目次

2.6.1 緒言 3
2.6.1.1 構造式及び薬理学的特性 3
2.6.1.2 適応症及び投与方法（案） 4
2.6.1.3 非臨床試験計画 5
2.6.1.4 参考文献 6

図目次

図 2.6.1-1 遺伝子組換えヒトLAL（セベリパーゼ　アルファ）の推定アミノ酸配列 3

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）
LAL	lysosomal acid lipase	ライソゾーム酸性リパーゼ
M6P	mannose-6-phosphate	マンノース-6-リン酸
SD	Sprague-Dawley	－

2.6.1　緒言

2.6.1.1　構造式及び薬理学的特性

セベリパーゼ　アルファ（SBC-102）は遺伝子組換えヒトライソゾーム酸性リパーゼであり、トランスジェニックニワトリ発現系を用いて、組換え DNA 技術により卵白中に産生される。精製されたセベリパーゼ　アルファは分子量が約 55 kD の糖タンパク質であり、ヒト固有の酵素と同一のアミノ酸配列を有する（図 2.6.1-1）。セベリパーゼ　アルファは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、並びに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、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又は広範に発現している M6P 受容体を介した細胞への取り込みを促進している。セベリパーゼ　アルファは、欠損又は不足しているライソゾーム酸性リパーゼ（LAL）を遺伝子組換えヒト型酵素で補充することにより、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。

図 2.6.1-1　遺伝子組換えヒト LAL（セベリパーゼ　アルファ）の推定アミノ酸配列

```
                    1                                                  39
mkmrflglvvclvlwtlhsegSGGKLTAVDPETNMNVSEIISYWGFPSEEYLVETEDGYI

40                                                                     99
LCLNRIPHGRKNHSDKGPKPVVFLQHGLLADSSNWVTNLANSSLGFILADAGFDVWMGNS

100                                                                   159
RGNTWSRKHKTLSVSQDEFWAFSYDEMAKYDLPASINFILNKTGQEQVYYVGHSQGTTIG

160                                                                   219
FIAFSQIPELAKRIKMFFALGPVASVAFCTSPMAKLGRLPDHLIKDLFGDKEFLPQSAFL

220                                                                   279
KWLGTHVCTHVILKELCGNLCFLLCGFNERNLNMSRVDVYTTHSPAGTSVQNMLHWSQAV

280                                                                   339
KFQKFQAFDWGSSAKNYFHYNQSYPPTYNVKDMLVPTAVWSGGHDWLADVYDVNILLTQI

340                                  378
TNLVFHESIPEWEHLDFIWGLDAPWRLYNKIINLMRKYQ
```

遺伝子組換えヒト LAL 遺伝子の推定アミノ酸配列は天然型ヒト LAL（Genbank Refseq, NM_000235.2）と 100%の相同性を有する。小文字はリーダーシグナルペプチド配列を示す。下線は 3 つの代替 N 末端残基、S1（メジャー型）、G3 及び T6（マイナー型）を示す。

2.6.1.2　適応症及び投与方法（案）

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中である。LAL 欠損症はまれ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*）。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。すべての患者における症状は病原学的に関連しており、共通の病態生理を示す。LAL 欠損症の合併症は同じ遺伝子の変異に起因しており、同タイプの脂質の蓄積を引き起こす。LAL 欠損症では、トランスアミナーゼの増加で示される肝障害の徴候が、乳児を含む広範な年齢範囲で認められる。肝線維症及び肝硬変を併発した、小滴性脂肪症を伴う肝臓での異常な脂質の蓄積も、乳児を含む広範な年齢範囲で認められる。腸管合併症による吸収不良は、乳児に最も顕著に認められるが、罹患した小児及び成人においても認められる。成長障害は、乳児に最も顕著に認められるが、罹患した小児においても認められる。共通して認められる、高比重リポタンパク質の低下及びトリグリセリドの増加を含む共通の脂質異常は広範な年齢範囲で認められる。患者集団の年齢分布も、一連の疾患であること及びいくつかの他の疾患でみられるように二つの別個の集団ではないことを支持している。

セベリパーゼ　アルファは、欠損又は不足している LAL 酵素を遺伝子組換えヒト型酵素で補充することにより、LAL 欠損標的細胞の LAL 活性を増加させ、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、LAL 欠損症による非常に重篤な影響を減少させる。

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。

2.6.1.3　非臨床試験計画

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については、非臨床試験 7 試験、すなわち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。

In vitro 試験から、セベリパーゼ　アルファが一貫して発現する N 結合型糖鎖構造を介して、重要標的細胞での効果的な取り込みとライソゾームへの標的化を可能にする特性を持つことが示唆されている。ラットモデルでセベリパーゼ　アルファの *in vivo* 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 欠損ラットは肝腫大などの著明な臓器肥大、血清トランスアミナーゼの増加、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。本非臨床疾患モデルにセベリパーゼ　アルファを 5 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回 4 週間又は 3 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回 19 週間、静脈内持続投与すると、血清トランスアミナーゼの改善、肝臓、脾臓及び小腸など臓器肥大の縮小、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の改善が認められた。他のライソゾーム病に対する酵素補充療法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。

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。

SD ラット及びカニクイザルにセベリパーゼ　アルファを毎週 1 回静脈内持続投与した際の忍容性は良好であった。反復投与毒性試験における無毒性量は、検討した最高用量、すなわち、ラットでは 50 mg/kg（4 週間投与毒性試験）、サルでは 50 及び 30 mg/kg（4 週間及び 6 ヵ月間投与毒性試験）と考えられ、これらのヒト等価用量は臨床用量 3 mg/kg の約 3～5 倍に相当する。

生殖発生毒性試験では、SD ラットにセベリパーゼ　アルファを 3 日に 1 回又は 1 週間に 2 回静脈内持続投与した結果、雄ラットの一般毒性に対する無毒性量は 20 mg/kg と考えられた（最高用量の 60 mg/kg ではインフュージョン反応が強く認められた）。雌雄ラットの受胎能、胚発生、母動物の一般毒性及びラットの出生前後の 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 と考えられた。ラットの生殖発生毒性試験の無毒性量のヒト等価用量は臨床用量 3 mg/kg の約 1～3 倍に相当する。New Zealand White ウサギでは母動物の一般毒性

及び胚発生に対する無毒性量又は無影響量は最高用量の 50 mg/kg と考えられた。ヒト等価用量は臨床用量 3 mg/kg の約 5 倍に相当する。

全体的にみると、製造販売承認申請のための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、今回の非臨床試験計画は適切に支持している。

2.6.1.4　参考文献

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.

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

目次

2.6.2 薬理試験の概要文 6
2.6.2.1 まとめ 6
2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験 7
2.6.2.1.2 副次的薬理試験 8
2.6.2.1.3 安全性薬理試験 8
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 8
2.6.2.2.1 *In vitro* 薬理試験 9
2.6.2.2.1.1 ラットマクロファージ細胞における取り込み 9
2.6.2.2.1.1.1 ラットマクロファージ細胞における取り込み及びライソゾーム局在化（SBC102-P001） 9
2.6.2.2.1.1.2 ラットマクロファージ細胞における受容体特異性（SBC102-P001） 10
2.6.2.2.1.2 セベリパーゼ　アルファ処置ヒト線維芽細胞における取り込みとLAL活性増加（SBC102-P001） 11
2.6.2.2.2 *In vivo* 薬理試験 12
2.6.2.2.2.1 LAL欠損症ラットモデル 12
2.6.2.2.2.2 LAL欠損ラットの遺伝学的特性（SBC102-P002） 13
2.6.2.2.2.3 LAL欠損表現型の特性（SBC102-P002, SBC102-P003, SBC102-P006） ..14
2.6.2.2.2.4 LAL欠損ラットにセベリパーゼ　アルファを 5 mg/kgの用量で 4 週間投与した際の薬力学的効果（SBC102-P002） 21
2.6.2.2.2.5 投与開始を延期したLAL欠損ラットにセベリパーゼ　アルファを 3 mg/kgの用量で 19 週間投与した際の薬力学的効果（SBC102-P005） .24
2.6.2.2.2.6 セベリパーゼ　アルファを 3 mg/kgの用量で投与した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） 33
2.6.2.2.2.7 LAL欠損ラットにおけるセベリパーゼ　アルファの用量反応性（SBC102-P002） 40
2.6.2.3 副次的薬理試験 42
2.6.2.4 安全性薬理試験 42

2.6.2.4.1 中枢神経系安全性薬理；ラットの 4 週間静脈内持続投与毒性試験及び 2 週間回復性試験、[redacted] Study No. 8232384（SBC102-T002） 43
2.6.2.4.2 心血管系安全性薬理；テレメトリー装着覚醒雄性サルへのセベリパーゼ アルファ静脈内持続投与による心血管系安全性薬理評価、[redacted] Study No. 8232454（SBC102-T004） 44
2.6.2.4.3 呼吸器系安全性薬理；ヘッドアウトプレチスモグラフィを用いた雄性ラットへのセベリパーゼ　アルファ静脈内投与による呼吸器系安全性薬理評価、[redacted] Study No. 8232453（SBC102-T005） 45
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用 46
2.6.2.6 考察及び結論 46
2.6.2.7 図表 49
2.6.2.8 参考文献 49

表目次

表 2.6.2-1 効力を裏付ける試験の一覧 9
表 2.6.2-2 3 週齢から 12 週齢のLAL欠損ラット及び野生型ラットの体重（g） 15
表 2.6.2-3 4 週齢から 13 週齢の LAL欠損ラット及び野生型ラットの体重 16
表 2.6.2-4 4 週齢、8 週齢及び 10 週齢の LAL欠損ラット及び野生型ラットの臓器重量（体重に対する相対重量） 18
表 2.6.2-5 12 週齢から 13 週齢の LAL欠損ラット及び野生型ラットの臓器重量（体重に対する相対重量） 19
表 2.6.2-6 セベリパーゼ アルファを 3 mg/kgの用量で 1 週間に 1 回 19 週間投与したLAL欠損ラットの相対臓器重量 （体重に対する相対重量） 27
表 2.6.2-7 セベリパーゼ アルファを 3 mg/kgの用量で 1 週間に 1 回 19 週間投与したLAL欠損ラットの空腸コレステロール含有量 28
表 2.6.2-8 セベリパーゼ アルファを 3 mg/kgの用量で 1 週間に 1 回 19 週間投与したLAL欠損ラットの肝臓コレステロール含有量 29
表 2.6.2-9 セベリパーゼ アルファを 3 mg/kgの用量で 1 週間に 1 回 19 週間投与したLAL欠損ラットの肝臓トリグリセリド含有量 30
表 2.6.2-10 セベリパーゼ アルファを 3 mg/kgの用量で 1 週間に 1 回 19 週間投与したLAL欠損ラット（27 週齢）及び溶媒を投与したLAL欠損ラット（9 週齢から 12 週齢）の血清トランスアミナーゼ及びアルカリホスファターゼ値 31
表 2.6.2-11 24 週齢から 28 週齢の野生型ラットの血清トランスアミナーゼ及びアルカリホスファターゼ値 31
表 2.6.2-12 セベリパーゼ アルファを 3 mg/kgの用量で 1 週間に 1 回 19 週間投与したLAL欠損ラット（27 週齢）及び溶媒を投与したLAL欠損ラット（9 週齢から 12 週齢）の血清脂質パラメータ 32
表 2.6.2-13 24 週齢から 28 週齢の野生型ラットの血清脂質パラメータ 32
表 2.6.2-14 セベリパーゼ アルファ投与中止後の試験スケジュール 34
表 2.6.2-15 安全性薬理試験 43

図目次

図 2.6.2-1 マクロファージ細胞におけるセベリパーゼ アルファのライソゾーム局在化 10
図 2.6.2-2 マンナンによるセベリパーゼ アルファの取り込み阻害作用 11
図 2.6.2-3 LAL欠損症乳児由来ヒト線維芽細胞のセベリパーゼ アルファとのインキュベーション後のLAL活性 12
図 2.6.2-4 ラットの遺伝子解析 14
図 2.6.2-5 野生型ラット及び溶媒又はセベリパーゼ アルファを 5 mg/kgの用量で 1 週間に 1 回 4 週間投与したLAL欠損ラットの体重 22
図 2.6.2-6 8 週齢の野生型ラット及び溶媒又はセベリパーゼ アルファを 5 mg/kgの用量で 1

週間に 1 回 4 週間投与した 8 週齢のLAL欠損ラットの臓器重量（体重に対する相対重量） 23
図 2.6.2-7　8 週齢の野生型ラット及び溶媒又はセベリパーゼ　アルファを 5 mg/kgの用量で 1 週間に 1 回 4 週間投与した 8 週齢のLAL欠損ラットの肝臓コレステロール、コレステロールエステル及びトリグリセリド含有量 23
図 2.6.2-8　セベリパーゼ　アルファを 3 mg/kgの用量で 1 週間に 1 回 19 週間投与したLAL欠損ラットの平均週間体重 25
図 2.6.2-9　野生型Yoshidaラットの平均体重--背景データ 25
図 2.6.2-10　セベリパーゼ　アルファを 3 mg/kgの用量で 1 週間に 1 回 19 週間投与したLAL欠損ラットの平均週間体重変化（成長速度） 26
図 2.6.2-11　セベリパーゼ　アルファを 3 mg/kgの用量で 1 週間に 1 回 4 週間投与した後のLAL欠損ラットの平均体重 35
図 2.6.2-12　セベリパーゼ　アルファを 3 mg/kgの用量で 1 週間に 1 回 4 週間投与した後のLAL欠損ラットの相対肝臓重量 36
図 2.6.2-13　セベリパーゼ　アルファを 3 mg/kgの用量で 1 週間に 1 回 4 週間投与した後のLAL欠損ラットの肝臓コレステロール含有量 36
図 2.6.2-14　セベリパーゼ　アルファを 3 mg/kgの用量で 1 週間に 1 回 4 週間投与した後のLAL欠損ラットの肝臓トリグリセリド含有量 37
図 2.6.2-15　セベリパーゼ　アルファを 3 mg/kgの用量で 1 週間に 1 回 4 週間投与した後のLAL欠損ラットの血清コレステロール及びトリグリセリド値 37
図 2.6.2-16　セベリパーゼ　アルファを 3 mg/kgの用量で 1 週間に 1 回 4 週間投与した後のLAL欠損ラットの血清高比重リポタンパク質及び低比重リポタンパク質値 38
図 2.6.2-17　セベリパーゼ　アルファを 3 mg/kgの用量で 1 週間に 1 回 4 週間投与した後のLAL欠損ラットの血清トランスアミナーゼ値 39

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）
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
AST	Aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
DNA	Deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
FACS	fluorescence-activated cell-sorting	－
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
HDL	High-density lipoprotein	高比重リポタンパク質
LAL	Lysosomal acid lipase	ライソゾーム酸性リパーゼ
LDL	Low-density lipoprotein	低比重リポタンパク質
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
PCR	Polymerase chain reaction	ポリメラーゼ連鎖反応
SD	Sprague-Dawley	－

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

ライソゾーム酸性リパーゼ（LAL）欠損症は稀な常染色体性劣性一遺伝子疾患であり、遺伝子変異はLALをコードする遺伝子（LIPA）に影響し、酵素活性の著明な低下又は欠失を引き起こす。そのため標的臓器及び組織のライソゾームにLALの基質であるコレステロールエステル及びトリグリセリドが蓄積する（Grabowski, 2012, *The Online Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease [online]*）。LAL欠損症は著しい健康障害及び平均余命の短縮を伴い、有効な治療法はない。

