2.6.6 毒性試験の概要文

目次

1 まとめ 4
2 単回投与毒性試験 6
2.1 ラット単回静脈内投与および皮下投与毒性試験（[redacted]0383 試験） 6
2.2 サル単回静脈内投与および皮下投与毒性試験（[redacted]0386 試験） 7
3 反復投与毒性試験 8
3.1 ラット 1 ヵ月間皮下投与毒性試験および 4 週間回復性試験（[redacted]0384 試験） 8
3.2 ラット 1 ヵ月間静脈内投与毒性試験および 4 週間回復性試験（[redacted]0385 試験） 14
3.3 サル 1 ヵ月間皮下投与毒性試験および 4 週間回復性試験（[redacted]0387 試験） 15
3.4 サル 1 ヵ月間静脈内投与毒性試験および 4 週間回復性試験（[redacted]0388 試験） 19
3.5 雄サル 26 週間皮下投与毒性試験（[redacted]0164 試験） 20
4 遺伝毒性試験 22
4.1 細菌を用いた遺伝子突然変異試験（復帰突然変異試験）（[redacted]0389 試験） 22
4.2 ほ乳類細胞を用いた遺伝子突然変異試験（[redacted]0390 試験） 23
4.3 染色体異常試験（[redacted]0392 試験） 23
4.4 マウス小核試験（[redacted]0391 試験） 24
5 がん原性試験 25
6 生殖発生毒性試験 26
6.1 MSJ-0011 の生殖器に及ぼす影響 26
7 局所刺激性試験（RA9580 試験） 28
8 その他の毒性試験 29
9 考察および結論 30
10 図表 32
11 参考文献 33

表目次

表 2.6.6 - 1 MSJ-0011 の毒性試験および結果の概要 5
表 2.6.6 - 2 MSJ-0011 のラットへの反復皮下投与後の血清 AUC 値 11
表 2.6.6 - 3 MSJ-0011 のサルへの反復皮下投与後の血清 AUC 値 18
表 2.6.6 - 4 in vitro および in vivo 遺伝毒性試験 22
表 2.6.6 - 5 陽性対照物質 23
表 2.6.6 - 6 局所刺激性試験デザイン 28

略語一覧

AUC	Area Under the Concentration vs Time Curve	濃度-時間曲線下面積
FSH	Follicle Stimulating Hormone	卵胞刺激ホルモン
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
hCG	Human Chorionic Gonadotropin	ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン
hCG-HP	Urinary Human Chorionic Gonadotropin- Highly Purified	高純度に精製した尿由来 hCG
HGPRT	Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase	ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements and Registration of Pharmaceuticals for Human Use	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
LH	Luteinising Hormone	黄体化ホルモン
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 Luteinising Hormone	遺伝子組換えヒト黄体化ホルモン
6-TG	6-Thioguanine	6-チオグアニン
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
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

コリオゴナドトロピン アルファ（MSJ-0011）の製造販売承認申請のための毒性試験を、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）適用下で実施した。実施した毒性試験およびその結果の概要を表 2.6.6 - 1 に示す。

MSJ-0011 の毒性試験には、毒性試験に繁用され、背景データが豊富である動物種を使用した。ラットおよびサルは、メルクセローノの他の遺伝子組換え性腺刺激ホルモン［遺伝子組換えヒト卵胞刺激ホルモン（recombinant human follicle stimulating hormone、r-hFSH）および遺伝子組換えヒト黄体化ホルモン（recombinant human luteinising hormone、r-hLH）］の開発においても使用された動物種である。

重要な毒性試験として、ラットおよびサルを用いた静脈内投与および皮下投与による単回投与毒性試験（[redacted]0383 および[redacted]0386 試験）、ラットおよびサルを用いた皮下投与による 1 ヵ月間反復投与毒性試験（[redacted]0384 および[redacted]0387 試験）、in vitro および in vivo 遺伝毒性試験（[redacted]0389、[redacted]0390、[redacted]0392 および[redacted]0391 試験）およびウサギを用いた皮下投与および筋肉内投与による局所刺激性試験（RA9580 試験）を実施した。皮下投与は本薬の予定臨床投与経路である。

予定臨床投与経路とは異なる静脈内投与により実施したラットおよびサルを用いた 1 ヵ月間反復投与毒性試験（[redacted]0385 および[redacted]0388 試験）、および男性不妊を適応症とする臨床開発を目的として実施した雄性サルを用いた皮下投与による 26 週間反復投与毒性試験（[redacted]0164 試験）の成績は、参考資料とした。

毒性試験に使用した被験物質は、市販製剤に使用される原薬と、構造、力価、純度および不純物の点で同等であった（モジュール 2.6.7.4 項、3.2.S.2.6 項および 3.2.S.3.2 項参照）。製剤中に含まれる全ての添加物は、日本薬局方および医薬品添加物規格に従っている。

表 2.6.6 - 1 MSJ-0011 の毒性試験および結果の概要

試験の種類、動物種、投与経路および期間	試験番号/GLP 適用	投与量（IU/kg/日）	無毒性量（IU/kg/日）	主な所見
単回投与毒性試験				
ラット：静脈内、皮下	[redacted]0383/GLP	0 、 2000 、 20000、200000	該当せず	概略の致死量：> 200000 IU/kg（静脈内、皮下）
サル：静脈内、皮下	[redacted]0386/GLP	200000	該当せず	概略の致死量：> 200000 IU/kg（静脈内、皮下）
反復投与毒性試験				
ラット：皮下、1 ヵ月間投与＋4 週間回復	[redacted]0384/GLP	0、20、200、2000、20000	20000	予期されたヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（human chorionic gonadotropin、hCG）の薬理学的作用に基づく変化が認められたのみであった。
ラット：静脈内、1 ヵ月間投与＋4 週間回復	[redacted]0385/GLP	0、20、200、2000、20000	20000	予期された hCG の薬理学的作用に基づく変化が認められたのみであった。
サル：皮下、1 ヵ月間投与＋4 週間回復	[redacted]0387/GLP	0、20、200、2000、20000	20000	予期された hCG の薬理学的作用に基づく変化が認められたのみであった。
サル：静脈内、1 ヵ月間投与＋4 週間回復	[redacted]0388/GLP	0、20、200、2000、20000	20000	予期された hCG の薬理学的作用に基づく変化が認められたのみであった。
雄サル：皮下、26 週間投与	[redacted]0164/GLP	0、50、500、5000	5000	1 ヵ月間の毒性試験と同様に、hCG の薬理学的作用に基づく変化を除き、特記すべき所見はみられなかった。
遺伝毒性試験				
細菌を用いる復帰突然変異試験：in vitro	[redacted]0389/GLP	0、165～13361 IU/plate	該当せず	陰性
ほ乳類細胞を用いる遺伝子突然変異試験：in vitro	[redacted]0390/GLP	0、495～13361 IU/mL	該当せず	陰性
ヒトリンパ球を用いる染色体異常試験：in vitro	[redacted]0392/GLP	0、495～13361 IU/mL	該当せず	陰性
マウス小核試験：静脈内、単回投与	[redacted]0391/GLP	0 、 2000 、 20000、200000	該当せず	陰性
局所刺激性試験				
ウサギ：皮下、筋肉内、単回投与	RA9580/GLP	0.5 mL/投与部位 液剤または凍結乾燥製剤：0、250 μg/0.5 mL	該当せず	忍容性良好、毒性所見なし

2 単回投与毒性試験

2.1 ラット単回静脈内投与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）

Sprague Dawley ラットに、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）で静脈内投与（投与速度：約 0.1 mL/秒）および皮下投与し、単回投与毒性を検討した。対照群には生理食塩液を同様の方法で投与した。1 群雌雄各 5 匹の動物を用いた。

静脈内投与では、投与後 1、5、15 および 30 分、1、2、4 および 6 時間、ならびにその翌日から 1 日 2 回 14 日間、動物の一般状態を観察した。皮下投与では、投与後 30 分、2、4、および 6 時間、ならびにその翌日から 1 日 2 回 14 日間、一般状態を観察した。投与後 14 日間の観察期間終了後に全例を安楽死させ、剖検した。卵巣および精巣については、重量測定および病理組織学的検査を実施した。

14 日間の観察期間を通じて、いずれの投与経路および用量でも死亡は認められなかった。

一般状態および行動ならびに投与部位の観察では、いずれの投与経路および用量でも、本薬投与に関連した変化は観察されなかった。

投与当日、投与後 3、7、10、14 日に測定した体重の推移には、対照群と比較していずれの投与経路および用量でも毒性学的に意義のある変化は認められなかった。

病理学的検査では、生殖器を除き、雌雄ともいずれの投与経路でも変化はみられなかった。

雄では、両投与経路の全本薬投与群で、精巣重量の減少が、精子形成の低下、精子細胞の変性および精細管の空胞化を伴って観察された。

雌では、皮下投与の全本薬投与群および静脈内投与の 200000 IU/kg 投与群で、用量の増加に伴った黄体数の軽度な増加が認められた。また、全本薬投与群で、用量依存性がない卵胞嚢胞の軽度な増加がみられた。

雄でみられた生殖器の変化は、黄体化ホルモン（luteinizing hormone、LH）受容体に結合し、ライディッヒ細胞（間質細胞）を刺激する絨毛性性腺刺激ホルモンの既知の作用に関連したものである。ラットではライディッヒ細胞の刺激によりテストステロン濃度が上昇し、これにより下垂体からの卵胞刺激ホルモン（follicle stimulating hormone、FSH）分泌が抑制される結果、精子形成の低下と生殖細胞の変性が生じる。

雌の生殖器の変化は、本薬の卵胞及び黄体への刺激作用から予期される所見であった。

以上の結果、本試験における MSJ-0011 の概略の致死量は、両投与経路とも 200000 IU/kg/日超と判断された。

2.2 サル単回静脈内投与および皮下投与毒性試験 ([redacted]0386 試験)

添付資料番号：4.2.3.1.2（GLP 適用）

雌雄各 2 匹のカニクイザルに MSJ-0011 を 200000 IU/kg の用量（投与容量：5 mL/kg）で、最初に静脈内投与（投与速度：約 0.1 mL/秒）した。その 3 週間後に同じ動物に同じ用量で MSJ-0011 を皮下投与し、2 週間の観察期間終了後に動物を安楽死させ、剖検した。抗 MSJ-0011 抗体測定用の血清を投与前（静脈内投与の 5 日前）、最初の投与（静脈内投与）後 14、21，35 日に採取した。

いずれの投与経路でも、死亡は認められなかった。

各投与経路での投与後 0.5、1、2、4 および 6 時間、ならびにその翌日から 1 日 2 回、21 日間（静脈内投与）または 14 日間（皮下投与）の一般状態および投与部位の観察では、いずれの動物にも、変化は認められなかった。また、投与後 1 時間および 24 時間の体温および瞳孔反射には、投与前と比較して、いずれの動物にも、本薬投与に関連した変化は認められなかった。

投与当日、投与後 3、7、10、14 日に測定した体重および摂餌量には、投与前と比較して特に変化は認められなかった。なお、各投与経路での投与後 3 日に、ごく軽度な摂餌量減少がみられたが、これは動物のハンドリングに伴うストレスによるものと考えられた。

投与前、投与後 3 および 14 日に実施した血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査および糞便検査では、いずれの動物にも変化や異常は認められなかった。

最初の投与（静脈内投与）後 14 日に 3 例（雄 2 例および雌 1 例）、および 35 日（皮下投与後 14 日）に全例で、抗 MSJ-0011 抗体が検出された。

剖検では、雄に毒性学的に意義のある変化は認められなかった。雌 1 例で卵巣（両側）の腫大が認められたため、この卵巣を採取し、重量測定および病理組織学的検査を実施したところ、卵巣（両側）の重量増加を伴う淡明な嚢胞または血液嚢胞の形成がみられた。この所見は本薬投与に関連した唯一の変化と考えられた。

雌雄各 2 匹のサルに MSJ-0011 を 200000 IU/kg の用量で静脈内投与および皮下投与の順に 3 週間の間隔を置いてそれぞれ単回投与したところ、毒性変化は認められず、投与局所の忍容性も良好であった。唯一みられた本薬投与に関連した変化は、雌 1 例の卵巣の重量増加を伴う嚢胞形成であった。これはヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（human chorionic gonadotropin、hCG）の薬理作用である卵巣刺激作用と関連する、予期された作用である。

以上の結果、本試験における MSJ-0011 の概略の致死量は、両投与経路とも 200000 IU/kg/日超と判断された。

3 反復投与毒性試験

3.1 ラット1ヵ月間皮下投与毒性試験および4週間回復性試験 ([redacted]0384試験)

添付資料番号：4.2.3.2.1（GLP適用）

MSJ-0011の反復皮下投与毒性をラットで評価した。

Sprague Dawleyラットに、生理食塩液に溶解したMSJ-0011を20、200、2000および20000 IU/kg/日の用量で1日1回、1ヵ月間連日皮下投与した。対照群には生理食塩液を同様の方法で投与した。投与容量は全群で0.2 mL/kgとした。1群雌雄各16匹の動物を用いた。

一般状態観察、体重、摂餌量および摂水量の測定、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査および血清中MSJ-0011、テストステロンおよびエストラジオール濃度の測定を実施した。また、抗MSJ-0011抗体の測定も実施した。

1ヵ月間の投与期間終了後、各群雌雄各6匹を用いて、4週間の休薬により、変化の回復性を評価した。投与期間終了時および回復期間終了時に動物を安楽死させ、病理学的検査に供した。

3.1.1 臨床症状観察

死亡

試験期間を通じて、死亡は認められなかった。

一般状態

雄では、本薬投与に関連した変化は認められなかったが、雌では、2000および20000 IU/kg/日群の投与第3週から乳首に軽度な腫れが観察された。しかし、この変化は、休薬後に明らかな回復傾向を示した。

体重

本薬投与群の雄で、用量依存性がない軽度な体重増加抑制が投与期間中に認められた。一方、雌では、主に200、2000および20000 IU/kg/日群で、用量依存性がない体重増加亢進がみられた。しかし、回復期間中は、雌雄ともに対照群と比較して体重増加量に差はみられなかった。

摂餌量および摂水量

雄では、摂餌量に用量依存性がないごく軽度な減少がみられたのみで、いずれの用量でも、特に問題となる変化は認められなかった。雌では、主に200、2000および20000 IU/kg/日群で、摂餌量および摂水量の増加がみられたが、いずれも休薬後に回復した。

眼科学的検査

雌雄とも、いずれの用量でも本薬投与に関連した所見は観察されなかった。

3.1.2 臨床検査

血液学的検査

1ヵ月間の投与期間終了後に、本薬投与群で、以下の変化が観察された。

雄では、全本薬投与群で、用量依存性がない白血球数および血小板数のごく軽度な減少が認められた。

雌では、20000 IU/kg/日群で、赤血球数、ヘモグロビン量およびヘマトクリット値の軽度減少が認められた。また、全本薬投与群で、白血球数のごく軽度な減少が認められた。

上記の変化には回復性が認められた。

血液生化学的検査

本薬投与による影響として、以下の変化が観察された。

雄では、全本薬投与群で、用量依存性がない無機リンの軽度減少が認められた。

雌では、全本薬投与群で、用量の増加に伴う総蛋白の増加（蛋白分画では α_1 グロブリン比の上昇と β グロブリン比の低下）が認められた。200、2000 および 20000 IU/kg/日群では、尿素の軽度増加、用量の増加に伴う総コレステロールの減少および用量依存性がないトリグリセリドの増加、クロールの軽度減少が認められた。また、全本薬投与群で、アルカリホスファターゼの軽度低下もみられた。

雄では、回復期間終了後も電解質の軽度な変動がみられた。雌では、上記パラメータのほとんどで回復性が認められた。

尿検査

雄では、尿量の軽度減少が主に 20000 IU/kg/日群でみられたのみで、特記すべき変化は認められなかった。雌では、全本薬投与群で、若干の電解質の変動（すなわち、ナトリウムとカリウムの減少）および尿蛋白の増加が認められた。回復期間終了後には、特記すべき変化は認められなかった。

3.1.3 病理学的検査

器官重量、剖検および病理組織学的検査

投与期間終了後に、対照群と比較して本薬投与群で以下の変化が観察された。

肝臓：雌の全本薬投与群で、おおむね用量の増加に伴う肝臓重量の増加および 20 IU/kg/日以外の用量群で大きさの増加がみられた。病理組織学的検査では、200 IU/kg/日以上の用量群で軽度の肝細胞肥大が観察された。

