	Center for Drug Evaluation and Research	医薬品評価研究センター
C_{max}	Maximum observed serum concentration	最高血清中濃度
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酵素免疫測定法
FDA	Food and Drug Administration	（米国）食品医薬品局
GlcNAc	N-acetylglucosamine	N-アセチルグルコサミン
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GMP	Good Manufacturing Practice	医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質の基準
HRP	Horseradish peroxidase	西洋ワサビペルオキシダーゼ
ICH	International Conference on Harmonisation	医薬品規制調和国際会議
LAL	Lysosomal acid lipase	ライソゾーム酸性リパーゼ
LLOQ	Lower limit of quantitation	定量下限
M6P	Mannose-6-phosphate	マンノース-6-リン酸
MMR	Macrophage mannose receptor	マクロファージマンノース受容体
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
PK	Pharmacokinetic	薬物動態
SD	Sprague-Dawley	–
$t_{1/2}$	Elimination half-life	消失半減期
TK	Toxicokinetic	トキシコキネティクス
TMB	3,3’,5,5’-tetramethylbenzidine	3,3’,5,5’-テトラメチルベンジジン

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 緒言

セベリパーゼ　アルファはライソゾーム酸性リパーゼ（LAL）欠損症に対する酵素補充療法治療薬である。LAL 欠損症は稀な遺伝性疾患であり、患者は重要なライソゾーム酵素である LAL を欠損している。LAL 欠損症は重篤で進行性の生命を脅かす疾患であり、有効な治療法はない。

LAL 欠損症は単一疾患であるが、他のライソゾーム病及び先天性代謝異常で認められるように、LAL 欠損症患者の症状は時間とともに進行する（Grabowski, 2012, *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease [online]*）。この疾患範囲は幅広く、乳児期に急速に進行する症状から、小児及び成人における症状までに及ぶ。前者では通常生後 6 ヵ月以内に死亡し、後者では発症、疾患進行率及び診断が広範な年齢範囲でみられる。

乳児の LAL 欠損症の症状は、歴史的にしばしばウォルマン病と呼ばれ、通常生後 6 ヵ月以内に死に至る非常に稀な型の LAL 欠損症である（Grabowski, 2012, *The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases [online]*）。この型の疾患は最も急速に LAL 欠損症の症状が進行し、成長障害及び肝腫大を特徴とする重度の肝臓病、血清トランスアミナーゼ値の増加、高ビリルビン血症、凝固障害及び低アルブミン血症を伴う。これらは主要な臨床的特徴であり、早期死亡率に対する重要な寄与因子である（Anderson, 1999, *Mol Genet Metab*; Mayatepek, 1999, *J Inherit Metab Dis*）。肝線維症及び肝硬変は急速に発症し、これらは生後 6 ヵ月以内の患児において報告されている（Marshall, 1969, *Arch Dis Child*; Konno, 1966, *Tohoku J Exp Med*; Crocker, 1965, *Pediatrics*）。

LAL 欠損症の症状は幅広く、患者は小児から 40 代の成人（稀にこれを超える）まで認められる。肝臓及び脂質の異常が臨床像の特徴で、著明な肝腫大、血清トランスアミナーゼ値の増加、肝臓組織中コレステロールエステル含有量の増加、肝線維症、肝硬変、脂質異常症並びに急速進行性粥状動脈硬化を伴う（Ambler, 2013, *JIMD Rep*; Anderson, 1999, *Mol Genet Metab*; Grabowski, 2012, *The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases [online]*; Beaudet, 1977, *J Pediatr*; Elleder, 2000, *Virchows Arch*; Dincsoy, 1984, *Am J Clin Pathol*; Partin, 1969, *Gastroenterol*; Sloan, 1972, *J Clin Invest*）。この LAL 欠損症の症状は歴史的にコレステロールエステル蓄積症（CESD）として知られている。

現在では各種ライソゾーム病の治療法として多くの酵素補充療法治療薬が承認されている。しかし、現在でも安全かつ効果的な LAL 欠損症の治療法はない。

セベリパーゼ　アルファはトランスジェニックニワトリの卵白から精製された遺伝子組換えヒトライソゾーム酸性リパーゼであり、ヒト固有の酵素と同一のアミノ酸配列を有する。セベリパーゼ　アルファの分子量は約 55 kD であり、ライソゾーム内でコレステロールエステル及びトリグリセリドから遊離コレステロール、グリセロール及び遊離脂肪酸への加水分解を触媒する。セベリパーゼ　アルファは、末端 N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）、マンノース及びマンノース-6-リン酸（M6P）を伴う N 結合型糖鎖を含有しており、これらはマクロファージマンノース受容体（MMR）又は広範に発現する M6P 受容体を介した細胞への取り込みを促進している。欠損又は不足している LAL を遺伝子組換えヒト型酵素で補充することにより、セベリパーゼ　アルファは LAL 欠損標的細胞の LAL 活性を増加させ、全身に蓄積したコレステロールエステル及びトリグリセリドを低下させることにより、LAL 欠損症に伴う有害作用を減少させる。

セベリパーゼ　アルファはクエン酸三ナトリウム二水和物、クエン酸一水和物及びヒト血清アルブミンを含有する製剤として供給され、静脈内持続投与前に滅菌生理食塩液で希釈する。静脈内持続投与はセベリパーゼ　アルファの予定臨床投与経路である。

セベリパーゼ　アルファは LAL 欠損症治療のための希少疾病用医薬品に指定されている。

2.4.1.1　非臨床試験計画概略

セベリパーゼ　アルファの非臨床試験では、本剤の作用機序に焦点をあてて評価した。

効力を裏付ける薬理作用はげっ歯類及びカニクイザルで評価可能であった。これらの動物種では酵素活性及びライソゾーム標的指向化機序が種を超えて保存されており、遺伝子組換えヒト酵素の作用を両種の非臨床疾患モデル（存在する場合）及び毒性試験内で確実に検討することが可能である。

セベリパーゼ　アルファの非臨床試験として、効力を裏付ける試験 6 試験、安全性薬理試験 2 試験、安全性薬理及び毒性試験 1 試験並びに毒性試験 10 試験を実施した。薬物動態及びトキシコキネティクス評価は、前述の試験のうち 7 試験（効力を裏付ける試験 1 試験及び毒性試験 6 試験）で検討した（2.4.7 項参照）。非臨床試験計画は ICH M3（R2）ガイドライン（医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験実施についてのガイダンス）、ICH S6（R1）ガイドライン（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）及び ICH S7A（安全性薬理試験ガイドライン）に準拠して実施した。すべての重要な非臨床試験は、代

表的な臨床グレードの製剤を用いて、米国食品医薬品局（FDA）、経済協力開発機構（OECD）及び厚生労働省の非臨床試験のためのガイドラインに従って実施した。

以下の薬理試験を実施した。

- MMR を発現しているラット肺胞マクロファージ細胞におけるセベリパーゼ　アルファの *in vitro* 取り込み及びライソゾーム局在化
- MMR を発現しているラット肺胞マクロファージ細胞を用いた競合結合実験における MMR に対するセベリパーゼ　アルファの *in vitro* 結合
- LAL 欠損症患者由来の M6P を発現している非形質転換線維芽細胞におけるセベリパーゼ　アルファとのインキュベーション後の *in vitro* LAL 活性増加
- LAL 欠損症ラットモデルにおけるセベリパーゼ　アルファの *in vivo* 薬理作用
- 中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に対するセベリパーゼ　アルファの安全性薬理

これらの試験成績の要約を、2.6.2 薬理試験の概要文及び 2.6.3 薬理試験概要表に示した。

以下の薬物動態試験を実施した。

- Sprague-Dawley（SD）ラットにおけるセベリパーゼ　アルファの薬物動態（PK）プロファイル
- SD ラット及びカニクイザルにおけるセベリパーゼ　アルファのトキシコキネティクス（TK）プロファイル
- 妊娠 SD ラット及び妊娠 New Zealand White ウサギにおけるセベリパーゼ　アルファの TK プロファイル

これらの試験成績の要約を、2.6.4 薬物動態試験の概要文及び 2.6.5 薬物動態試験概要表に示した。

以下の毒性試験を実施した。

- カニクイザルにおけるセベリパーゼ　アルファの単回投与毒性試験
- SD ラット及びカニクイザルにおけるセベリパーゼ　アルファの 4 週間反復投与毒性試験
- カニクイザルにおけるセベリパーゼ　アルファの 6 ヵ月間反復投与毒性試験

- SD ラット及び New Zealand White ウサギにおけるセベリパーゼ　アルファの生殖発生毒性試験

これらの試験成績の要約を、2.6.6 毒性試験の概要文及び 2.6.7 毒性試験概要表に示した。

今回の非臨床試験計画は、臨床試験で使用され、申請時の用法用量案で推奨される用法及び用量でセベリパーゼ　アルファを臨床使用することを支持するとともに、セベリパーゼ　アルファの製造販売承認申請を適切に支持している。

2.4.1.2　被験物質

今回の非臨床試験計画では、臨床試験で使用する代表的な製剤を適切に評価した（表 2.4-1）。毒性試験（トキシコキネティクス検討）及び安全性薬理試験では、臨床試験で使用する代表的な製剤を用いて実施した。これらの試験では、セベリパーゼ　アルファ（表示濃度 2 mg/mL）は、クエン酸三ナトリウム二水和物（13.7 mg/mL）、クエン酸一水和物（1.57 mg/mL）及びヒト血清アルブミン（10 mg/mL）を含有する製剤として供給され、静脈内持続投与前に滅菌生理食塩液で 1 : 1 に希釈した。効力を裏付ける試験ではセベリパーゼ　アルファを生理食塩液で調製したが、この処方は臨床試験で使用されていない。

製剤は、医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理の基準（GMP）に準拠して製造した。製剤の添加物は一般に安全性が認められているため、安全性に関する懸念はないと考えられる。

表 2.4-1　セベリパーゼ　アルファの非臨床試験に使用した被験物質に関する情報

試験番号	試験種、投与経路、動物種	製剤ロット番号	製造者	臨床試験での使用
SBC102-T003（8234874）	単回投与毒性試験、静脈内持続投与、カニクイザル	[redacted][a]	Synageva BioPharma	NA
SBC102-T002（8232384）	4 週間投与毒性試験、静脈内持続投与、SD ラット[c]			
SBC102-T001（8232455）	4 週間投与毒性試験、静脈内持続投与、カニクイザル			
SBC102-T002（8232384）	4 週間投与毒性試験、静脈内持続投与、SD ラット[c]	[redacted][a]	Synageva BioPharma	NA
SBC102-T001（8232455）	4 週間投与毒性試験、静脈内持続投与、カニクイザル			
SBC102-T004（8232454）	安全性薬理試験（心血管系）、静脈内持続投与、カニクイザル			
SBC102-T005（8232453）	安全性薬理試験（呼吸器系）、静脈内持続投与、SD ラット			
SBC102-T006（20006580）	6 ヵ月間投与毒性試験、静脈内持続投与、カニクイザル	[redacted][a]	Synageva BioPharma	NA
		[redacted][a]	Synageva BioPharma	NA
		[redacted][a]	Synageva BioPharma	NA
		[redacted][a]	Synageva BioPharma	LAL-CL01 LAL-CL03
SBC102-T007（902522）	胚・胎児発生に関する試験（予備）、静脈内持続投与、SD ラット	[redacted][a]	Synageva BioPharma	NA
SBC102-T008（902523）	胚・胎児発生に関する試験（予備）、静脈内持続投与、New Zealand White ウサギ	[redacted][a]	Synageva BioPharma	NA
SBC102-T009（902526）	受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（雄）、静脈内持続投与、SD ラット	[redacted][a]	Synageva BioPharma	NA

表 2.4-1　セベリパーゼ　アルファの非臨床試験に使用した被験物質に関する情報（続き）

試験番号	試験種、投与経路、動物種	製剤ロット番号	製造者	臨床試験での使用
SBC102-T010（902528）	受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（雌）、静脈内持続投与、SD ラット	[redacted][a]	Synageva BioPharma	NA
SBC102-T011（902524）	胚・胎児発生に関する試験、静脈内持続投与、SD ラット			
SBC102-T013（902527）	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、静脈内持続投与、SD ラット			
SBC102-T012（902525）	胚・胎児発生に関する試験、静脈内持続投与、New Zealand White ウサギ	[redacted][a]	Synageva BioPharma	NA
SBC102-P001	ラット肺胞マクロファージにおけるセベリパーゼ　アルファの取り込み	[redacted][b]	Synageva BioPharma	NA
SBC102-P001	LAL 欠損ヒト線維芽細胞におけるセベリパーゼ　アルファの取り込み	[redacted][b]	Synageva BioPharma	NA
SBC102-P002	LAL 欠損ラットにおけるセベリパーゼ　アルファの薬物動態及び薬理作用	[redacted][b]	Synageva BioPharma	NA
SBC102-P005	LAL 欠損ラットにおけるセベリパーゼ　アルファの投与開始を遅らせた際の有効性	[redacted][b]	Synageva BioPharma	NA
		[redacted][b]	Synageva BioPharma	NA

表 2.4-1　セベリパーゼ　アルファの非臨床試験に使用した被験物質に関する情報（続き）

試験番号	試験種、投与経路、動物種	製剤ロット番号	製造者	臨床試験での使用
SBC102-P005	LAL 欠損ラットにおけるセベリパーゼ　アルファの投与開始を遅らせた際の有効性	[redacted][b]	Synageva BioPharma	NA
SBC102-P012	セベリパーゼ　アルファを 1 週間に 1 回 4 週間投与した LAL 欠損ラットにおける肝臓中コレステロール及びトリグリセリドの消失と再蓄積			
SBC102-P012	セベリパーゼ　アルファを 1 週間に 1 回 4 週間投与した LAL 欠損ラットにおける肝臓中コレステロール及びトリグリセリドの消失と再蓄積	[redacted][b]	Synageva BioPharma	NA
		[redacted][b]	Synageva BioPharma	NA
SBC102-P003	LAL 欠損ラットの生存率解析	NA[d]	NA	NA
SBC102-P006	LAL 欠損及び野生型ラット表現型– 臨床観察	NA[d]	NA	NA