LAL欠損症は単一の疾患であるが、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（Grabowski, 2012, *The Online Metabolic & Molecular Basis of Inherited Diseases [online]*）。

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 Basis 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、脂質異常症及び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 Basis 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（SBC-102）は Synageva BioPharma 社が LAL 欠損症に対する酵素補充療法治療薬として開発している。セベリパーゼ　アルファは遺伝子組換えヒト LAL 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、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）又は広範に発現している 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。

本文書で要約された非臨床薬理データは、LAL 欠損症動物モデルでの臨床的に重要な各種評価項目に対する酵素補充療法治療薬であるセベリパーゼ　アルファの有効性を示している。

2.6.2.1.1　効力を裏付ける試験

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。ラットマクロファージ細胞株で fluorescence-activated cell-sorting （FACS）分析を用いてマンノース含有オリゴ多糖マンナンによる *in vitro* 競合阻害試験を実施し、セベリパーゼ　アルファの組織取り込みにおける MMR 特異性を確認した。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（Coriell Institute, GM06144）のライソゾームへの内在化後、セベリパーゼ　アルファは酵素活性を保持し、蓄積した脂質基質の加水分解を触媒した。

LAL欠損症ラットモデルで、セベリパーゼ　アルファの*in vivo*薬力学的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。一方、ヘテロ型ラットはヒト同様、まったく病気の兆候を呈すことはない。セベリパーゼ　アルファを投与することにより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、また、肝臓、小腸及び脾臓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。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。改善効果は短期及び長期のセベリパーゼ　アルファ投与後に認められ、また、抗薬物抗体（ADA）存在下でも持続した。より進行した病態（8週齢）で認められた改善効果は、より早期の投与開始（4 週齢）によって認められた効果と同程度であった。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とおり、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。

2.6.2.1.2　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、補充を必要とする欠失酵素に対し生化学的に高い相同性を持った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。

2.6.2.1.3　安全性薬理試験

安全性薬理試験として Sprague-Dawley（SD）ラットで、（1）呼吸器系に対する単回静脈内投与の影響及び（2）中枢神経系に対する 1 週間に 1 回反復静脈内投与の影響を評価した。また、カニクイザルで心血管系安全性薬理評価を実施した。セベリパーゼ　アルファを最大 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なかった。セベリパーゼ　アルファを最大 50 mg/kg の用量で投与した雄性 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 の用量で単回静脈内持続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。

2.6.2.2　効力を裏付ける試験

表 2.6.2-1 に効力を裏付ける試験の概要を示す。

表 2.6.2-1　効力を裏付ける試験の一覧

試験番号	試験の種類	試験系	用量（mg/kg）	GLP 適用
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	*In vitro* NR8383 ラットマクロファージ	--	不適
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	*In vitro* ヒト線維芽細胞	--	不適
SBC102-P002	セベリパーゼ　アルファの薬物動態及び薬理作用	Yoshida ラット	1 週間に 1 回 0 1 週間に 1 回 5	不適
SBC102-P003	LAL 欠損ラットの生存率解析	Yoshida ラット	なし	不適
SBC102-P005	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	Yoshida ラット	1 週間に 1 回 0 1 週間に 1 回 3	不適
SBC102-P006	LAL 欠損及び野生型ラット表現型 - 臨床観察	Yoshida ラット	なし	不適
SBC102-P012	肝臓におけるコレステロールとトリグリセリドの消失と再蓄積	Yoshida ラット	1 週間に 1 回 3	不適

GLP = 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準；LAL = ライソゾーム酸性リパーゼ

2.6.2.2.1　*In vitro* 薬理試験

2.6.2.2.1.1　ラットマクロファージ細胞における取り込み

2.6.2.2.1.1.1　ラットマクロファージ細胞における取り込み及びライソゾーム局在化（SBC102-P001）

（4.2.1.1.1）

MMRを発現しているラット肺胞マクロファージ細胞株NR8383（Lane, 1998, *J Leukoc Biol*）を用いてライソゾームへのセベリパーゼ　アルファの取り込みと局在化を検討した（SBC102-P001）。

方法

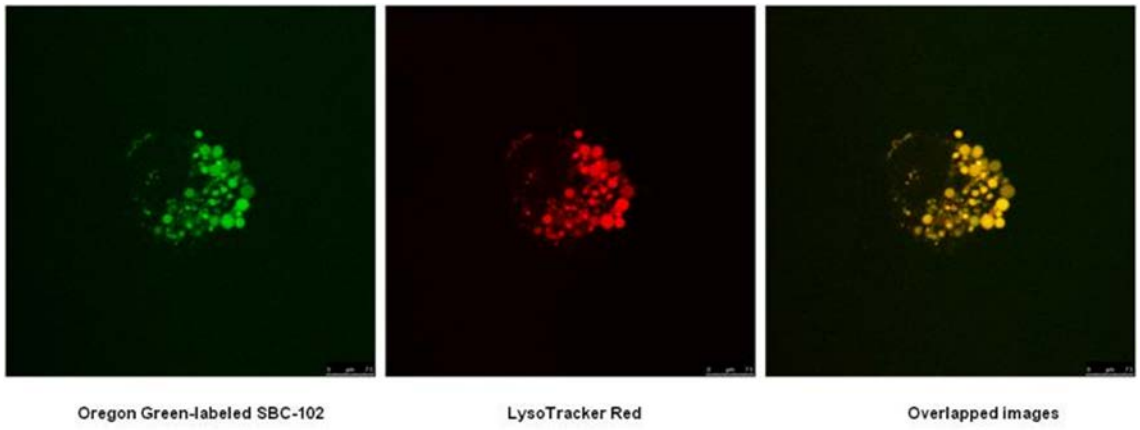
オレゴングリーンで蛍光標識したセベリパーゼ　アルファ 5 µg/mL（91 nmol/L）とライソゾームマーカー“LysoTracker® Red”（Invitrogen）75 µmol/Lを細胞と 2 時間インキュベートした。

その後、細胞におけるセベリパーゼ　アルファとライソゾームマーカーの共局在について共焦点蛍光顕微鏡の連続スキャンモードを使用して観察した（図 2.6.2-1）。

結果

セベリパーゼ　アルファのライソゾームへの局在化が示され、これは既に報告されている遺伝子組換えヒトLALを用いた同様の各種*in vitro*試験結果と一致した（Du, 2001, *Hum Mol Genet*; Du, 2005, *Am J Hum Genet*）。

図 2.6.2-1　マクロファージ細胞におけるセベリパーゼ　アルファのライソゾーム局在化



出典：SBC102-P001 (4.2.1.1.1) Study Report Figure 8-1
蛍光標識したセベリパーゼ　アルファ（SBC-102）及び Lyso Tracker Red とのインキュベーション後の NR8383 マクロファージの蛍光顕微鏡検査。共焦点蛍光顕微鏡の連続スキャンモードを使用して、488 nm 及び 514 nm で励起し、撮影した。

2.6.2.2.1.1.2　　ラットマクロファージ細胞における受容体特異性（SBC102-P001）

（4.2.1.1.1）

MMR を発現しているラット肺胞マクロファージ細胞株 NR8383 を用いて競合結合実験を行い、MMR に対するセベリパーゼ　アルファの結合特異性を評価した（図 2.6.2-2）（SBC102-P001）。

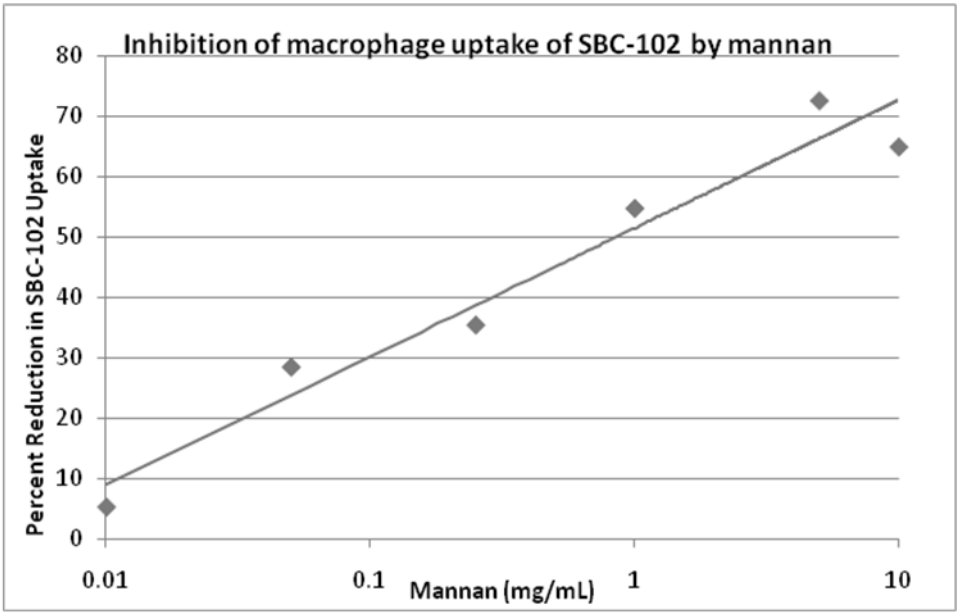
方法

オレゴングリーンで蛍光標識したセベリパーゼ　アルファ 5 µg/mL（91 nmol/L）と各種濃度のマンノース含有オリゴ糖であるマンナンを細胞と 2 時間インキュベートした。セベリパーゼ アルファの取り込みに対するマンナンによる相対阻害を、マンナン非存在下の対照群と比較し、蛍光強度の中央値をエンドポイントとして FACS 分析で定量化した。

結果

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阻害作用が認められ、セベリパーゼ　アルファが MMR を介してライソゾームに局在することが示された。

図 2.6.2-2　マンナンによるセベリパーゼ　アルファの取り込み阻害作用



出典：SBC102-P001 (4.2.1.1.1) Study Report Figure 8-2
蛍光標識したセベリパーゼ　アルファ（SBC-102）及び各濃度のマンナンを NR8383 細胞と 2 時間インキュベートした。セベリパーゼ　アルファの取り込みはエンドポイントとして蛍光強度の中央値を用いた蛍光活性化セルソーターで測定した。

2.6.2.2.1.2　セベリパーゼ　アルファ処置ヒト線維芽細胞における取り込みとLAL活性増加（SBC102-P001）

（4.2.1.1.1）

LAL 欠損細胞を用いた *in vitro* 実験でセベリパーゼ　アルファの LAL 活性増加能を調べた（SBC102-P001）。

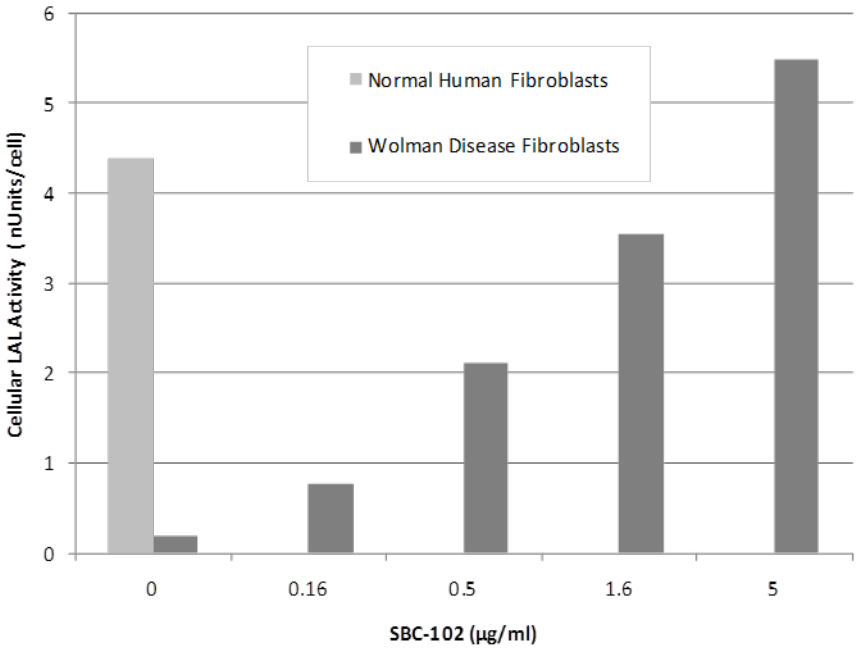
方法

セベリパーゼ　アルファを最大 5 µg/mL の濃度で LAL 欠損症乳児由来の非形質転換線維芽細胞（Coriell Institute for Medical Research, Camden, NJ）と 37℃で 4 時間インキュベートした。非特異的シグナルを除去するために細胞を洗浄し、細胞溶解液の LAL 活性を 4 メチルウンベリフェリルオレアートを酵素基質として測定した。

結果

正常ヒト線維芽細胞に比べて LAL 欠損症乳児由来のヒト線維芽細胞では細胞内在性 LAL 活性は非常に低く、LAL 欠損線維芽細胞をセベリパーゼ　アルファとインキュベートすると、濃度依存的な LAL 活性の増加が認められた（図 2.6.2-3）。これらの結果から、セベリパーゼ　アルファは LAL 欠損症由来細胞に取込まれ、LAL 活性を増強することが示された。

図 2.6.2-3　LAL 欠損症乳児由来ヒト線維芽細胞のセベリパーゼ　アルファとのインキュベーション後の LAL 活性



出典：SBC102-P001 (4.2.1.1.1) Study Report Figure 8-3
各濃度のセベリパーゼ　アルファ（SBC-102）を線維芽細胞と 4 時間インキュベートした。細胞をリン酸緩衝生理食塩液で洗浄し、溶解緩衝液にて溶解した。細胞溶解液を用いて LAL 活性を測定した。

2.6.2.2.2　*In vivo* 薬理試験

2.6.2.2.2.1　LAL欠損症ラットモデル

Yoshidaラット（LAL欠損）はホモ動物においてLIPA遺伝子の 3’末端に広範な自然発生欠失を有し、LAL欠損症を生じるDonryuラットである（Yoshida, 1990, *Lab Anim Sci*）。この欠損症のため多くの組織でLAL基質（コレステロールエステル及びトリグリセリド）が蓄積する。脂質蓄積による異常はLAL欠損症患者の一連の疾患でみられる異常に酷似しており、それらの異常

には肝臓や脾臓を含む臓器の著明な肥大、血清トランスアミナーゼ値の増加、肝線維症、成長障害及び寿命の短縮などが含まれる。

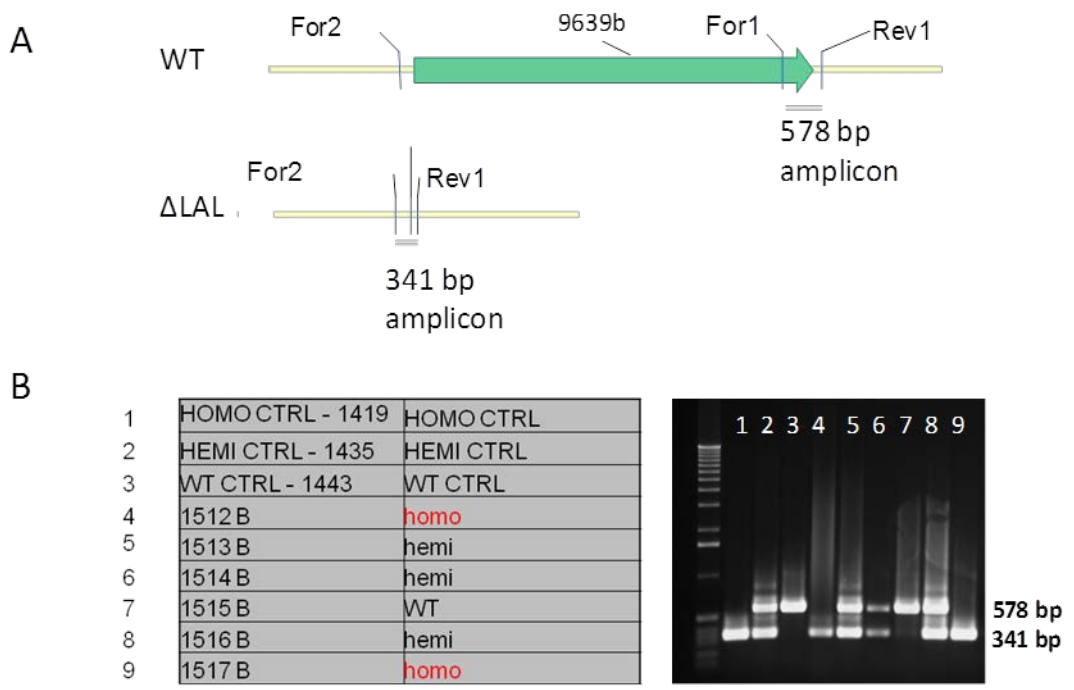
2.6.2.2.2.2 LAL欠損ラットの遺伝学的特性（SBC102-P002）