腎臓：20000 IU/kg/日群の雄のみで、腎臓重量の軽度増加傾向がみられた。雌では、20000 IU/kg/日群の数例で病理組織学的に脂肪変性と考えられる尿細管の軽度空胞化が観察された。

胸腺：胸腺重量以外に変化がみられなかった 20 IU/kg/日群の雌を除き、全本薬投与群で概して病理組織学的に軽度の萎縮を伴う胸腺重量および大きさの減少が認められた。これらの変化には、用量の増加に伴う発現頻度の増加傾向がみられた。

精巣および精巣上体：200 IU/kg/日以上の用量群で、精巣重量および大きさの減少が認められ、病理組織学的にライディッヒ細胞の過形成と関連した軽度から重度の精細管上皮の空胞化、変性、石灰化および精子形成低下が観察された。精巣の変化は精巣上体にも及び、精巣上体における精子の数の減少および変性した精子がみられた。20 IU/kg/日群での変化は軽度であり、精巣重量に変動はみられなかった。

前立腺および精嚢：全本薬投与群の両器官に、用量依存性がない重量および大きさの増加が認められ、病理組織学的に軽度または中等度の腺拡張が観察された。2000 および 20000 IU/kg/日群では、軽度の前立腺上皮の過形成が観察された。

卵巣：全本薬投与群で、用量依存性がない卵巣重量の増加および軽度から重度の大きさの増加がみられ、卵胞嚢胞（血液を含むものが散見）、黄体の数の増加および肥大が観察された。200 IU/kg/日以上の用量群では、これらの変化に用量依存性はなく、20 IU/kg/日群ではその程度はより軽かった。

子宮：200、2000 および 20000 IU/kg/日群で、内膜に軽度または中等度の変性および過形成が観察された。それに伴い、20000 IU/kg/日群では子宮重量の軽度増加が認められた。

膣　：200 から 20000 IU/kg/日群で、用量依存性がない軽度または中等度の粘液増加と粘膜過形成が観察された。

乳腺：雄では、全本薬投与群で、分泌物の増加を伴う軽度または中等度の腺房および/または導管の拡張が認められ、少数例で腺房過形成もみられた。雌では、全本薬投与群で、分泌物の増加を伴った腺房過形成がみられ、その程度および発現頻度は雄に比べて高かった。これらの変化には、200、2000 および 20000 IU/kg/日群では用量依存性がなく、20 IU/kg/日群ではその程度がわずかに軽かった。

下垂体：雌の全本薬投与群で、下垂体重量および大きさの用量の増加に伴う増加が認められ、病理組織学的には好塩基性細胞の空胞の増加（おそらく分泌物の増加による）を伴う肥大が認められた。20 IU/kg/日群では軽度肥大のみが観察された。

副腎：雌の 2000 および 20000 IU/kg/日群で、用量の増加に伴う副腎重量の減少がみられ、病理組織学的には束状帯の厚さの軽度減少および/または球状帯の肥大が観察された。200 IU/kg/日群では、この病理組織学的変化は 1 例のみで観察された。

投与部位：雌雄の 20000 IU/kg/日群で、血管周囲に軽度または中等度の単核細胞浸潤が観察された。雌の 200 および 2000 IU/kg/日群でも、程度は軽度であるが、同様の変化が認められた。

回復期間終了後、上記のほとんどの変化は完全に回復したか、明らかな回復傾向を示した。

3.1.4　雄のテストステロン濃度および雌のエストラジオール濃度

テストステロン濃度またはエストラジオール濃度を、投与期間終了時および回復期間終了時に採取した血清を用いて測定した。

投与期間終了時の雄の血清テストステロン濃度は、20 および 200 IU/kg/日群では、用量の増加に伴い増加したが、2000 および 20000 IU/kg/日群では、さらなる増加はみられなかった。

投与期間終了時の雌の血清エストラジオール濃度は、対照群および 20 IU/kg/日群では、検出限界未満あるいは検出限界に近い値であったが、200、2000 および 20000 IU/kg/日群では、用量の増加に伴い増加した。

回復期間終了時の血清テストステロンおよびエストラジオール濃度は、全本薬投与群で、対照群と同程度であった。

3.1.5　血清中 MSJ-0011 濃度

トキシコキネティクス（TK）測定用に、各群雌雄各 16 匹の動物を番号順に 8 匹ずつ 2 つのサブグループに分け、投与前、投与後 1、2、4、6、9、12 および 24 時間時点に各サブグループの 1 例の尾静脈から採血した。なお、第 1 サブグループからは投与 1 日および 15 日、第 2 サブグループからは投与 7 日および 24 日（雄）または 25 日（雌）に採血した。

血清中濃度-時間曲線下面積［area under the (serum concentration-time) curve、AUC］値（IU· h/mL）を表 2.6.6 - 2 に示す。MSJ-0011 曝露量は雌雄ともにおおむね用量に比例して増加した。投与 1 日から投与 7 日または 15 日にかけて AUC の増加傾向がみられたが、蓄積性はなかった。MSJ-0011 への長期曝露後（投与 24 または 25 日）は、抗 MSJ-0011 抗体の産生により、MSJ-0011 濃度が減少した。

表 2.6.6 - 2　MSJ-0011 のラットへの反復皮下投与後の血清 AUC 値

用量（IU/kg/日）		$AUC_{0\text{-}24}$（IU· h/mL）			
		投与 1 日	投与 7 日	投与 15 日	投与 24 または 25 日
20	雄	0.572	3.587	2.249	0.798
	雌	0.532	0.817	2.338	0.023
200	雄	6.332	7.983	8.711	6.792
	雌	1.800	7.136	5.846	1.211
2000	雄	53.990	81.150	36.700	31.425
	雌	35.900	69.375	56.000	50.325
20000	雄	309.500	905.625	908.000	83.875
	雌	923.250	501.250	794.000	164.625

3.1.6 抗 MSJ-0011 抗体の産生

投与期間および回復期間終了時に、全例から採取した血清を用いて、放射性免疫沈降法により、抗 MSJ-0011 抗体を測定した。

抗 MSJ-0011 抗体は、投与期間および回復期間終了時に、本薬投与群の雌雄ほぼ全例で検出された。

3.1.7 結論

体重、摂餌量および摂水量の増加が本薬投与群の雌で認められたが、体重増加は血中ステロイドの増加による水分貯留と関連した変化と考えられた。

ラットに MSJ-0011 を 20 から 20000 IU/kg/日の用量で 1 ヵ月間連日皮下投与したところ、主に生殖器に LH で誘発される変化と同様の所見が観察された。これらの所見の類似性は hCG の主作用が LH 様作用であるということから説明できる[1、2、3]。

精巣および副生殖器の変化は、性腺刺激ホルモンのライディッヒ細胞に対する直接作用と関連する。すなわち、性腺刺激ホルモンのライディッヒ細胞への刺激は、本細胞でのテストステロン産生および分泌を高め、続いて下垂体からの内因性の性腺刺激ホルモン分泌を抑制する[4、5]。

性成熟ラットでは、セルトリ細胞への FSH 刺激を介した精子形成を促すには、下垂体からの性腺刺激ホルモンおよびライディッヒ細胞からのアンドロゲンの濃度が均衡していることが必要である[6、7]。げっ歯類では、MSJ-0011 によって生じたホルモンの不均衡（FSH 抑制）が、病理組織学的に精巣に精子形成の低下および生殖細胞の変性を引き起こしたと考えられる。前立腺および精嚢の大きさおよび重量の増加は、MSJ-0011 によって誘発されたテストステロンの増加に起因すると考えられる。

雌ラットの性周期（約 5 日間隔）は、視床下部を介する直接的な下垂体への正および負のフィードバック機構により調節される、下垂体からの周期的な性腺刺激ホルモン分泌によって制御されている。これらの周期的制御が、MSJ-0011 を反復投与する間に乱れた結果、卵胞嚢胞、黄体の大きさおよび数の増加、子宮内膜の過形成、膣粘膜の粘液増加、ならびに乳腺の過形成などの形態学的変化を生じたものと考えられる。下垂体への影響として認められた好塩基性細胞の肥大は、性ステロイドの増加による性腺刺激ホルモンの生合成および貯留に対する正のフィードバック[7]の結果として生じたと考えられた。

胸腺の萎縮および肝細胞肥大は、高濃度のステロイドに長期間曝露された影響として知られている[8、9、10]。高用量のステロイドは、腎尿細管の変化も生じ得る[11]。雌の副腎皮質の変化は、MSJ-0011 の薬理学的作用により、副腎皮質ステロイドの合成が阻害されたことによるものと考えられた。また、赤血球パラメータの減少は血液希釈に起因するものと判断された。その他の血液生化学的検査値および尿検査値の軽度変動は脂質およびタンパク質代謝および電解質バランスへの影響によるものと考えられた。

上記変化はいずれも本質的に、性周期およびホルモン代謝などの点でヒトと大きく異なる動物に、高用量の MSJ-0011 を投与することで、薬理学的作用が過剰発現したものであった。さらに、上記変化はいずれも動物の全般的な健康状態に悪影響を与えず、回復期間終了後には回復または明らかな回復傾向を示した。したがって、MSJ-0011 は最高用量の 20000 IU/kg/日まで本質的な毒性を示さず、

投与局所に対する忍容性も良好と考えられた。本試験における MSJ-0011 の無毒性量は 20000 IU/kg/日と判断された。

3.2 ラット 1 ヵ月間静脈内投与毒性試験および 4 週間回復性試験 ([redacted]0385 試験)

添付資料番号：4.2.3.2.2（参考資料、GLP 適用）

MSJ-0011 の反復静脈内投与毒性をラットで評価した。

Sprague Dawley ラットに、生理食塩液で溶解した MSJ-0011 を 20、200、2000 及び 20000 IU/kg/日の用量で 1 日 1 回、1 ヵ月間連日静脈内投与した。対照群には生理食塩液を同様の方法で投与した。投与容量は全群で 0.2 mL/kg とした。1 群雌雄各 16 匹の動物を用いた。

一般状態観察、体重、摂餌量および摂水量の測定、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、ならびに血清中 MSJ-0011、テストステロンおよびエストラジオール濃度の測定を実施した。また、抗 MSJ-0011 抗体の測定も実施した。1 ヵ月間の投与期間終了後、各群雌雄各 6 匹を用いて、4 週間の休薬により変化の回復性を評価した。投与期間終了時および回復期間終了時に動物を安楽死させ、病理学的検査に供した。

皮下投与試験と基本的に同様の変化が観察された（3.1 項参照）。即ち、本薬投与に関連した死亡は認められなかった。20 IU/kg/日群を除く雄の本薬投与群に軽度の体重増加抑制が認められた。雌では用量依存性のない体重増加の亢進が認められた。雌では、回復性のある赤血球数の減少や血液生化学的検査値（コレステロール、尿素、肝酵素）の変動が認められた。雄では、精巣の重量および大きさの軽度減少が認められ、病理組織学的検査では、用量依存性のない生殖細胞の変性を伴う軽度（20 IU/kg/日群）から重度の精子形成低下が観察された。雌では、全本薬投与群で、卵巣の重量および大きさの軽度（20 IU/kg/日群）から重度の増加が認められ、病理組織学的検査では、軽度から重度の黄体の数の増加および肥大、卵胞嚢胞（ときに出血性）の増加が観察された。また、膣および子宮粘膜に軽度過形成がみられた。さらに、雌雄とも、乳腺に腺房過形成が認められた。雌では、20 IU/kg/日群を除き、用量の増加に伴って、軽度から中等度の下垂体の重量および大きさの増加がみられた。器官重量および病理組織学的変化は、回復期間終了時には、回復ないし回復傾向を示した。

雄の血清テストステロン濃度は、20000 IU/kg/日まで用量の増加に伴い増加した。回復期間終了時には、全本薬投与群で血清テストステロン濃度は対照群と同程度に回復した。

雌の血清エストラジオール濃度は、対照群および 20 IU/kg/日群では検出限界未満あるいは検出限界に近い値であったが、200、2000 および 20000 IU/kg/日群では対照群に比べて用量の増加に伴い増加した。回復期間終了後には、全本薬投与群で血清エストラジオール濃度は正常値に回復した。

投与期間中の血清中 MSJ-0011 濃度は、雌雄ともに用量の増加に伴い増加した。最高用量（20000 IU/kg/日）群の雄で認められた、ホルモンの蓄積によると考えられる投与 1 日から 15 日および投与 7 日から 25 日の AUC の増加を除き、他の全本薬投与群の雌雄（20000 IU/kg/日群の雌を含む）で、投与期間の増加に伴う明らかな曝露量（AUC）の変化は認められなかった。

抗 MSJ-0011 抗体は、各本薬投与群の約半数例で検出された。

上記変化はいずれも実質的に、性周期およびホルモン代謝などの点でヒトと大きく異なる動物に高用量の MSJ-0011 を投与することで、薬理学的作用が過剰発現したものであった。さらに、上記変化はいずれも動物の全般的な健康状態に悪影響を与えず、回復期間終了後には回復または明らかな回復傾向を示した。したがって、MSJ-0011 は最高用量の 20000 IU/kg/日まで本質的な毒性を示さず、投与局所に対する忍容性も良好と考えられた。本試験における MSJ-0011 の無毒性量は 20000 IU/kg/日と判断された。

3.3 サル 1 ヵ月間皮下投与毒性試験および 4 週間回復性試験 ([redacted]0387 試験)

添付資料番号：4.2.3.2.3（GLP 適用）

MSJ-0011 の反復皮下投与毒性をカクニイザルで評価した。

カニクイザルに、生理食塩液で溶解した MSJ-0011 を 20、200、2000 および 20000 IU/kg/日の用量で 1 日 1 回、1 ヵ月間連日皮下投与した。対照群には生理食塩液を同様の方法で投与した。投与容量は全群で 0.2 mL/kg とした。1 群雌雄各 4 匹の動物を用いた。

一般状態観察、体重および摂餌量の測定、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、便潜血検査、血清中 MSJ-0011、テストステロンおよびエストラジオール濃度の測定および抗 MSJ-0011 抗体の測定を実施した。1 ヵ月間の投与期間終了後、各群雌雄各 1 匹を用いて、4 週間の休薬により変化の回復性を評価した。投与期間終了時および回復期間終了時に動物を安楽死させ、病理学的検査に供した。

20000 IU/kg/日群の雌 1 例で、投与開始後 2 週間以内に急性のマラリア感染に伴う重度の貧血及び白血球増加症がみられたので、この動物のデータは評価の対象としなかった。

3.3.1 臨床症状観察

死亡

試験期間を通じて、死亡は認められなかった。

一般状態

いずれの動物にも、一般状態および投与部位に、本薬投与に関連した変化は観察されなかった。

体重

雄で、本薬投与に関連した変化が認められた。すなわち、全本薬投与群で、対照群と比較して体重増加量が高値を示した。この変化は休薬後に回復し、回復期間終了時には 2000 および 20000 IU/kg/日群でわずかに体重減少がみられたものの、体重推移は全試験群で同様であった。

摂餌量

雌雄とも、いずれの本薬投与群でも、試験期間を通じて摂餌量の変化は認められなかった。

眼科学的検査

いずれの動物にも、眼科学的変化は認められなかった。

3.3.2 臨床検査

血液学的検査

雌雄とも、いずれの用量および時点でも、本薬投与に関連した血液学的変化は認められなかった。

血液生化学的検査

雄では、本薬投与群のいずれも、血液生化学的検査値に毒性学的意義のある変化は認められなかったものの、用量依存性がないγ-グルタミルトランスペプチダーゼ活性の上昇および用量の増加に伴う総コレステロール値の減少が、わずかながら、投与期間の中期および終了時にみられた。さらに、200 から 20000 IU/kg/日までの本薬投与群で、投与期間終了時に軽度の蛋白分画の不均衡（β-グロブリン分画の低下を主因とするグロブリン比の低下）および総蛋白の減少傾向がみられた。しかし、病理学的に意義のある変化は観察されず、回復期間終了時には、これらの変化は回復した。