NA = 該当せず

a　毒性試験（トキシコキネティクス検討）及び安全性薬理試験に使用したセベリパーゼ　アルファは、臨床試験と同じ製剤とした:クエン酸三ナトリウム二水和物（13.7 mg/mL）、クエン酸一水和物（1.57 mg/mL）及びヒト血清アルブミン（10 mg/mL）。重要な毒性試験で使用したロットの分析結果はモジュール 3 品質に関わる資料に添付した。

b　効力を裏付ける試験に使用したロットのセベリパーゼ　アルファは生理食塩液で調製したが、この処方は臨床試験で使用されていない。これらのロットは、毒性試験（GLP）及び臨床試験で使用した GMP スケールの製造工程が確立する前に、実験室スケールで製造した。実験室スケールロットの分析結果はモジュール 3 品質に関わる資料に添付していない。

c　SBC102-T002 試験には中枢神経系に対する影響に関する安全性薬理評価が含まれている。

d　SBC102-P003 及び SBC102-P006 試験は、溶媒又はセベリパーゼ　アルファを投与していない観察試験である。

2.4.2 薬理試験

セベリパーゼ　アルファの効力を裏付ける薬理活性を、適切な *in vitro* 試験及び LAL 欠損症動物モデルを用いた適切な *in vivo* 試験で評価した。*In vitro* 試験ではリン酸緩衝食塩液にて、また、*in vivo* 試験では生理食塩液にてセベリパーゼ　アルファを調製した。これらの試験は医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）には準拠していないが、現在の科学的水準に照らし適正に実施した。

適切な動物種を用いてセベリパーゼ　アルファの安全性薬理評価を行った。これらの試験は FDA の GLP 規則、米国連邦規則集の Title 21、Part 58 及びそれらに適用される改正に従って実施した。安全性薬理試験では、セベリパーゼ　アルファを臨床試験と同じ緩衝液［クエン酸三ナトリウム二水和物（13.7 mg/mL）、クエン酸一水和物（1.57 mg/mL）及びヒト血清アルブミン（10 mg/mL）］で調製した。

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

酵素補充療法治療薬とは、ライソゾーム蓄積症の原因である酵素活性の低下又は欠損に対して、その欠損又は不足している酵素を組換え技術によるヒト型酵素で補充するという根本的な原因に対する治療手法である。LAL 欠損症では、補充酵素であるセベリパーゼ　アルファは病因となっている LAL を欠損した重要な標的細胞中での LAL 活性を増加させ、全身でライソゾームに蓄積したコレステロールエステル及びトリグリセリドを低下させることにより、医学的に重要な LAL 欠損による有害作用を減少させる。

蛍光標識したセベリパーゼ　アルファを用いた *in vitro* 実験により、MMR を発現しているラットマクロファージ細胞株で MMR 依存的な細胞内取り込みとライソゾームへの局在化が示された。また、このマクロファージ細胞でのセベリパーゼ　アルファの結合及び取り込みに対するマンノースの濃度依存的競合阻害作用も示され、その作用はセベリパーゼ　アルファが MMR を介して細胞内に取込まれることが示唆された。さらに、M6P を発現している LAL 欠損症乳児由来のヒト LAL 欠損線維芽細胞にセベリパーゼ　アルファを添加するとセベリパーゼ　アルファは細胞内に取り込まれ、セベリパーゼ　アルファによる濃度依存的な LAL 活性の回復がみられた。

LAL 欠損症ラットモデルで、セベリパーゼ　アルファの *in vivo* 薬理特性と酵素補充の有効性を評価した。Yoshida ラットは自然発生した LIPA 遺伝子の 3’欠失変異を有し、LAL 欠損症を生じる Donryu ラットである（Yoshida, 1990, *Lab Anim Sci*）。このホモ型 LAL 欠損ラットは肝腫

大などの著明な臓器肥大、血清トランスアミナーゼ値の増加、成長障害及び寿命の短縮等のヒト疾患に類似した多臓器異常を呈する。

セベリパーゼ　アルファの投与はLAL欠損症による異常を改善した。LAL欠損ラットに4週齢からセベリパーゼ　アルファを1回あたり5 mg/kgの用量で1週間に1回4週間投与すると、体重増加の亢進、臓器重量の低下及び組織脂質含有量の低下によって示されるように、関連病態が軽減された。溶媒を投与したLAL欠損ラットと比べて、これらの変化は統計的に有意であると考えられた。肉眼的病理検査では、臓器重量の低下に加えて肝臓の色の正常化が認められた。溶媒を投与したLAL欠損ラットと極めて対照的に、セベリパーゼ　アルファを投与したLAL欠損ラットでは正常な肝臓の病理組織学的所見が認められた。

LAL欠損ラットの疾患重症度が週齢により進行することから、より進行した病態でのセベリパーゼ　アルファの有効性も評価した。8週齢からセベリパーゼ　アルファを1回あたり3 mg/kgの用量で1週間に1回19週間投与することにより、体重増加の亢進、成長速度の改善、臓器肥大の縮小、組織LAL基質含有量の低下及び血清トランスアミナーゼ値の改善が認められた。それらの改善効果に伴い、肝臓の病理組織学的所見の改善が認められた。これらの改善は生存率の改善を伴っていた。より進行した病態（8週齢から投与）でのセベリパーゼ　アルファの改善効果は、4週齢から短期間（4週間）投与した際にみられた効果と同等であった。セベリパーゼ　アルファの改善効果は抗薬物抗体（ADA）存在下においても持続した。

セベリパーゼ　アルファ投与中止後に起きる薬理的異常の経時変化を評価したところ、投与中止後3週という早期に肝臓重量の増加と共に肝臓コレステロール及びトリグリセリド含有量の増加、血清アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ及びアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）値の増加と血清高比重リポタンパク質の低下が認められた。これらのことから、LAL欠損ラットで薬効を維持するためにはセベリパーゼ　アルファの継続投与が必要であり、また、ラットにおいては3週間未満の投与間隔が重要であると考えられた。

2.4.2.2　副次的薬理試験

副次的薬理試験は実施していない。セベリパーゼ　アルファは、補充療法を目的とした、欠損酵素に生化学的に高い相同性を持つ遺伝子組換え内因性酵素であることから、副次的薬理作用は想定されない。特定の非臨床副次的薬理試験を必要とする科学的根拠は認められなかった。

2.4.2.3 安全性薬理試験

2.4.2.3.1 中枢神経系安全性薬理

SD ラットにセベリパーゼ　アルファを 1 回あたり 0、5、20 及び 50 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回 4 週間静脈内持続投与した毒性試験で、中枢神経系評価として行動観察、自律神経機能評価及び外観観察を実施した。投与 1 日及び投与最終週に実施したホームケージテスト、ハンドヘルドテスト、オープンフィールドテスト及び誘発行動観察では、セベリパーゼ　アルファ投与に関連した変化は認められなかった。したがって、セベリパーゼ　アルファによると考えられる中枢神経系に対する毒性作用は観察されなかった。

2.4.2.3.2 心血管系安全性薬理

薬物投与歴のない覚醒カニクイザルに、無線テレメトリー装置及び静脈アクセスポートを装着した後にセベリパーゼ　アルファを 0 及び 50 mg/kg の用量で単回静脈内持続投与し、心血管系に対する作用を評価した。各時点で血行動態パラメータ（平均血圧、収縮期血圧、拡張期血圧及び心拍数）、深部体温及び心電図（PR、QRS、QT 及び QTc 間隔）を記録し、解析した。その結果、血行動態パラメータ及び深部体温に生物学的に有意な変化はなく、心電図異常及び QT/QTc 延長も認められなかった。

2.4.2.3.3 呼吸器系安全性薬理

SD ラットにセベリパーゼ　アルファを 0､5､20 及び 50 mg/kg の用量で単回静脈内持続投与し、呼吸器系に対する作用を評価した。セベリパーゼ　アルファを投与した動物では、いずれの時点においても 1 回換気量及び呼吸数に統計的に有意な変化又は生物学的に関連があると考えられる変化は認められなかったが、20 及び 50 mg/kg 群では、5 時間の持続投与中に統計的に有意ではない呼吸数の上昇傾向がみられた。50 mg/kg 群では換気量の増加傾向及び 20 mg/kg 群では共変量を調整した平均換気量の有意な増加がみられたが、20 及び 50 mg/kg 群でみられた呼吸数の上昇傾向に起因するものである可能性が高い。変化が軽度であること及び持続投与後の可逆性を考慮すると、これらの変化は毒性学的に意味があるとは考えられなかった。

2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用

薬力学的薬物相互作用の可能性について考察した。セベリパーゼ　アルファは欠損した内因性酵素に対する酵素補充療法治療薬であることから、特定の非臨床薬力学的薬物相互作用試験を必要とする科学的根拠は見当たらず、実施していない。

2.4.3 薬物動態試験

薬物動態試験及びトキシコキネティクス試験の結果を以下に要約した。重要な組織への分布、用量及び投与方法に関する知見は、効力を裏付ける試験の結果から容易に入手可能であったことから（2.4.2.1 項参照）、セベリパーゼ　アルファの非臨床評価のうち、生体内分布試験は実施しなかった。

2.4.3.1 分析法

セベリパーゼ　アルファの血清中濃度は、ラットにおける単回投与 PK 試験では酵素免疫測定法（ELISA）により、その他の TK 試験では酵素活性測定法により測定した。各試験の定量下限（LLOQ）は 2.6.5 薬物動態試験概要表に示した。ADA は ELISA により検出し、中和抗体は酵素活性測定法により検出した。

2.4.3.1.1 セベリパーゼ　アルファの ELISA

ELISA では、マウス抗ヒト LAL モノクローナル抗体を捕捉抗体としてコーティングしたマイクロプレートに希釈した血清検体を添加した。結合したセベリパーゼ　アルファを、ウサギ抗ヒト LAL 抗体、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）標識したヤギ抗ウサギ抗体及び基質である 3,3’,5,5’-テトラメチルベンジジン（TMB）を順次加えて検出した。

2.4.3.1.2 セベリパーゼ　アルファの酵素活性測定法

セベリパーゼ　アルファのリパーゼ酵素活性は、蛍光性基質である 4-メチルウンベリフェリルオレアート（4MUO）の分解により生成する蛍光性の 4-メチルウンベリフェロン（4MU）を励起波長 360 nm、蛍光波長 460 nm で検出することにより測定した。結果は相対蛍光強度で示した。30 分間における基質の分解量を 4MU の検量線から求めた。37°C において 1 分間に 1 µmol の 4MUO を分解するために必要な酵素量を 1 単位と定義した。

2.4.3.1.3 抗薬物抗体（ADA）検出法

ADA は ELISA により検出し、中和抗体は酵素活性測定法により検出した。

ELISA では、セベリパーゼ　アルファをコーティングしたマイクロプレート中で血清検体をインキュベートした。その後、固相化セベリパーゼ　アルファに結合した ADA に対してビオチン標識したセベリパーゼ　アルファを添加した。結合した ADA は、HRP 標識したストレプトアジビン及びペルオキシダーゼの存在で発色団を生成する基質（TMB）を順次添加することに

より検出した。マイクロプレートリーダーにより、プレートの吸光度を測定した（スクリーニング試験）。

このスクリーニング試験で陽性を示した検体について、ADA の存在を確認するために免疫除去試験を実施した（確認試験）。ADA の分析プレート上の固相化セベリパーゼ　アルファへの結合をブロックするために、スクリーニング試験で陽性を示した検体をセベリパーゼ　アルファと共にあらかじめインキュベートした。その後、前述の ELISA により、マイクロプレートの吸光度の減少を測定した。

中和抗体の存在は、抗体陽性検体をセベリパーゼ　アルファとインキュベーション後、2.4.3.1.2 項と同様に酵素活性を測定することによって検出した。

2.4.3.2　単回投与後の薬物動態

SD ラットにセベリパーゼ　アルファ（生理食塩液で調製）を 1 及び 5 mg/kg の用量で単回静脈内急速投与したときの PK を評価した。セベリパーゼ　アルファを 3～50 mg/kg の用量範囲で静脈内持続投与したときの単回投与後の TK は、SD ラット及びカニクイザルを用いた反復投与毒性試験並びに妊娠 New Zealand White ウサギを用いた生殖発生毒性試験における初回投与日に評価した。これらの反復投与試験では、セベリパーゼ　アルファは臨床試験と同じ緩衝液、すなわち、クエン酸三ナトリウム二水和物（13.7 mg/mL）、クエン酸一水和物（1.57 mg/mL）及びヒト血清アルブミン（10 mg/mL）を含有する緩衝液で製剤化されたものを使用し、約 10 mL/kg/h の速度で持続投与した。単回投与後の PK/TK パラメータの要約を表 2.4-2 に示した。

静脈内投与終了後のセベリパーゼ　アルファは、急速投与及び持続投与ともに、飽和する可能性がある受容体介在性の組織取り込み機構により全身循環血液中から速やかに消失した。セベリパーゼ　アルファの組織取り込みは、MMR 及び M6P 受容体の両者に取り込まれる N 結合型糖鎖によって促進されていると考えられる。この速やかな消失は、他のライソゾーム酵素であり、マンノース末端や GlcNAc 末端を N 結合型糖鎖として含有するグルコセレブロシダーゼにおいて、ラット及びマウスで認められた現象によく類似している（Furbish, 1981, *Biochim Biophys Acta*; Friedman, 1999, *Blood*）。