（4.2.1.1.2）

ラットの尾の先端を切り取り、採取した組織から抽出したデオキシリボ核酸（DNA）のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）解析を実施し、ホモ型（LAL 欠損）、ヘテロ型及び野生型動物を同定した（図 2.6.2-4）（SBC102-P002）。

野生型及び突然変異遺伝子の DNA を用いた PCR では、それぞれ 578 塩基対及び 341 塩基対のアンプリコンが得られた。また、ヘテロ型ラットの DNA を用いた PCR では、2 種類のサイズのアンプリコンが得られた。最初の 100 例の産仔のうち、25%は LAL 欠損、31%は野生型、そして 44%はヘテロ型であることが遺伝的に確認された。これは予想されるメンデル比率（1:1:2）に近いことから、LAL 欠損症遺伝子型に関連した胎生致死率の有意な増加はないことが示された。

図 2.6.2-4　ラットの遺伝子解析



出典：SBC102-P002 (4.2.1.1.2) Study Report Figure 1
CTRL = 対照
(A)　野生型対立遺伝子及びライソゾーム酸性リパーゼ（LAL）欠損対立遺伝子であるΔLAL の遺伝子地図及び PCR プライマー Yoshida For1、For2 及び Rev1 及び PCR アンプリコンの相対的位置
(B)　2 つの野生型対立遺伝子（WT）、2 つの変異型対立遺伝子（homo）、もしくは野生型及び変異型対立遺伝子（hemi）を含んでいる同腹ラットから抽出した DNA の PCR 反応のアガロースゲル分析

2.6.2.2.2.3　LAL欠損表現型の特性（SBC102-P002, SBC102-P003, SBC102-P006）

（4.2.1.1.2、4.2.1.1.3、4.2.1.1.4）

Yoshida ラットでの LAL 欠損症の表現型所見を、3 週齢からおおよそ 14 週齢まで検討した。14 週齢で生存している動物は重度の瀕死状態であった（SBC102-P002、SBC102-P003、SBC102-P006）。疾患所見は経時的に進行するため、LAL 欠損ラットの寿命は野生型に比べて劇的に短縮した。

3 週齢から 13 週齢の LAL 欠損ラット及び野生型ラットの体重を表 2.6.2-2 及び表 2.6.2-3 に示した。野生型ラットは 4 週齢から 10 週齢にかけて急速に成長した。この期間中、野生型ラットの体重は増加し続けたのに対し、LAL 欠損ラットの体重はおおよそ 7 週齢から 8 週齢で最大となり、死亡するまで定常であった。12 週齢の雌雄の野生型ラットの体重は、LAL 欠損ラットのそれぞれ約 2.5 倍及び 3 倍であった。

表 2.6.2-2　3 週齢から 12 週齢の LAL 欠損ラット及び野生型ラットの体重（g）

週齢（週）	野生型						LAL 欠損					
	雄			雌			雄			雌		
	例数	平均値	標準偏差	例数	平均値	標準偏差	例数	平均値	標準偏差	例数	平均値	標準偏差
3	41	39.9	5.8	38	40.2	6.2	17	37.9	5.7	20	32.3	5.3
4	38	68.7	8.4	31	69.0	8.3	17	53.3	8.5	20	48.9	8.4
5	23	111.5	13.5	25	106.6	12.4	14	72.8	13.3	17	64.5	11.0
6	21	158.1	16.2	25	140.1	13.8	12	91.0	16.4	16	77.5	15.1
7	20	199.7	18.4	23	164.7	12.7	12	99.0	17.7	16	82.9	17.3
8	25	237.1	18.0	26	182.8	14.9	15	97.4	17.3	18	84.8	17.2
9	12	255.0	11.2	5	195.0	11.4	8	93.3	15.3	8	79.8	20.3
10	12	274.1	14.5	5	206.7	12.5	7	96.6	16.8	8	80.9	19.2
11	11	289.5	13.0	4	213.1	7.6	6	100.5	14.1	8	79.7	18.5
12	11	301.8	13.6	4	218.0	7.5	6	99.4	13.5	7	78.9	19.3

出典：SBC102-P002 (4.2.1.1.2) Study Report Table 1
LAL = ライソゾーム酸性リパーゼ

表 2.6.2-3　4 週齢から 13 週齢の LAL 欠損ラット及び野生型ラットの体重

遺伝子型	性別	例数		体重（g）									
			日齢	**28**	**35**	**42**	**49**	**56**	**63**	**70**	**77**	**84**	**91**
			週齢	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**
野生型	雄	2	平均値	80.25	112.1	163	203.9	254.9	285.15	311.75	329.5	341.25	345.5
野生型	雌	2	平均値	72.8	103.9	139.8	159.5	178.7	206	225.45	230.5	239.65	249.7
野生型	雌雄	4	平均値	76.5	108.0	151.4	181.7	216.8	245.6	268.6	280.0	290.5	297.6
			標準偏差	4.7	10.0	17.0	29.7	45.9	46.8	50.6	57.9	59.8	67.7
LAL欠損	雄	2	平均値	50.3	67.55	86.9	98.65	107.45	106.95	105.8	102.25	103.9	98.1[a]
LAL欠損	雌	2	平均値	53.25	66.35	80.25	90.3	93.05	95	97.9	99.35	100.65	115.7[a]
LAL欠損	雌雄	4	平均値	51.8	67.0	83.6	94.5	100.3	101.0	101.9	100.8	102.3	106.9[b]
			標準偏差	2.2	10.0	12.0	15.9	16.9	14.9	12.9	14.0	15.4	12.4

出典：SBC102-P006 (4.2.1.1.4) Study Report Table 2

LAL = ライソゾーム酸性リパーゼ

[a] 例数 = 1

[b] 例数 = 2

LAL 欠損ラットの臓器重量（体重に対する相対重量）を野生型ラットと比較した。LAL 欠損ラットの肝臓、脾臓、腸間膜リンパ節、十二指腸、空腸及び回腸などの重要な組織で、体重と比べて不釣合いな臓器重量の増加が認められた。野生型ラットと LAL 欠損ラット間の相対臓器重量の差異は 4 週齢までに認められ、多くの組織において時間と共に進行し、10 週齢までに非常に重篤となった（表 2.6.2-4 及び表 2.6.2-5）。一部のラットで体重の代わりに脳重量を用いて解析を行ったところ、LAL 欠損ラットの相対臓器重量の増加が確認された。

表 2.6.2-4　4 週齢、8 週齢及び 10 週齢の LAL 欠損ラット及び野生型ラットの臓器重量（体重に対する相対重量）

週齢（週）	遺伝子型	肝臓			脾臓			腸間膜リンパ節			十二指腸			空腸			回腸		
		雄/雌	平均値	標準偏差	雄/雌	平均値	標準偏差	雄/雌	平均値	標準偏差	雄/雌	平均値	標準偏差	雄/雌	平均値	標準偏差	雄/雌	平均値	標準偏差
4	LAL 欠損	3/3	7.4	0.9	2/2	0.63	0.1	2/2	0.61	0.09	2/2	0.6	0.06	2/2	3.4	0.68	2/2	2.1	0.3
	野生型	2/2	5.2	0.5	2/2	0.36	0.1	2/2	0.16	0.02	2/2	0.3	0.04	2/2	1.6	0.23	2/2	1.3	0.1
8	LAL 欠損	4/5	11.50	1.62	4/4	0.86	0.16	2/3	0.62	0.08	2/4	0.90	0.29	2/3	3.67	0.35	2/3	2.75	0.54
	野生型	5/6	4.78	0.26	5/6	0.29	0.05	5/6	0.14	0.09	5/6	0.34	0.10	5/6	1.33	0.22	5/6	1.18	0.22
10	LAL 欠損	2/1	14.7	0.6	2/1	1.00	0.1	2/1	0.74	0.06	2/1	0.9	0.11	2/1	4.2	0.46	2/1	3.2	0.1
	野生型	1/1	4.6	0.2	1/1	0.26	0.02	1/1	0.25	0.08	1/1	0.2	0.11	1/1	1.0	0.16	1/1	1.2	0.1

出典：SBC102-P002 (4.2.1.1.2) Study Report Table 2
LAL = ライソゾーム酸性リパーゼ

表 2.6.2-5　12 週齢から 13 週齢の LAL 欠損ラット及び野生型ラットの臓器重量（体重に対する相対重量）

週齢（週）	遺伝子型			肝臓	脾臓	腸間膜リンパ節	十二指腸	空腸	回腸
			例数	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値
12-13	LAL欠損	雄	2	21.49	1.15	1.02	1.27	4.73	4.20
	野生型	雄	2	3.68	0.22	0.29	0.23	0.83	0.72
12-13	LAL欠損	雌	2	23.21	1.15	0.83	0.71	5.28	4.39
	野生型	雌	2	4.10	0.25	0.30	0.24	1.22	1.14

出典：SBC102-P006 (4.2.1.1.4) Study Report Table 5
LAL = ライソゾーム酸性リパーゼ

LAL 欠損ラットと野生型ラット間で著明な差異のある重要な臨床病理パラメータは、血清アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、コレステロール、トリグリセリド、高比重リポタンパク質（HDL）及び低比重リポタンパク質（LDL）であった。おおよそ 13 週齢の LAL 欠損ラットでは、野生型ラットに比べて血清 ALT、AST、コレステロール、トリグリセリド及び LDL 値は増加し、HDL 値は低下した。

4 週齢で多く認められた肉眼的病理所見は、中等度の肝腫大、肝臓の黄橙色の変色、脾腫、腸間膜及び胃リンパ節腫大、中等度の小腸壁肥厚であった。病理組織学的所見は、肝臓の泡沫マクロファージ/クッパー細胞及び脾臓の泡沫マクロファージの多巣性集積、泡沫マクロファージの浸潤を伴う小腸粘膜固有層の著明な拡張、泡沫マクロファージによる皮質の多巣性拡張を伴うびまん性の腸間膜及び胃リンパ節の髄質の組織球症並びに腸間膜脂肪の中等度萎縮であった。8 週齢での病理組織学的所見は、4 週齢の所見と同様であったが、概してより重篤であった。8 週齢での病理組織学的所見は、二次性の重度のリンパ組織萎縮を伴う泡沫マクロファージによる腸間膜及び胃リンパ節皮質の重度の洞の組織球症及び多巣性拡張、小腸粘膜固有層の重度の組織球症、肝臓及び脾臓の泡沫組織球の多巣性で大きな集積、腸間膜脂肪の著明な漿液性萎縮、副腎皮質の軽度の多巣性組織球症であった。脳など他の検査した組織は肉眼的及び病理組織学的には正常であり、障害は認められなかった。

病理組織学的には、4 週齢及び 8 週齢共にすべての病変を有する動物で、各種臓器中の組織球の細胞質は多数の微細な空胞を持つ淡く染色する物質により著明に拡張していた（すなわち、細胞質は泡沫状を呈していた）。加えて、病変を有する動物の肝細胞には多数の微細で球形の境界が明瞭な細胞質内空胞が認められた。組織球の細胞質の拡張部位と肝細胞の細胞質内空胞で認められた物質は Oil Red-O 染色陽性であった。さらに、ヘマトキシリンエオジン染色切片により、脂質を多く含有する少数の組織球に針状亀裂の存在が認められた。これら細胞質内亀裂の形態的特徴はコレステロール結晶と一致していた。

LAL 欠損症ラットモデルにおけるこれら病理組織学的所見は LAL 欠損症患者の所見と酷似していた（Grabowski, 2012, *The Online Metabolic & Molecular Basis of Inherited Diseases [online]*）。LAL 欠損症ラットモデルの肝臓、脾臓及びリンパ節の所見は、LAL 欠損症の小児や成人のみならず LAL 欠損症乳児で認められる異常と極めて類似していた。また、消化器系病理組織学的所見は LAL 欠損症乳児で認められる異常と極めて類似していた。

LAL 欠損ラットの生存曲線は二相性を示し、離乳期付近及び 11 週齢付近で死亡率の増加が観察された。LAL 欠損ラットの 50%は 12 週齢までに死亡し、14 週齢までに全例が死亡した。2

週齢時の遺伝子解析によってLAL欠損症遺伝子型はメンデル遺伝の法則に従うことが示されたことから（2.6.2.2.2.2 項参照）、胎児及び早期（2週齢前）の死亡率についてはおそらくLAL欠損症遺伝子型は重要でないと考えられた。すべての野生型ラットは少なくとも200日（28.6週）まで生存したことから、LAL欠損ラットで見られる高い死亡率はLAL欠損症に直接関連しており、この高度な近交系コロニーにおける他の特徴によるものではないことが示された。

2.6.2.2.2.4 LAL欠損ラットにセベリパーゼ　アルファを5 mg/kgの用量で4週間投与した際の薬力学的効果（SBC102-P002）

（4.2.1.1.2）

野生型ラットを対照としてLAL欠損ラットの表現型に基づき、最初の試験を実施した（SBC102-P002）。LAL欠損ラットに、セベリパーゼ　アルファを5 mg/kgの用量で1週間に1回4週間尾静脈内に急速投与し、体重、臓器重量、組織基質及び病理組織に対する薬理作用を検証した。

方法

LAL欠損ラット（セベリパーゼ　アルファ5 mg/kg群は雄1例及び雌2例、溶媒群は雌3例）にジフェンヒドラミン5 mg/kgを腹腔内投与した後に、溶媒（生理食塩液）又は生理食塩液にて調製したセベリパーゼ　アルファを1回あたり5 mg/kgの用量で尾静脈内に投与した。LAL欠損ラットに4週齢から1週間に1回、計4回投与し、8週齢で試験を終了した。

評価項目は体重、臓器重量（脾臓、腸間膜リンパ節、肝臓、十二指腸、空腸、回腸、消化管リンパ節、副腎、膵臓及び脳）、組織病理、組織コレステロール含有量及びトリグリセリド含有量とした。

