2.6.1 緒言

目次

1 ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（human chorionic gonadotropin、hCG） 2
2 MSJ-0011 の原薬および製剤 3
3 MSJ-0011 の構造 4
4 予定する効能・効果および用法・用量 6
5 参考文献 7

略語一覧

hCG	Human Chorionic Gonadotropin	ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン
hFSH	Human Follicle Stimulating Hormone	ヒト卵胞刺激ホルモン
hLH	Human Luteinizing Hormone	ヒト黄体化ホルモン
hMG	Human Menopausal Gonadotropin	ヒト閉経後性腺刺激ホルモン
hTSH	Human Thyroid Stimulating Hormone	ヒト甲状腺刺激ホルモン
IVF	In Vitro Fertilization	体外受精
LH	Luteinizing Hormone	黄体化ホルモン
r-hCG	Recombinant Human Chorionic Gonadotropin	遺伝子組換えヒト絨毛性性腺刺激ホルモン
u-hCG	Urinary Human Chorionic Gonadotropin	尿由来ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン

1 ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（human chorionic gonadotropin、hCG）

hCGは早ければ受胎6日後に栄養芽細胞によって産生される水溶性の糖たん白ホルモンで、黄体および胎児胎盤の早期内分泌機能を刺激および維持する。妊娠初期において、hCGは黄体の寿命を延長し、胎盤自体がこの機能を果たすまで黄体によるエストロゲンとプロゲステロンの分泌を活性化および維持する[1]。初期の妊娠維持において、早期の栄養芽細胞およびその後の胎盤によるhCGの産生は不可欠である[2、3]。

hCGは、下垂体ゴナドトロピン[ヒト卵胞刺激ホルモン(human follicle stimulating hormone、hFSH)、ヒト黄体化ホルモン(human luteinizing hormone、hLH)およびヒト甲状腺刺激ホルモン(human thyroid stimulating hormone、hTSH)]と同じファミリーに属する。

hCGは、92のアミノ酸残基からなるαサブユニット（糖たん白ホルモンに共通）および145のアミノ酸残基からなる標的特異的βサブユニットで構成される[1、4、5、6、7]。

細胞レベルでは、hLHおよびhCGの働きは、黄体化ホルモン（luteinizing hormone、LH）/hCG受容体と呼ばれる細胞膜特異的な糖たん白成分に結合することにより始まる。hCGのLH/hCG受容体への結合能はhCG特有の構造的特性に依存している。卵巣（莢膜および顆粒膜細胞）および精巣（ライディッヒ細胞）における生化学的なプロセスを調節する細胞内機序を始動させるには、適切なLH/hCG受容体との相互作用が必要である[4]。

これらの細胞において、hLHおよびhCGは受容体との結合を介して、細胞膜に局在するアデニル酸シクラーゼ酵素を活性化し、アデノシン三リン酸を環状アデノシン一リン酸に変換する。これに続き、不活性型プロテインキナーゼが環状アデノシン一リン酸により活性化され、コレステロールをプレグネノロンに変換し、ミトコンドリアにおけるステロイド産生が開始する。

女性において、hCGは卵胞期後期の正常なLHサージと同様に、卵胞の成熟および破裂、ならびに黄体による正常なホルモン分泌を促す。すなわち、不妊治療を受けている患者において、卵胞の最終成熟と排卵を誘発する。また、黄体機能を維持するホルモンとして排卵後にも投与される。

低ゴナドトロピン性性腺機能低下症の男性においては、精巣の内分泌機能を刺激するためにhCGおよびヒト閉経後性腺刺激ホルモン（human menopausal gonadotropin、hMG）が使用されている。すなわち、hCGはライディッヒ細胞のLH/hCG受容体に結合してテストステロンの産生を刺激する。したがって、hCGは精巣内テストステロン濃度に依存する精子形成に寄与している。

2 MSJ-0011の原薬および製剤

尿由来ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（urinary human chorionic gonadotropin、u-hCG）は、不妊治療の領域において長年にわたり有効かつ安全に使用されているが、その製造には大量の尿採取および処理を必要とする。

hCG製剤の純度およびバッチ間の品質の一貫性を向上するため、ならびに汚染のリスク（たとえば、感染性粒子、尿から抽出された薬物および薬物代謝物ならびに非特異的な尿蛋白質の存在）を回避するため、Merck Serono社は、市販のu-hCG（Profasi）に代わる臨床使用を目的とした遺伝子組換えヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（recombinant human chorionic gonadotropin、r-hCG）、コリオゴナドトロピン　アルファ（遺伝子組換え）（以下、MSJ-0011）の原薬を開発した。

MSJ-0011の製剤はMerck Serono社によって開発され、海外では多数の国でOvidrelまたはOvitrelleの販売名（以下、Ovidrel）で同一の適応で市販されている。Ovidrelは、遺伝子組換え技術を利用して製造された最初のr-hCG製剤であり、2000年および2001年にそれぞれ米国と欧州連合で承認された。現在までに世界101ヵ国で承認され、臨床での有効性および安全性の実績を有する。

3 MSJ-0011 の構造

MSJ-0011 は、hCG の α および β サブユニットをコードするヒト遺伝子を導入した遺伝子組換えチャイニーズハムスター卵巣細胞により産生される(モジュール 2.3.S.1.2 項および 3.2.S.1.2 項参照)。MSJ-0011 は、非共有結合している 2 つのサブユニット、α および β サブユニットから成るヘテロ二量体糖たん白である。

α サブユニットは、第 52 位および第 78 位アスパラギンの 2 ヵ所に N-結合型糖鎖付加部位を有する 92 のアミノ酸残基からなるポリペプチドであり、5 つの分子内ジスルフィド結合を有する。β サブユニットは、第 13 位および第 30 位アスパラギンの 2 ヵ所に N-結合型糖鎖付加部位、ならびに第 121 位、第 127 位、第 132 位および第 138 位セリンの 4 ヵ所に O-結合型糖鎖付加部位を有する 145 のアミノ酸残基からなるポリペプチドであり、6 つの分子内ジスルフィド結合を有する。