雌では、本薬投与に関連した変化は、いずれの用量および時点でも認められなかった。

尿検査

雌雄とも、いずれの用量および時点でも、本薬投与に関連した尿検査値の変化は認められなかった。

便潜血検査

いずれの時点でも、動物の糞便に潜血は認められなかった。

3.3.3 病理学的検査

器官重量および剖検

投与期間終了時に、雄の全本薬投与群で、対照群と比較して前立腺および精嚢の平均重量および大きさの増加が認められ、大きさの増加程度には用量依存性がみられた。さらに、20000 IU/kg/日群では、対照群と比較して精巣の大きさの増加に伴う精巣の平均重量の増加が認められた。また、雄の全本薬投与群の胸腺では、対照群と比較して平均重量および大きさの減少が認められ、大きさの減少程度には用量依存性がみられた。雌では、20000 IU/kg/日群のみで同様の減少がみられた。雌の 20000 IU/kg/日群の 1 例では子宮および卵巣の重量および大きさの増加も認められた。休薬による回復期間終了時には、20 IU/kg/日群の前立腺、精嚢および胸腺の変化は完全に回復し、200、2000 および 20000 IU/kg/日群の雄の生殖器の変化には回復傾向がみられた。

病理組織学的検査

精巣、精巣上体、前立腺、精嚢、卵巣、子宮、胸腺および投与部位に、本薬投与に関連した所見が認められた。投与期間終了時に、全本薬投与群の精巣で、用量の増加に伴うライディッヒ細胞の

過形成が認められた。さらに、20000 IU/kg/日群の精巣では、対照群およびその他の用量群と比較して精上皮の成熟および精子形成の亢進像がみられた。

回復期間終了時には、ライディッヒ細胞の過形成は完全に消失し、20000 IU/kg/日群の雄の生殖細胞の成熟度は対照群の動物と同程度であった。

前立腺および精嚢では、全本薬投与群で、用量の増加に伴う腺上皮の肥大が観察され、ほとんどの場合、腺管拡張を伴っていた。回復期間終了時には、これらの変化は 20 IU/kg/日群では回復し、その他の本薬投与群では明らかな回復傾向を示した。卵巣では、2000 および 20000 IU/kg/日群で用量の増加に伴う黄体数の増加が認められたが、回復期間終了時には、この変化は 2000 IU/kg/日群では完全に回復し、20000 IU/kg/日群では明らかな回復傾向を示した。また、投与期間終了時に 20000 IU/kg/日群の雌 1 例で子宮内膜腺の過形成が認められたが、回復期間終了時には本薬投与に関連した所見は観察されなかった。胸腺では、投与期間終了時に、全本薬投与群の雄で、用量の増加に伴う軽度から重度の皮質の萎縮が観察され、雌では、20000 IU/kg/日群で程度の軽い萎縮がみられた。この変化は休薬後に完全に回復した。投与部位では、全本薬投与群で、血管周囲への単核細胞浸潤の発現頻度および程度が、対照群と比較して用量の増加に伴い増加した。回復期間終了時には、この変化は 20 IU/kg/日群では完全に回復し、200、2000 および 20000 IU/kg/日群では明らかな回復性を示した。

3.3.4 雄のテストステロン濃度および雌のエストラジオール濃度

テストステロン濃度またはエストラジオール濃度を、投与開始前、投与期間（14 日および 29 日）および回復期間終了時に採取した血清を用いて、免疫測定法により測定した。

雄のテストステロン濃度は、全本薬投与群で著しく増加したが、回復期間終了時には、投与開始前の値に回復した。

雌のエストラジオール濃度は、投与開始前および投与期間を通じて、全動物で検出限界未満であった。

3.3.5 血清中 MSJ-0011 濃度

TK 測定用に、MSJ-0011 皮下投与の 1、7、15 日および 24 日（雌では 26 日）に、各群雌雄各 4 匹の動物から 1 日 2 回（時点毎に各群雌雄各 1 例）採血し、血清中 MSJ-0011 濃度を測定した。

血清 AUC 値（IU· h/mL）を表 2.6.6 - 3 に示す。MSJ-0011 曝露量は、20 から 2000 IU/kg/日の用量範囲でおおむね用量に比例して増加したが、最高用量の 20000 IU/kg/日では、用量比を予想以上に上回る AUC の増加が認められた。試験期間中の血中薬物動態は、雌雄とも、いずれの用量でも、3 回目の測定日（投与 15 日）まで AUC の増加傾向を示した。その後、20000 IU/kg/日群の雌を除き、投与 24 または 26 日（最終測定日）に AUC の減少がみられた。この減少は、抗 MSJ-0011 抗体の産生に起因するものと考えられる。

表 2.6.6 - 3 MSJ-0011 のサルへの反復皮下投与後の血清 AUC 値

用量（IU/kg/日）		AUC_{0-24}（IU· h/mL）			
		投与 1 日	投与 7 日	投与 15 日	投与 24 または 26 日
20	雄	0.196	1.4725	1.966	1.403
	雌	1.582	1.842	2.128	1.271
200	雄	12.322	21.456	27.650	18.440
	雌	11.519	14.963	32.140	1.405
2000	雄	88.950	182.490	812.025	113.500
	雌	101.976	155.025	749.906	75.800
20000	雄	2247.950	2985.250	4051.500	2667.000
	雌	2385.000	2409.000	3202.000	4445.000

3.3.6 抗 MSJ-0011 抗体産生

全動物から、投与開始前、投与期間の中期および終了時ならびに回復期間終了時に採取した血清を用いて、放射性免疫沈降法により抗 MSJ-0011 抗体を測定した。

抗 MSJ-0011 抗体は、雌雄とも、各本薬投与群のほぼ全例で検出され、2000 および 20000 IU/kg/日群では、ほとんどの動物で投与開始 2 週間後には既に陽性であった。

3.3.7 結論

雄の生殖器の形態学的変化は、hCG のライディッヒ細胞への刺激を介するテストステロン分泌に基づくものであり、これにより精子形成および副生殖器（前立腺および精嚢）が刺激され、さらに、蛋白同化による成長促進作用の結果として、体重増加が亢進する [1、2、4、5、12]。また、本試験で認められた胸腺の萎縮は、性ホルモンの投与により起こる本器官の退縮として知られている作用である [8、9]。なお、臨床検査値には、毒性学的に意義のある変化は認められなかった。雌では、本薬の卵巣への刺激、さらに 1 例では子宮への刺激に関連する変化も観察された。

結論として、上記変化は、いずれも高用量の MSJ-0011 を投与することで、強い薬理学的作用が発現したことによるものであった。これらの変化は、いずれも動物の全般的な健康状態に悪影響を与えず、回復期間終了後には回復または明らかな回復傾向を示した。また、MSJ-0011 は、最高用量の 20000 IU/kg/日まで、投与局所に対する忍容性も良好と考えられた。したがって、本試験における MSJ-0011 の無毒性量は 20000 IU/kg/日と判断された。

3.4　サル 1 ヵ月間静脈内投与毒性試験および 4 週間回復性試験 ([redacted]0388 試験)

添付資料番号：4.2.3.2.4（参考資料、GLP 適用）

MSJ-0011 の反復静脈内投与毒性をカニクイザルで評価した。

カニクイザルに、生理食塩液で溶解した MSJ-0011 を 20、200、2000 および 20000 IU/kg/日の用量で、1 日 1 回、1 ヵ月間連日静脈内投与した。対照群には生理食塩液を同様の方法で投与した。投与容量は、全群で 0.2 mL/kg とした。1 群雌雄各 4 匹の動物を用いた。

一般状態観察、体重および摂餌量の測定、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、便潜血検査、血清中 MSJ-0011、テストステロンおよびエストラジオール濃度の測定、ならびに抗 MSJ-0011 抗体の測定を実施した。1 ヵ月間の投与期間終了後、各群雌雄各 1 匹を用いて、4 週間の休薬により変化の回復性を評価した。投与期間および回復期間終了時に動物を安楽死させ、病理学的検査に供した。

皮下投与試験と基本的に同様の変化が観察された。すなわち、雌雄の生殖器および胸腺（主に雄）を除き、特記すべき所見は認められなかった。

雄の生殖器の形態学的変化として、全本薬投与群で、精巣のライディッヒ細胞の過形成、腺上皮の肥大、ならびに腺管拡張を伴う前立腺および精嚢の平均重量および大きさの増加が観察された。さらに、投与期間終了時に、本薬投与群の雄全例で、用量の増加に伴う胸腺の萎縮が認められた。胸腺の萎縮は、回復期間終了時にも、2000 および 20000 IU/kg/日群の雄 2 例で観察されたが、その程度は顕著に軽減していた。また、本薬投与により、血清テストステロン濃度が用量の増加に伴い増加したが、回復期間終了時には投与開始前の値に回復した。

雌では、投与期間終了時に、200、2000 および 20000 IU/kg/日群で用量の増加に伴う黄体数の増加が認められたが、回復期間終了時には、変化を示した全群で完全に回復した。しかし、血清エストラジオール濃度が常に検出限界未満（15 pg/mL 未満）であったことから、この所見と性ホルモン刺激との関係は明らかではなかった。

投与部位では、20000 IU/kg/日群の少数例に、病理組織学的検査で血管周囲への可逆性の多巣性単核細胞浸潤が観察されたのみで、一般状態観察および剖検時の肉眼所見では変化は認められなかった。

1 ヵ月間の静脈内投与期間中の MSJ-0011 曝露量は、全測定日でおおむね用量に比例して増加したが、投与期間とともに変動する傾向は認められなかった（唯一の例外として、20000 IU/kg/日群の雌雄で投与 15 日および 26 日に AUC 値の増加がみられた）。

全動物から投与開始前、投与期間の中期および終了時ならびに回復期間終了時に血清を採取し、放射性免疫沈降法により抗 MSJ-0011 抗体を測定した。投与期間終了時に、20000 IU/kg/日群の全例、200 および 2000 IU/kg/日群の雄全例および雌各 1 例で抗 MSJ-0011 抗体が検出された。20 IU/kg/日群では、回復期間終了時に雄 1 例で抗体が検出されたのみであった。200、2000 および 20000 IU/kg/日群では全例で回復期間終了時も抗体が検出され、数例では投与開始 2 週間後には既に抗体が検出されていた。

結論として、上記変化は、いずれも高用量の MSJ-0011 を投与することで、強い薬理学的作用が発現したことによるものであった。これらの変化は、いずれも動物の全般的な健康状態に悪影響を与えず、回復期間終了後には回復または明らかな回復傾向を示した。また、MSJ-0011 は、最高用量の

20000 IU/kg/日まで、投与局所に対する忍容性も良好と考えられた。したがって、本試験における MSJ-0011 の無毒性量は 20000 IU/kg/日と判断された。

3.5 雄サル 26 週間皮下投与毒性試験 ([redacted]0164 試験)

添付資料番号：4.2.3.2.5（参考資料、GLP 適用）

性成熟した雄サルに MSJ-0011 を 26 週間反復皮下投与して、MSJ-0011 の毒性および生殖機能への潜在的影響を、高純度に精製した尿由来 hCG（urinary human chorionic gonadotropin-highly purified、hCG-HP）と比較検討した。

カニクイザルに、生理食塩液に溶解した MSJ-0011 を 50、500 および 5000 IU/kg/日の用量で、1 日 1 回、26 週間連日皮下投与した。さらに、別の群に、hCG-HP を 500 IU/kg/日の用量で投与した。対照群には生理食塩液を同様の方法で投与した。投与容量は全群で 0.2 mL/kg とした。1 群雄 5 匹の動物を用いた。

一般状態観察、体重および摂餌量の測定、眼科学的検査、臨床検査、病理学的検査、精子の形態および機能検査、血清中 MSJ-0011 および性ホルモン濃度の測定、ならびに抗 MSJ-0011 抗体の測定を実施した。

1 ヵ月間の毒性試験で認められたと同様のテストステロンを介した成長促進作用および生殖器の変化以外に、特記すべき変化はみられなかった。MSJ-0011 の 5000 IU/kg/日群および hCG-HP の 500 IU/kg/日群の生殖器には、病理組織学的変化を伴わない精巣および精嚢の平均重量の増加が認められた。また、全 MSJ-0011 投与群で、軽度から中等度の下垂体前葉の好酸性細胞の肥大が認められ、その発現頻度および程度は用量の増加に伴い増加した。MSJ-0011 の 5000 IU/kg/日群では、乳腺腺房の過形成が観察され、導管の拡張を伴っている場合もみられた。比較対照物質の hCG-HP でも、上記の器官に MSJ-0011 でみられたものと同種の変化が、同様の発現頻度および程度で認められた。精子の数、運動性、形態および機能に関する検査では、MSJ-0011 および hCG-HP 投与群ともに、対照群と比べて特に異常は認められなかった。

対照群と比較して、血管周囲への単核細胞浸潤の発現頻度および程度の軽度増加が MSJ-0011 および hCG-HP 投与群に認められ、皮下出血の発現頻度の軽度増加が MSJ-0011 の 5000 IU/kg/日群にみられた。

MSJ-0011 投与群では、投与 4 週の投与後 24 時間時点の血清中 MSJ-0011 濃度は、初回投与の投与後 24 時間値と同様であった。しかし、投与継続に伴い、投与 12 および 26 週では、ほとんどの動物で抗 MSJ-0011 抗体の産生により血清中 MSJ-0011 濃度が著しく減少し、投与 26 週では、50 および 500 IU/kg/日群のほぼ全例で血清中 MSJ-0011 濃度が検出限界未満であった。一方、5000 IU/kg/日群の一部の動物では、極めて高い血清中 MSJ-0011 濃度が認められ、抗 MSJ-0011 抗体価が曝露量に大きな影響を与えるレベルにはない場合には、持続的に MSJ-0011 が蓄積することが示唆された。hCG-HP 投与群では、投与初日の血清中 hCG 濃度が、同用量の MSJ-0011 投与群よりも低かった。しかし、投与 4、12 および 26 週では、投与前の hCG 濃度が MSJ-0011 投与群よりも高かった。

血清テストステロン濃度は、MSJ-0011 および hCG-HP の全投与群で、投与前の約 3 ng/mL から投与 4 週には約 60 ng/mL に増加した。しかし、投与継続に伴い、投与 12 および 26 週では、抗 MSJ-0011 抗体価が高い動物で、テストステロン濃度が投与前の値まで減少した。なお、MSJ-0011 の 5000

IU/kg/日群および hCG-HP 群では、抗 MSJ-0011 抗体価が曝露量に大きな影響を与えるレベルにない動物で、高いテストステロン濃度が維持された。

全動物から投与開始前、投与 4、12 および 26 週に血清を採取し、抗 MSJ-0011/hCG-HP 抗体を放射性免疫沈降法により測定した。抗体は、投与 4 週では MSJ-0011 の 50 IU/kg/日群の 5 例中 2 例、5000 IU/kg/日群の 5 例中 3 例、500 IU/kg/日群および hCG-HP 群の全例で検出された。また、投与 12 および 26 週では、抗 MSJ-0011/hCG-HP 抗体が MSJ-0011 を投与した全例および hCG-HP を投与した全例で認められた。

結論として、上記変化は、いずれも高用量の MSJ-0011 を投与することで、強い薬理学的作用が発現したことによるものであった。これらの変化は、いずれも動物の全般的な健康状態に悪影響を与えなかった。また、サルの 1 ヵ月間反復投与毒性試験における回復性評価の結果から、いずれも可逆性の変化と考えられた。さらに、MSJ-0011 は、最高用量の 5000 IU/kg/日まで、投与局所に対する忍容性も良好と考えられた。したがって、本試験における MSJ-0011 の無毒性量は 5000 IU/kg/日と判断された。

4 遺伝毒性試験

遺伝毒性試験を GLP 適用下で計 4 試験実施した。試験デザインを表 2.6.6 - 4 に示す。なお、全試験で陰性対照として生理食塩液を用いた。

表 2.6.6 - 4 in vitro および in vivo 遺伝毒性試験

試験の種類（試験番号）	試験系	動物数	投与経路	投与/処理期間	用量
復帰突然変異試験（[redacted]0389）	ネズミチフス菌（TA1535、TA1537、TA1538、TA98、TA100） 大腸菌（CM891）	－	in vitro	72 時間	165～13361 IU/plate の 5 濃度（公比 3）
遺伝子突然変異試験（[redacted]0390）	ほ乳類細胞：V79 チャイニーズハムスター肺細胞	－	in vitro	2 時間	495～13361 IU/mL の 4 濃度（公比 3）
染色体異常試験（[redacted]0392）	ヒトリンパ球	－	in vitro	2.5 時間	495～13361 IU/mL の 4 濃度（公比 3）
小核試験（[redacted]0391）	CD-1 マウス骨髄細胞、20匹（雌雄各10匹）/群 投与24および48時間後に各群雌雄各 5 匹検査	雌雄各 45 匹(陰性および陽性対照群含む)	静脈内	単回投与	2000、20000、200000 IU/kg