結果

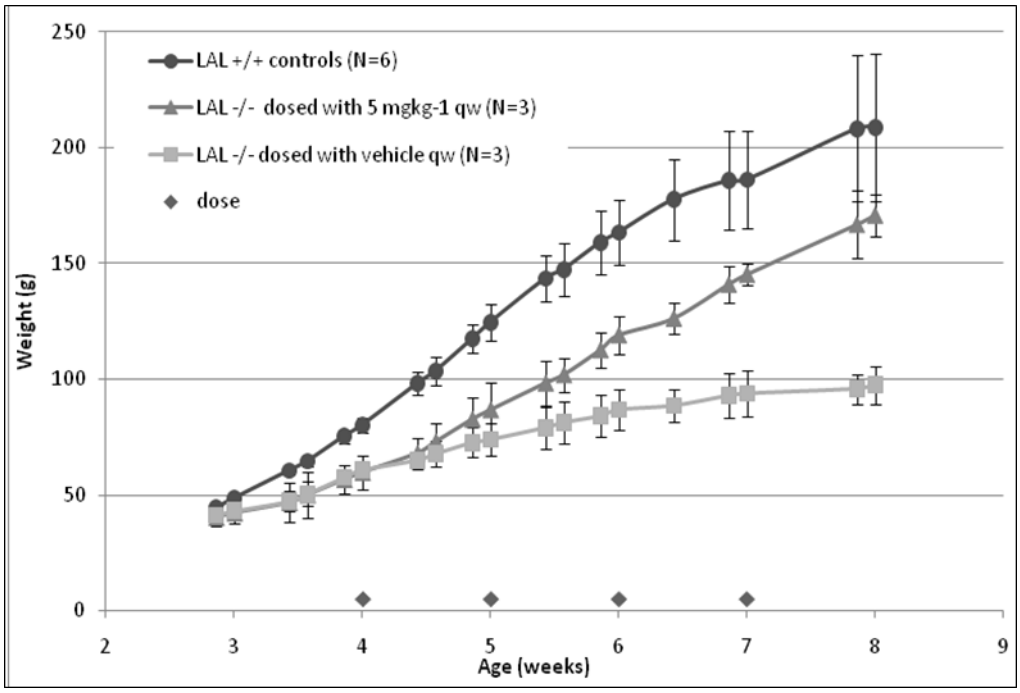
LAL欠損ラットにセベリパーゼ　アルファを5 mg/kgの用量で1週間に1回4週間投与すると、溶媒を投与したLAL欠損ラットに比べて、体重増加が統計的に有意に改善した（図 2.6.2-5；$p = 0.0003$）。また、肝臓（$p = 0.0007$）、脾臓（$p = 0.0001$）及びその他の臓器（$p < 0.05$）の臓器重量（図 2.6.2-6）、組織総コレステロール（$p = 0.0005$）、コレステロールエステル（$p = 0.001$）及びトリグリセリド含有量（$p = 0.014$）（図 2.6.2-7）も統計的に有意に低下した（注意：多重性の調整は実施していない）。肉眼的病理検査では、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。

結論

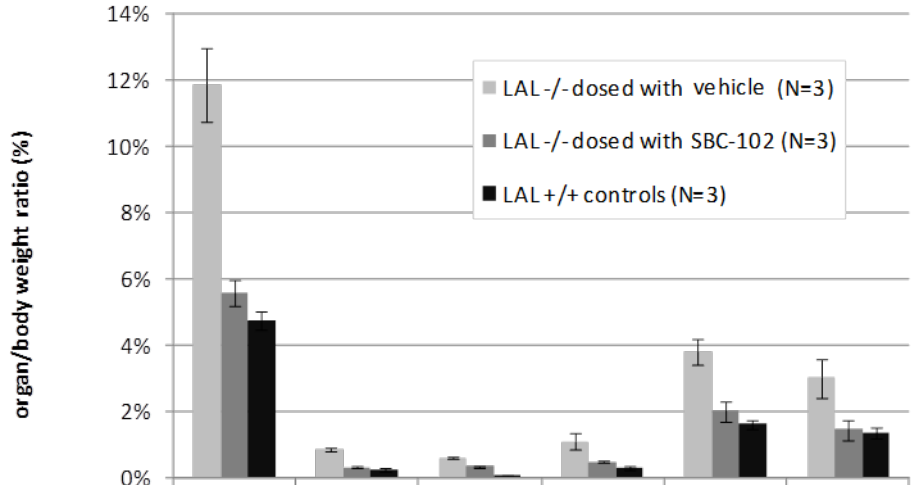
LAL 欠損ラットにセベリパーゼ　アルファを 5 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回投与すると、体重増加の亢進、臓器重量の低下及び組織脂質含有量の低下によって示されるように、病態が軽減された。

図 2.6.2-5　野生型ラット及び溶媒又はセベリパーゼ　アルファを 5 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回 4 週間投与した LAL 欠損ラットの体重



出典：SBC102-P002 (4.2.1.1.2) Study Report Figure 3
LAL 欠損ラットにセベリパーゼ　アルファ又は溶媒を 1 週間に 1 回静脈内に単回又は分割投与（4 時間以内）した。野生型ラットは同週齢の同腹児対照。4 週齢から始めた投与を X 軸上にダイヤモンドで表示した。
qw = 1 週間に 1 回

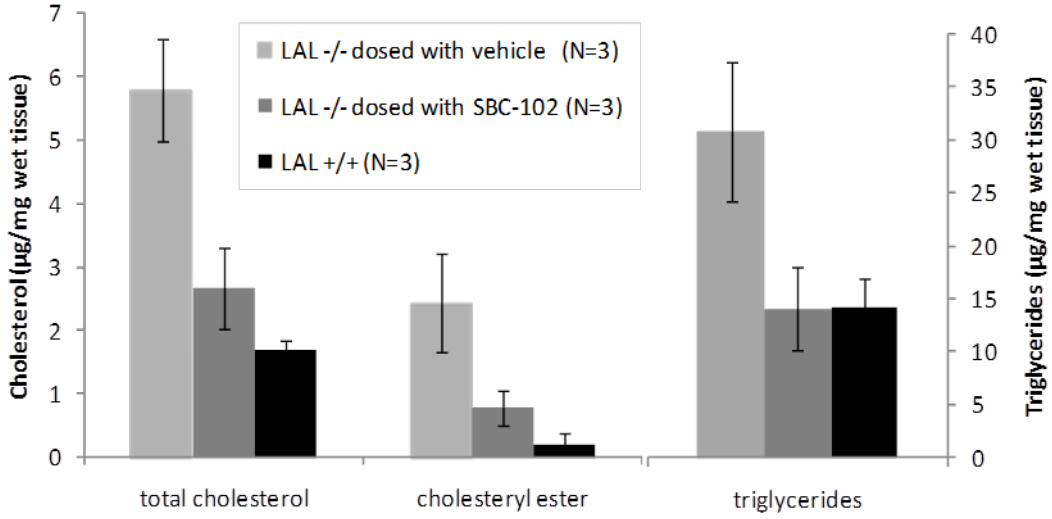
図 2.6.2-6　8 週齢の野生型ラット及び溶媒又はセベリパーゼ　アルファを 5 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回 4 週間投与した 8 週齢の LAL 欠損ラットの臓器重量（体重に対する相対重量）



	liver	spleen	mesenteric LN	duodenum	jejunum	ileum
LAL -/- dosed with vehicle (N=3)	11.85%	0.84%	0.59%	1.11%	3.80%	3.01%
LAL -/- dosed with SBC-102 (N=3)	5.57%	0.32%	0.35%	0.48%	2.00%	1.46%
LAL +/+ controls (N=3)	4.75%	0.25%	0.07%	0.30%	1.61%	1.38%

出典：SBC102-P002 (4.2.1.1.2) Study Report Figure 4
LAL = ライソゾーム酸性リパーゼ；LN = リンパ節；SBC-102 = セベリパーゼ　アルファ

図 2.6.2-7　8 週齢の野生型ラット及び溶媒又はセベリパーゼ　アルファを 5 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回 4 週間投与した 8 週齢の LAL 欠損ラットの肝臓コレステロール、コレステロールエステル及びトリグリセリド含有量



出典：SBC102-P002 (4.2.1.1.2) Study Report Figure 5
LAL = ライソゾーム酸性リパーゼ；SBC-102 = セベリパーゼ　アルファ

2.6.2.2.2.5　投与開始を延期したLAL欠損ラットにセベリパーゼ　アルファを 3 mg/kgの用量で 19 週間投与した際の薬力学的効果（SBC102-P005）

（4.2.1.1.5）

LAL 欠損症ラットモデルでの最初の試験として、4 週齢からセベリパーゼ　アルファを 1 週間に 1 回投与すると、LAL 欠損症による表現型異常が相当程度改善することが確認された。続いて、4 週齢に比べてより病態が重篤となる 8 週齢まで投与開始を延期した後、LAL 欠損ラットにセベリパーゼ　アルファを 1 週間に 1 回尾静脈内に急速投与し、セベリパーゼ　アルファの有効性を検討した（SBC102-P005）。

方法

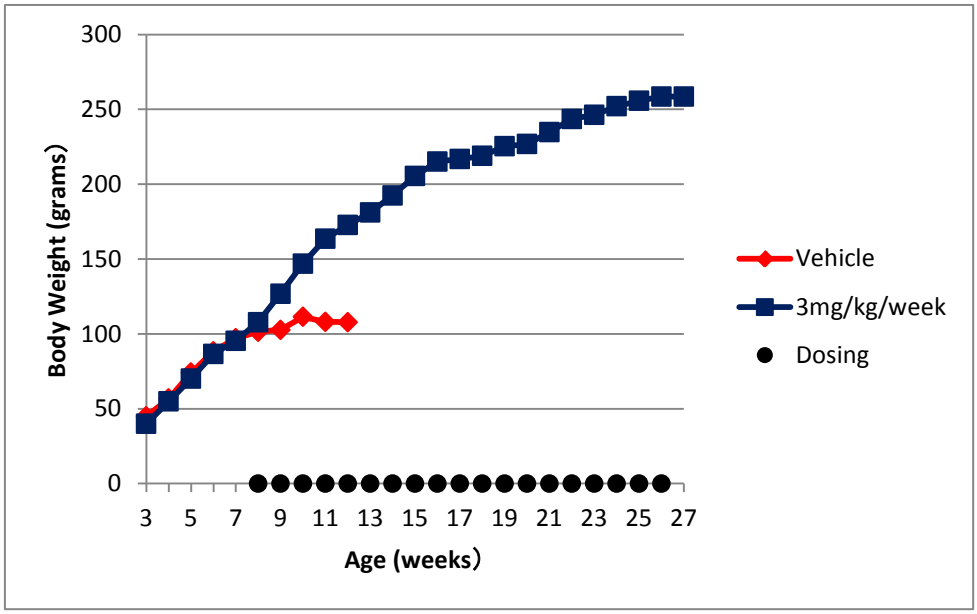
8 週齢の LAL 欠損ラット（雌雄各 3 例/群）にジフェンヒドラミン 5 mg/kg を腹腔内投与した後、溶媒（生理食塩液）又は生理食塩液にて調製したセベリパーゼ　アルファを 1 回あたり 3 mg/kg の用量で尾静脈内に 1 週間に 1 回 19 週間投与した。26 週齢で最終投与を行い、27 週齢で試験を終了した。

1 週間に 1 回の評価項目は体重と成長速度（体重変化）とした。試験終了時の評価項目は、臓器重量（肝臓、脾臓、腸間膜リンパ節、十二指腸、空腸、回腸及び脳）、組織コレステロール含有量及びトリグリセリド含有量、血清トランスアミナーゼ値、アルカリホスファターゼ（ALP）値、脂質値及び組織病理とした。

結果

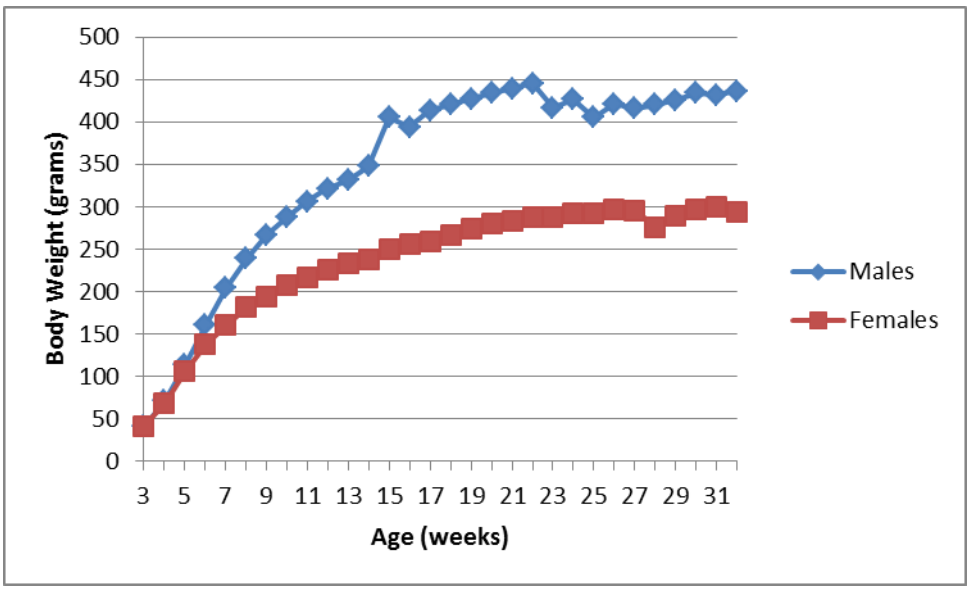
セベリパーゼ　アルファを 3 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回投与した LAL 欠損ラットの体重は、溶媒を投与した LAL 欠損ラットよりも速やかに増加し、その効果は投与開始後 1 週という早期から認められた（図 2.6.2-8）。背景データベースに基づくと、LAL 欠損雄性ラット及び LAL 欠損雌性ラットの平均体重は、それぞれ 14 週齢では野生型ラットの 63%及び 74%、また、27 週齢では野生型ラットの 67%及び 77%であった（図 2.6.2-9）。野生型ラットとの差異は酵素補充療法治療薬の投与開始前の LAL 欠損ラットの成長障害による可能性が考えられる。投与開始前の 8 週齢での雌雄 LAL 欠損ラットの体重は、野生型に対しそれぞれ 57%及び 47%であった。セベリパーゼ　アルファを投与した LAL 欠損ラットの成長速度は、溶媒を投与した LAL 欠損ラットに比べて明らかに改善した（図 2.6.2-10）。セベリパーゼ　アルファを投与した LAL 欠損ラットは、27 週齢での計画的安楽死まで例外なく長期生存したが、溶媒を投与した LAL 欠損ラットは 9 週齢～12 週齢で瀕死安楽死処置となった。

図 2.6.2-8 セベリパーゼ アルファを 3 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回 19 週間投与した LAL 欠損ラットの平均週間体重



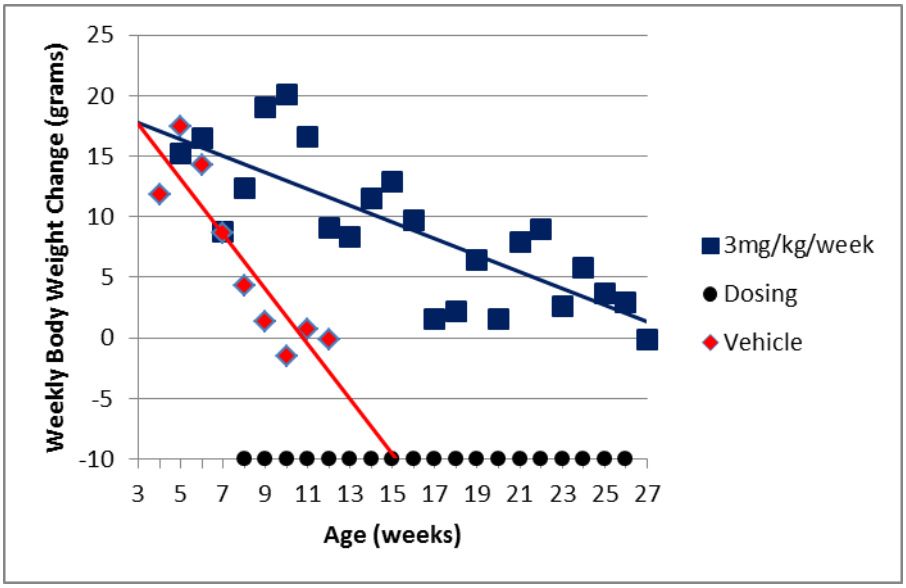
出典：SBC102-P005 (4.2.1.1.5) Study Report Figure 2
溶媒を投与した LAL 欠損ラットは 9 週齢から 12 週齢で瀕死安楽死処置とした。セベリパーゼ アルファを投与した LAL 欠損ラットは 27 週齢で安楽死処置とした。