表 2.4-2　セベリパーゼ　アルファ単回投与後の薬物動態及びトキシコキネティクスパラメータ（平均値）

動物種	用量 (mg/kg)	投与経路	溶媒	C_{max}[c] (μg/mL)	AUC_{last}[c] (μg·h/mL)	$t_{½}$[c,d] (h)
SD ラット	1	静脈内急速	生理食塩液	12.6	1.7	--[e]
	5	静脈内急速	生理食塩液	68.1	17.3	--[e]
SD ラット[a]	5	静脈内持続	緩衝液[b]	0.880-0.973	2.55-4.04	--[e]
	20	静脈内持続	緩衝液[b]	5.82-9.47	23.0-42.2	--[e]
	50	静脈内持続	緩衝液[b]	60.4-127	150-413	--[e]
カニクイザル[a]	5	静脈内持続	緩衝液[b]	0.966-0.978	3.76-3.90	--[e]
	20	静脈内持続	緩衝液[b]	16.0-20.9	65.1-91.5	0.174-0.187[f]
	50	静脈内持続	緩衝液[b]	133-179	443-493	0.588-0.622
カニクイザル[a]	3	静脈内持続	緩衝液[b]	1.16-1.43	2.94-3.37	--[e]
	10	静脈内持続	緩衝液[b]	17.6-17.7	40.4-41.2	0.190-0.255[f]
	30	静脈内持続	緩衝液[b]	207-216	597-598	0.520-1.15
New Zealand White ウサギ[a,g]	3	静脈内持続	緩衝液[b]	0.207	0.780	--[e]
	10	静脈内持続	緩衝液[b]	2.70	11.1	--[e]
	25	静脈内持続	緩衝液[b]	147	451	--[e]
	50	静脈内持続	緩衝液[b]	246	978	0.356
New Zealand White ウサギ[a,g]	10	静脈内持続	緩衝液[b]	3.68	12.2	--[e]
	25	静脈内持続	緩衝液[b]	48.7	250	--[e]
	50	静脈内持続	緩衝液[b]	147	863	0.420

出典：SBC102-P002; SBC102-T002 Toxicokinetic Report Table 1; SBC102-T001 Toxicokinetic Report Table 1; SBC102-T006 Toxicokinetic Report Table 2; SBC102-T008 Toxicokinetic Report Table 2; SBC102-T012 Toxicokinetic Report Table 2

a　反復投与毒性試験。単回投与の PK/TK は初回投与時の結果を評価。

b　緩衝液：クエン酸三ナトリウム二水和物（13.7 mg/mL）、クエン酸一水和物（1.57 mg/mL）及びヒト血清アルブミン（10 mg/mL）。投与の際、セベリパーゼ　アルファは滅菌した生理食塩液に 1：1 で希釈した。

c　特に明記しない限り、2 つの値は初回投与日の雄雌それぞれの平均値を表示。静脈内急速投与の試験においては各用量 1 例ずつ、計 2 例の結果を表示。

d　$\ln(2)/\lambda_z$ から算出した消失半減期（λ_z は終末消失相の対数線形回帰により求めた消失速度定数）

e　明確な消失相が認められないため、あるいは投与期間中の採血回数が限られたため平均 $t_{½}$ は算出せず

f　雌雄各 1 例の値を範囲で表示

g　妊娠動物を用いた試験（雄は実施せず）。妊娠 7 日目からセベリパーゼ　アルファを 3 日に 1 回投与。

SD ラットを用いた単回投与試験において、セベリパーゼ　アルファは静脈内急速投与後、全身循環血液中から速やかに消失し、組織取り込みには飽和過程の存在が考えられた。取り込み

速度（消失半減期として表現）は、1 及び 5 mg/kg の用量に対してそれぞれ約 6 及び 20 分であった。全身曝露量（投与開始［0 時間］から定量可能な血清中濃度が観測された最終時間までの濃度-時間曲線下面積[AUC_{last}]）はそれぞれの用量で 1.7 及び 17.3 μg·h/mL であった（表 2.4-2）。

SD ラット及びカニクイザルを用いた反復投与毒性試験並びに妊娠 New Zealand White ウサギを用いた生殖発生毒性試験において、投与 1 日目の初回静脈内持続投与後の平均血清中セベリパーゼ　アルファ濃度推移から、持続投与中に最高血清中濃度（C_{max}）に達し、投与終了後、血清中濃度は速やかに低下することが明らかとなった。サルでは、投与 1 日目の平均 $t_{1/2}$（雌雄）は、4 週間反復投与試験における高用量の 50 mg/kg 群で 0.588～0.622 時間、6 ヵ月間反復投与試験における高用量の 30 mg/kg 群で 0.520～1.15 時間であった（表 2.4-2）。妊娠ウサギでは、妊娠 7 日目（初回投与日）の $t_{1/2}$ は、生殖発生毒性予備試験における高用量の 50 mg/kg 群で 0.356 時間、本試験における高用量の 50 mg/kg 群で 0.420 時間であった。SD ラット、低用量群（3～5 mg/kg）のサル及び高用量群（50 mg/kg）を除くウサギでは、血液のサンプリングポイントが限定されていたため、又は血液中からの速やかな消失のため明確な消失相が確認できず、$t_{1/2}$ は算出できなかった。

2.4.3.3　反復投与後の薬物動態

反復投与毒性試験及び生殖発生毒性試験において、SD ラット、カニクイザル及び妊娠 New Zealand White ウサギにセベリパーゼ　アルファを 1 回あたり 3～60 mg/kg の用量で反復投与したときの TK を評価した。セベリパーゼ　アルファは、クエン酸三ナトリウム二水和物（13.7 mg/mL）、クエン酸一水和物（1.57 mg/mL）及びヒト血清アルブミン（10 mg/mL）を含有する製剤を使用し、約 10 mL/kg/h の速度で静脈内持続投与した。反復投与後の TK パラメータの要約を表 2.4-3 に示した。

反復投与終了後、セベリパーゼ　アルファは、飽和する可能性のある受容体介在性の取り込み機構により循環血液中から速やかに消失した。2.4.3.2 項に示したように、組織取り込みは MMR 及び M6P 受容体により促進されていると考えられる。

表 2.4-3　セベリパーゼ　アルファ反復投与における最終投与後のトキシコキネティクスパラメータ（平均値）

動物種	用量 (mg/kg)	投与経路	溶媒	測定日（日）	C_{max}[c] (μg/mL)	AUC_{last}[c] (μg·h/mL)	$t_{½}$[c,d] (h)
SD ラット[a]	5	静脈内持続	緩衝液[b]	22	0.387-0.997	1.42-3.28	--[e]
	20	静脈内持続	緩衝液[b]	22	5.19-16.1	19.7-63.3	--[e]
	50	静脈内持続	緩衝液[b]	22	74.9-106	289-450	--[e]
カニクイザル[a]	5	静脈内持続	緩衝液[b]	22	1.16-1.16	4.67-4.86	--[e]
	20	静脈内持続	緩衝液[b]	22	16.7-24.5	70.9-84.7	0.319[f]
	50	静脈内持続	緩衝液[b]	22	108-120	419-443	0.355-0.447
カニクイザル[a]	3	静脈内持続	緩衝液[b]	176	3.56-3.62	5.84-6.36	0.327-0.551[f]
	10	静脈内持続	緩衝液[b]	176	43.8-47.8	103-107	0.387-1.03
	30	静脈内持続	緩衝液[b]	176	320-351	1040-1086	0.658-0.676
SD ラット[g]	6	静脈内持続	緩衝液[b]	妊娠 17	0.560	2.16	--[e]
	20	静脈内持続	緩衝液[b]	妊娠 17	2.85	12.1	--[e]
	60	静脈内持続	緩衝液[b]	妊娠 17	57.9	227	--[e]
New Zealand White ウサギ[g]	3	静脈内持続	緩衝液[b]	妊娠 19	1.07	4.05	--[e]
	10	静脈内持続	緩衝液[b]	妊娠 19	5.97	22.9	0.502[f]
	25	静脈内持続	緩衝液[b]	妊娠 19	58.9	237	0.459[f]
	50	静脈内持続	緩衝液[b]	妊娠 19	146	653	0.489
New Zealand White ウサギ[g]	10	静脈内持続	緩衝液[b]	妊娠 19	2.62	12.2	1.78
	25	静脈内持続	緩衝液[b]	妊娠 19	69.5	379	0.506
	50	静脈内持続	緩衝液[b]	妊娠 19	132	730	0.450

出典：SBC102-T002 Toxicokinetic Report Table 1; SBC102-T001 Toxicokinetic Report Table 2; SBC102-T006 Toxicokinetic Report Table 2; SBC102-T011 Study Report Text Table 11; SBC102-T008 Toxicokinetic Report Table 3; SBC102-T012 Toxicokinetic Report Table 2

a　週 1 回投与

b　緩衝液：クエン酸三ナトリウム二水和物（13.7 mg/mL）、クエン酸一水和物（1.57 mg/mL）及びヒト血清アルブミン（10 mg/mL）。投与の際、セベリパーゼ　アルファは滅菌した生理食塩液に 1：1 で希釈した。

c　特に明記しない限り、2 つの値は雄雌それぞれの平均値を表示。

d　$\ln(2)/\lambda_z$から算出した消失半減期（λ_zは終末消失相の対数線形回帰により求めた消失速度定数）

e　明確な消失相が認められないため、あるいは投与期間中の採血回数が限られたため平均 $t_{½}$は算出せず

f　雄又は雌 1 例の値

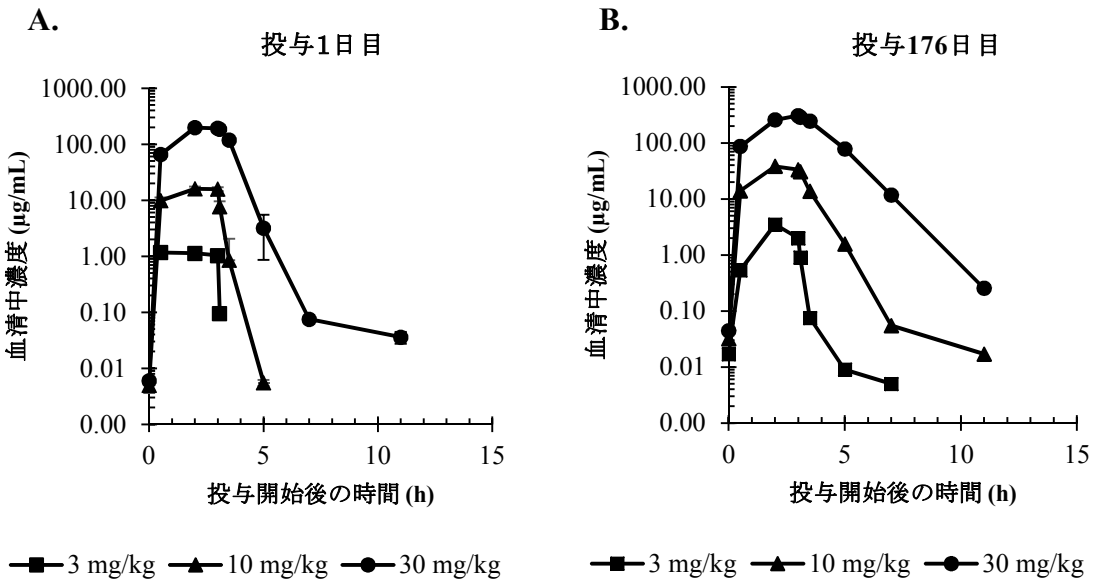
g　妊娠動物を用いた試験（雄は実施せず）。妊娠 6 日目（ラット）又は妊娠 7 日目（ウサギ）からセベリパーゼ　アルファを 3 日に 1 回投与。

ラット及びサルを用いた 4 週間反復投与毒性試験において、投与 22 日目の投与前の血清中セベリパーゼ　アルファ濃度は LLOQ 未満であったことから、血清中から完全に消失していることが示された。C_{max} は持続投与中又は投与終了後の早い時間に認められ、投与終了後の濃度は速やかに減少した。ラット及びサルでは、曝露量（C_{max} 及び AUC_{last}）の増加の割合は用量比よりも大きかった。投与 22 日目の C_{max} 及び AUC_{last} は全ての用量で投与 1 日目の値に対して、ラットで 2 倍未満（0.4～1.9 倍）、サルで 1.3 倍以下（0.7～1.3 倍）であった（表 2.4-2［投与 1 日目］、表 2.4-3［投与 22 日目］）。ラット及び低用量（5 mg/kg）群のサルにおける投与 22 日目の平均 $t_{1/2}$ は、血液中からのセベリパーゼ　アルファの消失が速く、明確な消失相が確認できなかったため算出しなかった。投与 22 日目の高用量（50 mg/kg）群におけるサルの平均 $t_{1/2}$ は、雄で 0.447 時間、雌で 0.355 時間であった。

幼若サルを用いた 6 ヵ月間反復投与毒性試験において、C_{max} は持続投与中又は投与終了後の早い時間に認められ、投与終了後の濃度は速やかに減少した。曝露量（C_{max} 及び AUC_{last}）の増加の割合は用量比よりも大きかった。投与 176 日目の C_{max} 及び AUC_{last} は全ての用量で投与 1 日目の最大 3 倍（1.5～3.1 倍）であった（表 2.4-2［投与 1 日目］、表 2.4-3［投与 176 日目］）。投与 176 日目における $t_{1/2}$ は、高用量（30 mg/kg）群の雄で 0.658 時間、雌で 0.676 時間であり、中間用量（10 mg/kg）群の雄で 1.03 時間、雌で 0.387 時間であった。低用量（3 mg/kg）群における $t_{1/2}$ は、明確な消失相が確認できず、大部分の動物で算出できなかった。