4.1 細菌を用いた遺伝子突然変異試験（復帰突然変異試験）（[redacted]0389 試験）

添付資料番号：4.2.3.3.1.1（GLP 適用）

細菌［ネズミチフス菌 TA1535、TA1537、TA1538、TA98 および TA100（ヒスチジン要求性）および大腸菌 CM891（トリプトファン要求性)］を用いて、代謝活性化系の存在下および非存在下で、独立した試験を 2 回実施した。MSJ-0011 の突然変異誘発性は、陰性対照物質（生理食塩液）と比較して復帰変異コロニー数を有意に増加させる作用の有無により判定した。

陽性対照物質を表 2.6.6 - 5 に示す。

表 2.6.6 - 5 陽性対照物質

菌株	代謝活性系存在下		代謝活性系非存在下	
	陽性対照	濃度（μg/プレート）	陽性対照	濃度（μg/プレート）
TA1535	Hydrazine sulphate	500	2-Aminoanthracene	6.25
TA1537	9-Aminoacridine HCl	40	2-Aminoanthracene	6.25
TA1538	2-Nitrofluorene	2.5	2-Aminofluorene	5
TA98、TA100	Doxorubicine HCl	4	2-Aminofluorene	5
CM891	Methylmethanesulphate	325	2-Aminoanthracene	1

陽性対照物質は、自然発生による平均復帰変異コロニー数と比較して、少なくとも 2 倍かつ統計学的に有意に復帰変異コロニー数を増加させた。一方、MSJ-0011 では、陰性対照物質と比較して、代謝活性化系の有無に関わらず、いずれの用量でも復帰変異コロニー数の明らかな増加はみられなかった。したがって、本試験条件下で、MSJ-0011 は突然変異誘発性を示さないと判断された。

4.2 ほ乳類細胞を用いた遺伝子突然変異試験 ([redacted]0390 試験)

添付資料番号：4.2.3.3.1.2（GLP 適用）

独立した 2 試験で、V79 チャイニーズハムスター肺細胞を代謝活性化系の存在下および非存在下で被験物質に曝露させ、培養した後、6-チオグアニン（6-TG）を含む選択培地または含まない非選択培地でさらに培養した。MSJ-0011 への曝露後 0、6、9 日に、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRT）を欠損した 6-TG 抵抗性の変異体表現型細胞を選択培地で形成されるコロニーとして計数し、突然変異出現頻度を算出した。

陽性対照として、代謝活性化系非存在下ではメタンスルホン酸エチル（5 mM）、代謝活性化存在下では N-ニトロソジメチルアミン（10 mM）を使用した。

これらの陽性対照物質は、陰性対照物質（生理食塩液）と比較して突然変異体（$HGPRT^-$）の出現頻度を明らかに増加させた。

2 試験とも、MSJ-0011 の各用量での突然変異体（$HGPRT^-$）の出現頻度は、代謝活性化系の有無に関わらず、自然発生による突然変異出現頻度の 95%信頼限界の範囲内であった。したがって、本試験条件下で、MSJ-0011 は突然変異誘発性を示さないと判断された。

4.3 染色体異常試験 ([redacted]0392 試験)

添付資料番号：4.2.3.3.1.3（GLP 適用）

二人のドナーから得たヒトリンパ球を代謝活性化系の存在下および非存在下で被験物質に曝露させ、培養した。有糸分裂中のリンパ球をコルヒチンで処理し、分裂中期で停止させ、染色体異常の有無を検査した。

陽性対照物質として、代謝活性化系非存在下ではマイトマイシン C（0.75 μg/mL）、代謝活性化系存在下ではシクロホスファミド（17.25 μg/mL）を使用した。

これらの陽性対照物質は、染色体異常を有する細胞の割合を統計学的に有意に増加させた。一方、MSJ-0011 で処理した細胞の染色体異常出現率には、いずれの用量でも、陰性対照物質（生理食塩液）で処理した細胞の値との間に統計学的有意差はみられなかった。したがって、本試験条件下で、MSJ-0011 は染色体異常誘発性を示さないと判断された。

4.4 マウス小核試験 ([redacted]0391 試験)

添付資料番号：4.2.3.3.2.1（GLP 適用）

被験物質または対照物質を Crl:CD-1(ICR)マウスに単回静脈内投与した。投与後 24 および 48 時間に各群雌雄各 5 匹を安楽死させ、大腿骨の骨髄塗抹標本を 1 匹当たり 2 枚作製し、小核を有する幼若赤血球数を計測した。

陽性対照物質として、マイトマイシン C を 8 mg/kg（10 mL/kg）の用量で、雌雄各 5 匹に腹腔内投与した。投与後 48 時間に動物を安楽死させ、検査に供した。

マイトマイシン C 投与群では、陰性対照（生理食塩液）群と比較して、小核を有する幼若赤血球の出現頻度が統計学的に有意に増加した。一方、MSJ-0011 投与群の小核出現頻度には、いずれの検査時点でも、陰性対照群の値との間に統計学的有意差はみられなかった。したがって、本試験条件下で、MSJ-0011 は小核誘発性を示さないと判断された。

5 がん原性試験

MSJ-0011 のがん原性試験は実施していない。

適用が予定されている女性の不妊治療では、MSJ-0011 の投与回数が治療 1 コースにつき 1 回であり、総使用回数が限られていること、本薬の遺伝毒性試験で遺伝毒性が認められなかったこと、また、反復投与毒性試験や副次的薬理試験（モジュール 2.6.2.3 項参照）でもがん原性の懸念に結びつく変化が認められなかったことから、MSJ-0011 のがん原性試験は不要と考えられた。

MSJ-0011 はバイオテクノロジー応用医薬品であり、既に臨床で長年使用され、発がん性の報告がない尿由来ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（urinary human chorionic gonadotropin、u-hCG）と実質的に同等である。バイオテクノロジー応用医薬品では、標準的ながん原性試験は一般的に不適当である［日米 EU 医薬品規制調和国際会議（international conference on harmonisation of technical requirements and registration of pharmaceuticals for human use、ICH）ガイドライン S6（R1）］。がん原性試験は、通常、臨床での使用が少なくとも 6 ヵ月以上継続される場合または期間を置いて繰り返される場合に求められる（ICH S1A）。

がん原性試験を実施しなかった詳細な理由は、モジュール 2.4.5.1 項に示した。

6 生殖発生毒性試験

MSJ-0011の独立した生殖発生毒性試験は実施していない。

MSJ-0011 と u-hCG の薬物動態プロファイルは類似しており、MSJ-0011 の一般毒性試験においてhCGの薬理作用に基づく可逆性の変化のみが認められていることから、MSJ-0011 の生殖発生毒性は公表されている u-hCG の試験成績[13]から評価可能と判断した。また、ヒトで予定されている使用条件下で MSJ-0011 が生殖発生毒性を誘発する可能性は低いと考えられた。MSJ-0011 の生殖発生毒性試験を実施しなかった詳細な理由は、モジュール2.4.5.1項に示した。

6.1 MSJ-0011の生殖器に及ぼす影響

MSJ-0011の生殖器に及ぼす影響を、一般毒性試験の中で評価した。結果の要約を以下に示す。

雌：

ラットでは、単回静脈内投与および皮下投与毒性試験（[redacted]0383試験、2.1項参照）の2000 IU/kg以上の投与群で、卵胞嚢胞の発現頻度の軽度増加および黄体数の軽度増加が認められた。また、1ヵ月間反復皮下投与および静脈内投与毒性試験（皮下投与：[redacted]0384試験、静脈内投与：[redacted]0385試験、3.1項および3.2項参照）では、20 IU/kg/日以上の投与群で、卵巣の重量および大きさの用量依存性のない増加、黄体の数および大きさの軽度から中等度の増加、散発的な出血を伴った卵胞嚢胞の増加、子宮および膣粘膜の軽度過形成および軽度から中等度の分泌物増加を伴う乳腺腺房の過形成がみられた。

サルでは、単回静脈内投与および皮下投与毒性試験（[redacted]0386試験、2.2項参照）の200000 IU/kgの用量で2例中1例に卵胞の出血嚢胞が認められた。また、1ヵ月間反復皮下投与および静脈内投与毒性試験（皮下投与：[redacted]0387試験、静脈内投与：[redacted]0388試験、3.3項および3.4項参照）では、20000 IU/kg/日群で子宮および卵巣の重量の増加（皮下投与）、黄体数の増加、子宮内膜腺の過形成がみられた。

雄：

ラットでは、単回静脈内投与および皮下投与毒性試験（[redacted]0383試験、2.1項参照）の2000 IU/kg以上の投与群で精巣重量の減少、軽度から中等度の精子細胞の変性および精細管上皮の空胞化を伴う精子形成低下が認められた。また、1ヵ月間反復皮下投与および静脈内投与毒性試験（皮下投与：[redacted]0384試験、静脈内投与：[redacted]0385試験、3.1項および3.2項参照）では、両投与経路の20 IU/kg/日以上の投与群で精巣の重量および大きさの減少、軽度から重度の生殖細胞の変性を伴う精子形成低下およびライディッヒ細胞の過形成、皮下投与の20 IU/kg/日以上の投与群および静脈内投与の200 IU/kg/日以上の投与群で前立腺および精嚢の重量および大きさの増加、両投与経路の2000および20000 IU/kg/日群で前立腺の腺管拡張および上皮の軽度過形成がみられた。

サルでは、単回静脈内投与および皮下投与毒性試験（[redacted]0386試験、2.2項参照）の200000 IU/kgの用量で何ら変化は認められなかった。また、1ヵ月間反復皮下投与および静脈内投与毒性試験（皮下投与：[redacted]0387試験、静脈内投与：[redacted]0388試験、3.3項および3.4項参照）では、20 IU/kg/日以上の

投与群で精嚢および前立腺の重量および大きさの増加ならびに軽度の腺上皮肥大および腺管拡張が認められ、皮下投与の20000 IU/kg/日群では精巣の重量および大きさの増加もみられた。さらに、両投与経路の全本薬投与群で、用量の増加に伴うライディッヒ細胞の過形成がみられ、皮下投与の20000 IU/kg/日群では精子形成の亢進像も観察された。

雌雄ラットおよびサルにみられた変化は、いずれも、LH/hCG 受容体を発現する器官への、hCGの直接的な薬理学的作用に起因するもの、または性ホルモン産生の刺激に基づく二次的変化であった。MSJ-0011 の 1 ヵ月間反復投与毒性試験では、これらの変化は 4 週間の回復期間終了時には、回復性を示した（詳細は 3.1 項、3.2 項、3.3 項および 3.4 項参照）。したがって、MSJ-0011 の毒性プロファイルは、u-hCG と類似していると考えられる。

結論として、MSJ-0011 投与後に認められた所見はhCG の薬理学的作用に基づき、直接的または二次的に誘発された変化であり、MSJ-0011 がヒトで予定されている使用条件下で生殖発生毒性を誘発する可能性は低いと考えられる。

7 局所刺激性試験（RA9580試験）

添付資料番号：4.2.3.6.1（GLP適用）

MSJ-0011液剤で局所刺激性試験を実施した。

試験には、局所刺激性試験に汎用されるNew Zealand Whiteウサギ（各群雄6匹、計12匹）を用いた。本薬の臨床適用経路は皮下であるが、誤投与され得る部位である筋肉内への投与でも評価した。

被験物質は、表2.6.6 - 6に示す試験デザインに従って、皮下（背部皮下）または筋肉内（外側広筋内）に単回投与した。

表2.6.6 - 6 局所刺激性試験デザイン

試験群（投与経路）	動物数	投与部位	被験物質	投与容量（mL/部位）	投与用量（μg/部位）	肉眼的病理検査（動物数）	
						投与後2日	投与後14日
1（皮下および筋肉内投与）	6	右側	MSJ-011液剤	0.5	250	3	3
		左側	陰性対照（プラセボ）	0.5	0		
2（皮下および筋肉内投与）	6	右側	MSJ-0011凍結乾燥製剤	0.5	250	3	3
		左側	陰性対照（生理食塩液）	0.5	0		

投与後2日および14日にそれぞれ各群3匹を安楽死させ、投与部位の肉眼的観察を行った。

いずれの投与経路でも、投与部位にMSJ-0011液剤投与による明らかな反応はみられなかった。また、投与後2日および14日に実施した投与部位の肉眼的病理検査では、本剤投与に関連する所見は認められなかった。

結論として、250 μg/0.5 mLの濃度のMSJ-0011液剤を250 μg/部位（0.5 mL/部位）の用量で、皮下および筋肉内に投与した場合の局所忍容性は、非常に良好であった。したがって、本試験結果は、本製剤を皮下投与する場合の局所安全性を示唆するものであった。

8 その他の毒性試験

その他の毒性試験は実施していない。

9 考察および結論

MSJ-0011の毒性試験として、ラットおよびカニクイザルでの単回投与毒性試験および1ヵ月間反復投与毒性試験、ならびに雄カニクイザルでの26週間反復投与毒性試験を実施した。さらに、in vitroおよびin vivo遺伝毒性試験も実施した。局所刺激性は、反復投与毒性試験の中で評価するとともに、独立した局所刺激性試験をウサギで実施して評価した。いずれの試験もGLP適用下で実施した。

ラットおよびサルへの単回静脈内投与および皮下投与後に、MSJ-0011は、わずかな毒性しか示さなかった。

反復投与毒性試験で、ラットおよびサルに20000 IU/kg/日までの高用量を1ヵ月間連日投与した場合、ならびに雄サルに5000 IU/kg/日までの高用量を26週間連日投与した場合に観察された所見は、特定の内分泌腺およびそれらの影響下にある組織、特に生殖器官を刺激する、強い薬理学的作用に基づく二次的変化であった。こうした作用は、性ステロイドの産生およびFSHの産生に対するhCGの作用に基づき、げっ歯類とサルでは異なることが知られている。これらの作用は、特定の男性不妊症および女性不妊症の治療薬として、ヒトで長年、有効かつ安全に使用されてきたu-hCGの作用と同様である。

特記すべき変化として、雄ラットで精巣にライディッヒ細胞の過形成および精細管上皮の変性、ならびに前立腺および精嚢に二次的変化が認められ、雌ラットで膣上皮の過形成および卵巣の黄体数の増加がみられた。また、雌ラットでは乳腺の過形成も観察された。サルでは、ライディッヒ細胞の過形成による精巣の腫大（精子形成は維持）、卵巣の黄体数の増加および乳腺の過形成が認められた。また、血清エストゲン（ラットのみ）およびテストステロン値に、関連する変化がみられた。観察された所見の多くはテストステロン値の変化で説明することができるが、ラットでの変化はFSHの分泌減少も関与していると考えられる。FSHの分泌減少は高濃度のhCGへの曝露により引き起こされることが知られている。ラットでは高濃度のステロイドによる二次的影響として、可逆的な胸腺萎縮および体内の水分貯留もみられた。

雄カニクイザルでの26週間反復投与毒性試験では、試験期間を通じて精子の数、形態、性状および機能は維持され、毒性学的意義のある所見は認められなかった。

1ヵ月間反復投与毒性試験で認められた変化には、いずれも回復性がみられた。

MSJ-0011のTKを、上記のラットおよびサルの反復投与毒性試験の中で評価した。血清中MSJ-0011のAUC値により評価したMSJ-0011の暴露量は、投与した用量範囲内において、おおむね用量に比例して増加した。反復皮下投与毒性試験の投与15日のAUC値を、ヒトに本薬250 μgを単回皮下投与した際のAUC値と比較すると、ラットでは約70～80倍、サルでは約280～350倍高かった（詳細は、モジュール2.4.5.2項参照）。ラットおよびサルに対して異種タンパク質であるMSJ-0011は種々の用量で抗MSJ-0011抗体の産生を促し、投与開始2～3週間後には血清hCG濃度を減少させる傾向にあった。MSJ-0011は、ヒトでは治療1コースにつき単回投与で適用され、また、内因性hCGにきわめて類似していることから、実験動物でのMSJ-0011の免疫原性をそのままヒトに外挿することはできない。

上記のように、MSJ-0011投与に関連する変化は、全般的に、本薬に期待される薬理学的作用が臨床用量とは懸け離れた高用量で過剰発現したものである。しかしながら、これらの変化はいずれも動物の全般的な健康状態に悪影響を与えず、回復期間終了後には回復または明らかな回復傾向を示

した。したがって、無毒性量は、各反復投与毒性試験で投与された最高用量と判断された。また、MSJ-0011 で認められた作用のプロファイルは、既に十分に研究され、長年広く臨床で使用されている尿由来製剤 u-hCG と同じである。

MSJ-0011 で一連の遺伝毒性試験を実施した結果、いずれも陰性であり、本薬の反復投与試験でも、がんおよび前がん病変は認められなかった。

これまでに利用可能な全データを通じて、MSJ-0011 のがん原性の懸念は認められていない。また、MSJ-0011 はバイオテクノロジー応用医薬品であること、およびヒトで予定されている用法が治療 1 コースにつき単回投与であり、総投与回数が限られていることからも、がん原性試験は必要ないと考えられた［ICH S1A および S6（R1）］。

MSJ-0011 の独立した生殖発生毒性試験は実施していない。ラットおよびサルの単回および反復投与毒性試験では、hCG の薬理学的作用に基づく変化を除き、MSJ-0011 の雌雄生殖器に対する影響は認められなかった。さらに、公表されている u-hCG の生殖発生毒性に関する試験成績から、ヒトで予定されている使用条件下で MSJ-0011 が生殖発生毒性を誘発する可能性は低いと判断された。

1ヵ月間反復皮下投与毒性試験での MSJ-0011 の局所忍容性は良好であり、MSJ-0011 液剤をウサギに単回皮下および筋肉内投与した場合の局所忍容性も良好であった。

結論として、MSJ-0011 の毒性試験で得られた結果により MSJ-0011 の毒性は適切に評価され、予定されている使用条件下では、ヒトに特段のリスクはないものと考えられる。

10 図表

表は本文中に記載した。

11 参考文献

1 Kuret JA, Murad F. Adenohypophyseal hormones and related substances. In: Gilman AG, Rall TW, Nies A, Taylor P, editors. Goodman and Gildman's The pharmacological basis of therapeutics. 8th ed. New York: Pergamon Press; 1990. 1334-60.