図 2.6.2-9 野生型 Yoshida ラットの平均体重--背景データ



出典：SBC102-P005 (4.2.1.1.5) Study Report Figure 1

図 2.6.2-10　セベリパーゼ　アルファを 3 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回 19 週間投与した LAL 欠損ラットの平均週間体重変化（成長速度）



出典：SBC102-P005 (4.2.1.1.5) Study Report Figure 3
溶媒を投与した LAL 欠損ラットは 9 週齢から 12 週齢で瀕死安楽死処置とした。セベリパーゼ　アルファを投与した LAL 欠損ラットは 27 週齢で安楽死処置とした。

セベリパーゼ　アルファを投与した LAL 欠損ラットでは、臓器肥大に関して改善効果が認められた。全病変臓器の重量が低下し（表 2.6.2-6）、同時に空腸（表 2.6.2-7）だけでなく肝臓の LAL 基質含有量も低下した（表 2.6.2-8 及び表 2.6.2-9）。セベリパーゼ　アルファを投与した LAL 欠損ラットの LAL 基質含有量はより若い対照動物と比較されており、これら対照動物が 27 週齢まで生存していたならば LAL 基質がより多く組織に蓄積していたと考えられる。肝腫大の縮小に伴い、血清トランスアミナーゼ値及び血清脂質プロフィールの正常化も認められた。セベリパーゼ　アルファを投与した LAL 欠損ラットの血清 AST 値は溶媒を投与した LAL 欠損ラットよりも低下し、野生型ラットと同程度となった（表 2.6.2-10 及び表 2.6.2-11）。セベリパーゼ　アルファを投与した LAL 欠損ラットの血清 LDL 値は溶媒を投与した LAL 欠損ラットに比べて低下し、血清 HDL 値は増加した。これらの平均値は野生型ラットと同程度となった（表 2.6.2-12 及び表 2.6.2-13）。

表 2.6.2-6　セベリパーゼ　アルファを 3 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回 19 週間投与した LAL 欠損ラットの相対臓器重量 （体重に対する相対重量）

					相対臓器重量（体重に対する相対重量）						
用量	性別	例数		体重（g）	肝臓	脾臓	腸間膜リンパ節	十二指腸	空腸	回腸	脳
溶媒	雄	3	平均値	126.27	14.60	1.12	0.81	1.09	3.94	3.76	1.15
			標準偏差	8.94	2.01	0.14	0.04	0.11	0.32	0.92	0.04
	雌	3	平均値	76.59	16.58	0.95	0.90	1.31	5.29	3.74	1.68
			標準偏差	10.02	1.66	0.10	0.13	0.30	0.30	0.60	0.13
3 mg/kg	雄	3	平均値	290.51	4.20	0.26	0.29	0.38	1.11	0.91	0.58
			標準偏差	7.57	0.31	0.01	0.05	0.10	0.06	0.07	0.02
	雌	3	平均値	226.25	4.97	0.38	0.41	0.57	1.87	1.35	0.71
			標準偏差	11.36	0.68	0.04	0.10	0.17	0.46	0.43	0.04

出典：SBC102-P005 (4.2.1.1.5) Study Report Table 9
LAL = ライソゾーム酸性リパーゼ
溶媒を投与した LAL 欠損ラットは 9 週齢から 12 週齢で瀕死安楽死処置とした。セベリパーゼ　アルファを投与した LAL 欠損ラットは 27 週齢で安楽死処置とした。

表 2.6.2-7　セベリパーゼ　アルファを 3 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回 19 週間投与した LAL 欠損ラットの空腸コレステロール含有量

8 週齢から溶媒を週 1 回 2～5 週間投与した 9～12 週齢時の LAL 欠損ラット						
				コレステロール（μg/mg tissue）		
用量	性別	例数		総	遊離	コレステロールエステル
溶媒	雄	3	平均値	7.61	3.43	4.19
			標準偏差	1.99	0.56	1.45
	雌	3	平均値	8.83	4.02	4.81
			標準偏差	1.98	0.59	1.40
	雌雄	6	平均値	8.22	3.73	4.50
			標準偏差	1.90	0.61	1.32
8 週齢からセベリパーゼ　アルファを 3 mg/kg 週 1 回 19 週間投与した 27 週齢時の LAL 欠損ラット						
用量	性別	例数		総	遊離	コレステロールエステル
3 mg/kg	雄	3	平均値	4.55	2.90	1.66
			標準偏差	2.55	1.19	1.37
	雌	3	平均値	5.00	2.96	2.04
			標準偏差	2.33	0.78	1.58
	雌雄	6	平均値	4.78	2.93	1.85
			標準偏差	2.20	0.90	1.34

出典：SBC102-P005 (4.2.1.1.5) Study Report Table 11
LAL = ライソゾーム酸性リパーゼ
溶媒を投与した LAL 欠損ラットは 9 週齢から 12 週齢で瀕死安楽死処置とした。セベリパーゼ　アルファを投与した LAL 欠損ラットは 27 週齢で安楽死処置とした。

表 2.6.2-8　セベリパーゼ　アルファを 3 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回 19 週間投与した LAL 欠損ラットの肝臓コレステロール含有量

8 週齢から溶媒を週 1 回 2～5 週間投与した 9～12 週齢時の LAL 欠損ラット						
				コレステロール（μg/mg tissue）		
用量	性別	例数		総	遊離	コレステロールエステル
溶媒	雄	3	平均値	12.39	5.04	7.35
			標準偏差	1.94	0.80	1.15
	雌	3	平均値	11.86	4.87	6.99
			標準偏差	2.26	0.83	1.45
	雌雄	6	平均値	12.13	4.95	7.17
			標準偏差	1.90	0.74	1.18
8 週齢からセベリパーゼ　アルファを 3 mg/kg 週 1 回 19 週間投与した 27 週齢時の LAL 欠損ラット						
用量	性別	例数		総	遊離	コレステロールエステル
3 mg/kg	雄	3	平均値	3.20	1.62	1.59
			標準偏差	0.14	0.32	0.29
	雌	3	平均値	5.68	2.46	3.22
			標準偏差	0.89	0.28	0.91
	雌雄	6	平均値	4.44	2.04	2.41
			標準偏差	1.47	0.53	1.08

出典：SBC102-P005 (4.2.1.1.5) Study Report Table 10
LAL = ライソゾーム酸性リパーゼ
溶媒を投与した LAL 欠損ラットは 9 週齢から 12 週齢で瀕死安楽死処置とした。セベリパーゼ　アルファを投与した LAL 欠損ラットは 27 週齢で安楽死処置とした。

表 2.6.2-9　セベリパーゼ　アルファを 3 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回 19 週間投与した LAL 欠損ラットの肝臓トリグリセリド含有量

8 週齢から溶媒を週 1 回 2～5 週間投与した 9～12 週齢時の LAL 欠損ラット				
用量	**性別**	**例数**		**トリグリセリド（nmol/mg tissue）**
溶媒	雄	3	平均値	18.02
			標準偏差	1.67
	雌	3	平均値	12.72
			標準偏差	1.77
	雌雄	6	平均値	15.37
			標準偏差	3.29
8 週齢からセベリパーゼ　アルファを 3 mg/kg 週 1 回 19 週間投与した 27 週齢時の LAL 欠損ラット				
用量	**性別**	**例数**		**トリグリセリド（nmol/mg tissue）**
3 mg/kg	雄	3	平均値	10.25
			標準偏差	6.5
	雌	3	平均値	13.95
			標準偏差	1.11
	雌雄	6	平均値	12.10
			標準偏差	4.64

出典：SBC102-P005 (4.2.1.1.5) Study Report Table 12
LAL = ライソゾーム酸性リパーゼ
溶媒を投与した LAL 欠損ラットは 9 週齢から 12 週齢で瀕死安楽死処置とした。セベリパーゼ　アルファを投与した LAL 欠損ラットは 27 週齢で安楽死処置とした。

表 2.6.2-10　セベリパーゼ　アルファを 3 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回 19 週間投与した LAL 欠損ラット（27 週齢）及び溶媒を投与した LAL 欠損ラット（9 週齢から 12 週齢）の血清トランスアミナーゼ及びアルカリホスファターゼ値

		雄		雌		雌雄	
8 週齢から溶媒を週 1 回 2～5 週間投与した 9～12 週齢時の LAL 欠損ラット							
例数		3		3		6	
評価項目	単位	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
ALT	U/L	52	15	59	18	56	15
AST	U/L	287	49	359	39	323	56
ALP	U/L	153	42	184	26	169	36
8 週齢からセベリパーゼ　アルファを 3 mg/kg 週 1 回 19 週間投与した 27 週齢時の LAL 欠損ラット							
例数		3		3		6	
評価項目	単位	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
ALT	U/L	53	5.0	29	8.4	41	15
AST	U/L	91	17	100	36	96	25
ALP	U/L	126	21	63	18	95	38

Source：SBC102-P005 (4.2.1.1.5) Study Report Table 3 and Table 4
ALP = アルカリホスファターゼ ; 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 ; LAL = ライソゾーム酸性リパーゼ
溶媒を投与した LAL 欠損ラットは 9 週齢から 12 週齢で瀕死安楽死処置とした。セベリパーゼ　アルファを投与した LAL 欠損ラットは 27 週齢で安楽死処置とした。

表 2.6.2-11　24 週齢から 28 週齢の野生型ラットの血清トランスアミナーゼ及びアルカリホスファターゼ値

週齢		24 週	28 週
性別		雌	雌
評価項目	単位		
ALT	U/L	72	72
AST	U/L	116	126
ALP	U/L	183	123

Source：SBC102-P005 (4.2.1.1.5) Study Report Table 5
ALP = アルカリホスファターゼ ; 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
同週齢の野生型ラットの背景データを含む.

表 2.6.2-12　セベリパーゼ　アルファを 3 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回 19 週間投与した LAL 欠損ラット（27 週齢）及び溶媒を投与した LAL 欠損ラット（9 週齢から 12 週齢）の血清脂質パラメータ

		雄		雌		雌雄	
8 週齢から溶媒を週 1 回 2～5 週間投与した 9～12 週齢時の LAL 欠損ラット							
例数		**3**		**3**		**6**	
評価項目	**単位**	**平均値**	**標準偏差**	**平均値**	**標準偏差**	**平均値**	**標準偏差**
コレステロール	mg/dL	95.67	16.86	122.67	8.96	109.17	19.09
トリグリセリド	mg/dL	80.33	12.42	126.33	25.58	103.33	30.96
HDL	mg/dL	14.33	1.53	15.33	1.15	14.83	1.33
LDL	mg/dL	20.33	4.51	27.00	5.29	23.67	5.72
8 週齢からセベリパーゼ　アルファを 3 mg/kg 週 1 回 19 週間投与した 27 週齢時の LAL 欠損ラット							
例数		**3**		**3**		**6**	
評価項目	**単位**	**平均値**	**標準偏差**	**平均値**	**標準偏差**	**平均値**	**標準偏差**
コレステロール	mg/dL	74	1.7	67	54	71	34
トリグリセリド	mg/dL	77	25	93	44	85	33
HDL	mg/dL	28	2.0	27	4.4	28	3
LDL	mg/dL	13	1.5	< 7	-	-	-

Source：SBC102-P005 (4.2.1.1.5) Study Report Table 6 and Table 7
LAL = ライソゾーム酸性リパーゼ；HDL = 高比重リポタンパク質；LDL = 低比重リポタンパク質
溶媒を投与した LAL 欠損ラットは 9 週齢から 12 週齢で瀕死安楽死処置とした。セベリパーゼ　アルファを投与した LAL 欠損ラットは 27 週齢で安楽死処置とした。

表 2.6.2-13　24 週齢から 28 週齢の野生型ラットの血清脂質パラメータ

週齢		**24 週**	**28 週**
性別		**雌**	**雌**
評価項目	単位		
コレステロール	mg/dL	105	100
トリグリセリド	mg/dL	117	94
HDL	mg/dL	33	30
LDL	mg/dL	< 7	< 7

Source：SBC102-P005 (4.2.1.1.5) Study Report Table 8
HDL = 高比重リポタンパク質；LDL = 低比重リポタンパク質
同週齢の野生型ラットの背景データを含む

病理組織学的には、セベリパーゼ　アルファを投与したLAL欠損ラットの肝臓の所見は野生型ラットと類似していた。セベリパーゼ　アルファを投与したLAL欠損ラットの肝臓には、ランダムで小型の（直径20～80 μm）亜急性炎症巣及び軽微な壊死巣が認められた。これらの所見は病態が解消しつつある領域を示していると考えられ、脂肪を多く含有する壊死したマクロファージ及び肝細胞の残留物が炎症細胞で囲まれていた。これらの病変は非常に軽度で、臨床的に意義があるとは考えられなかった。

セベリパーゼ　アルファを投与したLAL欠損ラット全例で、試験終了時にADAが認められた（スクリーニング試験及び確認試験）が、溶媒を投与したLAL欠損ラットでは認められなかった。ADAの存在にもかかわらず、セベリパーゼ　アルファの疾患改善効果は19週間の投与期間を通じて持続した。

結論

セベリパーゼ　アルファを3 mg/kgの用量で8週齢から1週間に1回19週間静脈内投与したところ、成長障害の改善（体重及び体重増加）、臓器肥大の縮小及び肝臓蓄積脂質の低下が認められた。溶媒を投与したLAL欠損ラット（9週齢から12週齢で瀕死安楽死）に比べて、セベリパーゼ　アルファを投与したLAL欠損ラット全例が27週齢の計画的安楽死まで生存したことから、これら動物の健康全般に対するセベリパーゼ　アルファの長期投与による改善効果が確認された。セベリパーゼ　アルファの改善効果はADA存在下でも持続し、また、より病態が進行した8週齢から投与開始した際のセベリパーゼ　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（2.6.2.2.2.4 項参照）。

2.6.2.2.2.6　セベリパーゼ　アルファを3 mg/kgの用量で投与した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）

（4.2.1.1.6）

LAL欠損症ラットモデルでの最初の試験として、4週齢のLAL欠損ラットにセベリパーゼ　アルファを1週間に1回4週間投与すると、肝臓及びその他組織のコレステロール及びトリグリセリド含有量が相当程度低下することが確認された。続いて、セベリパーゼ　アルファ投与中止後の肝臓組織中コレステロール（総コレステロール、遊離コレステロール及びコレステロールエステル）及びトリグリセリド含有量を測定し、LAL基質低下の効果及び組織脂質の異常な再蓄積と同時に血清生化学パラメータの経時変化を調べた（SBC102-P012）。LAL欠損ラット