α サブユニットの一次構造を以下に示す。糖鎖付加部位は下線を引いたイタリック体で示した。

				5					10					15
Ala	Pro	Asp	Val	Gln	Asp	Cys	Pro	Glu	Cys	Thr	Leu	Gln	Glu	Asn
				20					25					30
Pro	Phe	Phe	Ser	Gln	Pro	Gly	Ala	Pro	Ile	Leu	Gln	Cys	Met	Gly
				35					40					45
Cys	Cys	Phe	Ser	Arg	Ala	Tyr	Pro	Thr	Pro	Leu	Arg	Ser	Lys	Lys
				50					55					60
Thr	Met	Leu	Val	Gln	Lys	*Asn*	Val	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Cys	Cys
				65					70					75
Val	Ala	Lys	Ser	Tyr	Asn	Arg	Val	Thr	Val	Met	Gly	Gly	Phe	Lys
				80					85					90
Val	Glu	*Asn*	His	Thr	Ala	Cys	His	Cys	Ser	Thr	Cys	Tyr	Tyr	His
Lys	Ser													

β サブユニットの一次構造を以下に示す。糖鎖付加部位は下線を引いたイタリック体で示した。

1				5					10					15
Ser	Lys	Glu	Pro	Leu	Arg	Pro	Arg	Cys	Arg	Pro	Ile	*Asn*	Ala	Thr
				20					25					30
Leu	Ala	Val	Glu	Lys	Glu	Gly	Cys	Pro	Val	Cys	Ile	Thr	Val	*Asn*
				35					40					45
Thr	Thr	Ile	Cys	Ala	Gly	Tyr	Cys	Pro	Thr	Met	Thr	Arg	Val	Leu
				50					55					60
Gln	Gly	Val	Leu	Pro	Ala	Leu	Pro	Gln	Val	Val	Cys	Asn	Tyr	Arg
				65					70					75
Asp	Val	Arg	Phe	Glu	Ser	Ile	Arg	Leu	Pro	Gly	Cys	Pro	Arg	Gly
				80					85					90
Val	Asn	Pro	Val	Val	Ser	Tyr	Ala	Val	Ala	Leu	Ser	Cys	Gln	Cys
				95					100					105
Ala	Leu	Cys	Arg	Arg	Ser	Thr	Thr	Asp	Cys	Gly	Gly	Pro	Lys	Asp
				110					115					120
His	Pro	Leu	Thr	Cys	Asp	Asp	Pro	Arg	Phe	Gln	Asp	Ser	Ser	Ser
				125					130					135
Ser	Lys	Ala	Pro	Pro	Pro	*Ser*	Leu	Pro	Ser	Pro	*Ser*	Arg	Leu	Pro
				140					145					
Gly	Pro	*Ser*	Asp	Thr	Pro	Ile	Leu	Pro	Gln					

MSJ-0011 の分子量の理論値は、α サブユニットが 10.2 kDa（10195.59 Da）、β サブユニットが 15.5 kDa（15519.74 Da）で、たん白質部分の分子量は 25.7 kDa（25715.34 Da）である。

MSJ-0011 の α および β サブユニット一次構造は、特性解析により u-hCG と[redacted]が確認された。また、両サブユニットの糖鎖組成が決定され、u-hCG と類似していることが分かった（モジュール 2.3.S.3.1.8 項および 3.2.S.3.1.7 項参照）。

4 予定する効能・効果および用法・用量

本剤は、0.5 mL 中に 250 μg の MSJ-0011 を含む単回皮下投与を目的とする液剤で、不妊治療の領域で使用される。本剤の予定する効能・効果、用法・用量は、以下の通りである。

効能・効果

- 排卵誘発及び黄体化
- 生殖補助医療における卵胞成熟と黄体化

用法・用量

- コリオゴナドトロピン　アルファ（遺伝子組換え）として 250 μg を単回皮下投与する。

5 参考文献

1 Birken S, Krichevsky A, O'Connor J, et al. Chemistry and immunochemistry of hCG, its subunits and its fragments. In: Chin WW, Boime I, editors. Glycoprotein hormones. Norwell: Serono Symposia; 1990; 45-61.

2 Ganong WF. The gonads: development and function of the reproductive system. In: Review of medical physiology. 12th ed. New York: Appleton & Lange; 1985; 345-80.

3 Costanzo LS. Reproductive physiology. In: Physiology. Philadelphia: WB Saunders; 1998; 394-411.

4 Pierce JG, Parsons TF. Glycoprotein hormones: structure and function. Annu Rev Biochem. 1981; (50): 465-95.

5 Sairam MR. Les hormones gonadotropes de l'hypophyse humaine (FSH, LH et prolactine): structure et mecanisme d'action. In: MauvaisJarvis P, Sitruk-Ware R, editors. Medecine de la reproduction (gynecologie endocrinienne). Paris: Flammarion Medecine/Sciences; 1986; 41-57.

6 Bahl OP. Chemistry of human chorionic gonadotropin. In: Li CH, editor. Hormonal proteins and peptides. New York: Academic Press; 1973; 171-99.

7 Keutmann HT, Dawson B, Bishop WH, et al. Structure of human luteinizing hormone alpha subunit. Endocr Res Commun. 1978; 5(1): 57-70.