サルを用いた 6 ヵ月間反復投与毒性試験において、全身曝露量（AUC_{last}）は週 1 回、6 ヵ月間反復投与により 2 倍以上に増加しており、セベリパーゼ　アルファの PK 挙動が変化していることを示唆している。この曝露量の増加に対する正確なメカニズムは不明であるが、蓄積によるものではないと考えられる。少なくともセベリパーゼ　アルファの PK は速い α 分布相とそれに続く遅い β 消失相を示す 2-コンパートメントモデルに従うと考えられる（図 2.4-1）。見かけの曝露量の増加に対する可能な説明は、1 日目の投与後にセベリパーゼ　アルファが初期の段階で標的細胞に速やかに取り込まれ、受容体取り込みメカニズムの飽和により細胞への取り込みが減弱し、次の投与又は高用量に対する分布平衡効果により中央コンパートメントすなわち血液中の曝露量が増大する可能性があるということである。曝露量の増大の程度は同一用量の個体間でも変動があり、用量依存的な増加も認められなかった。血清中濃度（C_{max} 又は AUC_{last}）の変動は ADA の存在とは相関していなかった。PK/TK 分析に使用されている LAL 活性測定法は内因性の LAL とセベリパーゼ　アルファを識別できないため、投与 176 日目に観測された投与前の曝露量に対する内因性 LAL の寄与は、現時点では不明である。

図 2.4-1　カニクイザルにセベリパーゼ　アルファを静脈内持続投与したときの初回投与時（投与 1 日目、パネル A）及び最終投与時（投与 176 日目、パネル B）の血清中セベリパーゼ　アルファ濃度推移



出典：SBC102-T006 Toxicokinetic Report Table 1
投与時間は約 3 時間
平均値を表示
LLOQ = 0.00156 µg/mL

妊娠ラットにセベリパーゼ　アルファを妊娠期間中、すなわち妊娠 6 日目から、3 日に 1 回反復投与したとき、最終投与日（妊娠 17 日目）の投与前の全ての血清検体及び溶媒投与群の全ての血清検体中の濃度は LLOQ 未満であった。6、20 及び 60 mg/kg 群の C_{max} は持続投与中に観測され、投与終了後血清中濃度は速やかに減少した。曝露量の増加の割合は用量比よりも大きかった（6 mg/kg から 60 mg/kg の用量 10 倍に対して 104 倍増加）。6、20 及び 60 mg/kg 群の C_{max} はそれぞれ 0.560、2.85 及び 57.9 µg/mL であり、AUC_{last} はそれぞれ 2.16、12.1 及び 227 µg·h/mL であった（表 2.4-3）。投与終了時間付近のサンプリングポイントが不十分であったため $t_{1/2}$ は算出できなかった。

妊娠ウサギにセベリパーゼ　アルファを妊娠 7 日目から、3 日に 1 回反復投与した 2 試験において、C_{max} は持続投与中に認められ、投与終了後の濃度は速やかに減少した。曝露量（C_{max} 及び AUC_{last}）は用量の増加と共に増加したが（表 2.4-3）、予備試験では曝露量の増加の割合と用量比との関係は明確ではなかった。本試験では妊娠 19 日目において 10 から 50 mg/kg へ 5 倍の用量増加に対して、全身曝露量（AUC_{last}）は 60 倍増加した。評価が可能であった場合の $t_{1/2}$

の平均値（妊娠 19 日目）は、本試験において 10 mg/kg 群：1.78 時間、25 mg/kg 群：0.506 時間及び 50 mg/kg 群：0.450 時間、予備試験において 50 mg/kg 群：0.489 時間であった。

2.4.4 毒性試験

セベリパーゼ　アルファの非臨床試験計画では、臨床試験で使用する代表的な製剤を適切に評価した。非臨床毒性試験として、単回投与毒性試験 1 試験（カニクイザル）、反復投与毒性試験 3 試験（SD ラット 4 週間、カニクイザル 4 週間及びカニクイザル 6 ヵ月間）、生殖発生毒性試験の予備試験 2 試験（SD ラット及び New Zealand White ウサギ）及び生殖発生毒性試験 5 試験（SD ラット 4 試験及び New Zealand White ウサギ 1 試験）を実施した。トキシコキネティクス成績は 2.4.3.2 項及び 2.4.3.3 項に記載した。反復投与毒性試験は、乳児における臨床投与方法（成人より頻回）をサポートするとともに、成人における臨床投与方法をサポートするために、1 週間に 1 回の静脈内持続投与で実施した。生殖発生毒性試験は、投与期間中にラット及びウサギが適切に曝露されることを確実にするために、1 週間に 2 回の静脈内持続投与で実施した。反復投与毒性試験及び生殖発生毒性試験は、OECD の GLP に準拠して実施しており、この GLP は欧州共同体に加盟する行政当局、米国（FDA）、日本（厚生労働省）及び OECD による GLP データ相互受け入れ加盟国で受け入れられている。スポンサーで実施した一部の分析は GLP に完全には準拠していない（2.6.6 毒性試験の概要文）。

毒性試験では、臨床試験で使用されたものと同様に、セベリパーゼ　アルファは、クエン酸三ナトリウム二水和物（13.7 mg/mL）、クエン酸一水和物（1.57 mg/mL）及びヒト血清アルブミン（10 mg/mL）を含有する製剤として供給され、静脈内持続投与前に滅菌生理食塩液で 1：1 に希釈した。約 10 mL/kg/h の投与速度で静脈内持続投与した。製剤の添加物は一般に安全と認められるとされており、安全性に関する懸念はない。

2.4.4.1 単回投与毒性試験

単回投与毒性試験では、カニクイザル（雄 1 例/群）にセベリパーゼ　アルファを 5 及び 40 mg/kg の用量で単回静脈内持続投与した結果、死亡はなく、一般状態並びに血液学的検査、血液凝固系検査及び尿検査パラメータにセベリパーゼ　アルファ投与に関連した変化はみられなかった。5 及び 40 mg/kg 投与例ともに軽微から軽度で用量依存性のない総ビリルビン、ALT 及びアルカリホスファターゼ（ALP）値の投与前値に対する増加が認められた。これらの変化はセベリパーゼ　アルファによる肝臓への軽微な影響を示している可能性があるが、試験施設における背景

データの範囲内の変動であることからセベリパーゼ　アルファ投与に関連した変化ではないと考えられた。反復投与毒性試験ではより高い用量で同様の変化は認められていない。

以上の結果から、カニクイザルにセベリパーゼ　アルファを最大 40 mg/kg の用量で単回静脈内持続投与した際の忍容性は良好であり、明らかな変化は認められなかった。体表面積を基に算出したヒト等価用量は 12.9 mg/kg であり、臨床用量の 3 mg/kg の 4.3 倍に相当した。

2.4.4.2　反復投与毒性試験

SD ラット及びカニクイザルの毒性試験では、標的臓器は特定されなかった。すなわち、肝臓、腎臓、心臓、中枢神経系などの臓器組織にセベリパーゼ　アルファ投与に関連した変化はみられなかった。

2.4.4.2.1　SD ラット

SD ラット（雌雄各 15 例/群）にセベリパーゼ　アルファを 1 回あたり 0、5、20 及び 50 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回、4 週間静脈内持続投与した際の毒性を評価するとともに、2 週間の休薬（雌雄各 15 例中 5 例/群）により、セベリパーゼ　アルファによる変化の可逆性、持続性及び遅延性発現を評価した。対照群を 2 群設定した。セベリパーゼ　アルファ又は溶媒の静脈内持続投与により発生する可能性のある発赤又は腫脹の発現を緩和するために、セベリパーゼ　アルファ投与前に、セベリパーゼ　アルファ投与群の全例にジフェンヒドラミン 5 mg/kg を筋肉内投与又は皮下投与した。対照群 2 群のうち 1 群の全例にもジフェンヒドラミンを同様に投与した。ライソゾーム病治療を目的とした酵素補充療法治療薬（ヒトタンパク質）を動物モデルで試験した前例に基づいて、この予防的前投与を設定した（Shull, 1994, *Proc Natl Acad Sci USA*; Bielicki, 1999, *J Biol Chem*; Vogler, 1999, *Pediatr Res*）。

50 mg/kg まで、忍容性は良好であった。一般状態の変化として、投与期間中に鼻あるいは四肢先端部の腫脹が認められ、四肢先端部の皮膚の発赤もみられた。これらの発現頻度は用量依存的であり、投与日に一過性に認められた。これらの所見は、多糖類や糖タンパク質を投与したラットにおいてよく知られている反応であり、予測された反応であった。アルビノラットでは、多糖類及び糖タンパク質を腹腔内投与又は静脈内投与すると、充血、そう痒及び四肢の浮腫などのアナフィラキシー様反応を特徴とする急性炎症性反応を示すことが報告されている（Parratt, 1958, *Br J Pharmacol Chemother*; Harris., 1967, *Br J Pharmacol Chemother*; Ankier, 1968, *Br J Pharmacol Chemother*; West, 1981, *Agents Actions*; Moodley, 1982, *Eur J Pharmacol*）。類似の即時型過敏症様反応は、他の遺伝子組換えヒト酵素補充療法治療薬である、Naglazyme

（galsulfase［FDA/CDER、Pharmacology/Toxicology Review and Evaluation、2005 年 4 月 7 日；European Public Assessment Report、2006 年 1 月 24 日］）及び velaglucerase alfa（グルコセレブロシダーゼ［FDA/CDER、Pharmacology/Toxicology Review and Evaluation、2010 年 1 月 28 日；European Public Assessment Report、2010 年 8 月 26 日］）でも認められている。なお、カニクイザルではセベリパーゼ　アルファを類似の用量で投与しても、過敏症様反応を示す明らかな一般状態の変化は認められていない（2.4.4.2.2 項参照）。

血液学的検査、血液凝固系検査、血液生化学的検査及び尿検査では、投与期間終了時にセベリパーゼ　アルファ投与に関連した変化はみられなかった。その他の一般状態の変化、体重及び体重増加量、機能観察総合評価結果、眼科学的検査所見、肉眼病理学的変化、器官重量並びに病理組織学的変化については､セベリパーゼ　アルファ投与に関連した変化はみられなかった。

4 週間投与後に、セベリパーゼ　アルファ投与群の 90 例の大部分で ADA（80 例、免疫除去試験で評価）及び中和抗体（77 例、酵素活性の中和により評価）が検出された。50 mg/kg 群の 1 例を除く投与開始前の全例及び対照群の全例では、ADA は陰性であった。

以上の結果から、SD ラットにセベリパーゼ　アルファを 1 回あたり最大 50 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回、4 週間静脈内持続投与した際の無毒性量は 50 mg/kg と考えられた。

2.4.4.2.2　　カニクイザル

2.4.4.2.2.1　　サルの 4 週間静脈内持続投与毒性試験及び 2 週間回復性試験

幼若カニクイザル（2～3 歳、雌雄各 5 例/群）にセベリパーゼ　アルファを 1 回あたり 0、5、20 及び 50 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回､4 週間静脈内持続投与した際の毒性を評価するとともに、2 週間の休薬（雌雄各 5 例中 2 例/群）により、セベリパーゼ　アルファによる変化の可逆性、持続性及び遅延性発現を評価した。溶媒又はセベリパーゼ　アルファ投与前に、予防的前投与として全例にジフェンヒドラミン 5 mg/kg を筋肉内投与した（2.4.4.2.1 項参照）。

50 mg/kg まで、忍容性は良好であった。明らかな一般状態の変化、体重及び体重増加量への影響、セベリパーゼ　アルファ投与に関連した臨床病理検査の変動並びに眼科学的検査所見はみられなかった。投与期間終了時及び休薬期間終了時に、剖検ではセベリパーゼ　アルファ投与に関連した肉眼病理学的変化はみられず、器官重量の変化も認められなかった。病理組織学的変化として､投与期間終了時及び休薬期間終了時ともに軽微から中等度の血管/血管周囲の炎症が、5 mg/kg 以上の群で、1 つ以上の臓器・組織で認められたが、発現頻度は低く、対照群を含む全群で認められていることから、セベリパーゼ　アルファ投与に関連した変化ではないと考えられた。しかし、サルに溶媒あるいはヒトタンパク質を投与したことに対する原因不明の免

疫原性反応である可能性は否定できない。なお、サルの 6 ヵ月間投与毒性試験では同様の変化は認められていない。

セベリパーゼ　アルファ投与群の 30 例中 3 例のみで ADA が検出されたが、中和活性は検出されなかった。投与開始前の全例及び対照群の全例で ADA は陰性であった。

以上の結果から、カニクイザルにセベリパーゼ　アルファを 1 回あたり最大 50 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回、4 週間静脈内持続投与した際の無毒性量は 50 mg/kg と考えられた。

2.4.4.2.2.2　サルの 6 ヵ月間静脈内持続投与毒性試験及び 2 週間回復性試験

幼若カニクイザル（2.3～2.9 歳、雌雄各 5 例/群）にセベリパーゼ　アルファをを 1 回あたり 0、3、10 及び 30 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回、6 ヵ月間静脈内持続投与した際の毒性を評価するとともに、2 週間の休薬（雌雄各 5 例中 2 例/群）により、セベリパーゼ　アルファによる変化の可逆性、持続性及び遅延性発現を評価した。ラット（2.4.4.2.1 項参照）と異なり、サル類（カニクイザル）では概して糖タンパク質の投与後にアナフィラキシー様反応を示さないと考えて、セベリパーゼ　アルファ投与前に定期的なジフェンヒドラミンの予防的前投与を行わなかった。

30 mg/kg まで、忍容性は良好であった。体重及び摂餌量測定、眼科学的検査、心電図検査、臨床病理検査、剖検及び器官重量測定ではセベリパーゼ　アルファ投与に関連した変化はみられず、病理組織学的検査でもセベリパーゼ　アルファ投与に関連した明らかな変化は認められなかった。セベリパーゼ　アルファ投与に関連すると考えられる変化は、10 mg/kg 群の雄 1 例で投与 1 日のみにみられた明らかなインフュージョン反応、すなわち自発運動の低下、顔面の発赤及び口角の泡に限られていた。ジフェンヒドラミンの投与により、これらの一般状態の変化は緩和された。また、当該例に 2 回目以降の投与前（投与 176 日を除く）にジフェンヒドラミンを投与したところ、その他のインフュージョン反応はみられなかった。なお、投与 176 日にはジフェンヒドラミンを投与しなかったが、インフュージョン反応はみられなかった。