にセベリパーゼ　アルファを 3 mg/kg の用量で 4 週齢から 1 週間に 1 回 4 週間、尾静脈内に急速投与し、投与中止後 13 週まで評価を実施した。

方法

4 週齢の LAL 欠損ラット（雌雄各 3 例/時点）にジフェンヒドラミン 5 mg/kg を腹腔内投与した後、生理食塩液にて調製したセベリパーゼ　アルファを 1 回あたり 3 mg/kg の用量で尾静脈内に 1 週間に 1 回 4、5、6 及び 7 週齢時に投与し、6、8、10、12、16 及び 20 週齢時に安楽死処置を行った。

1 週間に 1 回の評価項目は体重と成長速度（体重変化）とした。試験終了時の評価項目は、臓器重量（肝臓、脾臓、腸間膜リンパ節、十二指腸、空腸、回腸及び脳）、組織コレステロール及びトリグリセリド含有量、血清生化学値及び組織病理とした。

表 2.6.2-14 に試験手順のスケジュールを示した。

表 2.6.2-14　セベリパーゼ　アルファ投与中止後の試験スケジュール

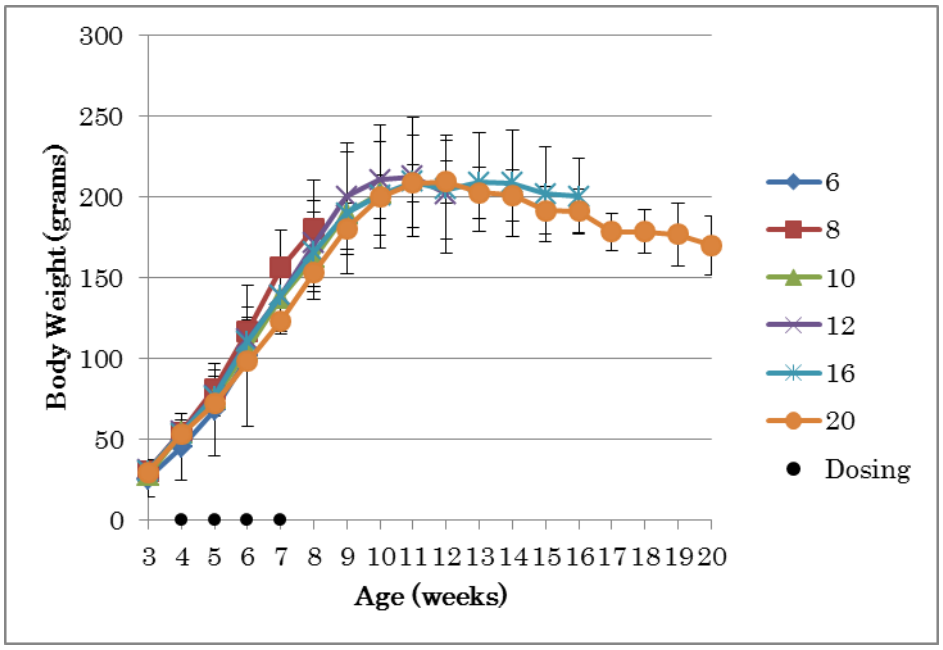
	投与期（週）				投与後（週）				
投与時の週齢	4	5	6	7	-	-	-	-	-
安楽死時の週齢	-	-	6	-	8	10	12	16	20
評価時の最終投与からの期間	-	-	1	-	1	3	5	9	13

出典：SBC102-P012 (4.2.1.1.6) Study Report Table 2

結果

全体的には、投与中止後に進行的に成長速度が低下し、投与中止後 5 週頃から体重が減少していることから、全般的な動物の健康状態の悪化が示された。セベリパーゼ　アルファの投与期間中（4 週齢～7 週齢）、LAL 欠損ラットの体重は増加したが、投与中止後初期に、LAL 欠損ラットの体重増加は緩やかとなり、その後、計画的安楽死まで体重は緩やかかつ持続的に減少した（図 2.6.2-11）。一般的に 9 週齢～12 週齢以上生存できない無処置の LAL 欠損ラットとは対照的に、セベリパーゼ　アルファの短期投与によって生存期間は延長した。16 週群及び 20 週群においても、セベリパーゼ　アルファを投与した LAL 欠損ラットはすべて計画的安楽死まで生存した。

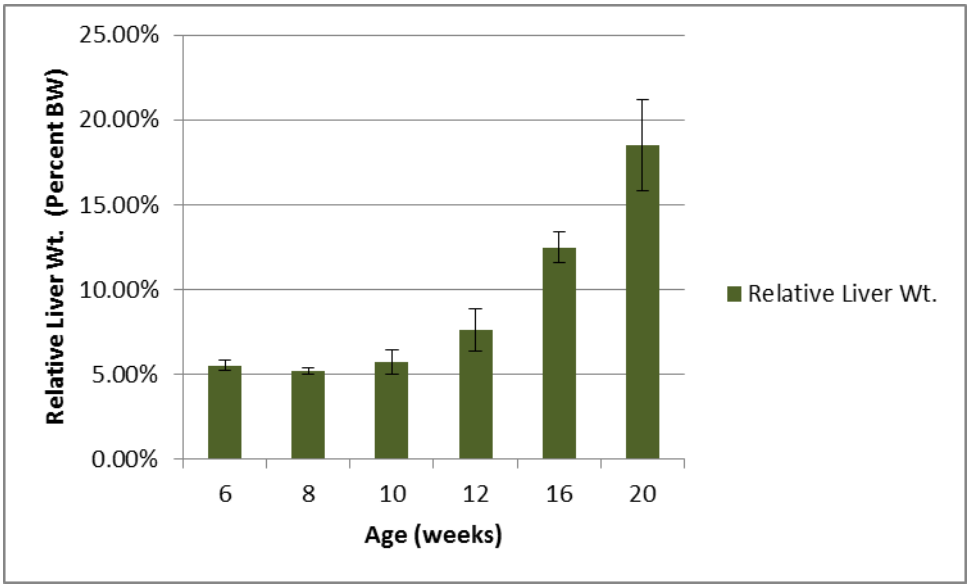
図 2.6.2-11 セベリパーゼ アルファを 3 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回 4 週間投与した後の LAL 欠損ラットの平均体重



出典：SBC102-P012 (4.2.1.1.6) Study Report Figure 1
LAL = ライソゾーム酸性リパーゼ
凡例はラット安楽死時の週齢を示す。

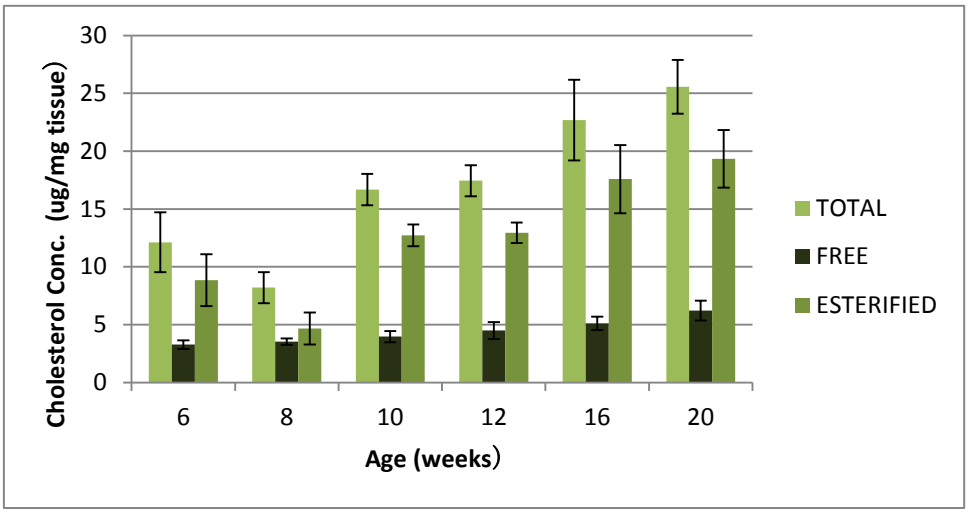
肝臓重量はセベリパーゼ アルファ投与中止後 3 週から増加し（図 2.6.2-12）、同時に肝臓組織中のコレステロール、遊離コレステロール、コレステロールエステル及びトリグリセリド含有量も増加した（図 2.6.2-13 及び図 2.6.2-14）。血清トリグリセリド及びコレステロール値も、それぞれ投与中止後 5 週及び 9 週から増加した（図 2.6.2-15）。血清 HDL 値は投与中止後 3 週から進行的に低下し、LDL 値は投与中止後 5 週から増加した（図 2.6.2-16）。血清 ALT 及び AST 値は投与中止後 3 週から進行的に増加した（図 2.6.2-17）。ガンマグルタミルトランスフェラーゼ値の増加は最終評価時（投与中止後 13 週）のみ認められた。

図 2.6.2-12 セベリパーゼ アルファを 3 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回 4 週間投与した後の LAL 欠損ラットの相対肝臓重量



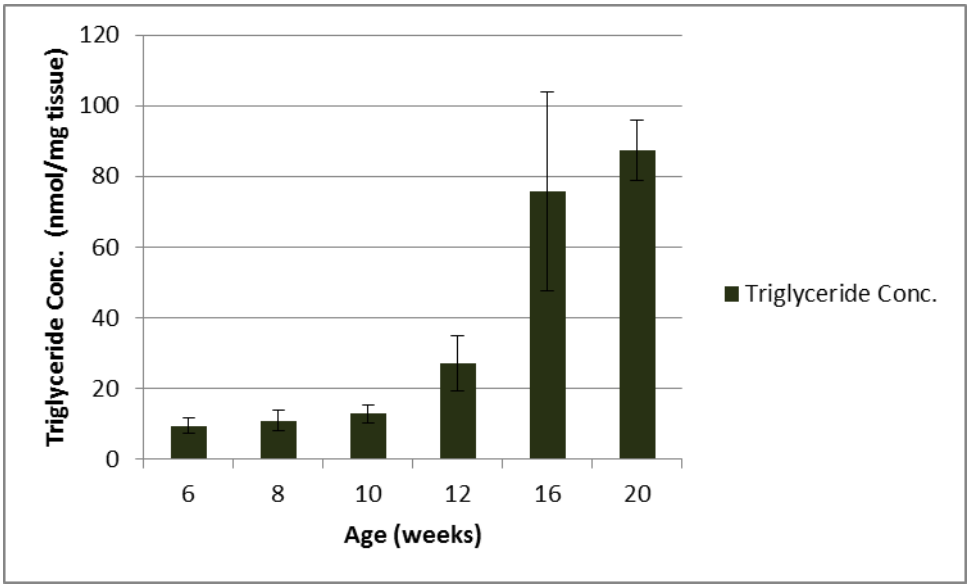
出典：SBC102-P012 (4.2.1.1.6) Study Report Figure 5
BW = 体重；LAL = ライソゾーム酸性リパーゼ；wt. = 重量

図 2.6.2-13 セベリパーゼ アルファを 3 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回 4 週間投与した後の LAL 欠損ラットの肝臓コレステロール含有量



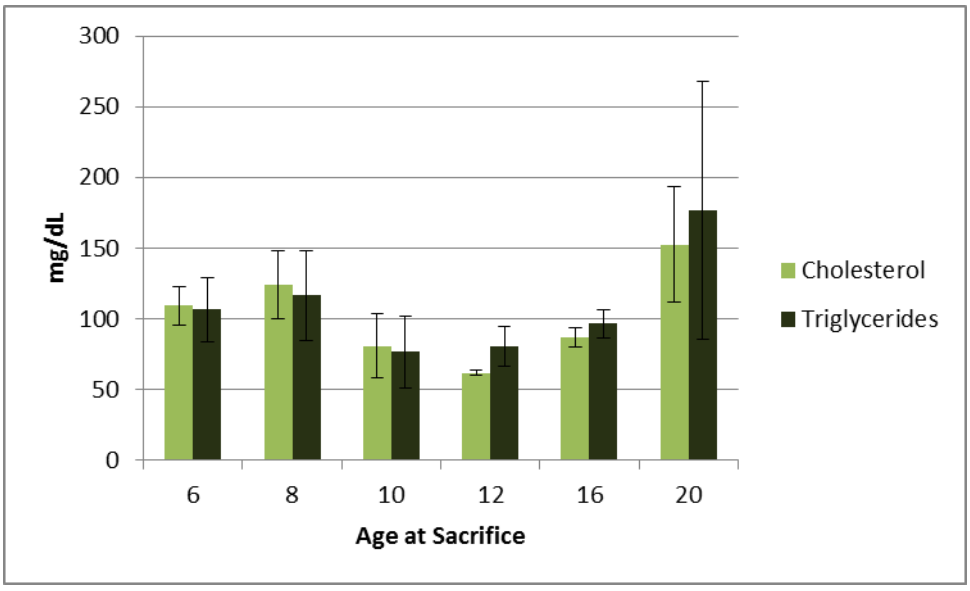
出典：SBC102-P012 (4.2.1.1.6) Study Report Figure 6
Conc. = 含有量；LAL = ライソゾーム酸性リパーゼ

図 2.6.2-14 セベリパーゼ アルファを 3 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回 4 週間投与した後の LAL 欠損ラットの肝臓トリグリセリド含有量



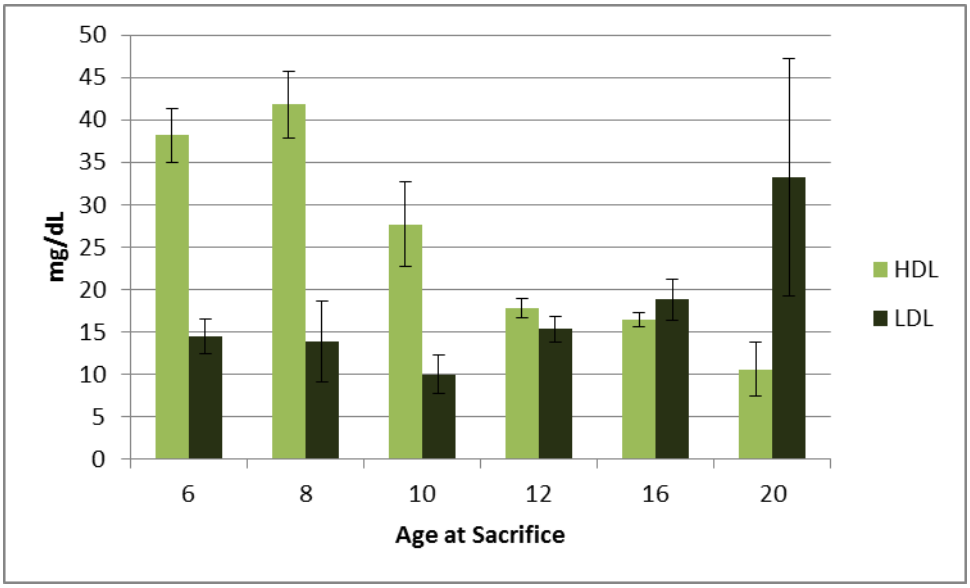
出典：SBC102-P012 (4.2.1.1.6) Study Report Figure 7
Conc. = 含有量；LAL = ライソゾーム酸性リパーゼ

図 2.6.2-15 セベリパーゼ アルファを 3 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回 4 週間投与した後の LAL 欠損ラットの血清コレステロール及びトリグリセリド値



出典：SBC102-P012 (4.2.1.1.6) Study Report Figure 4
LAL = ライソゾーム酸性リパーゼ

図 2.6.2-16　セベリパーゼ　アルファを 3 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回 4 週間投与した後の LAL 欠損ラットの血清高比重リポタンパク質及び低比重リポタンパク質値



出典：SBC102-P012 (4.2.1.1.6) Study Report Table 3
HDL = 高比重リポタンパク質；LAL = ライソゾーム酸性リパーゼ；LDL = 低比重リポタンパク質