2.6.2 薬理試験の概要文

目次

1 まとめ 5
2 効力を裏付ける試験 7
2.1 In vitro 効力を裏付ける試験 7
2.1.1 MSJ-0011 および u-hCG の受容体結合親和性試験（6864 試験） 7
2.2 In vivo 効力を裏付ける試験 8
2.2.1 排卵誘発剤としての MSJ-0011：雌アカゲザルでの用量設定試験（7298 試験） 8
3 副次的薬理試験 13
3.1 ヒト卵巣癌細胞の増殖に対する影響（7437 試験） 13
4 安全性薬理試験 14
4.1 麻酔ラットでの安全性薬理試験（6755 試験） 14
4.2 麻酔ビーグル犬での安全性薬理試験（18/[redacted]2068 試験） 14
4.3 ラット単回静脈内および皮下投与毒性試験（[redacted]0383 試験） 14
5 薬力学的薬物相互作用 15
6 考察および結論 16
7 図表 17

表目次

表 2.6.2 - 1 効力を裏付ける試験（6864 試験および 7298 試験） 5
表 2.6.2 - 2 副次的薬理試験（7437 試験） 5
表 2.6.2 - 3 安全性薬理試験結果の概要 6
表 2.6.2 - 4 u-hCG と MSJ-0011（3 ロット）の受容体結合親和性の比較 8
表 2.6.2 - 5 試験群の構成 9
表 2.6.2 - 6 採取した卵の核成熟度 10

図目次

図 2.6.2 - 1 1～4 群の MI 期の卵、MI 期から MII 期に成熟した卵および MII 期の卵の受精率およびそれらの総受精率 11
図 2.6.2 - 2 1～4 群の黄体期の血清中プロゲステロン濃度推移 12

略語一覧

CNS	Central nervous system	中枢神経系
ECG	Electrocardiograph	心電図
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
GnRH	Gonadotropin releasing hormone	性腺刺激ホルモン放出ホルモン
GV	Germinal vesicle	卵核胞
hCG	human Chorionic gonadotropin	ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン
K_d	Dissociation constant	解離定数
LH	Luteinizing hormone	黄体化ホルモン
MI	Metaphase I	第一減数分裂中期
MII	Metaphase II	第二減数分裂中期
PD	Pharmacodynamic	薬力学
PI	Prophase I	第一減数分裂前期
PK	Pharmacokinetic	薬物動態
r-hFSH	recombinant human Follicle stimulating hormone	遺伝子組換えヒト卵胞刺激ホルモン
r-hLH	recombinant human Luteinizing hormone	遺伝子組換えヒト黄体化ホルモン
u-hCG	urinary human Chorionic gonadotropin	尿由来ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン

1 まとめ

MSJ-0011 の予定する効能または効果に関する効力を裏付ける試験として、2 試験を実施した。これらの試験の概要を表 2.6.2 - 1 に示した。

表 2.6.2 - 1 効力を裏付ける試験（6864 試験および 7298 試験）

試験の種類（試験番号）	試験の目的
In vitro 受容体結合親和性試験（6864 試験）	In vitro ライディッヒ腫瘍細胞系で MSJ-0011 と尿由来ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（urinary human chorionic gonadotropin、u-hCG）の結合親和性を、解離定数を算出することにより比較評価する。
雌アカゲザルでの in vivo 用量設定薬力学（pharmacodynamic、PD）および薬物動態（pharmacokinetic、PK）試験（7298 試験）	成熟した雌サルで、排卵前後の事象を誘発させる刺激剤としての MSJ-0011 の効果を評価する。また、MSJ-0011 の単回投与後の血清ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（human chorionic gonadotropin、hCG）の生物活性プロファイルを評価し、u-hCG の成績と比較する。

In vitro および in vivo 試験により、以下の結果が示された。

- MSJ-0011 は u-hCG と同程度の黄体化ホルモン（luteinizing hormone、LH）/hCG 受容体への結合親和性を示した。
- 成熟した雌アカゲザルで、MSJ-0011 は u-hCG と同程度の成熟卵形成を促し、卵胞黄体化に対して同等のホルモン活性を示した。

以上のように、MSJ-0011 の効力は u-hCG と同様であった。

MSJ-0011 の培養卵巣癌細胞に対する影響を in vitro で評価するため、副次的薬理試験として 1 試験を実施した。試験の概要を表 2.6.2 - 2 に示した。

表 2.6.2 - 2 副次的薬理試験（7437 試験）

試験の種類（試験番号）	試験系	投与方法	用量	主な所見
ヒト卵巣癌細胞の増殖に対する影響（7437 試験）	Caov-3 細胞および SK-OV-3 細胞	In vitro	0.1, 1, 10 IU/mL	MSJ-0011 は卵巣癌細胞株 Caov-3 および SK-OV-3 の増殖に影響を与えなかった。

MSJ-0011 の安全性薬理学的評価を行うため、ラットおよびイヌを用いて、独立した安全性薬理試験として 2 試験および毒性試験として 1 試験を、以下の通り実施した。各試験は、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（Good Laboratory Practice、GLP）を遵守して実施した。

- MSJ-0011 を単回静脈内投与した麻酔ラットおよびイヌでの心血管系および呼吸系への影響の評価。
- MSJ-0011 を静脈内または皮下投与しラットでの単回投与毒性試験［中枢神経系（central nervous system、CNS）への影響の観察］。

表 2.6.2 - 3 に安全性薬理試験結果の概要を示した。

表 2.6.2 - 3 安全性薬理試験結果の概要

試験の種類（試験番号）	試験系	投与方法	用量	主な所見
安全性薬理試験：心血管系および呼吸系（6755）	麻酔 Sprague Dawley ラット、雌雄	in vivo（単回静脈内投与）	MSJ-0011：0、188、1880、18800 IU/kg u-hCG ：2000 IU/kg	MSJ-0011 投与により、心血管系および呼吸系に対する影響は認められなかった。
安全性薬理試験：心血管系および呼吸系（18[redacted]2068）	麻酔ビーグル犬、雌雄	in vivo（単回静脈内投与）	MSJ-0011：0、20、200、2000、20000 IU/kg	2000 IU/kg までの投与群では、MSJ-0011 投与に関連した影響は認められなかった。また、最高用量の 20000 IU/kg 群の 3 例でも、MSJ-0011 投与に関連した影響は認められなかった。同群の残り 1 例の雌では、呼吸数の増加がみられ、二次的変化、すなわち、収縮期動脈圧、心拍数、最大左室内圧 dp/dt および 分時換気量の軽微で可逆性の増加を伴っていた。
単回投与毒性試験：CNS（[redacted]0383）	Sprague Dawley ラット、雌雄	in vivo（単回静脈内または皮下投与）	MSJ-0011：0、2000、20000、200000 IU/kg	いずれの投与群でも一般状態、局所症状および行動に変化は認められなかった。

dp/dt：一次微分値

2 効力を裏付ける試験

2.1 In vitro 効力を裏付ける試験

2.1.1 MSJ-0011 および u-hCG の受容体結合親和性試験（6864 試験）

添付資料番号：4.2.1.1.1（参考資料）

MSJ-0011 の受容体結合親和性は、本ホルモンの特性を示すパラメータのひとつである。本試験では、MA-10 ライディッヒ腫瘍細胞を用いて、MSJ-0011 および u-hCG の標準品の LH/hCG 受容体への結合親和性を、解離定数（dissociation constant、K_d）を算出することにより比較評価した。

