イデルビオン静注用 250
イデルビオン静注用 500
イデルビオン静注用 1000
イデルビオン静注用 2000

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.6　毒性試験の概要文

CSL ベーリング株式会社

目次

略語・略号一覧....4
2.6.6.　毒性試験の概要文....5
2.6.6.1.　まとめ....5
2.6.6.2.　単回投与毒性試験....5
2.6.6.2.1.　rIX-FP：SD 系ラットにおける単回静脈内（ボーラス）投与毒性試験（試験番号 APQ0005）....6
2.6.6.2.2.　rIX-FP 及び rIX-FP-B：ラットにおける単回静脈内（ボーラス）投与毒性試験並びに 5 日間回復性試験（試験番号 8244656）....6
2.6.6.2.3.　rIX-FP：カニクイザルにおける単回静脈内（ボーラス）投与毒性試験（試験番号 APQ0007）....8
2.6.6.3.　反復投与毒性試験....8
2.6.6.3.1.　rIX-FP：SD 系ラットにおける 4 週間静脈内（ボーラス）投与毒性試験及び 2 週間回復性試験（試験番号 APQ0009）....9
2.6.6.3.2.　SD 系ラットにおける 4 週間静脈内（ボーラス）投与毒性試験　中和抗体（抗ヒト FIX 抗体）アッセイ（試験番号 09097）....10
2.6.6.3.3.　rIX-FP：SD 系ラットにおける 26 週間静脈内（ボーラス）投与毒性試験及び 4 週間回復性試験（試験番号 APQ0021）....10
2.6.6.3.4.　rIX-FP：カニクイザルにおける 4 週間静脈内（ボーラス）投与毒性試験（試験番号 APQ0001）....13
2.6.6.3.5.　カニクイザルにおける 4 週間静脈内（ボーラス）投与毒性試験　中和抗体（抗ヒト FIX 抗体）アッセイ（試験番号 09089）....14
2.6.6.4.　遺伝毒性試験....17
2.6.6.4.1.　非哺乳動物細胞系での In Vitro 試験....18
2.6.6.4.2.　哺乳動物細胞系での In Vitro 試験....18
2.6.6.4.3.　哺乳動物系での In Vivo 試験....19
2.6.6.4.4.　その他の試験系....19
2.6.6.5.　がん原性試験....19
2.6.6.6.　生殖発生毒性試験....20
2.6.6.7.　局所刺激性試験....20
2.6.6.7.1.　rIX-FP：ウサギの静脈内、動脈内及び静脈周囲投与による局所刺激性試験（試験番号 APQ0008）....20
2.6.6.8.　その他の毒性試験....21
2.6.6.8.1.　ウサギにおける In Vivo 血栓形成性試験（試験番号 S22456）....21
2.6.6.9.　考察及び結論....22
2.6.6.10.　参考文献....24

表目次

表 2.6.6-1：　単回投与毒性試験 5
表 2.6.6-2：　反復投与毒性試験 9
表 2.6.6-3：　カニクイザルにおける rIX-FP 反復投与後の中和抗体、抗薬物抗体、C_{max}、AUC 及び aPTT（試験番号 APQ0001/09089） 16
表 2.6.6-4：　遺伝毒性試験 18
表 2.6.6-5：　局所刺激性試験 20
表 2.6.6-6：　その他の毒性試験 21

図目次

図 2.6.6-1:　カニクイザルの各個体における C_{max}/Dose と ADA の関係（試験番号 APQ0001） 17
図 2.6.6-2：　カニクイザルの各個体における AUC/Dose と ADA の関係（試験番号 APQ0001） 17

略語・略号一覧

略語・略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
ADA	Anti-drug-antibody	抗薬物抗体
aPTT	Activated partial thromboplastin time	活性化部分トロンボプラスチン時間
AUC	Area under the plasma concentration-time curve	血漿中濃度－時間曲線下面積
AUC_{τ}	Area under the plasma concentration-time curve during a dosing interval at steady state	定常状態時の投与間隔中の血漿中濃度－時間曲線下面積
AUC_{0-t}	Area under the plasma concentration-time curve from zero up to the last sample with quantifiable drug concentration	0 時間から最終定量可能時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
AUC_{0-24}	Area under the plasma concentration-time curve from zero up to 24 hours	0 時間から 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
blq	Below limit of quantification	定量限界未満
BU	Bethesda Units	ベセスダ単位
C_{max}	Maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
FVIIa/TF	Activated coagulation factor VII/Tissue factor	活性化血液凝固第 VII 因子／組織因子
FIX	Coagulation factor IX	血液凝固第 IX 因子
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
IU	International units	国際単位
mIU	Milli International units	ミリ国際単位
na	Not applicable	該当せず
Nab	Neutralizing antibody	中和抗体
nL	Nanoliter	ナノリットル
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level	無毒性量
NZW	New Zealand White	－
rIX-FP	Recombinant human coagulation factor IX fused to human albumin	遺伝子組換えヒト血液凝固第 IX 因子－アルブミン融合タンパク質（CSL654）
SD	Sprague Dawley	－
$t_{1/2}$	Terminal half-life	半減期
v/v	Volume per volume	容量／容量
WFI	Water for injection	注射用水