2 Wilson JD. Androgens. In: Gilman AG, Rall TW, Nies A, Taylor P, editors. Goodman and Gildman's The pharmacological basis of therapuetics. 8th ed. New York: Pergamon Press; 1990. 1413-30.

3 Martindale W. Chorionic Gonadotrophin. In: Raynolds JEF, editor. Martindale: The Extra Pharmacopia. 31st ed. London: Pharmaceutical Press; 1996. p. 1276-7.

4 Sharp RM, Bartlett JMS, Kerr JB. Interaction between the seminiferous tubules and Leydig cells in the testis. In: Piva F, Bardin CW, Forti G, Motta M, editors. Cell to cell communication in endocrinology. Serono Symposia Publications. New York: Raven Press; 1988; 49:119-28.

5 Ganong WF. The gonads: development & function of the reproductive system. In: Review of medical physiology. 13th ed. Norwalk: Appleton & Lange; 1987. 346-80.

6 Foster PMD. Testicular structure and physiology: a toxicologist's view. In: Working PK, editor. Toxicology of the male and female reproductive system. New York: Hemisphere publishing Co.; 1989. 1-14.

7 Graves P. Gonadotrophs. In: Histopathology of preclinical toxicity studies: Interpretation and Relevance in Drug Safety Evaluation. Amsterdam: Elsevier; 1990. 682-3

8 Ham AW. Effects of certain hormones on the thymus. In: Histology. 7th ed. Philadelphia: J. B. Lippincott Company; 1974. 335

9 Luster MI, Pfeifer RW, Tucker AN. Influence of sex hormones on immunoregulation with specific reference to natural and environmental estrogens. In: Thomas JA, Korach KS, MacLachlan JA, editors. Endocrine Toxicology. New York: Raven Press; 1985. 67-83

10 Von Eicksted AUC W. Sex hormones and related compound including hormonal contraceptives. In: Dukes MNG, Beeley L, editors, Side Effects of Drugs Annual 14. Amsterdam: Elsevier; 1990. p. 343-64

11 Gopinath C, Prentice DE, Lewis DJ. The urinary system. In: Atlas of Experimental Toxicological Pathology. Lancaster: MTP Press; 1987. 77-90

12 Ross MH, Reith EJ, Romrell LJ. Males reproductive system. In: Histology, a text and atlas. 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1989. 603-47

13 Sairam MR, Kato K, Mukhopadhyay AK, et al. Preparation and properties of human chorionic gonadotropin antagonist for biological studies: antifertility effects in the female rat. Acta Endocrinologica. 1986 Aug; 112(4): 586-94.

2.6.7 毒性試験の概要表

目次

1 毒性試験：一覧表 2
2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表 4
3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧 5
4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧 6
5 単回投与毒性試験 7
6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 8
7 反復投与毒性試験：重要な試験 10
8 In Vitro 遺伝毒性試験 29
9 In Vivo 遺伝毒性試験 35
10 がん原性試験 36
11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 37
12 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 38
13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 39
14 生殖発生毒性試験：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 40
15 新生児を用いた試験 41
16 局所刺激性試験 42
17 その他の毒性試験 43

1 毒性試験：一覧表

Test Article: MSJ-0011

Type of study	Species and strain	Method of administration	Duration of dosing	Doses (IU/kg/day[a])	GLP compliance	Testing facility	Study number	Location Section	Evaluation/ Reference
Single-dose toxicity	Sprague Dawley rats	Intravenous Subcutaneous	Single dose	0, 2000, 20000, 200000	Yes	RBM, Italy	[redacted]0383	4.2.3.1.1	Evaluation
	Cynomolgus monkeys	Intravenous Subcutaneous	Single dose[b]	200000	Yes	RBM, Italy	[redacted]0386	4.2.3.1.2	Evaluation
Repeat-dose toxicity	Sprague Dawley rats	Subcutaneous	One month	0, 20, 200, 2000, 20000	Yes	RBM, Italy	[redacted]0384	4.2.3.2.1	Evaluation
	Sprague Dawley rats	Intravenous	One month	0, 20, 200, 2000, 20000	Yes	RBM, Italy	[redacted]0385	4.2.3.2.2	Reference
	Cynomolgus monkeys	Subcutaneous	One month	0, 20, 200, 2000, 20000	Yes	RBM, Italy	[redacted]0387	4.2.3.2.3	Evaluation
	Cynomolgus monkeys	Intravenous	One month	0, 20, 200, 2000, 20000	Yes	RBM, Italy	[redacted]0388	4.2.3.2.4	Reference
	Cynomolgus monkeys	Subcutaneous	26 weeks	0, 50, 500, 5000, (hCG-HP; 500)	Yes	RBM, Italy	[redacted]0164	4.2.3.2.5	Reference
Genotoxicity Gene mutation	S.typhimurium and E.coli	In vitro	-	0, 165, 495, 1485, 4454 and 13361 IU/plate	Yes	RBM, Italy	[redacted]0389	4.2.3.3.1.1	Evaluation
	V79 Chinese hamster lung cells	In vitro	-	0, 495, 1485, 4454, 13361 IU/mL	Yes	RBM, Italy	[redacted]0390	4.2.3.3.1.2	Evaluation
Chromosome aberration	Human lymphocytes	In vitro	-	0, 495, 1485, 4454, 13361 IU/mL	Yes	RBM, Italy	[redacted]0392	4.2.3.3.1.3	Evaluation
Micronucleus	CD-1 mice	Intravenous	Single dose	0, 2000, 20000, 200000	Yes	RBM, Italy	[redacted]0391	4.2.3.3.2.1	Evaluation

-: Not applicable; hCG-HP: Urinary human chorionic gonadotropin-highly purified

a - For repeat-dose toxicity studies, the highest NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) was underlined.

b - Single intravenous dose was followed by a three week off-treatment period and then a single subcutaneous dose was administered.

1 毒性試験：一覧表（つづき）

Test Article: MSJ-0011

Type of study	Species and strain	Method of administration	Duration of dosing	Doses (IU/kg/day)	GLP compliance	Testing facility	Study number	Location Section	Evaluation/ Reference
Carcinogenicity None									
Reproductive and developmental toxicity None									
Local tolerance	New Zealand White rabbits	Subcutaneous Intramuscular	Single dose	0, 250 μg/0.5 mL /injection site (liquid monodose formulation or lyophilized powder)	Yes	RBM, Italy	RA9580	4.2.3.6.1	Evaluation
Other toxicity studies None									

2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表

Test Article: MSJ-0011

Type of study	Test system	Method of administration	Doses (IU/kg/day)	GLP compliance	Study number	Location Section
One month repeat-dose toxicity study	Sprague-Dawley rats	Subcutaneous	0, 20, 200, 2000, 20000	Yes	[redacted]0384	4.2.3.2.1
One month repeat-dose toxicity study	Sprague-Dawley rats	Intravenous	0, 20, 200, 2000, 20000	Yes	[redacted]0385	4.2.3.2.2
One month repeat-dose toxicity study	Cynomolgus monkeys	Subcutaneous	0, 20, 200, 2000, 20000	Yes	[redacted]0387	4.2.3.2.3
One month repeat-dose toxicity study	Cynomolgus monkeys	Intravenous	0, 20, 200, 2000, 20000	Yes	[redacted]0388	4.2.3.2.4
26-week repeat-dose toxicity study	Cynomolgus monkeys	Subcutaneous	0, 50, 500, 5000, (hCG-HP ; 500)	Yes	[redacted]0164	4.2.3.2.5

hCG-HP: Urinary human chorionic gonadotropin-highly purified

3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧

Test Article: MSJ-0011

Steady-State (Day 15) AUC* (IU•h/mL)

Daily dose (IU/kg)	Rats[a]				Monkeys[b]				Humans[c]
	M		F		M		F		M&F
	s.c.	i.v.	s.c.	i.v.	s.c.	i.v.	s.c.	i.v.	s.c.
20	2.249	4.04	2.338	4.205	1.966	14.345	2.128	6.183	-
130[d]	-	-	-	-	-	-	-	-	10.35[e]
200	8.711	32.4	5.846	15.098	27.650	43.919	32.140	29.892	-
2000	36.700	282.7	56.000	241.063	812.025	407.339	749.906	310.319	-
20000	908.000	2532.5	794.000	1435.625	4051.500	4542.540	3202.000	6481.890	-

*AUC represents $AUC_{0\text{-}24}$ for rats and monkeys and $AUC_{inf.}$ for humans.
- Not applicable, M: Male, F: Female, i.v.: Intravenous, s.c.: Subcutaneous
a - One-month toxicity study (s.c.: Study No. [redacted]0384, i.v.: Study No. [redacted]0385)
b - One-month toxicity study (s.c.: Study No. [redacted]0387, i.v.: Study No. [redacted]0388)
c - Single s.c. injection of either MSJ-0011 freeze-dried or MSJ-0011 liquid monodose formulation (Study No. 23286)
d - 250 μg (about 130 IU/kg)
e - AUC for MSJ-0011 liquid monodose formulation

MSJ-0011/hCG serum levels (IU/L) in the monkey 26-week subcutaneous repeat-dose toxicity study (Study No. [redacted]0164)

Daily dose	Day 1			Week 4		Week 12		Week 26	
(IU/kg)	Pre-dose	6 h	24 h	Pre-dose	6 h	Pre-dose	6 h	Pre-dose	6 h
0	2±3	2±2	1±2	0.4±0.9	0±0	3±1	1±1	0±0	0±0
50	1±1.4	39±16	205±38	270±32	227±32	35±75	50±101	0±0	0±0
500	10±10	3612±610	1472±240	988±847	2072±1682	104±216	128±264	2±4	5±12
5000	0±0	21780±8316	25860±3907	26300±17005	46375±26829	79844±79353	85461±97049	50321±76778	62342±73404
500 (hCG-HP)	0±0	1308±294	990±317	1306±943	2036±1377	979±2109	2113±4414	454±867	1176±2319

hCG-HP: Urinary human chorionic gonadotropin-highly purified
(mean±standard deviation)

4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧

Test Article: MSJ-0011

Batch No.	Purity (%)	Specified impurities (%)		Study number	Type of study
		Oxidized formsb (%)	Aggregates by [redacted] (%)		
Proposed specification[a]	[redacted]	[redacted]	[redacted]		
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]0383	Single dose toxicity study in rats
				[redacted]0384	One-month subcutaneous toxicity study in rats
				[redacted]0387	One-month subcutaneous toxicity study in monkeys
				[redacted]0389	Reversion test with bacterial cells
				[redacted]0390	Gene mutation in V79 cells
				[redacted]0392	Chromosomal aberration in human lymphocytes
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]0386	Single dose toxicity study in monkeys
				[redacted]0388	One-month intravenous toxicity study in monkeys
				[redacted]0391	Micronucleus test in mouse bone marrow
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]0385	One-month intravenous toxicity study in rats
				[redacted]0388	One-month intravenous toxicity study in monkeys
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]0387	One-month subcutaneous toxicity study in monkeys
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]0164	26-week subcutaneous toxicity study in male monkeys
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	RA9580	Local tolerability study in rabbits

a - Current DS specifications.
b - Oxidized products in batches [redacted] to [redacted] were re-tested by final analytical method when it became available.

5 単回投与毒性試験

Test Article: MSJ-0011

Species/ strain	Method of administration (vehicle/formulation)	Doses (IU/kg)	Gender and No. per group	Observed maximum non-lethal dose (IU/kg)	Approximate lethal dose (IU/kg)	Noteworthy findings	Study number
Sprague Dawley rats[a]	Intravenous (Saline)	0, 2000, 20000, 200000	5M 5F	≥200000 ≥200000	>200000 >200000	Post-mortem examinations showed changes only in the gonads. Males Decreased testes weight at all doses, without a clear indication of a dose relationship. Histologically there was a slight to moderate decrease in spermatogenesis associated with sperm degeneration and tubular vacuolization. Females Dose-related increases in ovary weights after subcutaneous dosing only. Ovaries showed a slight increase in frequency of follicular cysts in all treated groups, compared to controls. Increase in the number of corpora lutea was also noted, mainly in rats treated by the subcutaneous route.	[redacted]0383
	Subcutaneous (Saline)	0, 2000, 20000, 200000	5M 5F	≥200000 ≥200000	>200000 >200000		
Cynomolgus monkeys[b]	Intravenous (Saline) Subcutaneous (Saline)	200000	2M 2F	≥200000 ≥200000	>200000 >200000	At post-mortem examinations, no compound-related change was seen in any animal, except for ovarian stimulation (follicular clear cyst and hematocyst) observed in one female and due to the hCG pharmacological activity. Antibodies were detected in 3 animals (2 males, 1 female) 14 days after the 1st dosing and in all monkeys 35 days after 1st dosing (14 days after the 2nd dosing).	[redacted]0386

a - After the administration, the rats were kept for a 14-day post-dose observation period.

b - A single dose of 20000 IU/kg of MSJ-0011 was injected to each animal, firstly by intravenous route. After a 2-week observation period and an additional week recovery period during which the monkeys did not show any significant change, the same dose was given by subcutaneous route to the same animals. Two weeks after the last administration, the animals were sacrificed for pathology studies.