方法：

MA-10 細胞上の LH/hCG 受容体に結合させた放射性ヨウ化 u-hCG を様々な濃度の非標識 u-hCG（ロット番号 CR-127）または MSJ-0011（ロット番号[redacted]、[redacted]または[redacted] で置換することにより競合的結合試験を実施した。3 重測定（3 ウェル/濃度/薬物）による競合的結合試験を計 5 試験実施した。各試験は u-hCG 標準品（CR-127）および MSJ-0011 の 3 ロット中 2 ロットを用いて実施した。これらの試験から、u-hCG（CR-127）で 5 つ、MSJ-0011 の[redacted]で 3 つ、[redacted]で 4 つおよび[redacted]で 3 つの K_d が得られた。これらの値から、u-hCG および MSJ-0011 の K_d を算出した。

結果：

結果を表 2.6.2 - 4 に示した。

3 ロットの MSJ-0011 で算出した K_d（平均±標準偏差）は、$0.86 \pm 0.05 \times 10^{-10}$M、$0.93 \pm 0.06 \times 10^{-10}$M および $0.87 \pm 0.09 \times 10^{-10}$M であり、これらの値の間に有意な差は認められなかった。

u-hCG で算出した K_d は $1.03 \pm 0.16 \times 10^{-10}$M、3 ロットの MSJ-0011 の平均 K_d は $0.89 \pm 0.04 \times 10^{-10}$M であった。

表 2.6.2 - 4　u-hCG と MSJ-0011（3 ロット）の受容体結合親和性の比較

解離定数（K_d：M、平均±標準偏差）

		u-hCG (CR-127)	MSJ-0011 (ロット[redacted])	MSJ-0011 (ロット[redacted])	MSJ-0011 (ロット[redacted])
試験 1	K_d	1.21×10^{-10}	9.13×10^{-11}	1.02×10^{-10}	—
	標準偏差	3.15×10^{-11}	3.65×10^{-12}	7.11×10^{-12}	—
試験 2	K_d	9.89×10^{-11}	8.37×10^{-11}	—	8.05×10^{-11}
	標準偏差	8.90×10^{-12}	4.19×10^{-12}	—	4.03×10^{-12}
試験 3	K_d	8.36×10^{-11}	—	8.77×10^{-11}	8.38×10^{-11}
	標準偏差	1.25×10^{-11}	—	7.89×10^{-12}	1.17×10^{-11}
試験 4	K_d	9.60×10^{-11}	8.31×10^{-11}	8.91×10^{-11}	—
	標準偏差	1.44×10^{-11}	6.65×10^{-12}	6.24×10^{-12}	—
試験 5	K_d	1.17×10^{-10}	—	9.49×10^{-11}	9.67×10^{-11}
	標準偏差	3.16×10^{-11}	—	6.65×10^{-12}	5.80×10^{-12}
全試験	N	5	3	4	3
	K_d	1.03×10^{-10}	0.86×10^{-10}	0.93×10^{-10}	0.87×10^{-10}
	標準偏差	0.16×10^{-10}	0.05×10^{-10}	0.06×10^{-10}	0.09×10^{-10}
			P=0.34		
		P=0.14			

統計解析：ANOVA、－：実施せず

結論：

MSJ-0011 の平均 K_d 値（$0.89 \pm 0.04 \times 10^{-10}$M）は u-hCG の K_d 値（$1.03 \pm 0.16 \times 10^{-10}$M）と類似していた。すなわち、MSJ-0011 は u-hCG と同程度の親和性で LH/hCG 受容体に結合する。したがって、MSJ-0011 は in vivo で LH/hCG 受容体を介して u-hCG と同様の生理学的作用を誘起することが示唆された。

2.2　In vivo 効力を裏付ける試験

2.2.1　排卵誘発剤としての MSJ-0011：雌アカゲザルでの用量設定試験（7298 試験）

添付資料番号：4.2.1.1.2（参考資料）

MSJ-0011 の用量設定 PK/PD 試験を実施し、成熟した雌アカゲザルで排卵前後の事象を誘発させる製剤としての MSJ-0011 の効果を評価した。また、薬物動態の結果を薬物動態試験の項（モジュール 2.6.4.8.1 項および 2.6.5.16 項参照）に示した。

方法：

本試験では、MSJ-0011 および u-hCG（Profasi）の筋肉内投与による排卵前後の事象の誘発、すなわち、in vivo での卵成熟、in vitro での卵の受精、および in vivo でのプロゲステロン産生の持続期間を指標とした黄体の機能に対する効果を評価した。さらに、MSJ-0011 または u-hCG の投与前後の種々の時点で動物から採取した血清サンプルを用いて、MSJ-0011 および u-hCG の生物活性プロファイルを検討した（詳細はモジュール 2.6.4.8.1 項および 2.6.5.16 項参照）。