図 2.6.2-17 セベリパーゼ アルファを 3 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回 4 週間投与した後の LAL 欠損ラットの血清トランスアミナーゼ値



出典：SBC102-P012 (4.2.1.1.6) Study Report Figure 2
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 ; LAL = ライソゾーム酸性リパーゼ

投与中止後に認められた肝臓の病理組織学的所見（泡沫マクロファージの蓄積による実質の置換及び小滴性の肝リピドーシス）は無処置の LAL 欠損ラットに類似していた。セベリパーゼ アルファの投与中止後、泡沫マクロファージの集積部位の数とサイズは時間と共に増加した。壊死領域のサイズと出現率も投与中止後の時間と共に増加した。

結論

セベリパーゼ アルファ投与中止後の LAL 基質再蓄積の経時変化の詳細な追跡調査及び血液生化学パラメータの異常の再発段階の詳細な追跡調査により、基質蓄積と疾患再発の関連について重要な知見が得られた。

投与中止後 3 週という早期に肝臓コレステロールエステル含有量の著明な増加と共に、AST 及び ALT 値の増加と HDL 値の低下が確認された。投与中止後にトリグリセリド、LDL 及び総コレステロール値の全体的な増加傾向も認められた。予想されたとおり、生化学パラメータの悪化と共に LAL 欠損症の影響を受ける重要臓器の進行的な臓器肥大及び病理組織学的所見の悪化が認められた。セベリパーゼ アルファの投与中止後、体重増加に対する改善効果は持続しなかった。無処置の LAL 欠損ラットの体重が 7 週齢から定常であるのと対照的に（2.6.2.2.2.3

項参照）、セベリパーゼ　アルファを 4 週間投与した LAL 欠損ラットの体重は減少した。4 週間のセベリパーゼ　アルファ投与により生存期間が改善し、投与期間以上無処置で生存できたことから、4 週間以上後に基質が再蓄積し、その有害効果が発生することが示唆された。

セベリパーゼ　アルファの薬効の可逆性から、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とおり、本動物モデルでの効果を維持するための継続的な酵素補充の必要性が示された。また、投与中止後 3 週から肝臓重量及び肝臓脂質含有量の増加が認められ、病態が悪化し始めたことから、ラットにおいては 3 週間未満の投与間隔が重要であることが示された。

2.6.2.2.2.7　LAL欠損ラットにおけるセベリパーゼ　アルファの用量反応性（SBC102-P002）

セベリパーゼ　アルファを 5 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回（qw）、4 週間投与した際の成績を基に、LAL 欠損ラットにおけるセベリパーゼ　アルファの薬理作用（PD）の用量範囲及び投与スケジュール（1 週間に 1 回［qw］及び 2 週間に 1 回［qow］）を検討した。

方法

LAL 欠損ラットにジフェンヒドラミン 5 mg/kg を腹腔内投与した後に、溶媒（生理食塩液）又は生理食塩液にて調整したセベリパーゼ　アルファを 1 週間に 1 回（qw、4 回投与、用量 0.35、1 及び 5 mg/kg）又は 2 週間に 1 回（qow、2 回投与、用量 0.2、1、3 及び 5 mg/kg）、4 週齢から 8 週齢で試験を終了するまで尾静脈内に投与した。

評価項目は体重、臓器重量（脾臓、腸管膜リンパ節、肝臓、十二指腸、空腸、回腸、胃リンパ節、副腎、膵臓及び脳）、組織コレステロール含有量、コレステロールエステル含有量、トリグリセリド含有量、肝臓中 LAL 酵素活性、血清トランスアミナーゼ値及び組織病理とした。

結果

セベリパーゼ　アルファを 0.2、1、3 及び 5 mg/kg の用量で 2 週間に 1 回、又は 0.35、1 及び 5 mg/kg を 1 週間に 1 回、4 週齢から 1 ヵ月間静脈内投与した結果、体重増加量、臓器の肥大、組織中の脂質含有量及び血清トランスアミナーゼ値の改善が認められた。ADA は分析した 36 例の血清試料には検出されなかった。

雌雄の LAL 欠損動物で、セベリパーゼ　アルファ投与により 8 週齢時の体重は溶媒投与群と比べて大きく、野生型ラットと同等であった。体重への影響は用量依存的で、最大の作用は 5 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回投与した群で認められ、溶媒対照群の体重よりも 1.74 倍増加していた。

同様に 4 週間投与後の体重増加量（%）についても高用量群で最大であった。重要なこととして、著明な薬理作用は中間用量（3 mg/kg、2 週間に 1 回）においても認められており、溶媒対照群と比べて、体重では 1.5 倍、体重増加量（%）では 2 倍増加していた。0.2 mg/kg の用量で 2 週間に 1 回投与した群では、溶媒対照群と比べて体重及び体重増加量（%）に明らかな差異は認められなかった。セベリパーゼ　アルファを LAL 欠損ラットに 4 週間投与すると、肝臓、脾臓、小腸及び腸間膜リンパ節の体重比重量が用量依存的に減少した。最大の作用は 5 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回投与した群で認められ、臓器重量は野生型ラットと同等であった。セベリパーゼ　アルファを投与した LAL 欠損ラットでは、肝臓及び小腸（十二指腸、空腸及び回腸）の重量が用量依存的に減少した。中間用量においても臓器重量減少の用量依存的な傾向がみられた。0.2 mg/kg の用量で 2 週間に 1 回投与した群では、溶媒対照群と比べて臓器重量の減少は認められなかった。肝臓中の LAL 基質であるコレステロール、コレステロールエステル及びトリグリセリド含有量（μg/mg wet tissue）は、野生型と比べて LAL 欠損ラットで顕著に増加している。セベリパーゼ　アルファを LAL 欠損ラットに 5 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回、4 週間投与すると、これらの基質は雌雄ともに野生型ラットにおける基質濃度とほぼ同等の組織内濃度に減少した。組織中コレステロール、コレステロールエステル及びトリグリセリド含有量の減少は用量依存的であった。0.2 mg/kg の用量で 2 週間に 1 回投与した群では、肝臓及び脾臓のコレステロールエステル濃度は、溶媒対照群と同等であったが、肝臓及び脾臓のトリグリセリド濃度は明らかに減少していた。セベリパーゼ　アルファを LAL 欠損ラットに 5 mg/kg の用量で単回投与した後、1、24 及び 72 時間に肝臓中の LAL 酵素活性を測定した。LAL 活性は投与後の時間経過と共に低下した。投与後 3 日まで LAL 活性は野生型ラットと同等であった。さらに、LAL 欠損ラットにおける肝臓の症状に対するセベリパーゼ　アルファの効果が血清トランスアミナーゼ値で示されている。セベリパーゼ　アルファを 5 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回、4 週間投与すると、血清 AST 値は週齢をあわせた野生型ラットと同等になった。一方、これより低い用量ではこの作用は明らかではなかった。

結論

LAL 欠損動物にセベリパーゼ　アルファを投与すると、このラット疾患モデルで認められる表現型の異常が本質的に改善された。セベリパーゼ　アルファを投与した LAL 欠損ラットでは、0.35 mg/kg（1 週間に 1 回）以上の用量で溶媒対照群と比べて体重が増加した。セベリパーゼ　アルファをより高い用量で投与した際には体重増加量（%）は野生型ラットと同等であった。臓器の肥大に関しても、改善効果が認められ、肝臓、小腸及び脾臓を含む影響を受けるすべての組織で臓器重量が低下した。血清 AST 及び ALT 値の改善も認められた。セベリパーゼ　アル

ファの予想される作用メカニズムと一致して、4 週間投与後に組織中の LAL 基質濃度は減少した。これらの成績はヒトの LAL 欠損症の治療薬としてセベリパーゼ　アルファの有用性を検討することを支持している。

2.6.2.3　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、補充を必要とする欠失酵素に対し生化学的に高い相同性を持った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。

2.6.2.4　安全性薬理試験

安全性薬理試験（表 2.6.2-15）として SD ラットに、(1) セベリパーゼ　アルファを最大 50 mg/kg の用量で単回静脈内投与し、呼吸器系に対する影響及び（2）セベリパーゼ　アルファを最大 50 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回反復静脈内投与し、中枢神経系に対する影響を評価した。カニクイザルにセベリパーゼ　アルファを 50 mg/kg の用量で単回静脈内投与し、心血管系に対する影響を評価した。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）で調製したセベリパーゼ　アルファは、滅菌生理食塩液で希釈した後に静脈内（持続）投与した。静脈内持続投与は予定臨床投与経路である。

表 2.6.2-15　安全性薬理試験

試験番号	試験の種類	試験系	用量（mg/kg）	GLP 適用
中枢神経系				
[redacted] 8232-384 （SBC102-T002）	機能的観察バッテリー	ラット /Sprague-Dawley	0、5、20、50	適
心血管系				
[redacted] 8232-454 （SBC102-T004）	心血管	サル /カニクイ	0、50 （交差法）	適
呼吸器系				
[redacted] 8232-453 （SBC102-T005）	呼吸器	ラット /Sprague-Dawley	0、5、20、50	適

GLP = 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準

2.6.2.4.1　中枢神経系安全性薬理；ラットの 4 週間静脈内持続投与毒性試験及び 2 週間回復性試験、[redacted] Study No. 8232384（SBC102-T002）

（4.2.3.2.1）

SD ラットにセベリパーゼ　アルファを 1 週間に 1 回 4 週間反復静脈内持続投与し、潜在的な中枢神経系に対する毒性作用を評価した(SBC102-T002）。本試験は GLP に準拠して実施した。

方法

SD ラット（雌雄各 10 例/群）に溶媒（2 群）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 週間静脈内持続投与した。回復群（雌雄各 5 例/群）にも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 週間静脈内持続投与した。投与速度は約 10 mL/kg/h とした。

本試験には対照群を 2 群（Group 1 と 2）設定した。Group 1 には溶媒のみを投与し、Group 2 には溶媒投与 30 分前に、ジフェンヒドラミン（5 mg/kg）を投与した。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 を前投与した。

観察項目として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を評価し、投与開始前、投与 1 日及び投与 4 週の投与終了直後に各例について約 5 分間、実施した。

また、体温も測定した。本試験で得られた毒性学的評価の詳細は 2.6.6 毒性試験の概要文で概説する。

結果

投与 1 日及び投与 4 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。投与 1 日のオープンフィールドテストで観察された右後肢の運動制限は、ジフェンヒドラミンの筋肉内注射に起因するものであり、一般状態観察所見と一致した。その他の評価項目で見られた差異（投与 1 日にみられた 50 mg/kg 群雌での平均侵害受容反射の増加及び 5 mg/kg 群雌での平均体温の上昇）は、セベリパーゼ　アルファの投与に関連したものではないと考えられた。

結論

セベリパーゼ　アルファを最大 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 SD ラットでは、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。

2.6.2.4.2　心血管系安全性薬理；テレメトリー装着覚醒雄性サルへのセベリパーゼ　アルファ静脈内持続投与による心血管系安全性薬理評価、[redacted] Study No. 8232454（SBC102-T004）

（4.2.1.3.1）

覚醒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、テレメトリーを用いて心血管系に対する潜在的薬理作用を評価した（SBC102-T004）。本試験は GLP に準拠して実施した。

方法

8 例の雄性カニクイザルに溶媒（0 mg/kg）及びセベリパーゼ　アルファ（50 mg/kg）を静脈内持続投与した。投与速度は約 10 mL/kg/h とし、約 5 時間かけて投与した。2 用量のクロスオーバーデザインで、投与の間に最低 6 日間の休薬期間を設けた。

評価項目は、一般状態観察、体重、体温、心拍数、血圧（収縮期血圧、拡張期血圧、平均血圧、脈圧）、定性的及び定量的心電図評価（PR、QT、QTc 間隔；QRS 時間）とした。

心拍数、血圧及び定量的心電図評価は、投与開始前、投与開始後 0～1 時間、1～2 時間、2～3 時間、3～4 時間、4～5 時間、5～6 時間、6～7 時間、7～10 時間、10～13 時間、13～16 時間及び 16～19 時間の記録について行った。定性的心電図評価は投与開始前、投与開始後 30 分、2 時間、5 時間、9 時間及び 18 時間の記録について行った。

結果

投薬期間中に、セベリパーゼ　アルファに関連する明らかな一般状態の変化及び体重に対する影響は認められなかった。

50 mg/kg の投与後に、血行動態パラメータ及び定量的心電図パラメータ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。セベリパーゼ　アルファ投与に関連した心電図波形の異常や不整脈は認められず、検討したすべての心電図データのセグメントは定性的に正常範囲内であった。

結論

セベリパーゼ　アルファを 50 mg/kg の用量で単回静脈内持続投与したカニクイザルでは、セベリパーゼ　アルファによると考えられる心血管系への有害作用は認められなかった。

2.6.2.4.3　呼吸器系安全性薬理；ヘッドアウトプレチスモグラフィを用いた雄性ラットへのセベリパーゼ　アルファ静脈内投与による呼吸器系安全性薬理評価、[redacted] Study No. 8232453（SBC102-T005）

（4.2.1.3.2）

SD ラットにセベリパーゼ　アルファを単回静脈内持続投与し、呼吸器系に対する潜在的薬理作用を評価した(SBC102-T005）。本試験は GLP に準拠して実施した。

方法

SD ラット（雄 8 例/群）に溶媒（2 群）又はセベリパーゼ　アルファを 5、20 及び 50 mg/kg の用量で単回静脈内持続投与した。投与速度は約 10 mL/kg/h とした。

本試験には対照群を 2 群（Group 1 と 2）設定した。Group 1 には溶媒のみを投与し、Group 2 には溶媒投与 30 分前に、ジフェンヒドラミン（5 mg/kg）を投与した。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 を前投与した。

評価項目は一般状態観察及び体重とした。呼吸パラメータ（1 回換気量、呼吸数、換気量）はプレチスモグラフィー装置に動物を拘束した状態で記録した。試験終了時に剖検を実施した。

呼吸パラメータの評価は、投与前日（30 分間）、投与開始後 0.5～7 時間（30 分毎）及び 24 時間（30 分間）の記録について行った。

結果

5 及び 20 mg/kg 群のそれぞれ 8 例中 3 例で認められた右後肢の運動制限は、ジフェンヒドラミンの筋肉内投与に関連したものと考えられた。50 mg/kg 群全例で、四肢及び頭部の腫脹が認められた。

対照群を含む全群の全例で、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。20 及び 50 mg/kg 群では、5 時間の持続投与中に呼吸数の上昇傾向が見られたが、統計的に有意ではなく、また、生理学的に意義あるものとは考えられなかった。50 mg/kg 群では換気量の増加傾向及び 20 mg/kg 群では共変量で調整した平均換気量の有意な増加が見られたが、20 及び 50 mg/kg 群で見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、これらの変化は生物学的に大きな懸念になるとは考えられなかった。

結論

セベリパーゼ　アルファを最大 50 mg/kg の用量で単回静脈内持続投与した雄性 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（1 回換気量、呼吸数、換気量）の変化は観察されなかった。

2.6.2.5　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。

2.6.2.6　考察及び結論

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。蛍光標識体を用いた *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。

Yoshida ラットモデルにおいて、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、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。

LAL 欠損ラットにセベリパーゼ　アルファを 5 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回投与すると、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　アルファの有効性を評価した。8 週齢からセベリパーゼ　アルファを 3 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回投与すると、体重増加が亢進し、成長速度が改善した。セベリパーゼ　アルファの予想される作用機序を裏付けるように、セベリパーゼ　アルファの投与により組織の LAL 基質含有量が低下し、肝臓の病理組織学的所見はほぼ正常まで回復した。臓器重量の低下及び血清トランスアミナーゼ値の改善は生存率の改善を伴った。セベリパーゼ　アルファの効果は ADA 存在下においても持続した。