セベリパーゼ　アルファを投与した 30 例中 23 例で ADA が認められた（3、10 及び 30 mg/kg 群でそれぞれ 10 例中 9 例、7 例及び 7 例）。中和抗体は 6 例で認められた（10 mg/kg 群の 4 例及び 30 mg/kg 群の 2 例、抗体価は特定されず）。

バイオ医薬品では認められることであるが、製造工程に関連した不純物として、残留した宿主細胞の DNA あるいはタンパク質が含まれる可能性がある。セベリパーゼ　アルファでは、[redacted]、[redacted]又は[redacted]などの卵白タンパク質が不純物として含まれる可能性がある。投与 176 日には、セベリパーゼ　アルファ投与により用量依存的な抗

[redacted]反応がみられ、3、10 及び 30 mg/kg 群でそれぞれ 10 例中 6 例、8 例及び 10 例で抗体価の低い抗[redacted]抗体が陽性であった。30 mg/kg 群の 1 例で投与開始前に抗[redacted]抗体が陽性であり、血清中のなんらかの成分と弱い反応を示した可能性が考えられる。対照群では、投与開始前及び投与 176 日のいずれにおいても抗[redacted]抗体は陰性であった。抗[redacted]抗体産生とインフュージョン反応又はその他の毒性の発現の間に関連性は認められなかった。

病理組織学的検査において、30 mg/kg 群の雌 1 例で広範囲に散在する多巣性の軽微な心筋の変性及び線維化が認められた。本試験の他の動物では同様の変化はみられなかった。カニクイザルにおける自然発生性の心筋の変性及び線維化については公表論文で報告されている。その発現頻度は、心筋の線維化で 0.1%（2050 例、Chamanza, 2006, *Toxicol Pathol*）、心筋の変性/線維化で 5.6%（570 例、Chamanza, 2010, *Toxicol Pathol*）並びに心筋の変性/壊死で 13%及び心筋の線維化で 4%（71 例、Vidal, 2010, *Toxicol Pathol*）であった。これらのことから、雌 1 例でみられた心臓の変化は偶発的変化であり、セベリパーゼ　アルファ投与に関連した変化ではないと考えられた。

以上の結果から、カニクイザルにセベリパーゼ　アルファを 1 回あたり最大 30 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回、6 ヵ月間静脈内持続投与した際の無毒性量は 30 mg/kg と考えられた。

2.4.4.3　遺伝毒性試験

ICH ガイドライン S6（R1）では、遺伝子組換えヒト酵素が DNA や染色体成分と直接相互作用するとは考えにくく、従来の医薬品について通常実施されてきた遺伝毒性試験の範囲と種類は、バイオ医薬品に対しては適切なものではなく必要とされないとされていることから、セベリパーゼ　アルファの遺伝毒性試験は実施しなかった。

2.4.4.4　がん原性試験

ICH ガイドライン S6（R1）では、バイオ医薬品においては作用メカニズム及び生物学的活性からがん原性に関する懸念がない場合に、標準的ながん原性試験は一般的に不適当とされていることから、セベリパーゼ　アルファのがん原性試験は実施しなかった。セベリパーゼ　アルファはライソゾーム病の酵素補充療法治療薬として開発された遺伝子組換え酵素であり、この条件に該当すると考えられる。

2.4.4.5　生殖発生毒性試験

生殖発生毒性試験の重要な試験では、セベリパーゼ　アルファに関連した死亡はなく、母動物への毒性、明らかな胚致死作用、胎児毒性及び催奇形作用はみられなかった。また、雌雄ラットの生殖能、受胎能及び初期胚発生に対する影響、並びに出生児に対する影響はなかった。

2.4.4.5.1　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

雄ラットの受胎能及び着床までの初期胚発生に関する静脈内持続投与試験

雄 SD ラット（22 例/群）にセベリパーゼ　アルファを 1 回あたり 0、6、20 及び 60 mg/kg の用量で交配前 28 日より、交配期間中を含めて剖検まで 1 週間に 2 回、静脈内持続投与した際の受胎能及び着床までの初期胚発生に対する影響を検討した。過敏症反応を緩和するために、4 回目の溶媒又はセベリパーゼ　アルファ投与中及びその後の投与前にジフェンヒドラミン 5 mg/kg を皮下投与した。

セベリパーゼ　アルファ投与に関連した死亡はみられなかった。対照群を含む全群で過剰なひっかき行動及び頭部あるいは鼻鏡部の腫脹などの過敏症反応を示す一般状態の変化が認められ、その発現時期には用量依存性が認められた。すなわち、60 mg/kg 群では初回投与から、6 及び 20 mg/kg 群と対照群では 1～4 週間遅れて発現し、その後の投与時にも認められた。これらの一般状態の変化は溶媒に関連した過敏症反応であり、セベリパーゼ　アルファ投与により増悪したことが示唆された。さらに、6 mg/kg 以上の群で非常に重度の過敏症反応が 4 回目の投与中に認められ、60 mg/kg 群で最も重度であった。4 回目の投与中に認められた一過性の一般状態の変化として、自発運動の低下、歩行異常、円背位、横臥、虚脱、筋緊張の低下、皮膚蒼白、眼瞼下垂、呼吸困難/異常呼吸あるいは呼吸数増加などが認められた。ジフェンヒドラミンを投与したところ、概して、4 回目及びそれ以降の投与時の一般状態の変化は緩和された。対照群においても眼瞼下垂及び自発運動の低下が認められたが、試験の後半で発現した。

この他にセベリパーゼ　アルファ投与に関連した一般状態の変化はみられなかった。体重は 6 mg/kg 以上の群と対照群で同等であった。摂餌量は、20 mg/kg 以上の群で一般状態の変化が発現しはじめた時期に相当する投与 14～17 日に軽度（7%）に減少し、統計学的有意差（P≦0.05）が認められた。この変化は一過性であることから、毒性とは考えられなかった。6 mg/kg 群では摂餌量の変化は認められなかった。平均交配所要日数、交尾率、受胎率及び雌動物の妊娠率はセベリパーゼ　アルファ投与群と対照群で同等であった。精子検査パラメータにセベリパー

ゼ　アルファ投与に関連した変化はみられなかった。剖検、器官重量及び精巣他の病理組織学的検査ではセベリパーゼ　アルファ投与に関連した変化はみられなかった。

以上の結果から、雄動物の一般毒性に対する無毒性量は 20 mg/kg、受胎能及び初期胚発生に対する無影響量は最高用量の 60 mg/kg と考えられた。

<u>雌ラットの受胎能及び着床までの初期胚発生に関する静脈内持続投与試験</u>

雌 SD ラット（22 例/群）にセベリパーゼ　アルファを 1 回あたり 0、6、20 及び 60 mg/kg の用量で 1 週間に 2 回、交配前 14 日より交配期間中を含めて妊娠 7 日まで、静脈内持続投与した際の受胎能及び着床までの初期胚発生に対する影響を検討した。過敏症反応を緩和するために、4 回目の溶媒又はセベリパーゼ　アルファ投与中及びその後の投与前にジフェンヒドラミン 5 mg/kg を皮下投与した。

セベリパーゼ　アルファ投与に関連した死亡はみられなかった。対照群を含む全群で、一過性で生死にかかわらない、過敏症反応を示す一般状態の変化（自発運動の低下、皮膚の発赤、頭部/鼻鏡部の腫脹あるいは過剰なひっかき行動）が投与日に認められた。発現頻度は対照群を含め全群で同様であり、概して初回投与から発現し、妊娠期間中も持続していた。60 mg/kg 群では、一過性の前肢先端部及び後肢の腫脹並びに耳介の発赤も認められ、溶媒に関連した過敏症反応がセベリパーゼ　アルファ投与により増悪したことが示唆された。さらに、非常に重度の過敏症反応として、6 及び 20 mg/kg 群で 4 回目の投与中に協調運動の失調あるいは横臥、歩行異常、呼吸困難あるいは呼吸数増加が認められた。ジフェンヒドラミンを投与したところ、概して、4 回目及びそれ以降の投与時のこれらの一般状態の変化は緩和された。

この他にセベリパーゼ　アルファ投与に関連した一般状態の変化はみられなかった。体重及び摂餌量にセベリパーゼ　アルファ投与に関連した変化はみられなかった。発情期の日数、性周期の数及び性周期の平均日数にセベリパーゼ　アルファ投与に関連した変化はみられなかった。平均交配所要日数、交尾率、受胎率及び雌動物の妊娠率にセベリパーゼ　アルファ投与に関連した変化はみられなかった。黄体数、着床数、生存胚数、死亡胚数、早期吸収胚数、着床前死亡率及び着床後死亡率にセベリパーゼ　アルファ投与に関連した変化はみられなかった。
6 mg/kg 以上の群の各 1 例で全胚吸収が認められたが、試験実施施設の背景データの範囲内であった。全胚吸収例を含めると、6 mg/kg 群の平均早期吸収胚数（2.0）及び着床後死亡率（12.2%）は試験実施施設の背景データの上限（それぞれ 0.4～1.6 及び 2.6～10.9%）を超えるが、用量依存性がないこと及び全胚吸収例を除くといずれも背景データの範囲内に入ることから、セベリ

パーゼ　アルファ投与に関連した変化ではないと考えられた。剖検ではセベリパーゼ　アルファ投与に関連した変化はみられなかった。

以上の結果から、雌動物の一般毒性に対する無毒性量並びに受胎能及び初期胚発生に対する無影響量は最高用量の 60 mg/kg と考えられた。

2.4.4.5.2　胚・胎児発生に関する試験

妊娠 SD ラット及び妊娠 New Zealand White ウサギにセベリパーゼ　アルファを静脈内持続投与した際の妊娠及び胚･胎児発生に対する影響を予備的に検討するとともに、引き続き実施するラットの胚･胎児発生に関する試験における用量選択のための情報を収集した。

2.4.4.5.2.1　ラットの胚・胎児発生に関する試験

<u>ラットの胚・胎児発生に関する静脈内持続投与予備試験</u>

交配を確認した雌 SD ラット（6 例/群）にセベリパーゼ　アルファを 1 回あたり 0、5、15、30 及び 60 mg/kg の用量で妊娠 6、9、12、15 及び 17 日に静脈内持続投与した。ジフェンヒドラミンの予防的前投与は実施しなかった。

死亡はみられなかった。体重にセベリパーゼ　アルファ投与に関連した変化はなかった。セベリパーゼ　アルファ投与に関連した一般状態の変化は各投与日に認められ、その発現時期及び程度は用量依存的であった。すなわち、5 mg/kg 以上の群で鼻鏡部及び頸部腹側の腫脹並びに頭蓋部の腫脹が、15 mg/kg 以上の群で過剰なひっかき行動並びに四肢先端部及び四肢の腫脹がみられた。対照群を含む全群で皮膚の発赤及び痂皮が腋窩部、胸部の腹側及び背側に認められたが、試験方法に関連した変化（溶媒投与に対する反応の可能性など）と考えられた。30 mg/kg 以上の群で摂餌量が一過性に減少した。剖検ではセベリパーゼ　アルファ投与に関連した変化はなかった。胎児体重及び胎児の外表検査ではセベリパーゼ　アルファ投与に関連した変化はなかった。黄体数、着床数、生存胎児数、死亡胎児数、吸収胚数、性比並びに着床前及び着床後死亡率にセベリパーゼ　アルファ投与に関連した変化はなかった。

以上の結果から､ラットの胚･胎児発生に関する静脈内持続投与試験の本試験の用量として､6、20 及び 60 mg/kg が適切と考えられた｡胚致死作用､胎児毒性及び催奇形作用は認められなかった。

ラットの胚・胎児発生に関する静脈内持続投与試験

交配を確認した雌 SD ラット（22 例/群）にセベリパーゼ　アルファを 1 回あたり 0、6、20 及び 60 mg/kg の用量で妊娠 6、9、12、15 及び 17 日に静脈内持続投与した。過敏症反応を緩和するために 4 回目の溶媒又はセベリパーゼ　アルファ投与中及び 5 回目の投与前にジフェンヒドラミン 5 mg/kg を皮下投与した。

セベリパーゼ　アルファ投与に関連した死亡はみられなかった。6 mg/kg 以上の群で投与中に、一過性でセベリパーゼ　アルファ投与に関連した前肢先端部、後肢先端部あるいは鼻鏡部の腫脹が認められ、その発現時期及び程度は用量依存的であった。すなわち、60 mg/kg 群の全例及び 20 mg/kg 群の数例では妊娠 6 日（初回投与）から、6 mg/kg 群の数例では妊娠 9 日（2 回目投与）から発現した。さらに、6 mg/kg 以上の群で妊娠 15 日（4 回目投与）に、より重度の過敏症反応を示す一般状態の変化が認められたが、用量依存性はみられなかった。これらの一般状態の変化として、自発運動の低下、眼瞼下垂、横臥又は虚脱が認められた。また、6 mg/kg 以上の群の各 1 例で呼吸困難、呼吸数増加又は異常呼吸音も認められた。これらの一般状態の変化を緩和するためにジフェンヒドラミンを投与した。対照群を含む全群で皮膚の発赤及び痂皮が腋窩部、胸部の腹側及び背側に認められたが、投与方法あるいは溶媒の投与に関連した変化と考えられた。体重、摂餌量、剖検所見、卵巣及び子宮所見並びに胎児検査ではセベリパーゼ　アルファ投与に関連した変化はなかった。

20 mg/kg 群の 3 例で ADA が陽性であった。対照群の全例では、ADA は陰性であった。

以上の結果から、母動物の一般毒性に対する無毒性量及び胚・胎児発生に対する無影響量は 60 mg/kg と考えられた。胚致死作用、胎児毒性及び催奇形作用は認められなかった。