規則的な月経周期が確認された動物に、月経周期の 19～21 日目から性腺刺激ホルモン放出ホルモン（Gonadotropin releasing hormone、GnRH）のアンタゴニスト（Antide 1.0 mg/kg 体重/日）を皮下投与し、内因性の性腺刺激ホルモン分泌を抑制した。その後、少なくとも 6 つの卵胞が超音波にて直径 4 mm 以上に達したことが確認されるまで、GnRH アンタゴニストと共に遺伝子組換えヒト卵胞刺激ホルモン（recombinant human follicle stimulating hormone、r-hFSH）の Gonal F（30 IU）を 1 日 2 回筋肉内投与した。

r-hFSH の最終投与日に、表 2.6.2 - 5 に示した 4 群の動物に MSJ-0011 または u-hCG を単回筋肉内投与した。

表 2.6.2 - 5　試験群の構成

試験群（動物数）	被験物質（投与経路）	用量（IU）
1（5）	MSJ-0011（筋肉内）	100
2（4*）	MSJ-0011（筋肉内）	300
3（5）	MSJ-0011（筋肉内）	1000
4（5）	u-hCG（筋肉内）	1000

*：卵胞の発育が不十分であった 1 例を除外した。

<u>卵成熟</u>

MSJ-0011 および u-hCG の排卵前後の事象の誘発に対する効果を評価するため、MSJ-0011 または u-hCG 投与 27 時間後に腹腔鏡下で採卵し、顆粒膜細胞から卵を分離した。卵成熟に関する以下の形態学的指標に基づき、核の成熟度を評価した。

- 第一減数分裂前期（prophase I、PI）：卵核胞（germinal vesicle、GV）を有する。
- 第一減数分裂中期（metaphase I、MI）：GV および極体を有さない。
- 第二減数分裂中期（metaphase II、MII）：ひとつの極体を有する。
- 閉鎖卵胞：核濃縮、および空胞化した不均一な卵細胞質を有する。

<u>In vitro での卵の受精</u>

2 匹の雄アカゲザルから電気刺激射精法により精液を採取した。採卵時に MII 期であった卵、採卵時に MI 期であったが、その後 8 時間以内に in vitro で MII 期まで成熟した卵、および採卵 8 時間後

も依然MI期のままであった卵に、任意に選択したいずれかの雄の運動精子を用いて授精した。翌朝、第二極体の放出と2つの前核の形成を指標として受精の確認を行った。

In vivoでの黄体機能の評価

MSJ-0011またはu-hCGの投与日から月経初日または投与20日後のいずれか早い日まで、毎日採血し、血清中プロゲステロン濃度を測定した。毎日、午前中に1回、目視により月経の確認を行った。月経が確認されなかった場合、0.1 ng/mL以上の血清プロゲステロン値を示した日数を排卵後の黄体期の期間として記録した。

結果：

卵成熟

表2.6.2-6に示したように、動物当たりの平均採卵数および採卵時にMI期またはMII期であった卵の比率の合計は、MSJ-0011の100、300および1000 IU群およびu-hCGの1000 IU群で同程度であった。MSJ-0011の100および300 IU群のMI期の卵の比率（それぞれ52%および56%）はu-hCGの1000 IU群（61%）と同程度であったが、MSJ-0011の1000 IU群（44%）ではu-hCG群と比較してMI期の卵の比率が低かった。一方、MSJ-0011の100および1000 IU群（それぞれ42%および44%）では、u-hCG群（28%）と比較してMII期の卵の比率が高かった。しかし、いずれの群でも、採卵時にMI期であった卵のほとんどが、採卵21時間後（すなわち、受精評価時点）までには、MII期までの減数分裂を完了した。

表2.6.2-6　採取した卵の核成熟度

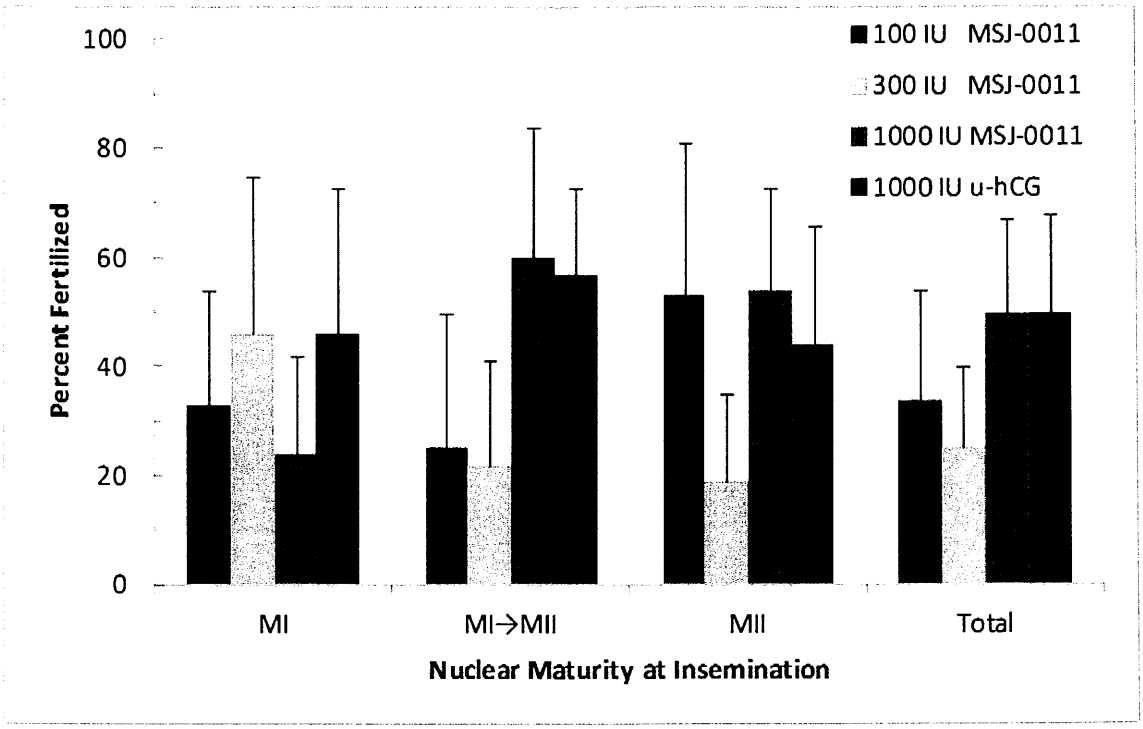
		平均個数±標準偏差（平均分布%）				
被験物質	用量 (IU)	計	PI	MI	MII	閉鎖卵胞
MSJ-0011	100	20±8	1±1 (6)	10±6 (52)	8±13 (42)	0±0 (0)
	300	18±12	2±3 (11)	10±9 (56)	6±8 (32)	0±1 (1)
	1000	28±18	2±2 (6)	12±12 (44)	12±8 (44)	2±3 (6)
u-hCG	1000	29±15	3±2 (10)	18±9 (61)	8±6 (28)	1±1 (2)