続いて、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。セベリパーゼ　アルファを 3 mg/kg の用量で 1 週間に 1 回 4 週間投与した後で投与を中止すると、投与中止後に動物の健康状態の全般的な悪化が観察された。投与中止後 3 週という早期に、肝臓重量の増加及び血清 AST 及び ALT 値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が認められ、血清 HDL の低下が明白となった。投与中止後 5 週ころから、成長速度が進行的に低下し、血清トリグリセリド値及びコレステロール値が増加したが、短期間の

セベリパーゼ　アルファ投与により生存期間は延長していた。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ことが示唆された。

SD ラットにセベリパーゼ　アルファを反復静脈内投与し、中枢神経系安全性薬理試験として行動観察、自律神経機能評価及び外観観察を行った。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　アルファを最大 50 mg/kg の用量で SD ラットに 1 週間に 1 回 4 週間投与したところ、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。

覚醒カニクイザルでテレメトリーを用いて、セベリパーゼ　アルファの心血管系安全性薬理パラメータに対する影響を評価した。セベリパーゼ　アルファを 50 mg/kg の用量で単回静脈内持続投与したが、血行動態パラメータ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。

覚醒 SD ラットで呼吸器系安全性薬理パラメータを評価した。セベリパーゼ　アルファを最大 50 mg/kg の用量で単回静脈内持続投与したが、いずれの時点においても呼吸器パラメータ（1 回換気量、呼吸数、換気量）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。

結論として、セベリパーゼ　アルファは *in vitro* で細胞に取り込まれてライソゾームに輸送され、LAL 活性を回復させることが示された。セベリパーゼ　アルファを投与した LAL 欠損ラットでは体重増加の亢進、臓器重量の低下、肝臓脂質含有量の低下及び血清トランスアミナーゼ値の低下など重要な疾患関連異常の改善と共に肝臓の病理組織学的所見の改善が認められた。改善効果はセベリパーゼ　アルファの短期間及び長期間投与後に認められ、また、ADA 存在下でも持続した。より進行した病態（8 週齢）でのセベリパーゼ　アルファの改善効果は、より早期（4 週齢）から投与した際にみられた効果と同等であった。LAL 欠損ラットでこれら改善効果を維持するためには継続的な酵素補充が必要であり、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。

中枢神経系、心血管系及び呼吸器系パラメータに対し、セベリパーゼ　アルファの毒性学的意義のある作用は認められなかった。

これらの結果から、LAL 欠損症患者の治療法としてセベリパーゼ　アルファの臨床有用性の検討が支持される。

2.6.2.7　図表

図又は表は適切な項に記載した。

2.6.2.8　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 cholesteryl ester storage disease.　*JIMD Rep*.　2013;8:41-46.

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.

Beaudet AL, Ferry GD, Nichols BL Jr, Rosenberg HS.　Cholesterol ester storage disease: Clinical, biochemical, and pathological studies.　*J Pediatr*.　1977;90:910-14.

Crocker AC, Vawter GF, Neuhauser EBD, 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.

Du H, Schiavi S, Levine M, Mishra J, Heur M, Grabowski GA.　Enzyme therapy for lysosomal acid lipase deficiency in the mouse.　*Hum Mol Genet*.　2001;10（16）:1639-48.

Du H, Levine M, Ganesa C, Witte DP, Cole ES, Grabowski GA.　The role of mannosylated enzyme and the mannose receptor in enzyme replacement therapy.　*Am J Hum Genet*.　2005;77（6）:1061-74.

Elleder M, Chlumská 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.

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

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.

Lane KB, Egan B, Vick S, Abdolrasulnia R, Shepherd VL. Characterization of a rat alveolar macrophage cell line that expresses a functional mannose receptor. *J Leukoc Biol*. 1998;64（3）:345-50.

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 （short report）. *J Inherit Metab Dis*. 1999;22:93-4.

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

Sloan HR, Fredrickson DS. Enzyme deficiency in cholesteryl ester storage disease. *J Clin Invest*. 1972;51:1923-26.

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

目次

2.6.3 薬理試験概要表 2
2.6.3.1 薬理試験：一覧表 2
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 4
2.6.3.3 副次的薬理試験 9
2.6.3.4 安全性薬理試験 10
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 11

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

下表に薬理試験の概要を示した。セベリパーゼ　アルファの *in vitro* 薬理試験はラット肺胞マクロファージ細胞及びヒト線維芽細胞で実施した。セベリパーゼ　アルファの *in vivo* 薬理試験は Donryu ラット及びライソゾーム酸性リパーゼ欠損 Donryu ラットである Yoshida ラットで実施した。安全性薬理試験は Sprague-Dawley ラット及びカニクイザルで実施した。

被験物質：セベリパーゼ　アルファ

Type of Study/Description	GLP[a]	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number/ Location
Primary Pharmacodynamics					
Cellular uptake of sebelipase alfa in rat alveolar macrophage	No	NR8383 rat macrophages	*In vitro*	Synageva BioPharma[b]	SBC102-P001/ 4.2.1.1.1
Cellular uptake of sebelipase alfa in LAL-deficient human fibroblasts	No	Human fibroblasts	*In vitro*	Synageva BioPharma	SBC102-P001/ 4.2.1.1.1
Pharmacokinetics and pharmacodynamic effects of sebelipase alfa	No	Yoshida rat	IV injection	Synageva BioPharma and [redacted]	SBC102-P002/ 4.2.1.1.2
Survival analysis of LAL-deficient rats	No	Yoshida rat	NA	Synageva BioPharma and [redacted]	SBC102-P003/ 4.2.1.1.3
Efficacy of a delayed treatment regimen with sebelipase alfa	No	Yoshida rat	IV injection	Synageva BioPharma and [redacted]	SBC102-P005/ 4.2.1.1.5
Description of the LAL-deficient and wild type phenotypes – overt clinical observations	No	Yoshida rat	NA	Synageva BioPharma	SBC102-P006/ 4.2.1.1.4
Elimination and re-accumulation of cholesterol and triglyceride in the liver	No	Yoshida rat	IV injection	Synageva BioPharma and [redacted]	SBC102-P012/ 4.2.1.1.6

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

被験物質：セベリパーゼ　アルファ

Type of Study/Description	GLP[a]	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number/ Location
Secondary Pharmacodynamics					
	No applicable study				
Safety Pharmacology					
CNS safety pharmacology	Yes	Sprague-Dawley rat	IV infusion	[redacted]	8232384 (SBC102-T002)/ 4.2.3.2.1
Cardiovascular safety pharmacology	Yes	Cynomolgus monkey	IV infusion	[redacted]	8232454 (SBC102-T004)/ 4.2.1.3.1
Respiratory safety pharmacology	Yes	Sprague-Dawley rat	IV infusion	[redacted]	8232453 (SBC102-T005)/ 4.2.1.3.2
Pharmacodynamic Drug Interactions					
	No applicable study				

CNS = central nervous system; GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous; LAL = lysosomal acid lipase; NA = not applicable; [redacted]

[a] An entry of "Yes" indicated that the study includes a GLP compliance statement.

[b] Fluorescence activated cell sorting analysis was conducted at [redacted].

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

効力を裏付ける薬理試験はNR8383ラットマクロファージ細胞、ヒト線維芽細胞及びYoshidaラットで実施した。下表に特記すべき所見など効力を裏付ける試験の概要を示した。それ以外の情報は2.6.2薬理試験の概要文に追記した。

被験物質：セベリパーゼ　アルファ

Type of Study/Description	Test System	Method of Administration	Dose	Gender and N per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Cellular uptake of sebelipase alfa in rat alveolar macrophage	NR8383 rat macrophages	*In vitro*	5 µg/mL	NA	Uptake of sebelipase alfa and localisation to lysosomes was demonstrated	SBC102-P001
Cellular uptake of sebelipase alfa in LAL-deficient human fibroblasts	Human fibroblasts	*In vitro*	0, 0.16, 0.5, 1.6, 5 µg/mL	NA	A mannose dose-dependent inhibition in sebelipase alfa binding/uptake was observed, consistent with a sebelipase alfa:MMR interaction. Dose-dependent increases in LAL activity were observed in LAL-deficient fibroblasts after incubation with increasing concentrations of sebelipase alfa, indicating that sebelipase alfa was endocytosed by M6P-expressing cells and also that exogenous sebelipase alfa corrected the intracellular enzyme deficiency in cells from a patient with LAL Deficiency.	SBC102-P001

2.6.3.2　効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：セベリパーゼ　アルファ

Type of Study/Description	Test System	Method of Administration	Dose	Gender and N per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Pharmacokinetics and pharmacodynamic effects of sebelipase alfa	Yoshida rat	IV injection, qw for 4 weeks	0 mg/kg qw 5 mg/kg qw	0: M/0, F/3 5: M/1, F/2 WT: M/1, F/5 (body weight) M/0, F/3 (other parameters)	Sebelipase alfa demonstrated reduction of the pathophysiology in LAL-deficient rats LAL-deficient rats treated with sebelipase alfa at a dose of 5 mg/kg qw gained more weight than vehicle-treated animals and demonstrated reductions in organ weights.　Tissue levels of LAL substrates were reduced after 4 weeks of treatment, as evidenced by a reduction in cholesteryl esters and triglycerides in the liver and spleen.	SBC102-P002

2.6.3.2　効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：セベリパーゼ　アルファ

Type of Study/Description	Test System	Method of Administration	Dose	Gender and N per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Survival analysis of LAL-deficient rats	Yoshida rat	NA	NA	M/10, F/10	LAL-deficient rats displayed a biphasic survival curve with an increase in mortality around the time of weaning and a second sharp increase beginning at approximately 11 weeks of age; 50% died by 12 weeks of age and all died by 14 weeks. Embryonic and early mortality (prior to 2 weeks of age) likely was not significant since genetic analysis at 2 weeks of age demonstrated a Mendelian inheritance pattern for the LAL-deficiency genotype. WT rats survived to at least 200 days (28.6 weeks) indicating the increased mortality in LAL-deficient rats was directly associated to the LAL deficiency and not due to another characteristic of the highly inbred colony.	SBC102-P003

2.6.3.2　効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：セベリパーゼ　アルファ

Type of Study/Description	Test System	Method of Administration	Dose	Gender and N per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Efficacy of a delayed treatment regimen with sebelipase alfa	Yoshida rat	IV injection, qw for 19 weeks	0, 3 mg/kg	M/3, F/3	In LAL-deficient rats, sebelipase alfa demonstrated positive effects on growth (body weight and body weight gain), decreases in organomegaly, and reductions in lipid accumulation in the liver. The survival of all sebelipase alfa-treated rats until scheduled sacrifice at 27 weeks of age (compared to the vehicle-treated rats sacrificed moribund at 9-12 weeks of age) confirmed the positive effects of long-term treatment on the general well-being of the animals. The positive effects were maintained even in the presence of ADAs, and the positive effects of sebelipase alfa in more advanced disease (treatment beginning at 8 weeks of age) were comparable to the effects observed with the short-term (4 weeks) administration beginning at 4 weeks of age.	SBC102-P005

2.6.3.2　効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：セベリパーゼ　アルファ

Type of Study/Description	Test System	Method of Administration	Dose	Gender and N per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Description of the LAL-deficient and wild type phenotypes – overt clinical observations	Yoshida rat	NA	NA	M/2, F/2	Throughout the observation period (28-91 days of age), the average body weight of the LAL-deficient rats was lower than that of the WT rats, and the WT rats maintained a greater growth velocity over each weekly interval. Key clinical pathology parameters were markedly different between the LAL-deficient and WT rats. At approximately 91 days of age, rats with advanced disease demonstrated elevated ALT, AST, serum cholesterol, triglyceride, and LDL levels compared to WT rats. The HDL levels in the LAL-deficient rats were lower than levels in the WT rats. Key organ weight differences included increased liver, spleen, duodenum, jejunum, and ileum weights in the LAL-deficient rats compared to the WT rats.	SBC102-P006

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：セベリパーゼ　アルファ

Type of Study/Description	Test System	Method of Administration	Dose	Gender and N per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Elimination and re-accumulation of cholesterol and triglyceride in the liver	Yoshida rat	IV injection, qw for 4 weeks	3 mg/kg	M/18, F18	Reversibility of the beneficial effects of sebelipase alfa treatment demonstrated that continuous enzyme replacement is necessary to maintain benefit in this animal model. Marked increases in liver cholesteryl ester was evidenced as early as 3 weeks after the last dose and was accompanied by increases in AST and ALT and decreases in HDL. Evidence of reversal of the favourable effect on triglycerides was seen later. Deterioration in biochemical parameters was accompanied by progressive organomegaly and worsening pathology in key organs. The favourable effects on weight gain were not sustained after discontinuation of treatment. The short exposure to sebelipase alfa improved survival.	SBC102-P012

ADA = anti-drug antibody; ALT = alanine aminotransferase; AST = aspartate aminotransferase; F = female; HDL = high density lipoprotein; hr = hours; IV = intravenous; LAL = lysosomal acid lipase; M = male; LDL = low density lipoprotein; M6P = mannose-6-phosphate; MMR = macrophage mannose receptor; NA = not applicable; qw = once a week; WT = wild-type

2.6.3.3 副次的薬理試験

副次的薬理試験は実施していない。

2.6.3.4 安全性薬理試験

セベリパーゼ　アルファの安全性薬理試験は Sprague-Dawley ラット及びカニクイザルで実施した。下表に特記すべき所見など安全性薬理試験の概要を示した。

被験物質：セベリパーゼ　アルファ

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Dose (mg/kg)	Gender and N per Group	Noteworthy Findings	GLP[a]	Study Number
Central Nervous System	Rat, Sprague-Dawley	IV infusion 10 mL/kg/hr, qw for 4 weeks	0, 5, 20, 50	M/10, F/10	Clinical observations: Test article-related, dose-dependent, transient swelling of paws and/or nose and red skin of the paws. Limited right use of the right hind limb associated with the intramuscular injection of diphenhydramine. Functional observational battery: There were no statistically significant or biologically important differences among the dosage groups in the measures of behaviour, autonomic functions, or appearance.	Yes	8232384 (SBC102-T002)
Cardiovascular System	Monkey, Cynomolgus	IV infusion 10 mL/kg/hr, single dose	0, 50 (crossover)	M/8	Cardiac effects: There were no relevant test article-related changes in hemodynamic parameters, ECG parameters, or body temperature.	Yes	8232454 (SBC102-T004)

2.6.3.4　安全性薬理試験（続き）

被験物質：セベリパーゼ　アルファ

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Dose (mg/kg)	Gender and N per Group	Noteworthy Findings	GLP[a]	Study Number
Respiratory System	Rat, Sprague-Dawley	IV infusion 10 mL/kg/hr, single dose	0, 5, 20, 50	M/8	Clinical observations: At 50 mg/kg, 8/8 animals demonstrated test article-related swollen paws and head post dose. At 5 and 20 mg/kg, 3/8 males demonstrated limited use of the right hind limb associated with the intramuscular injection of diphenhydramine. Pulmonary effects: There were no biologically relevant effects on respiration rate, tidal volume, or minute volume.	Yes	8232453 (SBC102-T005)

ECG = electrocardiogram; F = female; IV = intravenous; M = male; qw = once a week

[a] An entry of “Yes” indicated that the study includes a Good Laboratory Practice (GLP) compliance statement.

2.6.3.5　薬力学的薬物相互作用試験

セベリパーゼ　アルファを用いた薬力学的薬物相互作用試験は現在まで実施していない。