2.6.6. 毒性試験の概要文

2.6.6.1.　まとめ

毒性試験プログラムとして、げっ歯類及び非げっ歯類を用いた単回及び反復投与毒性試験を実施した。ラット及びサルで rIX-FP の薬理活性が確認されていることから、これらの動物種を用いて毒性試験を実施した。

rIX-FP は臨床で血友病 B 患者に反復投与されることから、28 日間及び 26 週間反復投与毒性試験を実施し、6 日目に途中剖検を行った。6 日目の中間評価では、抗薬物抗体（ADA）の産生は認められなかった。毒性試験に用いた低用量 75 IU/kg は当初予定された臨床最高投与量であり、この臨床投与量に対して中間用量（150 IU/kg 及び 500 IU/kg）並びに高用量（2000 IU/kg）はそれぞれ 2 倍、6.7 倍及び 26.7 倍の投与量に相当する。なお、新たな臨床最高投与量 100 IU/kg に対して、毒性試験に用いた中間用量及び高用量は、それぞれ 1.5 倍、5 倍及び 20 倍の投与量に相当する。

パイロットスケールと実生産スケールの製剤で毒性プロファイルを比較するため、ラットを用いて中間用量（500 IU/kg）で追加の単回投与毒性試験及びトキシコキネティクス測定を行った。

遺伝毒性について評価するため、細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames 試験）及び染色体異常試験の *in vitro* 試験を 2 試験実施した。

ラット及びサルを用いた単回及び反復投与毒性試験において本剤の局所刺激性について検討し、別途、ウサギを用いて局所刺激性試験を実施した。

ウサギのうっ血血栓症モデル（Wessler 試験）を用いて、潜在的な血栓形成のリスクについて検討した。本試験は、血栓形成を検討するための標準モデルである。

2.6.6.2.　単回投与毒性試験

ラット及びサルを用いて、rIX-FP の単回静脈内投与毒性試験を最高用量 500 IU/kg で実施した。

表 2.6.6-1 に単回投与毒性試験の一覧を示す。

表 2.6.6-1：　単回投与毒性試験

試験の種類／動物種・系統	試験番号	バッチ番号	使用製剤	GLP 適用
単回投与毒性試験／ラット（[redacted] (SD)）	APQ0005	[redacted]	rIX-FP	適用
単回投与毒性試験／ラット（[redacted] (SD)）	8244656	[redacted]	rIX-FP	適用
単回投与毒性試験／カニクイザル	APQ0007	[redacted]	rIX-FP	適用

2.6.6.2.1.　rIX-FP：SD 系ラットにおける単回静脈内（ボーラス）投与毒性試験（試験番号 APQ0005）

試験デザイン：

rIX-FP を [redacted] (SD)系ラットに単回静脈内（ボーラス）投与し、5 日間にわたり全身毒性及びトキシコキネティクスを評価した。各群雌雄各 5 匹のラット 3 群に、rIX-FP を 75、150 及び 500 IU/kg の用量で投与した。対照群には高用量群と同量（2.5 mL/kg）の生理食塩液を投与した。別途、対照群に雌雄各 3 匹、rIX-FP 投与群に雌雄各 9 匹を割り付け、トキシコキネティクス測定に使用した。トキシコキネティクス測定のため投与前、投与後 0.25、1、3、8、24、72 及び 120 時間に血液を採取した。

試験期間中に一般状態観察、体重及び摂餌量測定、血液学的検査、血液生化学的検査、トキシコキネティクス測定、尿検査、器官重量測定、剖検並びに病理組織学的検査を実施した。

トキシコキネティクス測定：

rIX-FP の単回静脈内投与後に、C_{max} 及び AUC は 75～500 IU/kg の範囲で用量比例的に増加した。全身曝露量に性差はみられなかった。この用量範囲における半減期（$t_{1/2}$）は、15.7～20.7 時間の範囲にあった。$t_{1/2}$、分布容積及び総血漿クリアランスに用量依存性はみられなかった。