In vitroでの卵の受精

図2.6.2-1に、MSJ-0011またはu-hCG投与後に採取した卵の受精率を、卵の核成熟度ごとに示した。MI期で授精させた卵の平均受精率に群間で差はみられなかった。採卵時にMI期であったが、その後in vitroで8時間以内にMII期まで成熟した卵は、1000 IUのMSJ-0011またはu-hCG投与により、100または300 IUのMSJ-0011投与時に比べて高い受精率を示す傾向にあった。採卵時にMII期であった卵の平均受精率は、MSJ-0011の300 IU群を除く全群で同程度であった。MSJ-0011の300 IU群で受精率が低かった理由は、この群では1例のMII期卵しか受精しなかったことによる。総受

精率は、MSJ-0011 の 1000 IU 群（50±17%）と u-hCG の 1000 IU 群（50±18%）で同程度であり、MSJ-0011 の 100 および 300 IU 群ではそれに比べて低かった。

図 2.6.2 - 1 1～4 群の MI 期の卵、MI 期から MII 期に成熟した卵および MII 期の卵の受精率およびそれらの総受精率

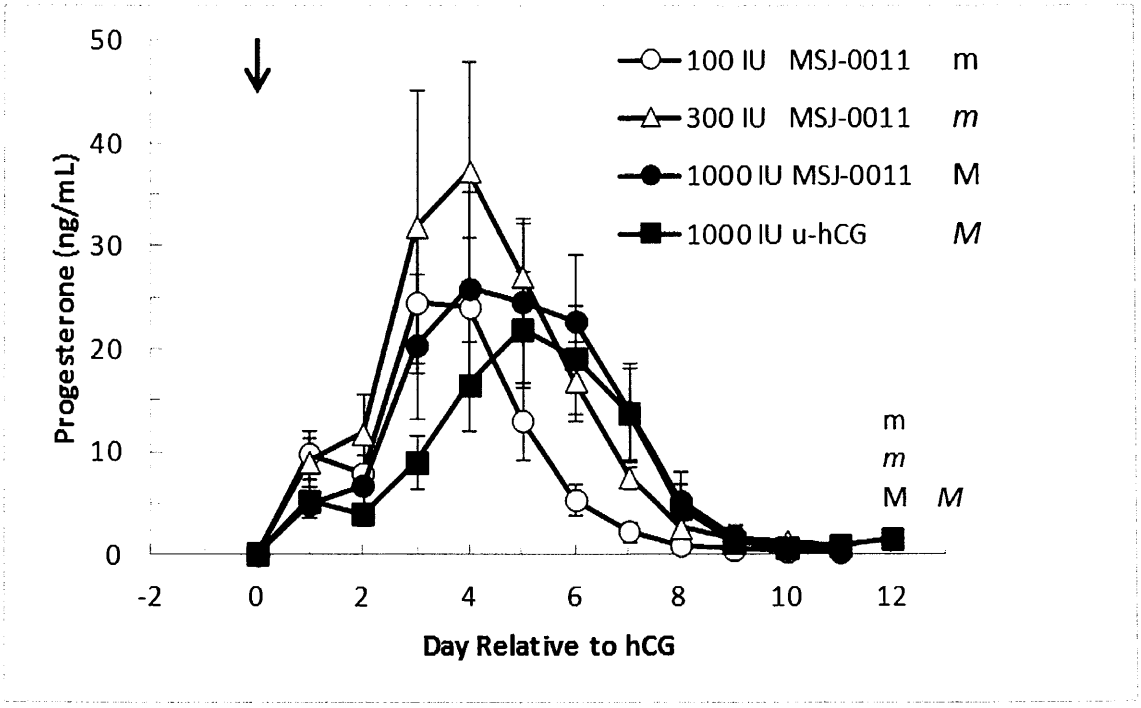


図は 100 IU（n=5）、300 IU（n=4）または 1000 IU（n=5）の MSJ-0011、または 1000 IU の u-hCG（n=5）投与後に採取した卵の核成熟度ごとの受精率を示す。
MII：採卵時に MII 期であったもの、MI→MII：採卵時に MI 期であったが、その後 8 時間以内に in vitro で MII 期まで成熟したもの、MI：採卵後 8 時間以内に in vitro で成熟しなかったもの、Total： MII + MI→ MII + MI
各カラムは授精させた総卵数に対する受精卵数の比率（%、平均±標準誤差）を示す。

<u>In vivo での黄体機能の評価</u>

In vivo で、黄体期のプロゲステロン産生の持続期間を指標として、黄体機能を評価した。MSJ-0011 または u-hCG 投与後の各群における黄体期の平均血清中プロゲステロン濃度推移を図 2.6.2 - 2 に示した。血清中プロゲステロン濃度は全群で投与後 24 時間以内に上昇した。その後、各群で異なる血清中プロゲステロン濃度推移を示した。すなわち、MSJ-0011 の 100 および 300 IU 群では、血清中プロゲステロンは投与 3 ないし 4 日後に最高濃度に達し、5 日後から月経までの間は減少した。また、MSJ-0011 の 1000 IU 群では、投与 4 日後に最高濃度に達し、6 日後まで高濃度を維持した後、減少した。一方、u-hCG 群では、それより遅く、投与 5 ないし 6 日後に血清中プロゲステロンが最高濃度に達した後、減少した。