2.4.4.5.2.2　ウサギの胚・胎児発生に関する試験

ウサギの胚・胎児発生に関する静脈内持続投与予備試験

人工授精した雌 New Zealand White ウサギ(5 例/群)にセベリパーゼ　アルファを 1 回あたり 0、3、10、25 及び 50 mg/kg の用量で妊娠 7、10、13、16 及び 19 日に静脈内持続投与した。ジフェンヒドラミンの予防的前投与は実施しなかった。

セベリパーゼ　アルファ投与に関連した死亡はみられなかった。一般状態観察、体重及び摂餌量測定並びに剖検ではセベリパーゼ　アルファ投与に関連した変化はみられなかった。母動物に対する影響はみられず、胎児毒性及び催奇形作用はみられなかった。各群で 80%以上の動物

が妊娠していた。50 mg/kg 群の 5 例中 2 例で後期吸収胚数が増加し、胚致死作用が認められた結果、対照群及び試験実施施設の背景データのいずれよりも生存胎児数が減少し、着床後死亡率が上昇した。黄体数、着床数及び着床前死亡率に影響はなく、死亡胎児はみられなかった。胎児体重にセベリパーゼ　アルファ投与に関連した変化はみられなかった。胎児の外表異常及び変異はみられなかった。

セベリパーゼ　アルファ投与群では 20 例中 12 例で ADA が陽性であった。このうち 10 mg/kg 群の 1 例では中和抗体が陽性であった。対照群の全例では ADA は陰性であった。

以上の結果から、ラットの胚・胎児発生に関する静脈内持続投与試験の本試験の用量として、10、25 及び 50 mg/kg が適切と考えられた。

<u>ウサギの胚・胎児発生に関する静脈内持続投与試験</u>

人工授精した雌 New Zealand White ウサギ（22 例/群）にセベリパーゼ　アルファを 1 回あたり 0、10、25 及び 50 mg/kg の用量で妊娠 7、10、13、16 及び 19 日に静脈内持続投与した。ジフェンヒドラミンの予防的前投与は実施しなかった。

セベリパーゼ　アルファ投与に関連した死亡及び一般状態の変化はみられなかった。体重及び摂餌量測定並びに剖検では、セベリパーゼ　アルファ投与に関連した変化はみられなかった。母動物パラメータにセベリパーゼ　アルファ投与に関連した変化はみられなかった。また、卵巣及び子宮検査パラメータに影響はなかった。胎児体重及び形態検査ではセベリパーゼ　アルファ投与に関連した変化はみられなかった。胚致死作用、胎児毒性及び催奇形作用はみられなかった。

セベリパーゼ　アルファ投与群では 12 例中 3 例で妊娠 20 日に ADA が陽性であった。投与開始前期間及び対照群の全例では ADA は陰性であった。

以上の結果から、母動物の一般毒性及び胚・胎児発生に対する無影響量は 50 mg/kg と考えられた。

2.4.4.5.3　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

交配を確認した雌 SD ラット（24 例/群）にセベリパーゼ　アルファを 1 回あたり 0、6、20 及び 60 mg/kg の用量で妊娠 6、9、12、15、18 及び 20 日並びに授乳 4、7、10、14 及び 17 日に静脈内持続投与した。ジフェンヒドラミンの予防的前投与は実施しなかった。

F_0母動物では、セベリパーゼ　アルファ投与に関連した死亡はみられなかった。妊娠期間中に、対照群を含む全群で投与開始後に腫脹あるいは過剰なひっかき行動などの一般状態の変化が認められ、授乳期間中においても程度は軽かったが認められた。発現時期及び程度は用量依存的な傾向を示し、6 mg/kg 以上の群では妊娠 6 日（初回投与）から、対照群では妊娠 9 日（2 回目投与）から認められた。これらの一般状態の変化は一過性で生死にかかわらないものであり、溶媒に関連した過敏症反応がセベリパーゼ　アルファ投与により増悪したことが示唆された。この他にセベリパーゼ　アルファ投与に関連した一般状態の変化はみられなかった。母動物の体重及び摂餌量測定、剖検並びに病理組織学的検査ではセベリパーゼ　アルファ投与に関連した変化はみられなかった。妊娠期間、妊娠率、出産率、性比、生存出生児数、死亡児数、形態異常を有する出生児数及びその他の母動物パラメータにセベリパーゼ　アルファ投与に関連した変化はみられなかった。20 mg/kg 群で死亡児数が増加し、統計学的有意差が認められた。これは母動物 2 例で喰殺がみられためと考えられ、母動物による喰殺は対照群の 1 例及び 60 mg/kg 群の 1 例でも認められていることから、セベリパーゼ　アルファ投与に関連した変化ではないと考えられた。20 mg/kg 群では着床痕数がやや少なかったが、着床後に投与を開始していることから、セベリパーゼ　アルファ投与に関連した変化ではないと考えられた。少なくとも一部はこれらの要因に関連して、20 mg/kg 群では生存出生児数及び出生率が減少した。

F_1出生児では、一般状態、生存率、成長、身体発育分化、初期行動発達及び生殖能にセベリパーゼ　アルファ投与に関連した変化はみられなかった。出生から離乳まで、出生児の体重に影響はなかった。出生時及びその後の生存率並びに哺育率、耳介の開展、眼瞼開裂、立ち直り反射及び聴覚性驚愕反射にセベリパーゼ　アルファ投与に関連した変化はみられなかった。離乳前に死亡又は安楽死させた出生児に、セベリパーゼ　アルファ投与に関連した外表及び内臓異常はみられなかった。対照群の雄 1 例が生後 63 日に死亡した。剖検及び病理組織学的検査でも死因は不明であった。20 mg/kg 群の雌では妊娠期間中（妊娠 0～13 日）の体重増加量が減少したが、妊娠 13 日の体重に統計学的に有意な低下がないことから、セベリパーゼ　アルファ投与に関連した変化ではないと考えられた。瞳孔反射、視覚性置き直し反応、自発運動パラメータ及び遊泳試験成績、陰茎亀頭と包皮の分離及び膣開口が認められた日数、並びに聴覚性驚愕順化パラメータにセベリパーゼ　アルファ投与に関連した変化はみられなかった。平均交配所要日数、交尾率、受胎率、雌動物の妊娠率、黄体数、着床数、生存胚数、死亡胚数、早期吸収胚数、着床前死亡率及び着床後死亡率にセベリパーゼ　アルファ投与に関連した変化はみられなかった。F_1世代の出生児及び成熟した動物にセベリパーゼ　アルファ投与に関連した死亡はなく、剖検及び病理組織学的検査で変化はみられなかった。

以上の結果から、母動物（F_0 世代）の一般毒性及び生殖能（分娩及び授乳）に対する無毒性量は最高用量の 60 mg/kg と考えられた。また、F_1 世代に対する無毒性量は最高用量の 60 mg/kg と考えられた。

2.4.4.6 局所刺激性試験

局所刺激性は 4 週間及び 6 ヵ月間投与毒性試験の一部として評価していることから、局所刺激性試験は実施していない。投与部位に変化が認められたが、投与手技に関連した変化であり、セベリパーゼ　アルファ投与に関連した変化はみられなかったことから、局所刺激性は許容されるものと考えられた。

SD ラットの 4 週間投与毒性試験（2.4.4.2.1 項参照）では、投与部位あるいはカテーテル挿入部位の病理組織学的所見として、血管壁あるいは周囲組織の慢性活動性炎症、血管内膜増殖、血管中膜線維化、及びまれに部分的又は完全静脈閉塞を伴う大腿静脈の血栓又は膿瘍が認められた。これらの部位における慢性活動性炎症はセベリパーゼ　アルファ投与群とジフェンヒドラミンを前処置した対照群で同程度に認められた。一方、ジフェンヒドラミンを前処置しなかった対照群では認められておらず、ジフェンヒドラミン前処置が炎症に関連している可能性が示唆された。休薬期間終了後の皮膚/皮下組織、投与部位あるいはカテーテル挿入部位の組織病理学的所見は、概して単発的な変化あるいは軽微から軽度の変化であった。これらの所見は対照群及びセベリパーゼ　アルファ投与群ともにみられたことから、試験中のカテーテル操作に起因するものであり、セベリパーゼ　アルファ投与に関連した変化ではないと考えられた。

同様に、カニクイザルの 4 週間投与毒性試験（2.4.4.2.2.1 項参照）では、対照群及びセベリパーゼ　アルファ投与群で投与部位あるいはカテーテル挿入部位に慢性/慢性活動性炎症が認められており、静脈アクセスポート又はカテーテルに対する局所の反応であり、セベリパーゼ　アルファ投与に関連した変化ではないと考えられた。休薬期間終了後に中間用量群の雄 1 例で、投与部位の皮膚/皮下組織に慢性活動性炎症が認められたが、静脈アクセスポート部位における局所の感染又は炎症による可能性が高く、セベリパーゼ　アルファ投与に関連した変化ではないと考えられた。

カニクイザルの 6 ヵ月間投与毒性試験（2.4.4.2.2.2 項参照）では、カテーテル挿入部位及びカテーテル先端部の病理組織学的変化として、線維化、慢性炎症、血栓、肉芽腫などが認められた。これらは投与方法に関連した変化としてよく観察される所見であり、対照群を含む全群で

同様に認められた。このため、投与手技に関連した変化であり、セベリパーゼ　アルファ投与に関連した変化ではないと考えられた。

2.4.4.7　幼若動物を用いた試験

セベリパーゼ　アルファの対象となる患者集団に小児患者が含まれていることを考慮して、非臨床安全性プログラムでは幼若動物を用いた試験を実施している。4 週間及び 6 ヵ月間投与毒性試験（2.4.4.2.2 項参照）で使用したカニクイザルは 2～3 歳の範囲であり、ヒトでは小児に相当する（Barrow, 2007, *Non Clinical Drug Safety Assessment: Practical Considerations for Successful Registration*）。

2.4.4.8　免疫原性

酵素補充療法治療薬を含む他のタンパク質医薬品でも認められることだが、セベリパーゼ　アルファの投与により免疫反応が発生する可能性がある。ADA 産生を SD ラット及びカニクイザルの反復投与毒性試験、SD ラット及び New Zealand White ウサギの生殖発生毒性試験、並びに LAL 欠損ラットの薬理試験で検討した。セベリパーゼ　アルファに対する ADA は ELISA で、中和抗体は酵素活性測定法で検出した（2.4.3.1 項参照）。ADA が検出されたが、セベリパーゼ アルファ投与に対する反応の変化、インフュージョン反応のリスクの増加又はその他の毒性の発現に関連していないと考えられた。

セベリパーゼ　アルファに対する ADA 産生を毒性試験のうち 6 試験で検討した（2.4.4.2 項及び 2.4.4.5 項参照）。SD ラットでは、溶媒又はセベリパーゼ　アルファを 1 回あたり 5、20 及び 50 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回 4 週間投与した後に、セベリパーゼ　アルファ投与群の 90 例の大部分で ADA（80 例）及び中和抗体（77 例）が検出された。投与開始前（1 例を除く）及び溶媒投与群の全例で ADA は検出されなかった。カニクイザルでは、溶媒又はセベリパーゼ　アルファを 1 回あたり 5、20 及び 50 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回 4 週間投与した後に、セベリパーゼ　アルファ投与群の 30 例中 3 例のみで ADA が検出されたが、中和抗体は検出されなかった。投与開始前及び溶媒投与群の全例で ADA は検出されなかった。一方、溶媒又はセベリパーゼ　アルファを 1 回あたり 3、10 及び 30 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回 6 ヵ月間投与した後に、セベリパーゼ　アルファ投与群の 30 例中 23 例で ADA が検出され、6 例で中和抗体が検出された。なお、6 ヵ月間投与毒性試験の 1 例で初回投与後に明らかなインフュージョン反応が認められたが（2.4.4.2.2.2 項参照）、この例では投与開始前に ADA も抗[redacted]抗

体も検出されなかった。妊娠動物に 1 回あたり最大 50 mg/kg（New Zealand White ウサギ）又は 60 mg/kg（SD ラット）の用量で妊娠期間中に投与した後に、ラットでは検討した 22 例中 3 例で、ウサギでは予備試験及び本試験でそれぞれ検討した 20 例中 12 例及び 12 例中 3 例で、ADA が検出された。このうち 1 試験（ウサギの予備試験）で中和抗体産生を検討した結果、中間用量の 10 mg/kg 群の 1 例で中和抗体が検出された。ADA が産生されたものの、毒性試験では忍容性は良好であった。いずれの試験においても、ADA 産生とセベリパーゼ　アルファの全身曝露量との間に明らかな関連はみられなかった。

LAL 欠損ラットの薬理試験 1 試験で ADA 産生を検討した。LAL 欠損ラットに溶媒又はセベリパーゼ　アルファを 1 回あたり 3 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回 19 週間投与したところ、セベリパーゼ　アルファを投与した LAL 欠損ラット全例（n=6）で、試験終了時に ADA が認められたが、溶媒を投与した LAL 欠損ラットでは認められなかった。本試験では ADA の存在にも関わらず、2.4.2.1 項に記載されているようにセベリパーゼ　アルファの改善効果は持続した。

2.4.4.9　不純物

バイオ医薬品では認められることであるが、製造工程に関連した不純物として、残留した宿主細胞の DNA あるいはタンパク質が含まれる可能性がある。セベリパーゼ　アルファでは、[redacted]、[redacted]又は[redacted]などの卵白タンパク質が不純物として含まれる可能性がある。確認のために、カニクイザルの 6 ヵ月間投与毒性試験で、ELISA にて抗[redacted]抗体産生を検討した。セベリパーゼ　アルファ投与により用量依存的な抗[redacted]反応がみられ、投与 176 日に 3、10 及び 30 mg/kg 群でそれぞれ 10 例中 6 例、8 例及び 10 例で抗体価の低い抗[redacted]抗体が陽性であった。対照群では、投与開始前及び投与 176 日のいずれにおいても抗[redacted]抗体は陰性であった。抗[redacted]抗体の産生とインフュージョン反応又はその他の毒性所見発現の間に関連性は認められなかった。