6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

Test Article: MSJ-0011

Species/ strain	Method of administration (vehicle/formulation)	Duration of dosing	Doses (IU/kg/day)	Gender and No. per group	NOAEL[a] (IU/kg)	Noteworthy findings	Study number
Sprague Dawley rats	Intravenous (Saline)	1 month	0, 20, 200, 2000, 20000	16 M 16 F	20000	In males, a slight decrease in size and weight of testes was observed, at histology revealed dose-unrelated slight (20 IU/kg) to markedly decreased spermatogenesis concomitant with germinal cell degeneration. Interstitial cell hyperplasia was also induced in the testes at all doses. In females, all treated groups showed slight (20 IU/kg) to marked increases in weight and size of ovaries, at histology characterized by slight to severe increase in number and/or size of corpora lutea and an increase in follicular cysts that were sometimes hemorrhagic. A slight or moderate increase (dose-related) in pituitary weight and size was observed and characterized by slight basophilic cell hypertrophy and increased vacuolation when compared to controls. The above changes were not present at the lower doses.	[redacted]0385
Cynomolgus monkeys	Intravenous (Saline)	1 month	0, 20, 200, 2000, 20000	4 M 4 F	20000	In males, a slight or moderate glandular epithelial hypertrophy and glandular dilation were seen in prostate and seminal vesicles at all doses. Interstitial cell hyperplasia was induced in testes of treated monkeys. The thymus became atrophic in a dose-related manner. In females, a dose-related increased number of corpora lutea was seen in the three higher dose group (200 – 20000 IU/kg).	[redacted]0388

a - No observed adverse-effect level
M: Male, F: Female

6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（つづき）

Test Article: MSJ-0011

Species/ strain	Method of administration (vehicle/formulation)	Duration of dosing	Doses (IU/kg/day)	Gender and No. per group	NOAEL[a] (IU/kg)	Noteworthy findings	Study number
Cynomolgus monkeys	Subcutaneous (Saline)	26 weeks	0, 50, 500, 5000 500 (hCG-HP)	5 M	5000	There was an increased rate of body weight gain and enlargement of the testes and seminal vesicles and histologically appreciable hyperplasia of mammary acinar epithelium in the MSJ-0011 and hCG-HP treated groups compared to the control. Enlargement and hypercellularity of the anterior pituitary was also noted. All these actions were attributed to the effects of increased production of testosterone due to the well-known pharmacological actions of hCG. Slight or moderate inflammatory cell infiltration was seen in the injection sites. Antibodies to MSJ-0011 and hCG-HP appeared and were present in all animals by Week 12. Despite the high titre, there were still measurable levels of MSJ-0011 in many top-dose animals at the end of the experiment. Detailed studies of sperm number, morphology, motility and functionality in the hamster ova penetration test showed normal results even in the high dose MSJ-0011 and the hCG-HP monkeys at the end of the experiment.	[redacted]0164

a - No observed adverse-effect level
hCG-HP: Urinary human chorionic gonadotropin-highly purified, M: Male

7 反復投与毒性試験：重要な試験

7A 反復投与毒性試験：重要な試験

Report Title: One-month subcutaneous toxicity study in rats followed by 4 weeks of recovery

Test Article: MSJ-0011

Species/strain: Sprague Dawley rats

Duration of dosing: 1 month

Study No [redacted]0384

Initial age: 7 weeks

Duration of postdose: 1 month

Location in CTD: Section 4.2.3.2.1

Date of first dose:
M: [redacted]
F : [redacted]

Method of administration: Subcutaneous

Vehicle/formulation: Saline/solution

GLP compliance: Yes

Special features: none

No observed adverse effect level: 20000 IU/kg

Daily dose (IU/kg)	0 (Control)		20		200		2000		20000	
Number of animals	M:16	F:16	M:16	F:16	M:16	F:16	M:16	F:16	M:16	F:16
Toxicokinetics: AUC (IU· h/mL)										
Day 1	-	-	0.572	0.532	6.332	1.800	53.990	35.900	309.500	923.250
Day 7	-	-	3.587	0.817	7.983	7.136	81.150	69.375	905.625	501.250
Day 15	-	-	2.249	2.338	8.711	5.846	36.700	56.000	908.000	794.000
Day 24 or 25	-	-	0.798	0.023	6.792	1.211	31.425	50.325	83.875	164.625
Noteworthy findings										
Died or sacrificed moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Body weight (%[a])	403.14 g	267.77 g	-9 **	+6	-6	+13 **	-9 **	+12 **	-7 *	+9 *
Food consumption (%[a])	35.34 g	25.46 g	-9 **	+9	-7	+7	-8 *	+2	-6	-1
Water consumption (%[a])	36.94 g	29.59 g	+0	+24 *	-7	+38 **	-5	+30 **	-1	+41 **

- Not applicable or no noteworthy findings, M: Male, F: Female

a - At the end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

Dunnett's multiple comp. test (parametric) or Mann Whitney's "U" test (nonparametric) * - $p < 0.05$ ** - $p < 0.01$

7A 反復投与毒性試験：重要な試験（つづき）

Study No. [redacted]0384 Test Article: MSJ-0011

Daily dose (IU/kg)	0 (Control)		20		200		2000		20000	
Number of animals	M:16	F:16	M:16	F:16	M:16	F:16	M:16	F:16	M:16	F:16
Clinical observations										
Swelling of nipples (after week 2)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology Week 5										
Erythrocytes (x 10^6 cells/mm^3)	7.73	6.81	7.80	6.61	7.63	6.46	7.73	6.51	7.62	6.24 **
Hemoglobin (g/dL)	15.64	13.98	15.86	13.79	15.71	13.04 *	15.84	13.36	15.49	12.82 **
Hematocrit (%)	45.48	41.11	46.06	41.36	46.08	39.12	46.45	39.16	46.00	38.34
Leukocytes (x 10^3 cells/mm^3)	14.25	11.08	11.79 *	10.25	12.49	9.38	12.04 *	9.29	11.51 **	9.61
Platelets (x 10^3 cells/mm^3)	803.81	781.81	746.19 *	845.69	745.31 *	834.25	725.13 **	825.69	747.44	818.44
Serum chemistry Week 5										
Urea (mg/dL)	28.14	29.67	31.17	33.65	29.01	39.22 **	31.63	37.51 **	29.27	41.07 **
Alkaline phosphatase (IU/L)	241.86	128.67	204.45	101.48 *	201.38	94.62 **	199.36	88.86 **	212.91	95.64 **
Total protein (g/L)	7.96	7.94	7.86	8.22	7.60 *	8.59 *	7.69	8.85**	7.67	9.14 **
α_1 globulins (%)	16.68	13.72	16.69	15.99 **	17.03	17.19 **	16.23	17.42 **	16.03	16.63 **
β globulins (%)	17.93	20,09	18.00	16.93 **	17.24	14.94 **	15.95 **	15.54 **	17.11	16.51 **
Total cholesterol (mg/dL)	66.43	89.78	61.49	80.25	64.66	44.76 **	70.80	40.24 **	69.09	24.83 **
Triglycerides (mg/dL)	112.36	38.03	65.37 **	62.99	82.11	155.54	91.71	72.27	70.34 *	124.56
Inorganic phosphorus (mg/dL)	9.05	7.54	8.39 **	7.68	8.21 **	7.85	8.42 **	7.36	8.33 **	7.33
Chloride (mEq/L)	105.32	106.64	105.68	105.35	105.35	104.52 *	105.59	104.69 *	105.81	104.34 **
Urinalysis Week 5										
Urinary volume (mL/16h)	12.06	10.88	9.81 *	11.19	10.25	11.44	9.88 *	9.94	8.56 **	9.63
Sodium (mEq/L)	0.77	0.87	0.66	0.79	0.79	0.61 *	0.61	0.56 **	0.54	0.41 **
Potassium (mEq/L)	3.01	2.24	2.56	2.48	2.71	2.41	2.60	1.95	2.36	1.84 *

- Not applicable or no noteworthy findings, M: Male, F: Female

Dunnett's multiple comp. test (parametric) or Mann Whitney's "U" test (nonparametric) * - $p < 0.05$ ** - $p < 0.01$

7A 反復投与毒性試験：重要な試験（つづき）

Study No. [redacted]0384 Test Article: MSJ-0011

Daily dose (IU/kg)	0 (Control)		20		200		2000		20000	
Urinalysis (continued)										
Protein (frequency of positive finding)	13/16	7/16	16/16	13/16	15/16	12/16	15/16	13/16	15/16	12/16
Organ weights (%[a])										
Number examined	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10
Liver	11.76 g	7.80 g	-9	+18	-10	+51 **	-4	+34 **	-7	+54 **
Kidney	3.10 g	2.04 g	-1	+8	-2	+19 *	+1	+13	+5	+11
Thymus	0.57 g	0.54 g	-44 **	-20	-40 **	-41 *	-42 **	-19	-42 **	-56 ***
Testes	3.43 g	-	-3	-	-32 ***	-	-33 ***	-	-34 **	-
Prostate	0.84 g	-	+39 *	-	+33	-	+39 *	-	+46 **	-
Seminal vesicles	1.27 g	-	+67 *	-	+64	-	+67 *	-	+105 **	-
Uterus	-	0.46 g	-	+4	-	+20	-	-2	-	+30
Ovaries	-	93.20 mg	-	+82 **	-	+837 **	-	+526 **	-	+955 **
Pituitary	13.2 mg	17.0 mg	-4	+15	-2	+62 **	+2	+71 *	+5	+101 **
Adrenals	61.50 mg	70.10 mg	-8	+13	-1	-3	-15	-11	-8	-17
Gross pathology										
Number examined	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10
Liver : increased size, slight	0	0	0	0	0	3	0	1	0	3
Thymus: decreased size, slight	0	0	2	0	2	3	2	1	1	3
Pituitary: increased size	0	0	0	1	0	3	0	3	0	5
slight	0	0	0	1	0	3	0	1	0	4
moderate	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1

- Not applicable or no noteworthy findings, M: Male, F: Female

a - Absolute weights differed from controls in the direction indicated. Number indicates percent difference for the absolute organ weights.

Dunnett's multiple comp. test (parametric) or Mann Whitney's "U" test (nonparametric) * - $p < 0.05$ ** - $p < 0.01$ *** - $p<0.001$

7A 反復投与毒性試験：重要な試験（つづき）

Study No. [redacted]0384 Test Article: MSJ-0011

Daily dose (IU/kg)	0 (Control)		20		200		2000		20000	
Gross pathology (continued)										
Number examined	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10
Testes: decreased size	0	-	0	-	6	-	7	-	8	-
slight	0	-	0	-	5	-	5	-	5	-
moderate	0	-	0	-	1	-	2	-	3	-
Prostate: increased size	0	-	3	-	2	-	3	-	5	-
slight	0	-	3	-	2	-	3	-	4	-
moderate	0	-	0	-	0	-	0	-	1	-
Seminal vesicles: increased size	0	-	4	-	3	-	5	-	7	-
slight	0	-	4	-	1	-	4	-	3	-
moderate	0	-	0	-	2	-	1	-	4	-
Mammary gland: increased size, slight	0	0	0	0	0	0	0	10	0	10
Ovaries:										
Cyst bloody, slight	-	0	-	1	-	4	-	1	-	2
Cyst clear	-	0	-	5	-	6	-	6	-	5
slight	-	0	-	3	-	4	-	6	-	4
moderate	-	0	-	2	-	2	-	0	-	1
Increased size	-	0	-	3	-	10	-	9	-	10
slight	-	0	-	2	-	3	-	4	-	2
moderate	-	0	-	1	-	2	-	2	-	1
severe	-	0	-	0	-	5	-	3	-	7
Uterus: increased size, slight	-	1	-	0	-	1	-	0	-	1

- Not applicable or no noteworthy findings, M: Male, F: Female

7A 反復投与毒性試験：重要な試験（つづき）

Study No. [redacted]0384 Test Article: MSJ-0011

Daily dose (IU/kg)	0 (Control)		20		200		2000		20000	
Gross pathology (continued)										
Number examined	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10
Injection site: subcutaneous, hemorrhagic area	1	1	3	2	2	2	6	1	2	2
slight	1	1	3	2	2	2	6	1	2	1
moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Histopathology										
Number examined	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10
Kidneys: cortex, vacuolization increase, slight	0	0	0	0	0	1	0	2	0	5
Liver: hepatocellular, hypertrophy, slight	0	0	0	0	0	3	0	2	0	6
Thymus: atrophy	0	0	3	0	2	3	6	2	4	5
slight	0	0	3	0	2	3	6	1	4	4
moderate	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Pituitary:										
Basophilic cells, hypertrophy	0	0	0	8	0	6	0	6	0	9
slight	0	0	0	8	0	5	0	5	0	3
moderate	0	0	0	0	0	1	0	1	0	6
Basophilic cells, vacuolization increase	0	0	0	0	0	5	0	2	0	7
slight	0	0	0	0	0	5	0	1	0	3
moderate	0	0	0	0	0	0	0	1	0	4
Adrenals:										
Zona fasciculata, decreased height, slight	0	0	0	0	0	1	0	2	0	3

M: Male, F: Female

7A 反復投与毒性試験：重要な試験（つづき）

Study No. [redacted]0384 Test Article: MSJ-0011

Daily dose (IU/kg)	0 (Control)		20		200		2000		20000	
Histopathology (continued)										
Number examined	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10
Adrenals:										
Zona glomerulosa, hypertrophy	0	0	0	0	0	1	0	3	0	6
slight	0	0	0	0	0	1	0	3	0	5
moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Testes:										
Decreased spermatogenesis	1	-	3	-	8	-	9	-	10	-
slight	1	-	3	-	1	-	2	-	4	-
moderate	0	-	0	-	6	-	7	-	5	-
severe	0	-	0	-	1	-	0	-	1	-
Germinal cells, degeneration	0	-	3	-	8	-	8	-	9	-
slight	0	-	3	-	3	-	2	-	4	-
moderate	0	-	0	-	4	-	6	-	4	-
severe	0	-	0	-	1	-	0	-	1	-
Interstitial cells, hyperplasia	0	-	0	-	7	-	9	-	9	-
slight	0	-	0	-	3	-	5	-	6	-
moderate	0	-	0	-	3	-	4	-	3	-
severe	0	-	0	-	1	-	0	-	0	-
Tubule(s), mineralization	0	-	0	-	5	-	4	-	5	-
slight	0	-	0	-	4	-	4	-	4	-
moderate	0	-	0	-	1	-	0	-	1	-
Tubule(s), slight vacuolization	3	-	8	-	8	-	5	-	6	-

- Not applicable or no noteworthy findings, M: Male, F: Female

7A 反復投与毒性試験：重要な試験（つづき）

Study No. [redacted]0384 Test Article: MSJ-0011

Daily dose (IU/kg)	0 (Control)		20		200		2000		20000	
Histopathology (continued)										
Number examined	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10
Epididymides:										
Decreased spermatic elements	1	-	2	-	9	-	9	-	9	-
slight	1	-	2	-	3	-	1	-	2	-
moderate	0	-	0	-	1	-	2	-	1	-
severe	0	-	0	-	5	-	6	-	6	-
Degenerative spermatic elements	1	-	2	-	7	-	8	-	9	-
slight	1	-	0	-	1	-	1	-	3	-
moderate	0	-	2	-	6	-	7	-	6	-
Prostate:										
Hyperplasia – epithelial, slight	0	-	0	-	0	-	1	-	3	-
Glands, dilatation, slight	0	-	4	-	3	-	2	-	3	-
Seminal vesicles:										
Glands, dilatation	1	-	6	-	6	-	5	-	6	-
slight	1	-	4	-	4	-	3	-	0	-
moderate	0	-	2	-	2	-	2	-	6	-
Ovaries:										
Hematocyst, slight	-	0	-	4	-	5	-	5	-	2
Corpus luteum, hypertrophy	-	0	-	5	-	9	-	10	-	10
slight	-	0	-	5	-	2	-	3	-	0
moderate	-	0	-	0	-	5	-	4	-	5
severe	-	0	-	0	-	2	-	3	-	5

- Not applicable or no noteworthy findings, M: Male, F: Female

7A 反復投与毒性試験：重要な試験（つづき）

Study No. [redacted]0384 Test Article: MSJ-0011

Daily dose (IU/kg)	0 (Control)		20		200		2000		20000	
Histopathology (continued)										
Number examined	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10
Ovaries:										
Corpus luteum, increased number	-	1	-	0	-	9	-	10	-	10
slight	-	0	-	0	-	4	-	5	-	6
moderate	-	1	-	0	-	5	-	5	-	4
Follicle(s), cyst(s)	-	0	-	5	-	7	-	7	-	6
slight	-	0	-	2	-	2	-	4	-	3
moderate	-	0	-	2	-	4	-	1	-	2
severe	-	0	-	1	-	1	-	2	-	1
Mammary gland:										
Increased secretory material	0	0	6	6	7	5	7	8	8	7
slight	0	0	4	5	5	4	4	8	4	7
moderate	0	0	2	1	2	1	3	0	4	0
Acini, dilatation	1	0	3	0	6	0	5	0	8	0
slight	1	0	3	0	6	0	5	0	4	0
moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0
Acini, hyperplasia	0	0	1	7	1	9	3	9	1	9
slight	0	0	1	7	1	5	2	5	1	0
moderate	0	0	0	0	0	4	1	4	0	9
Acini, pigment, slight	0	0	0	2	0	2	0	6	0	1
Ducts, dilatation, slight	0	0	4	0	2	0	1	0	5	0