図 2.6.2 - 2 1～4 群の黄体期の血清中プロゲステロン濃度推移



図は性腺刺激ホルモンで刺激したサルに 100 IU（n=5）、300 IU（n=4）または 1000 IU（n=5）の MSJ-0011、もしくは 1000 IU の u-hCG（n=5）を投与した後の黄体期の血清中プロゲステロン濃度を示す。
Day 0（矢印）は MSJ-0011 または u-hCG の投与日を示す。
各プロットは平均±標準誤差を示す。
各群の平均月経日を m（MSJ-0011 100 IU 群）、*m*（MSJ-0011 300 IU 群）、M（MSJ-0011 1000 IU 群）または *M*（u-hCG 1000 IU 群）で図中に示した。

黄体期の平均期間は、MSJ-0011 の 100 IU 群（11 日）、300 IU 群（11 日）1000 IU 群（11 日）、および u-hCG の 1000 IU 群（12 日）で 同様であった。

結論：

性腺刺激ホルモンで刺激した雌アカゲザルの月経周期途中に 100、300 および 1000 IU の MSJ-0011 を投与した場合、用量に比例して曝露量、すなわち LH/hCG サージが増加した結果（モジュール 2.6.4.8.1 項および 2.6.5.16 項参照）、排卵前後の事象としての卵成熟および黄体化が誘発された。1000 IU の MSJ-0011 を投与した際の排卵前後の事象の誘発は、同用量の u-hCG を投与した場合と同程度であった。

3 副次的薬理試験

3.1 ヒト卵巣癌細胞の増殖に対する影響（7437 試験）

添付資料番号：4.2.1.2.1（参考資料）

2 種のヒト卵巣癌細胞株（Caov-3 および SK-OV-3）を用いて in vitro で卵巣癌に対する遺伝子組換え性腺刺激ホルモン［MSJ-0011、r-hFSH および遺伝子組換えヒト黄体化ホルモン（recombinant human luteinizing hormone、r-hLH）］の増殖促進作用を評価した。

^{3}H-チミジン取り込みにより細胞増殖を評価した。無血清（Caov-3）または低血清（SK-OV-3）培養条件下で細胞を 0.1、1 および 10 IU/mL の被験物質で処理した。陽性対照として細胞増殖を最大限に促進し得る濃度のウシ胎児血清で培養細胞を処理した。試験は 2 回実施し、それぞれの試験で 3 回測定した。

その結果、MSJ-0011、r-hFSH および r-hLH はいずれも 10 IU/mL の濃度まで卵巣癌細胞株の増殖に影響を与えなかった。

4 安全性薬理試験

4.1 麻酔ラットでの安全性薬理試験（6755 試験）

添付資料番号：4.2.1.3.1（参考資料、GLP 適用）

無作為に分けた各群 8 匹（雌雄各 4 匹）の麻酔ラットに、溶媒である生理食塩液、188、1880 または 18800 IU/kg の MSJ-0011、もしくは 2000 IU/kg の u-hCG（比較対照）を静脈内投与した。動脈圧、心電図（electrocardiograph、ECG）、心拍数および呼吸数を投与後 30 分間、継続的に記録した。

測定したパラメータ（動脈圧、ECG、心拍数、呼吸数）に、MSJ-0011 または u-hCG 投与に関連した変化は、いずれの用量でも認められなかった。

4.2 麻酔ビーグル犬での安全性薬理試験（18[redacted]2068 試験）

添付資料番号：4.2.1.3.2（GLP 適用）

雌雄各 2 匹の麻酔ビーグル犬に MSJ-0011 を静脈内投与し、心血管系および呼吸系パラメータ（血圧、心拍数、左室収縮期圧、最大左室内圧一次微分値（dp/dt）、呼吸数、大腿動脈血流量、末梢血管抵抗および ECG パターン）への影響を検討した。

溶媒である生理食塩液および MSJ-0011（20、200、2000 および 20000 IU/kg）を 0.2 mL/kg の容量で動物に静脈内投与した。

雄 2 例では、いずれの用量でも MSJ-0011 静脈内投与に関連した明らかな影響は認められなかった。一方、雌 1 例では以下の変化がみられた。

雌 1 例では、最高用量の 20000 IU/kg で、動脈圧の軽微な変化、心拍数、最大左室内圧 dp/dt および分時換気量の増加、ならびに心電図（第 II 誘導）における ST 間隔短縮を伴う呼吸数の増加が認められた。これらの変化は投与後 5～10 分より認められたが、呼吸数を除き、投与後 45 分までに完全に回復した。呼吸数の増加は投与後 10 分から 60 分（観察時間終了時）まで継続した。上記の変化は呼吸数の変動に起因する二次的変化であり、MSJ-0011 の直接的な影響によるものではないと考えられた。

一方、他の雌 1 例では、いずれのパラメータにも MSJ-0011 投与による変化はみられなかった。

4.3 ラット単回静脈内および皮下投与毒性試験（[redacted]0383 試験）

添付資料番号：4.2.3.1.1（GLP 適用）

生理食塩液に溶解した MSJ-0011 を 2000、20000 および 200000 IU/kg の用量（投与容量：5 mL/kg）で各群雌雄各 5 匹のラットに静脈内および皮下投与した。対照群には生理食塩液を同様に投与した。14 日間の観察期間中、全動物で一般状態観察および体重、摂餌量ならびに摂水量の測定を定期的に実施した。

本試験の主目的は MSJ-0011 の単回静脈内および皮下投与後の一般毒性評価である（モジュール 2.6.6.2.1 項および 2.6.7.5 項参照）。したがって、CNS 機能の評価は一般状態観察に限られたが、ラットでの MSJ-0011 の CNS への影響の評価結果として本項に記載する。一般状態観察では、雌雄とも、いずれの投与経路でも行動の変化または CNS 機能への MSJ-0011 の影響を示唆する所見は認められなかった。