2.4.4.10　安全域

非臨床毒性試験に対する臨床での安全域は用量を基に計算し、表 2.4-4 及び表 2.4-5 に示した。反復投与毒性試験における無毒性量は、SD ラットの 4 週間投与毒性試験では 50 mg/kg（ヒト等価用量は 8.1 mg/kg）、カニクイザルの 4 週間投与毒性試験では 50 mg/kg（ヒト等価用量は 16.1 mg/kg）及びカニクイザルの 6 ヵ月間投与毒性試験では 30 mg/kg（ヒト等価用量は 9.7 mg/kg）と考えられ、臨床用量 3 mg/kg の 2.7～5.4 倍に相当した。生殖発生毒性試験では、3 日に 1 回

又は 1 週間に 2 回投与した結果、雄ラットの一般毒性に対する無毒性量は 20 mg/kg（ヒト等価用量は 3.2 mg/kg）、雌雄ラットの受胎能、胚発生、母動物の一般毒性、生殖能及び F_1 世代の発育分化に対する無毒性量又は無影響量は最高用量の 60 mg/kg（ヒト等価用量は 9.7 mg/kg）並びにウサギの母動物の一般毒性及び胚発生に対する無影響量は最高用量の 50 mg/kg（ヒト等価用量は 16.1 mg/kg）と考えられ、臨床用量 3 mg/kg の 1.1～5.4 倍に相当した。セベリパーゼ　アルファの安全域の範囲は他の遺伝子組換えライソゾーム酵素と類似していた。すなわち、Naglazyme、VPRIV 及び Vimizim では安全域は臨床用量の 1.8～3.7 倍であった（Naglazyme［galsulfase、FDA/CDER Approval Package、2005 年 5 月 31 日；European Public Assessment Report、2006 年 1 月 24 日］、VRPIV［velaglucerase alfa、FDA/CDER Approval Package、2010 年 2 月 26 日；European Public Assessment Report、2010 年 8 月 26 日］及び Vimizim［elosulfase alfa/CDER、FDA Approval Package、2014 年 2 月 14 日；European Public Assessment Report、2014 年 2 月 20 日］）。長期反復投与毒性試験で問題となる毒性所見がないことから、非臨床試験から得られた安全域はセベリパーゼ　アルファの製造販売承認申請においても許容されると考えられた。

表 2.4-4　反復投与毒性試験における無毒性量及びヒト等価用量並びに安全域

	投与期間	無毒性量（mg/kg）	ヒト等価用量[a]（mg/kg）	安全域[b] 動物の用量/臨床用量
ラット	4 週間、1 回/週	50	8.1	2.7
サル	4 週間、1 回/週	50	16.1	5.4
サル	6 ヵ月間、1 回/週	30	9.7	3.2

a　体表面積を基に算出（換算係数はラットで 6.2、サルで 3.1）
b　臨床用量 3.0 mg/kg を基に算出

表 2.4-5　生殖発生毒性試験における無毒性量及びヒト等価用量並びに安全域

	投与期間	無毒性量又は無影響量（mg/kg）	ヒト等価用量[a]（mg/kg）	安全域[b] 動物の用量/臨床用量
雄ラット	交配前 4 週間、交配期間中及び交配後 2～3 週間、2 回/週	20[c] 60[d]	3.2[c] 9.7[d]	1.1 3.2
雌ラット	交配前 2 週間、交配期間中及び妊娠 7 日まで、2 回/週	60	9.7	3.2
妊娠ラット	妊娠 6～17 日、1 回/3 日	60[e]	9.7[e]	3.2
雌ラット	妊娠 6 日～授乳 17 日、2 回/週	60	9.7	3.2
妊娠ウサギ	妊娠 7～19 日、1 回/3 日	50[f]	16.1[f]	5.4

a　体表面積を基に算出（換算係数はラットで 6.2、ウサギで 3.1）
b　臨床用量 3.0 mg/kg を基に算出
c　雄動物の一般毒性に対する無毒性量
d　生殖能及び初期胚発生に対する無影響量
e　母動物の一般毒性に対する無毒性量及び胚・胎児発生に対する無影響量
f　母動物の一般毒性に対する無毒性量及び胚・胎児発生に対する無影響量

2.4.5　総括及び結論

セベリパーゼ　アルファは LAL 欠損症に対する酵素補充療法治療薬として開発されている遺伝子組換えヒト LAL である。*In vitro* 実験により、セベリパーゼ　アルファは MMR を発現しているラットマクロファージ細胞に取り込まれ、ライソゾームへ輸送されることが示された。このマクロファージ細胞でのセベリパーゼ　アルファの結合及び取り込みに対するマンノースの濃度依存的競合阻害作用が示され、その作用はセベリパーゼ　アルファが MMR を介して細胞内に取込まれることが示唆された。さらに、セベリパーゼ　アルファは M6P を発現している LAL 欠損症乳児由来のヒト LAL 欠損線維芽細胞内に取り込まれ、LAL 活性を回復させた。

LAL 欠損症ラットモデルで、セベリパーゼ　アルファの薬理特性を評価した。Yoshida ラットは自然発生した LIPA 遺伝子の 3’欠失変異を有し、LAL 欠損症を生じる Donryu ラットである（Yoshida, 1990, *Lab Anim Sci*）。このホモ型 LAL 欠損ラットは、多数の組織（特に肝臓、脾臓及び小腸）のライソゾームでのコレステロールエステル及びトリグリセリドの蓄積、著明な臓器肥大、血清トランスアミナーゼ値の増加、成長障害及び早期死亡などのヒト疾患に類似した

形態学的、病理組織学的及び生化学的異常を呈する。LAL 欠損ラットにセベリパーゼ　アルファを投与すると、LAL 欠損症による異常が改善した。セベリパーゼ　アルファを投与した LAL 欠損ラットでは溶媒を投与した LAL 欠損ラットよりも体重増加が改善しており、全生存期間に関して肝臓、脾臓及び小腸など検査された全ての病変臓器の重量が低下するなど臓器肥大に関して改善効果が観察された。セベリパーゼ　アルファ投与により血清トランスアミナーゼ値は改善し、組織中のコレステロールエステル及びトリグリセリドのような LAL 基質含有量は低下した。これらの改善効果に伴い、肝臓の病理組織学的所見の改善が認められた。改善効果は短期間及び長期間のセベリパーゼ　アルファ投与後に認められ、また、ADA 存在下でも持続した。ライソゾーム病に対する他の酵素補充療法治療薬から予想される通り、本動物モデルでの効果の維持のためには継続的な酵素補充が必要であった。

SD ラットで中枢神経系又は呼吸器系に対して影響がなかったこと、また、カニクイザルで QT/QTc 延長など心血管系パラメータに対して影響がなかったことで示されるように、セベリパーゼ　アルファの安全性薬理プロファイルは容認できるものであった。セベリパーゼ　アルファを 1 回あたり最大 50 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回 4 週間投与した SD ラットでは、中枢神経系に対する毒性作用はみられず、セベリパーゼ　アルファを最大 50 mg/kg の用量で単回投与した SD ラットでは、生物学的に関連があると考えられる呼吸機能の変化は認められなかった。セベリパーゼ　アルファを 50 mg/kg の用量で単回投与したカニクイザルでは、セベリパーゼ アルファ投与に関連した心血管系有害作用は認められなかった。

動物にセベリパーゼ　アルファを静脈内（持続）投与したときの TK の結果は予測可能なものであった。セベリパーゼ　アルファの C_{max} は持続投与中又は投与終了後の早い時間に認められた。セベリパーゼ　アルファは血液中から速やかに消失し、組織取り込みには飽和過程の存在が考えられた。ラット、サル及びウサギにおける 3～60 mg/kg の用量範囲での曝露量（C_{max} 及び AUC_{last}）の増加の割合は用量比よりも大きかった。MMR 及び M6P 受容体の両者により取り込まれる N 結合型糖鎖を有することによってセベリパーゼ　アルファの組織取り込みは促進されていると考えられる。セベリパーゼ　アルファの速やかな消失は、他のライソゾーム酵素であり、マンノース末端や GlcNAc 末端を有する N 結合型糖鎖を含有するグルコセレブロシダーゼにおいてラット及びマウスで認められた現象によく類似している（Furbish, 1981, *Biochim Biophys Acta*; Friedman, 1999, *Blood*）。非臨床試験において、ADA の検出状況とセベリパーゼ アルファの全身曝露量の間に明らかな相関はないと考えられた。

カニクイザルにセベリパーゼ　アルファを単回静脈内持続投与した際の忍容性は良好であった。40 mg/kg ではセベリパーゼ　アルファ投与に関連した毒性は認められなかった。ヒト等価用量

は 12.9 mg/kg であり、臨床用量 3 mg/kg の 4.3 倍に相当した。SD ラットにセベリパーゼ　アルファを 1 週間に 1 回 4 週間静脈内持続投与並びに幼若カニクイザル（小児に相当する年齢）に 1 週間に 1 回 4 週間及び 6 ヵ月間投与した際の忍容性は良好であった。SD ラットに 1 週間に 1 回静脈内持続投与した際に一過性の一般状態の変化が認められたが、多糖類や糖タンパク質を投与したラットにおいて良く知られている即時型過敏症様反応と一致していた（Parratt, 1958, *Br J Pharmacol Chemother*; Harris, 1967, *Br J Pharmacol Chemother*; Ankier, 1968, *Br J Pharmacol Chemother*; West, 1981, *Agents Actions*; Moodley, 1982, *Eur J Pharmacol*）。SD ラットの 4 週間投与毒性試験の無毒性量は 50 mg/kg（ヒト等価用量は 8.1 mg/kg）と考えられ、臨床用量 3 mg/kg の 2.7 倍に相当した。カニクイザルでは過敏症様反応を示す明らかな一般状態の変化は認められなかった。6 ヵ月間投与毒性試験では 10 mg/kg 群の 1 例で投与 1 日に明らかなインフュージョン反応がみられたが、投与期間の後半ではジフェンヒドラミンを前投与しなくても、インフュージョン反応はみられなかった。カニクイザルの反復投与毒性試験における無毒性量は、4 週間投与毒性試験では 50 mg/kg（ヒト等価用量は 16.1 mg/kg）及び 6 ヵ月間投与毒性試験では 30 mg/kg（ヒト等価用量は 9.7 mg/kg）と考えられ、それぞれ臨床用量 3 mg/kg の 5.4 及び 3.2 倍に相当した。50 mg/kg は反復投与毒性試験で用いた最高用量である。ADA 及び抗[redacted]抗体の産生と毒性所見発現の間に関連性は認められなかった。

SD ラットの生殖発生毒性試験として、雌雄 SD ラットに交配前、交配期間中及び交配後に投与する受胎能及び初期胚発生に関する試験、妊娠 SD ラットの妊娠期間中に投与する胚・胎児発生に関する試験、並びに妊娠 SD ラットの妊娠期間及び授乳期間中に投与する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。これらの試験では、セベリパーゼ　アルファを最大 60 mg/kg の用量でおおよそ 3 日に 1 回静脈内持続投与した。ラットの生殖発生毒性試験においても、一過性で生死にかかわらない一般状態の変化（投与日に認められた腫脹及びひっかき反応）がみられたが、多糖類や糖タンパク質を投与したラットにおいて良く知られている反応と考えられた。その発現時期及び程度は用量依存的で、概してジフェンヒドラミンの投与により緩和された。これに加えて、胚・胎児発生に関する試験及び受胎能及び初期胚発生に関する試験では、より重度の過敏症反応が 4 回目以降の投与で認められた。雄ラットの受胎能及び初期胚発生に関する試験では最高用量の 60 mg/kg 群で最も重度であったことを除くと、この反応は用量依存的ではなかった。これらの変化を除くと、ラットの生殖発生毒性試験では忍容性は良好であった。セベリパーゼ　アルファに関連した死亡はなく、母動物への毒性、胚致死作用、胎児毒性及び催奇形作用はみられなかった。また、雌雄ラットの生殖能、受胎能及び初期胚発生に対する影響はなく、出生児の生存率、身体発育分化、感覚機能、初期行動発達

及び生殖能に対する影響はなかった。雄ラットの一般毒性に対する無毒性量は 20 mg/kg（ヒト等価用量は 3.2 mg/kg）、雌雄ラットの受胎能、胚発生、母動物の一般毒性、生殖能及び F_1 世代の発育分化に対する無毒性量又は無影響量は最高用量の 60 mg/kg（ヒト等価用量は 9.7 mg/kg）と考えられ、臨床用量 3 mg/kg の 1.1～3.2 倍に相当した。

New Zealand White ウサギの胚・胎児発生に関する試験では、忍容性は良好であった。予備試験では、妊娠ウサギにセベリパーゼ　アルファを 1 回あたり最大 50 mg/kg の用量で妊娠期間中に 3 日に 1 回静脈内持続投与した結果、母動物に対する影響はみられなかった。50 mg/kg のみで胚致死作用がみられたが、例数を多くした本試験では 50 mg/kg においても胚致死作用はみられなかったことから、毒性学的意義は不明であった。予備試験及び本試験ともに、セベリパーゼ アルファに関連した母動物の死亡及び一般状態の変化はなく、胎児毒性及び催奇形作用はみられなかった。母動物の一般毒性及び胚発生に対する無影響量は最高用量の 50 mg/kg（ヒト等価用量は 16.1 mg/kg）と考えられ、臨床用量 3 mg/kg の 5.4 倍に相当した。

結論として、LAL 欠損症動物モデルにセベリパーゼ　アルファを投与すると、血清トランスアミナーゼ値の改善、肝臓、脾臓及び小腸の臓器肥大の縮小、肝臓の病理組織学的所見の改善、成長速度の回復及び生存率の改善など特定の疾患異常が改善した。非臨床の一般毒性試験及び生殖発生毒性試験では、SD ラット、カニクイザル及び New Zealand White ウサギにおいて、臨床試験で使用され、申請時の用法用量案で推奨される用量及び用法を超える用量で、セベリパーゼ　アルファは問題のない非臨床安全性プロファイルを示し、セベリパーゼ　アルファの製造販売承認申請を適切に支持している。

2.4.6　参考文献

Ambler GA, Hoare M, Brais R, Shaw A, Butler A, Flynn P, et al.　Orthotopic liver transplantation in an adult with cholesterol ester storage disease.　*JIMD Rep*.　2013;8:41-6.