- Not applicable or no noteworthy findings, M: Male, F: Female

7A 反復投与毒性試験：重要な試験（つづき）

Study No. [redacted]0384 Test Article: MSJ-0011

Daily dose (IU/kg)	0 (Control)		20		200		2000		20000	
Histopathology (continued)										
Number examined	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10
Uterus:										
Mucosa, degeneration	-	0	-	0	-	5	-	3	-	8
slight	-	0	-	0	-	5	-	2	-	3
moderate	-	0	-	0	-	0	-	1	-	5
Mucosa, hyperplasia	-	1	-	0	-	7	-	5	-	10
slight	-	1	-	0	-	4	-	3	-	8
moderate	-	0	-	0	-	3	-	2	-	2
Vagina:										
Mucosa, hyperplasia	-	0	-	1	-	6	-	5	-	9
slight	-	0	-	1	-	3	-	2	-	3
moderate	-	0	-	0	-	3	-	3	-	6
Mucosa, mucification	-	3	-	4	-	7	-	9	-	9
slight	-	3	-	2	-	1	-	3	-	0
moderate	-	0	-	2	-	6	-	6	-	9
Injection site:										
Subcutaneous, inflammation – subacute, slight	1	2	0	0	0	0	0	2	2	2
Subcutaneous, perivascular mononuclear cell cuffing	0	0	0	0	0	2	0	1	1	3
slight	0	0	0	0	0	2	0	1	1	1
moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2

- Not applicable or no noteworthy findings, M: Male, F: Female

7A 反復投与毒性試験：重要な試験（つづき）

Study No. [redacted]0384 Test Article: MSJ-0011

Daily dose (IU/kg)	0 (Control)		20		200		2000		20000	
Additional examinations										
Number examined	M:16	F:16	M:16	F:16	M:16	F:16	M:16	F:16	M:16	F:16
Testosterone levels (ng/mL) Week 5	2.7	-	5.2	-	9.8	-	11.8	-	10.2	-
Estradiol levels (pg/mL) Week 5	-	8	-	4	-	78	-	120	-	296
The number of anti-hCG antibody positive animals	0	0	15	14	16	15	15	16	16	16
Postdose evaluation:										
Number exmined	M:6	F:6	M:6	F:6	M:6	F:6	M:6	F:6	M:6	F:6
Serum chemistry										
Urea (mg/dL)	33.59	37.91	34.01	40.05	31.29	44.84	32.07	43.91	33.48	45.54 *
α_1 globulins (%)	17.88	12.95	17.84	15.42 **	18.76	15.20 *	20.01	15.79 **	18.42	15.36 *
Inorganic phosphorus (mg/dL)	11.60	8.81	10.34	9.33	9.97 *	9.06	9.60 **	8.58	9.74 *	10.06
Organ weight[a] (%)										
Ovaries	-	89.5 mg	-	+19	-	+117	-	+132 **	-	+86 **
Uterus	-	0.56 g	-	+5	-	-14	-	-41 **	-	-30 *
Gross pathology										
Mammary gland:										
Increased size, slight	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2
Ovaries:										
Cyst clear	-	0	-	0	-	1	-	3	-	4
slight	-	0	-	0	-	0	-	3	-	4
moderate	-	0	-	0	-	1	-	0	-	0
Increased size	-	0	-	1	-	3	-	4	-	5
slight	-	0		1	-	2	-	3	-	5
moderate	-	0	-	0	-	1	-	1	-	0

- Not applicable or no noteworthy findings, M: Male, F: Female

a -Absolute weights differed from controls in the direction indicated. Number indicates percent difference for the absolute organ weights.

Dunnett's multiple comp. test (parametric) or Mann Whitney's "U" test (nonparametric) * - $p < 0.05$ ** - $p < 0.01$

7A 反復投与毒性試験：重要な試験（つづき）

Study No. [redacted]0384 Test Article: MSJ-0011

Daily dose (IU/kg)	0 (Control)		20		200		2000		20000	
Number examined	M:6	F:6	M:6	F:6	M:6	F:6	M:6	F:6	M:6	F:6
Histopathology										
Testes:										
Decreased spermatogenesis	0	-	3	-	3	-	4	-	2	-
slight	0	-	3	-	2	-	3	-	2	-
moderate	0	-	0	-	1	-	1	-	0	-
Germinal cells, degeneration	0	-	1	-	3	-	4	-	1	-
slight	0	-	1	-	2	-	3	-	1	-
moderate	0	-	0	-	1	-	1	-	0	-
Interstitional cells, hyperplasia, slight	0	-	0	-	5	-	4	-	4	-
Tubule(s), mineralization, slight	0	-	0	-	3	-	3	-	0	-
Tubule(s), vacuolization, slight	0	-	2	-	2	-	6	-	4	-
Epididymides:										
Decreased spermatic elements	0	-	0	-	0	-	2	-	2	-
slight	0	-	0	-	0	-	2	-	2	-
Degenerative spermatic elements	0	-	0	-	1	-	2	-	0	-
slight	0	-	0	-	1	-	1	-	0	-
moderate	0	-	0	-	0	-	1	-	0	-
Seminal vesicles:										
Glands, dilatation	1	-	2	-	1	-	4	-	3	-
slight	1	-	2	-	0	-	2	-	3	-
moderate	0	-	0	-	1	-	2	-	0	-

- Not applicable or no noteworthy findings, M: Male, F: Female

7A 反復投与毒性試験：重要な試験（つづき）

Study No. [redacted]0384 Test Article: MSJ-0011

Daily dose (IU/kg)	0 (Control)		20		200		2000		20000	
Number examined	M:6	F:6	M:6	F:6	M:6	F:6	M:6	F:6	M:6	F:6
Histopathology (continued)										
Mammary gland:										
Increased secretory material	1	1	1	0	0	1	0	3	2	3
slight	1	1	1	0	0	0	0	2	1	3
moderate	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
Acini, hyperplasia	0	1	0	0	0	4	0	5	0	4
slight	0	1	0	0	0	4	0	4	0	4
moderate	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Acini, pigment, slight	0	2	0	6	0	6	0	4	0	5
Ovaries:										
Hematocyst, slight	-	0	-	1	-	1	-	2	-	1
Corpus luteum, hypertrophy, slight	-	0	-	2	-	3	-	3	-	3
Corpus luteum, increased number	-	0	-	0	-	2	-	4	-	3
slight	-	0	-	0	-	1	-	3	-	3
moderate	-	0	-	0	-	1	-	1	-	0
Follicle, cyst(s)	-	0	-	3	-	3	-	5	-	4
slight	-	0	-	3	-	2	-	3	-	1
moderate	-	0	-	0	-	1	-	2	-	3
Uterus:										
Atrophy	-	0	-	2	-	1	-	6	-	5
slight	-	0	-	2	-	1	-	3	-	3
moderate	-	0	-	0	-	0	-	3	-	2

- Not applicable or no noteworthy findings, M: Male, F: Female

7A 反復投与毒性試験：重要な試験（つづき）

Study No. [redacted]0384 Test Article: MSJ-0011

Daily dose (IU/kg)	0 (Control)		20		200		2000		20000	
Number examined	M:6	F:6	M:6	F:6	M:6	F:6	M:6	F:6	M:6	F:6
Histopathology (continued)										
Uterus:										
Mucosa, hemorrhage, slight	-	1	-	0	-	0	-	0	-	0
Mucosa, hyperplasia, slight	-	0	-	0	-	1	-	2	-	1
Vagina:										
Mucosa, hyperplasia, slight	-	1	-	0	-	1	-	3	-	3
Mucosa, mucification	-	3	-	2	-	3	-	5	-	5
slight	-	2	-	2	-	2	-	2	-	4
moderate	-	1	-	0	-	1	-	3	-	1

- Not applicable or no noteworthy findings, M: Male, F: Female

7B 反復投与毒性試験：重要な試験

Report Title: One-month subcutaneous toxicity study in monkeys followed by 4 weeks of recovery

Test Article: MSJ-0011

Species/strain: Cynomolgus monkeys

Duration of dosing: 1 month

Study No.[redacted]0387

Initial age: approx. 2-3 years

Duration of postdose: 1 month

Location in CTD: Section 4.2.3.2.3

Date of first dose:
M:[redacted]
F :[redacted]

Method of administration: Subcutaneous

Vehicle/formulation: Saline/solution

GLP compliance: Yes

Special features: none

No observed adverse effect level: 20000 IU/kg

Daily dose (IU/kg)	0 (Control)		20		200		2000		20000	
Number of animals	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:3[a]
Toxicokinetics:										
AUC (IU· h/mL)										
Day 1	-	-	0.196	1.582	12.322	11.519	88.950	101.976	2247.950	2385.000[b] (2244.250)
Day 7	-	-	1.4725	1.841	21.456	14.963	182.490	155.025	2985.250	2409.000 (2572.200)
Day 15	-	-	1.966	2.128	27.650	32.140	812.025	749.906	4051.500	3202.000 (3115.500)
Day 24 or 26	-	-	1.403	1.271	18.440	1.405	113.500	75.800	2667.00	4445.000 (2155.500)
Noteworthy findings										
Died or sacrificed moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

- Not applicable or no noteworthy findings, M: Male, F: Female

a -Data from one of the highest dose females has not been reported since this animal developed severe anemia and leukocytosis within 2 weeks of treatment, secondary to acute malarial infection.

b -The mean AUC presented in the final study report (RBM Exp.[redacted]0387) includes data from the one animal that developed severe anemia and leukocytosis. The mean was recalculated upon exclusion of this animal. The originally reported data are provided in parentheses

7B 反復投与毒性試験：重要な試験（つづき）

Study No. [redacted]0387 Test Article: MSJ-0011

Daily dose (IU/kg)	0 (Control)		20		200		2000		20000	
Number of animals	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:3
Body weight (%[a])	2.97 kg	2.84 kg	+20	-11	+27 *	-4	+30 *	-7	+48 **	-11
Food consumption (%[a])	193.75 g	180.00 g	-4	-4	-1	0	-1	+1	-3	-1
Clinical observations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology Week 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum chemistry Week 5										
γ-glutamyl transpeptidase (IU/L)	127.93	146.86	257.46 *	130.11	314.15 **	142.96	258.02 *	137.07	209.89	118.71
Total cholesterol (mg/dL)	118.47	117.49	95.28	116.33	90.74	127.80	81.61 *	97.86	79.19 **	101.08
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ weights (%[b])										
Number examined	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:2
Thymus	3.13 g	2.43 g	-65 **	-21	-72 **	+91	-76 **	+14	-73 **	-55
Testes	1.17 g	-	+85	-	+80	-	+143	-	+1244 **	-
Prostate	0.44 g	-	+255	-	+475 **	-	+284	-	+666 **	-
Seminal vesicles	0.44 g	-	+741 **	-	+1318 **	-	+1032 **	-	+1377**	-
Ovaries	-	190.33 mg	-	+5.3	-	+43	-	-22	-	+136
Uterus	-	3.90 g	-	-28	-	-8	-	-32	-	+55

- Not applicable or no noteworthy findings, M: Male, F: Female

a -At the end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

b -Absolute weights differed from controls in the direction indicated. Number indicates percent difference for the absolute organ weights.

Dunnett's multiple comp. test (parametric) or Mann Whitney's "U" test (nonparametric) * - $p < 0.05$ ** - $p < 0.01$

7B 反復投与毒性試験：重要な試験（つづき）

Study No. [redacted]0387 Test Article: MSJ-0011

Daily dose (IU/kg)	0 (Control)		20		200		2000		20000	
Gross pathology										
Number examined	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:2
Thymus: decreased size	0	0	3	0	3	0	3	0	3	1
slight	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1
moderate	0	0	1	0	3	0	3	0	3	0
Testes: increased size, slight	0	-	0	-	0	-	0	-	3	-
Prostate: increased size	0	-	2	-	2	-	1	-	3	-
slight	0	-	2	-	1	-	1	-	1	-
moderate	0	-	0	-	1	-	0	-	2	-
Seminal vesicles: increased size	0	-	2	-	3	-	3	-	2	-
slight	0	-	2	-	2	-	3	-	0	-
moderate	0	-	0	-	1	-	0	-	2	-
Ovaries:										
Cyst clear, slight	-	0	-	1	-	2	-	0	-	0
Increased size, slight	-	0	-	0	-	0	-	0	-	1
Uterus: increased size, slight	-	0	-	0	-	0	-	0	-	1
Injection site:										
Subcutaneous, congested	1	2	1	0	2	1	0	2	1	2
slight	1	2	0	0	1	1	0	2	0	2
moderate	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0
Histopathology										
Number examined	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:2
Thymus: atrophy	1	1	3	0	3	0	3	0	3	2
slight	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1
moderate	0	0	2	0	2	0	1	0	0	1
severe	0	0	0	0	0	0	2	0	3	0

- Not applicable or no noteworthy findings, M: Male, F: Female

7B 反復投与毒性試験：重要な試験（つづき）

Study No.[redacted]0387 Test Article: MSJ-0011

Daily dose (IU/kg)	0 (Control)		20		200		2000		20000	
Histopathology (continued)										
Number examined	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:2
Testes:										
Interstitial cell(s), hyperplasia										
slight	0	-	1	-	3	-	3	-	3	-
Tubule(s), spermatogenesis	0	-	0	-	0	-	0	-	3	-
Epididymides:										
Tubule(s), spermatic elements	0	-	0	-	0	-	0	-	3	-
Prostate:										
Glands, dilation, slight	0	-	3	-	3	-	3	-	2	-
Glands, hypertrophy	0	-	3	-	3	-	3	-	3	-
slight	0	-	2	-	0	-	0	-	0	-
moderate	0	-	1	-	3	-	3	-	0	-
severe	0	-	0	-	0	-	0	-	3	-
Seminal vesicles:										
Glands, dilatation	0	-	3	-	3	-	3	-	3	-
slight	0	-	3	-	2	-	2	-	2	-
moderate	0	-	0	-	1	-	1	-	1	-
Glands, hypertrophy	0	-	3	-	3	-	3	-	3	-
slight	0	-	2	-	0	-	0	-	0	-
moderate	0	-	1	-	3	-	3	-	0	-
severe	0	-	0	-	0	-	0	-	3	-

- Not applicable or no noteworthy findings, M: Male, F: Female

7B 反復投与毒性試験：重要な試験（つづき）

Study No.[redacted]0387 Test Article: MSJ-0011

Daily dose (IU/kg)	0 (Control)		20		200		2000		20000	
Histopathology (continued)										
Number examined	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:2
Ovaries:										
Corpus luteum, increased number	-	0	-	0	-	0	-	2	-	2
slight	-	0	-	0	-	0	-	2	-	0
severe	-	0	-	0	-	0	-	0	-	2
Uterus:										
Endometrial glands, hyperplasia	-	1	-	0	-	0	-	2	-	2
slight	-	1	-	0	-	0	-	2	-	1
moderate	-	0	-	0	-	0	-	0	-	1
Vagina:										
Mucosa, hyperplasia, moderate	-	0	-	0	-	0	-	0	-	1
Submucosa, edema, moderate	-	0	-	0	-	0	-	0	-	1
Injection site:										
Perivascular mononuclear cell cuffing	2	1	3	2	3	3	3	3	3	2
slight	2	1	3	2	3	3	0	1	0	0
moderate	0	0	0	0	0	0	3	2	3	2
Subcutaneous, hemorrhage	1	2	1	0	2	0	2	1	1	0
slight	1	2	1	0	0	0	2	1	0	0
moderate	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0
Subcutaneous, inflammation acute	0	1	2	1	2	2	2	1	1	0
slight	0	1	2	1	1	2	2	1	1	0
moderate	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