5 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ていない。

6 考察および結論

In vitro および in vivo での効力を裏付ける試験により、以下の結果が示された。

- MSJ-0011 の LH/hCG 受容体への結合親和性は、u-hCG と同程度であった。したがって、MSJ-0011 は in vivo で u-hCG と同様の生理学的作用を誘起することが示唆された。
- 性腺刺激ホルモンで刺激した成熟した雌アカゲザルで、MSJ-0011 および u-hCG は同程度の成熟卵形成を促し、卵胞黄体化に対して同等のホルモン活性を示した。

以上のように、in vitro および in vivo での検討により、MSJ-0011 の効力は u-hCG と同様であることが示された。

副次的薬理試験で、MSJ-0011 の in vitro 培養卵巣癌細胞に対する作用を評価した結果、MSJ-0011 は卵巣癌細胞の増殖に影響を与えなかった。

ラットおよびイヌの安全性薬理試験での心血管系および呼吸系パラメータの評価、およびラットの単回投与毒性試験での CNS に関連する一般状態観察では、安全性薬理学的懸念は示されなかった。

7 図表

図表は本文中に記載した。

2.6.3 薬理試験の概要表

目次

1 薬理試験：一覧表 2
2 効力を裏付ける試験 3
3 副次的薬理試験 4
4 安全性薬理試験 5
5 薬力学的薬物相互作用試験 7

1 薬理試験：一覧表

Test Article: MSJ-0011

Type of study	Test system	Method of administration	Testing facility	Study number	Location Section	Evaluation / Reference
Primary pharmacodynamics						
Receptor binding affinity	Mouse derived cell line; MA10	In vitro	Ares Advanced Technology, Inc., USA	6864	4.2.1.1.1	Reference
Induction of periovulatory events	Rhesus monkey	Single dose ; intramuscular	Ares Advanced Technology, Inc., USA	7298	4.2.1.1.2	Reference
Secondary pharmacodynamics						
Effects on the growth of human ovarian cancer cells	Human ovarian cancer cell lines; Caov-3 and SK-OV-3	In vitro	Istituto di Ricerca C. Serono SpA, Italy	7437	4.2.1.2.1	Reference
Safety pharmacology						
Cardiovascular and respiratory effects	Anesthetized Sprague Dawley rats	Single dose ; Intravenous (bolus)	Istituto di Ricerca C. Serono SpA, Italy	6755	4.2.1.3.1	Reference
Cardiovascular and respiratory effects	Anesthetized Beagle dogs	Dose escalation; 5 doses at 60-minute intervals, intravenous (bolus)	[redacted] England	18[redacted]2068	4.2.1.3.2	Evaluation
CNS effects, parameters on clinical observation evaluated within a single-dose toxicity study[a]	Sprague Dawley rats	Single dose: intravenous or subcutaneous (bolus)	Istituto di Ricerche Biomediche "Antoine Marxer" RBM SpA, Italy	[redacted]0383	4.2.3.1.1	Evaluation
Pharmacodynamic drug interactions						
None						

a - Inspections for mortality were made twice a day (early in the morning and last in the afternoon). All signs of ill health, together with any behavioral changes of general and local reactions to treatment were recorded twice a day during the 14-day observation period. In particular, on the day of treatment, the animals were observed at 1, 5, 15 and 30 minutes and 1, 2, 4 and 6 hours after the intravenous administration.
CNS: Central nervous system

2 効力を裏付ける試験

Test Article: MSJ-0011

本文および図表は薬理試験の概要文に記載した（モジュール 2.6.2 項参照）。

3 副次的薬理試験

Test Article: MSJ-0011

本文は薬理試験の概要文に記載した（モジュール 2.6.2 項参照）。

4 安全性薬理試験

Test Article: MSJ-0011

Organ systems evaluated	Species/ strain	Method of administration	Doses (IU/kg)	Gender and No. per group	Noteworthy findings	GLP compliance	Study number
Cardiovascular and respiratory systems	Anesthetized Sprague Dawley rats	Single dose; Intravenous	0 (vehicle: saline) 188 1880 18800 (MSJ-0011) 200 (u-hCG)	4 M, 4 F	No statistically significant changes of the cardiovascular and respiratory parameters were recorded following the injection of MSJ-0011.	Yes	6755
Cardiovascular and respiratory systems	Anesthetized beagle dogs	Intravenous injection at 0.2 mL/kg over 1 min.	0 (vehicle: saline) 20 200 2000 20000 (Dose escalation at 60-minute intervals)	2 M, 2 F	No effects related to MSJ-0011 injection were noted in any dog up to the dose of 2000 IU/kg. This is also true for 3 dogs that received the highest dose of 20000 IU/kg. In only one female dog that received the highest dose, an episode of increased respiratory rate was accompanied by secondary changes such as minor and reversible increases in systolic arterial blood pressure, heart rate, maximal left ventricular dp/dt, and respiration minute volume.	Yes	18[redacted]2068

u-hCG: Urinary human chorionic gonadotropin, dp/dt: Left ventricle internal pressure time integral calculus level, M: Male, F: Female

4 安全性薬理試験（つづき）

Test Article: MSJ-0011

Organ systems evaluated	Species/ strain	Method of administration	Doses (IU/kg)	Gender and No. per group	Noteworthy findings	GLP compliance	Study number
CNS, parameters on clinical observation evaluated within single dose toxicity study[a]	Sprague Dawley rats	Single dose; Intravenous or subcutaneous (bolus)	0 (vehicle: saline) 2000 20000 200000	5 M, 5 F	No general or local clinical signs or behavioral alterations were noted in any treated rat.	Yes	[redacted]0383

a - Inspections for mortality were made twice a day (early in the morning and last in the afternoon). All signs of ill health, together with any behavioral changes of general and local reactions to treatment, were recorded twice a day during the 14-day observation period. In particular, on the day of treatment, the animals were observed at 1, 5, 15 and 30 minutes and 1, 2, 4 and 6 hours from the intravenous administration and at 30 minutes, 2, 4 and 6 hours from the subcutaneous administration.
CNS: Central nervous system, M: Male, F: Female

5 薬力学的薬物相互作用試験

Test Article: MSJ-0011

薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。