Ankier SI, West GB.　Inhibition of the anaphylactoid reaction in rats.　*Br J Pharmacol Chemother*.　1968;33(2):304-11.

Anderson RA, Bryson GM, Parks JS.　Lysosomal acid lipase mutations that determine phenotype in Wolman and cholesterol ester storage disease.　*Mol Genet Metab*.　1999;68(3):333-45.

Barrow PC. Toxicology testing for products intended for pediatric populations. In: Sietsema WK, Schwen R, editors. Nonclinical drug safety assessment: practical considerations for successful registrations. *FDAnews*; May 2007. p.413.

Beaudet AL, Ferry GD, Nichols BL Jr, Rosenberg HS. Cholesterol ester storage disease: Clinical, biochemical, and pathological studies. *J Pediatr.* 1977;90:910-4.

Bielicki J, Crawley AC, Davey RC, Varnai JC, Hopwood JJ. Advantages of using same species enzyme for replacement therapy in a feline model of mucopolysaccharidosis type VI. *J Biol Chem.* 1999;274(51):36335-43.

Chamanza R, Parry NM, Rogerson P, Nicol JR, Bradley AE. Spontaneous lesions of the cardiovascular system in purpose-bred laboratory nonhuman primates. *Toxicol Pathol.* 2006;34(4):357-63.

Chamanza R, Marxfeld HA, Blanco AI, Naylor SW, Bradley AE. Incidences and range of spontaneous findings in control Cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis) used in toxicity studies. *Toxicol Pathol.* 2010;38(4):642-57.

Crocker AC, Vawter GF, Neuhauser EB, Rosowsky A. Wolman's disease: three new patients with a recently described lipidosis. *Pediatrics.* 1965;35:627-40.

Dincsoy HP, Rolfes DB, McGraw CA, Schubert WK. Cholesterol ester storage disease and mesenteric lipodystrophy. *Am J Clin Pathol.* 1984;81:263-9.

Elleder M, Chlumska A, Ledvinová J, Poupetová H. Testis - a novel storage site in human cholesteryl ester storage disease. Autopsy report of an adult case with a long-standing subclinical course complicated by accelerated atherosclerosis and liver carcinoma. *Virchows Arch.* 2000;436:82-7.

Friedman B, Vaddi K, Preston C, Mahon E, Cataldo JR, McPherson JM. A comparison of the pharmacological properties of carbohydrate remodeled recombinant and placental-derived β-glucocerebrosidase: implications for clinical efficacy in treatment of Gaucher disease. *Blood.* 1999;93(9):2807-16.

Furbish FS, Steer CJ, Krett NL, Barranger JA. Uptake and distribution of placental glucocerebrosidase in rat hepatic cells and effects of sequential deglycosylation. *Biochim Biophys Acta.* 1981;673(4):425-34.

Grabowski GA, Du H, Charnas L. Lysosomal acid lipase deficiencies: The Wolman disease / cholesteryl ester storage disease spectrum. In: Valle D, Beaudet AL, Vogelstein B, Kinzler KW, Antonarakis SE, Ballabio A, eds. The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. New York City, NY: McGraw Hill Companies, Inc. Updated March 2012. Available from: http://ommbid.mhmedical.com/book.aspx?bookID=474 . Accessed 09 May 2014.

Harris JM, Luscombe DK, Poyser RH. The influence of molecular weight and structure on the vascular permeability responses induced by glucose polymers in rat skin. *Br J Pharmacol Chemother.* 1967;29(1):16-24.

Konno T, Fujii M, Watanuki T, Koizumi K. Wolman's disease: The first case in Japan. *Tohoku J Exp Med.* 1966;90(4):375-89.

Marshall WC, Ockenden BG, Fosbrooke AS, Cumings JN. Wolman's disease. A rare lipidosis with adrenal calcification. *Arch Dis Child.* 1969;44(235):331-41.

Mayatepek E, Seedorf U, Wiebusch H, Lenhartz H, Assmann G. Fatal genetic defect causing Wolman disease. *J Inherit Metab Dis.* 1999;22:93-4.

Moodley I, Mongar JL, Foreman JC. Histamine release induced by dextran: the nature of the dextran receptor. *Eur J Pharmacol.* 1982;83(1-2):69-81.

Parratt JR, West GB. Inhibition by various substances of oedema formation in the hind-paw of the rat induced by 5-hydroxytryptamine, histamine, dextran, eggwhite and compound 48/80. *Br J Pharmacol Chemother.* 1958;13(1):65-70.

Partin JC, Schubert WK. Small intestinal mucosa in cholesterol ester storage disease. A light and electron microscope study. *Gastroenterol.* 1969;57(5):542-58.

Shull RM, Kakkis ED, McEntee MF, Kania SA, Jonas AJ, Neufeld EF. Enzyme replacement in a canine model of Hurler syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91(26):12937-41.

Sloan HR and Fredrickson DS. Enzyme deficiency in cholesteryl ester storage disease. *J Clin Invest.* 1972;51:1923-6.

Vidal JD, Drobatz LS, Holliday DF, Geiger LE, Thomas HC. Spontaneous findings in the heart of Mauritian-origin Cynomolgus macaques (Macaca fascicularis). *Toxicol Pathol.* 2010;38(2):297-302.

Vogler C, Levy B, Galvin NJ, Thorpe C, Sands MS, Barker JE, et al. Enzyme replacement in murine mucopolysaccharidosis type VII: neuronal and glial response to beta-glucuronidase requires early initiation of enzyme replacement therapy. *Pediatr Res.* 1999;45(6):838-44.

West GB. Histamine release by sugar polymers in the rat. *Agents Actions.* 1981:11(1-2):75-6.

Yoshida H, Kuriyama M. Genetic lipid storage disease with lysosomal acid lipase deficiency in rats. *Lab Anim Sci.* 1990;40(5):486-9.

2.4.7　試験を実施しなかった理由

本項では報告書を添付しなかった試験について理由とともに示す（表 2.4-6）。

表 2.4-6　実施しなかった試験の一覧

Module 4		
4.2.1	**薬理試験**	
4.2.1.2	副次的薬理試験	副次的薬理試験は実施しなかった。セベリパーゼ　アルファは欠失内因性酵素に対する酵素補充療法治療薬である。そのため、特定の非臨床副次的薬理試験を必要とする科学的根拠は見出せない。
4.2.1.4	薬力学的薬物相互作用	薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。セベリパーゼ　アルファは欠失内因性酵素に対する酵素補充療法治療薬である。そのため、特定の非臨床薬力学的薬物相互作用試験を必要とする科学的根拠は見出せない。
4.2.2	**薬物動態試験**	
4.2.2.2	吸収	セベリパーゼ　アルファは静脈内持続投与されるため、吸収性については評価しなかった。
4.2.2.3	分布	重要な組織への分布、用量及び投与方法に関する知見は、効力を裏付ける試験の結果から容易に入手可能であったことから、セベリパーゼ　アルファの非臨床評価のうち、生体内分布試験は実施しなかった。
4.2.2.4	代謝	セベリパーゼ　アルファの代謝に関する試験は実施しなかった。セベリパーゼ　アルファは内因性のヒト酵素と同一のアミノ酸配列を有するタンパク質であり、ペプチド加水分解により代謝的な分解を受けると考えられる。
4.2.2.5	排泄	セベリパーゼ　アルファの排泄に関する試験は実施しなかった。この酵素の排泄は、内因性タンパク質と同じであると考えられる。
4.2.2.6	薬物動態学的薬物相互作用（非臨床）	薬物動態学的薬物相互作用に関する試験は実施しなかった。セベリパーゼ　アルファは内因性酵素欠損に対する酵素補充療法治療薬である。特定の非臨床 PK 薬物相互作用試験を要する科学的根拠は見当たらなかった。
4.2.2.7	その他の薬物動態試験	その他の非臨床 PK 試験は実施しなかった。セベリパーゼ　アルファは内因性酵素欠損に対する酵素補充療法治療薬であり、その他の PK 試験を要する科学的根拠は見当たらなかった。

表 2.4-6　実施しなかった試験の一覧（続き）

Module 4		
4.2.3	**毒性試験**	
4.2.3.3	**遺伝毒性試験**	
4.2.3.3.1	*In Vitro* 試験	ICH ガイドライン S6（R1）では、遺伝子組換えヒト酵素が DNA や染色体成分と直接相互作用するとは考えにくく、従来の医薬品について通常実施されてきた遺伝毒性試験の範囲と種類は、バイオ医薬品に対しては適切なものではなく必要とされないとされていることから、セベリパーゼ　アルファの遺伝毒性試験は実施しなかった。 このことは EMA の科学的助言ワーキングパーティー（SAWP）により支持されている。 ［EMA/CHMP/SAWP/447273/2012］
4.2.3.3.2	*In Vivo* 試験	
4.2.3.4	**がん原性試験**	
4.2.3.4.1	長期がん原性試験	ICH ガイドライン S6（R1）では、バイオ医薬品においては標準的ながん原性試験は一般的に不適当とされていることから、セベリパーゼ　アルファのがん原性試験は実施しなかった。 このことは EMA の科学的助言ワーキングパーティー（SAWP）により支持されている。 ［EMA/CHMP/SAWP/447273/2012］
4.2.3.4.2	短期又は中期がん原性試験	
4.2.3.4.3	その他の試験	
4.2.3.5	**生殖発生毒性試験**	
4.2.3.5.4	新生児を用いた試験	セベリパーゼ　アルファは小児への適用においても開発していることから、毒性試験で幼若カニクイザル（3 歳未満）の 4 週間及び 6 ヵ月間投与毒性試験などを実施している。当該試験（SBC102-T001 及び SBC102-T006）の報告書は Module 4.2.3.2 に添付している。
4.2.3.6	**局所刺激性試験**	
4.2.3.6	局所刺激性試験	4 週間及び 6 ヵ月間投与毒性試験の中で局所刺激性について検討していることから、セベリパーゼ　アルファの局所刺激性試験は実施していない。
4.2.3.7	**その他の毒性試験**	
4.2.3.7.1	抗原性試験	セベリパーゼ　アルファの抗原性試験は実施していない。SD ラット、カニクイザル及び New Zealand White ウサギの反復投与毒性試験あるいは生殖発生毒性試験並びに LAL 欠損ラットの効力を裏付ける試験内で、抗薬物抗体産生について検討している。

表 2.4-6　実施しなかった試験の一覧（続き）

Module 4		
4.2.3.7.2	免疫毒性試験	非臨床試験で免疫原性について検討しているので、セベリパーゼ　アルファの免疫毒性試験は実施していない。非臨床試験計画の適切性については、[redacted] 年に protocol assistance request の一部として EMA の CHMP と協議している。セベリパーゼ　アルファの免疫原性について考察し、免疫毒性試験を実施しないことを説明できるという条件で、提案した試験パッケージは欧州の製造販売承認申請をサポートするために適切であることに、CHMP は合意した。 非臨床試験では剖検前に採取した血液試料中に ADA が検出されていることから、セベリパーゼ　アルファに免疫原性があることは明らかである。これは遺伝子組換えヒトタンパク質を異種動物に投与した際に予想される反応であり、ラットで実施した以前の試験成績と一致している。セベリパーゼ　アルファの毒性試験では抗薬物抗体が検出されたが、用量依存的ではなかった（2.4.4.8 項参照）。
4.2.3.7.3	毒性発現の機序に関する試験	セベリパーゼ　アルファの毒性発現の機序に関する試験は実施していない。臨床試験及び非臨床試験の成績並びにセベリパーゼ　アルファの既知の機序を考え合わせると、毒性発現の機序に関する試験は必要ないと考えられる。
4.2.3.7.4	依存性試験	セベリパーゼ　アルファの依存性試験は実施していない。セベリパーゼ　アルファは効果を発現するために継続的に処置する必要のある酵素補充療法治療薬であり、このクラスの薬物では身体依存性及び精神依存性の可能性は考えられない。
4.2.3.7.5	代謝物の毒性試験	セベリパーゼ　アルファの代謝物の毒性試験は実施していない。セベリパーゼ　アルファの臨床試験及び非臨床試験の成績並びに毒性プロファイルを考え合わせると、代謝物の毒性試験は必要ないと考えられる。

表 2.4-6　実施しなかった試験の一覧（続き）

Module 4		
4.2.3.7.6	不純物の毒性試験	セベリパーゼ　アルファの不純物の毒性試験は実施していない。バイオ医薬品では認められることであるが、製造工程に関連した不純物として、残留した宿主細胞の DNA あるいはタンパク質が含まれる可能性がある。セベリパーゼ　アルファでは [redacted]、[redacted]又は[redacted]などの卵白タンパク質が不純物として含まれる可能性がある。これらの天然由来タンパク質について毒性試験を実施しても意味のある情報が得られるとは考えられない。臨床試験で抗体産生及びインフュージョン反応をモニターしている。確認のために、サルの 6 ヵ月間投与毒性試験で抗[redacted]抗体産生を検討し、用量依存的な抗[redacted]抗体の産生が確認された。
4.2.3.7.7	その他の試験	セベリパーゼ　アルファのその他の試験は実施していない。セベリパーゼ　アルファの臨床試験及び非臨床試験の成績並びに毒性プロファイルを考え合わせると、その他の試験は必要ないと考えられる。