- Not applicable or no noteworthy findings, M: Male, F: Female

7B 反復投与毒性試験：重要な試験（つづき）

Study No. [redacted]0387 Test Article: MSJ-0011

Daily dose (IU/kg)	0 (Control)		20		200		2000		20000	
Additional examinations										
Number examined	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:3
Mean testosterone levels (ng/mL) Day 29	n.q	-	22.6	-	55.6	-	25.5	-	50.6	-
Mean estradiol levels (pg/mL) Day 29	-	n.q.	-	n.q.	-	n.q.	-	n.q.	-	n.q.
The number of anti-hCG antibody positive animals	0	0	2	2	3	4	4	4	4	4
Postdose evaluation:										
Number examined	M:1	F:1	M:1	F:1	M:1	F:1	M:1	F:1	M:1	F:1
Gross pathology										
Thymus: decreased size	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1
slight	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1
moderate	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
Testes: increased size, slight	0	-	0	-	0	-	1	-	1	-
Prostate: increased size, slight	0	-	0	-	1	-	1	-	1	-
Seminal vesicles: increased size	0	-	0	-	1	-	1	-	1	-
slight	0	-	0	-	1	-	0	-	1	-
moderate	0	-	0	-	0	-	1	-	0	-
Ovaries:										
Dark area, slight	-	0	-	1	-	0	-	0	-	1
Increased size, slight	-	0	-	0	-	1	-	0	-	0
Uterus: increased size, slight	-	0	-	0	-	1	-	0	-	0

- Not applicable or no noteworthy findings, M: Male, F: Female, n.q.: not quantifiable (testosterone: < 0.75 ng/mL, estradiol: < 75 pg/mL)

8 In Vitro 遺伝毒性試験

8A In Vitro 遺伝毒性試験

Report Title: Study of the capacity of the test article r-hCG to induce gene mutations in Salmonella typhimurium strains and in Escherichia coli CM 891(agar plate test)

Test Article: MSJ-0011

Test for induction of: Reversion test with bacterial cells		No. of independent assays: 2	Study No.[redacted]0389
Strains: S.typhimurium and E.coli		No. of replicate cultures: 3	Location in CTD: Section 4.2.3.3.1.1
Metabolizing system: Aroclor-induced rat liver S9, 10%		No. of cells analyzed/culture: -	
Vehicles:	For test article: Pyrogen free saline	For positive controls: Water for injection: Hyd DMSO: 9-AA, 2-NF, Doxo, MMS, 2-AA, 2-AF	GLP compliance: Yes
Treatment:			Date of treatment:[redacted]
Cytotoxic effects:	None		
Genotoxic effects:	None		

8A In Vitro 遺伝毒性試験（つづき）

Study No.[redacted]0389

Test Article: MSJ-0011

Metabolic activation	Test article	Concentration or dose level	Assay 1 Revertant colony counts (mean±S.D.)					
			TA1535	TA1537	TA1538	TA98	TA100	CM891
Without activation	Saline	100 μL/plate	28±2	11±4	22±5	52±8	209±14	139±27
	MSJ-0011	165 IU/plate	26±4	10±3	19±2	47±3	189±16	125±22
	MSJ-0011	495 IU/plate	25±3	10±2	24±5	56±5	184±22	133±6
	MSJ-0011	1485 IU/plate	26±5	9±3	19±2	52±3	203±13	134±16
	MSJ-0011	4454 IU/plate	27±4	9±2	20±3	53±9	183±19	128±15
	MSJ-0011	13361 IU/plate	25±3	9±2	21±3	50±7	198±14	135±22
	Hyd	500 μg/plate	95±12 ***	-	-	-	-	-
	9-AA	40 μg/plate	-	42±5 ***	-	-	-	-
	2-NF	2.5 μg/olate	-	-	368±14***	-	-	-
	Doxo	4 μg/plate	-	-	-	928±97 ***	526±71 **	-
	MMS	325 μg/plate	-	-	-	-	-	401±77 **
With activation	Saline	100 μL/plate	26±6	9±4	21±2	58±5	213±21	177±12
	MSJ-0011	165 IU/plate	23±1	9±1	22±3	58±9	198±20	183±6
	MSJ-0011	495 IU/plate	24±4	8±3	19±3	53±7	205±6	158±17
	MSJ-0011	1485 IU/plate	25±2	8±2	21±5	58±7	196±20	171±4
	MSJ-0011	4454 IU/plate	25±5	8±2	19±2	55±4	207±15	170±19
	MSJ-0011	13361 IU/plate	24±2	9±2	19±5	54±6	189±13	161±20
	2-AA	6.25 μg/plate	137±34 **	361±46 ***	-	-	-	-
		1 μg/plate	-	-	-	-	-	686±66 ***
	2-AF	5 μg/plate	-	-	769±234 **	953±97 ***	654±64 ***	-

- Not applicable

Student's "t" test ** - $p < 0.01$ *** - $p<0.001$

Hyd: Hydrazine sulphate, 9-AA: 9-Aminoacridine HCl monohydrate, 2-NF: 2-Nitrofluorene, Doxo: Doxorubicine HCl, MMS: Methylmetanesulphonate, 2-AA: 2-Aminoanthracene, 2-AF: Aminofluorene

8A In Vitro 遺伝毒性試験（つづき）

Study No.[redacted]0389 Test Article: MSJ-0011

Metabolic activation	Test article	Concentration or dose level	Assay 2 Revertant colony counts (mean±S.D.)					
			TA1535	TA1537	TA1538	TA98	TA100	CM891
Without activation	Saline	100 μL/plate	21±2	11±2	22±5	53±12	179±17	164±42
	MSJ-0011	165 IU/plate	20±4	9±1	18±2	50±2	176±27	132±15
	MSJ-0011	495 IU/plate	18±4	9±3	20±2	45±2	150±16	149±20
	MSJ-0011	1485 IU/plate	23±5	10±2	20±3	51±10	182±7	148±41
	MSJ-0011	4454 IU/plate	22±5	10±1	18±4	52±10	173±11	148±18
	MSJ-0011	13361 IU/plate	18±5	10±3	18±5	54±2	176±16	144±18
	Hyd	500 μg/plate	90±4 ***	-	-	-	-	-
	9-AA	40 μg/plate	-	48±6 ***	-	-	-	-
	2-NF	2.5 μg/olate	-	-	594±113 ***	-	-	-
	Doxo	4 μg/plate	-	-	-	824±38 ***	486±29 ***	-
	MMS	325 μg/plate	-	-	-	-	-	535±115 **
With activation	Saline	100 μL/plate	22±3	13±3	28±4	66±11	150±21	164±28
	MSJ-0011	165 IU/plate	26±9	11±2	29±3	51±4	154±23	149±10
	MSJ-0011	495 IU/plate	25±4	8±4	24±6	51±6	138±8	153±15
	MSJ-0011	1485 IU/plate	25±4	10±4	23±5	58±5	134±14	163±31
	MSJ-0011	4454 IU/plate	22±1	10±1	22±2	59±2	149±3	162±12
	MSJ-0011	13361 IU/plate	24±4	11±2	23±5	44±6	158±13	168±22
	2-AA	6.25 μg/plate	114±17 ***	333±38 ***	-	-	-	-
		1 μg/plate	-	-	-	-	-	650±61 ***
	2-AF	5 μg/plate	-	-	967±38 ***	1405±370 **	670±53 ***	-

- Not applicable
Student's "t" test ** - $p < 0.01$ *** - $p<0.001$
Hyd: Hydrazine sulphate, 9-AA: 9-Aminoacridine HCl monohydrate, 2-NF: 2-Nitrofluorene, Doxo: Doxorubicine HCl, MMS: Methylmetanesulphonate, 2-AA: 2-Aminoanthracene, 2-AF: Aminofluorene

8B In Vitro 遺伝毒性試験

Report Title: Study of capacity of the test article r-hCG to induce gene mutations in V79 Chinese hamster lung cells

Test Article: MSJ-0011

Test for induction of: Gene mutation
No. of independent assays: 2
Study No. [redacted]390

Strains: V79 Chinese hamster lung cells
No. of replicate cultures: 8
Location in CTD: Section 4.2.3.3.1.2

Metabolizing system: Aroclor-induced rat liver S9, 25%
No. of cells analyzed/culture: -

Vehicles: For test article: Pyrogen free saline
For positive controls: Water for injection + HBSSH: EMS, DMNA
GLP compliance: Yes

Treatment:
Date of treatment: [redacted]

Cytotoxic effects: None

Genotoxic effects: None

Metabolic activation	Test article	Concentration or dose level	Assay 1 Mutant frequency (mean±S.D.) X10^6	Assay 2 Mutant frequency (mean±S.D.) X10^6
Without activation	Spontaneous		5.96±1.63	6.74±2.18
	MSJ-0011	495 IU/mL	5.96±3.55	7.61±2.41
	MSJ-0011	1485 IU/mL	4.48±0.65	6.60±4.80
	MSJ-0011	4454 IU/mL	4.89±2.01	7.73±4.35
	MSJ-0011	13361 IU/mL	6.01±1.48	7.22±0.27
	EMS	5 mM	110.66±17.79	109.33±35.40
With activation	Spontaneous		7.62±1.72	8.28±1.91
	MSJ-0011	495 IU/mL	5.53±3.90	7.36±1.17
	MSJ-0011	1485 IU/mL	4.78±0.95	7.29±4.78
	MSJ-0011	4454 IU/mL	5.37±0.46	9.77±0.10
	MSJ-0011	13361 IU/mL	6.04±2.27	7.80±0.68
	DMNA	10 mM	55.74±11.88	72.23±13.49

HBSSH: Hank's balanced salt solution with Hepes buffer, EMS: Ethylmethanesulphonate, DMNA: N-nitrosodiumethylamine

8C In Vitro 遺伝毒性試験

Report Title: Study of capacity of the test article r-hCG to induce chromosome aberrations in human lymphocytes cultured in vitro

Test Article: MSJ-0011

Test for induction of: Chromosomal aberration		No. of independent assays: 1	Study No. [redacted]392
Strains: Human lymphocytes		No. of replicate cultures: 2	Location in CTD: Section 4.2.3.3.1.3
Metabolizing system: Aroclor-induced rat liver S9, -17%		No. of cells analyzed/culture: 100	
Vehicles:	For test article: Pyrogen free saline	For positive controls: Water for injection: Mitomycin C, CP	GLP compliance: Yes
Treatment:			Date of treatment: [redacted]
Cytotoxic effects:	None		
Genotoxic effects:	None		

8C In Vitro 遺伝毒性試験（つづき）

Study No. [redacted]0392

Test Article: MSJ-0011

Metabolic activation	Test article	Concentration or dose level	No. culture	No. metaphase	Chromatid aberrations				Chromosomal aberrations				No. of cells with aberrations (%)	
					G	B	F	Exch.	G	B	F	Exch.	incl. gaps	excl. gaps
Without activation	Negative control		I + II	200	3	-	-	-	-	-	-	-	3 (1.50)	0
	MSJ-0011	495 IU/mL	I	100	2	-	-	-	-	-	-	-	2 (2.00)	0
			II	100	-	-	-	-	-	1	-	-	1 (1.00)	1 (1.00)
	MSJ-0011	1485 IU/mL	I	100	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
			II	100	2	-	-	-	-	-	-	-	2 (2.00)	0
	MSJ-0011	4454 IU/mL	I	100	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
			II	100	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
	MSJ-0011	13361 IU/mL	I	100	1	-	-	-	-	-	-	-	1 (1.00)	0
			II	100	1	-	-	-	-	-	-	-	1 (1.00)	0
	Mitomycin C	0.75 μg/mL	I	50	4	1	1	5	-	2	1	-	12 (24.00)***	9 (18.00)***
			II	50	2	1	1	6	-	3	1	-	13 (26.00)***	12 (24.00)***
With activation	Negative control		I + II	200	1	-	-	-	-	-	-	-	1 (0.50)	0
	MSJ-0011	495	I	100	1	-	-	-	-	-	-	-	1 (1.00)	0
			II	100	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
	MSJ-0011	1485	I	100	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
			II	100	-	1	-	-	-	-	-	-	1 (1.00)	1 (1.00)
	MSJ-0011	4454	I	100	1	-	-	-	-	-	-	-	1 (1.00)	0
			II	100	1	-	-	-	-	-	-	-	1 (1.00)	0
	MSJ-0011	13361	I	100	2	-	-	-	-	-	-	-	2 (2.00)	0
			II	100	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
	CP	17.25 μg/mL	I	50	1	-	1	5	-	1	-	-	7 (14.00)	6 (12.00)
			II	50	6	2	-	7	-	2	3	-	17 (34.00)	13 (26.00)

- Not found
G: Gap, B: Break, F: Fragment, Exch.: Exchange
CP: Cyclophosphamide
Chi-squared test *** $p < 0.001$

9 In Vivo 遺伝毒性試験

Report Title: Micronucleus induction in bone marrow cells of mice treated by intravenous route with the test article r-hCG

Test Article: MSJ-0011

Test for induction of: Bone-marrow micronuclei
Species/strains: CD-1 mice
Age: 5 weeks
Cells evaluated: polychromatic erythrocytes, polychromatic erythrocytes/normochromatic erythrocytes, normochromatic erythrocytes
No. of cells analyzed/animal: 2000 polychromatic cells, 1000 erythrocytes for ratio of poly- to normochromatic cells
Special features: None
Toxic/cytotoxic effects: None
Genotoxic effects: None
Evidence of exposure: None

Treatment schedule: Single dose
Sampling time: 24 and 48 hr after dosing
Method of administration: intravenous
Vehicle/formulation: Pyrogen free saline/solution

Study No. [redacted]0391
Location in CTD: Section 4.2.3.3.2.1
GLP compliance: Yes
Date of dosing: [redacted]

Test article	Dose (IU/kg)	No. of animals	24 hr from administration		48 hr from administration	
			MN-PCE/PCE[a]	PCE/NCE	MN-PCE/PCE[a]	PCE/NCE
Vehicle	0	5 M	0.800±0.837	1.069±0.227	0.600±0.894	1.092±0.222
MSJ-0011	2000	5 M	0.400±0.894	1.112±0.109	1.000±0.707	1.191±0.114
	20000	5 M	1.000±0.707	1.018±0.132	1.000±1.225	1.147±0.338
	200000	5 M	0.400±0.894	1.252±0.350	0.800±1.304	1.078±0.250
Mitomycin C	8 mg/kg	5 M	-	-	6.800±2.588 **	0.667±0.099
Vehicle	0	5 F	0.600±0.894	1.119±0.256	1.200±0.447	1.112±0.156
MSJ-0011	2000	5 F	0.800±1.304	1.118±0.354	0.800±0.837	1.396±0.191
	20000	5 F	0.600±0.894	0.939±0.177	0.800±0.837	0.907±0.263
	200000	5 F	0.600±0.548	1.051±0.209	1.200±0.447	1.000±0.091
Mitomycin C	8 mg/kg	5 F	-	-	10.200±4.438 **	0.627±0.026

- Not applicable, MN: Micronuclei, NCE: Normochromatic erythrocytes, PCE: Polychromatic erythrocytes, M: Male, F: Female
a - For the mutagenicity evaluation, 2000 polychromatic erythrocytes were counted and scored for micronucleated cells for each animal.
Mann Whitney's test ** - $p < 0.01$

10 がん原性試験

がん原性試験は実施していない。がん原性試験を実施しなかった詳細な理由はモジュール 2.4.5.1 項に示した。

11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

生殖発生毒性試験は実施していない。生殖発生毒性試験を実施しなかった詳細な理由はモジュール 2.4.5.1 項に示した。

12 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

生殖発生毒性試験は実施していない。生殖発生毒性試験を実施しなかった詳細な理由はモジュール 2.4.5.1 項に示した。

13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

生殖発生毒性試験は実施していない。生殖発生毒性試験を実施しなかった詳細な理由はモジュール 2.4.5.1 項に示した。

14 生殖発生毒性試験：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

生殖発生毒性試験は実施していない。生殖発生毒性試験を実施しなかった詳細な理由は非臨床試験の概括評価 2.4.5.1 項に示した。

15 新生児を用いた試験

新生児を用いた試験は実施していない。

16 局所刺激性試験

Test article: MSJ-0011

Species/strain	Method of administration (vehicle/formulation)	Doses (mL/injection site)	Gender and No. per group	Noteworthy findings	Study number
NZW rabbit	Subcutaneous and intramuscular	0.5 (0, 250 μg of liquid formulation or lyophilized powder)	6 males	Well tolerated, no toxicologically relevant findings	RA9580

NZW: New Zealand White

17 その他の毒性試験

その他の毒性試験は実施していない。