試験所見：

試験期間中に死亡例はみられなかった。500 IU/kg 群の雌はプロトロンビン時間が対照群と比べて統計学的に有意に延長し、500 IU/kg 群の雌雄及び 150 IU/kg 群の雌で血漿カリウム濃度が対照群と比べて統計学的に有意に高値であった。これ以外には、投与に関連した所見ないしは毒性学的意義のある所見は認められなかった。

結論：

以上より、ラットに rIX-FP を最高 500 IU/kg の用量で単回静脈内（ボーラス）投与した結果、毒性を示唆する所見や投与部位の刺激性は認められず、忍容性が良好であった。本試験条件下で、NOAEL は 500 IU/kg と推定された。

2.6.6.2.2.　rIX-FP 及び rIX-FP-B：ラットにおける単回静脈内（ボーラス）投与毒性試験並びに 5 日間回復性試験（試験番号 8244656）

試験デザイン：

パイロットスケール及び実生産スケールの原薬から製造された rIX-FP の毒性を比較するため、本試験を実施した。ラットに被験物質を単回静脈内（ボーラス）投与して毒性を評価し、遅発毒性の発現及び毒性の可逆性を評価するため 5 日間の回復性試験を実施した。また、パイロットスケールから実生産スケールに移行後の、製造工程に由来する不純物（#不純物 1）濃度の増加による影響についても、被験物質の毒性プロファイルとして評価した。本試

験に使用したパイロットスケール生産の被験物質は、先に実施した試験番号 APQ0005 に使用した被験物質と同一である。

トキシコキネティクス測定：

パイロットスケール及び実生産スケールで製造した rIX-FP の全身毒性及びトキシコキネティクスを、[redacted] (SD)系ラットを用いて評価した。2 群（各群雌雄各 5 匹）の動物に、パイロットスケール又は実生産スケールの rIX-FP を 500 IU/kg の用量で投与した。対照群には生理食塩液を 2.5 mL/kg の容量で投与した。対照群に雌雄各 3 匹、各投与群に雌雄各 9 匹を割り付け、トキシコキネティクス評価に使用した。投与前、投与後 0.25、1、3、8、24、72 及び 120 時間に血液を採取した。

トキシコキネティクス測定の結果、両製剤で $t_{1/2}$、分布容積及び総血漿クリアランスに差異はみられなかった。$t_{1/2}$ は 16.8～20.5 時間の範囲であった。血漿中濃度及びトキシコキネティクスパラメーターは雌雄で同等であった。

試験所見：

試験期間中、途中死亡はみられなかった。さらに、試験期間を通して一般状態の変化はみられず、いずれの投与群においても体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学検査及び尿検査に影響は認められなかった。いずれの製造スケールの rIX-FP でも、局所的又は全身的な影響を示す剖検所見は認められなかった。

実生産スケールの rIX-FP を投与した雄で肝臓重量が増加したが、病理組織学的変化が認められなかったことから、毒性学的意義は低いと考えられた。さらに、rIX-FP を投与した動物で脾臓重量がやや増加し、病理組織学的変化と関連がみられた。大腿骨、胸骨及び脾臓で認められた病理組織学的変化は、いずれも軽度の造血亢進と関連があると考えられた。大腿骨及び胸骨では病理組織学的に骨髄脂肪の減少が観察され、この変化は投与群の雌雄で対照群より頻度が高かった。さらに、脾臓の髄外造血の程度は投与群の雄でわずかに重度であった。これらの軽微な影響について、パイロットスケール又は実生産スケールで製造された rIX-FP の投与群間で、明確な差異はみられなかった。

結論：

全体として、パイロットスケールと実生産スケールの rIX-FP を 500 IU/kg の用量で単回静脈内投与した結果、対照群と比べて有意な毒性学的変化は認められないと結論された。さらに、実生産スケールの被験物質を投与した場合には製剤中の#不純物 1　濃度が増加したにもかかわらず、パイロットスケールと実生産スケールの被験物質でトキシコキネティクスや毒性プロファイルに明らかな差異が認められなかったことから、これまでに実施した試験で示された rIX-FP の優れた安全性プロファイルが確認された。したがって、APQ0005 試験と同様に本試験における NOAEL は 500 IU/kg と推定された。

#新薬情報公開時に置き換え

2.6.6.2.3. rIX-FP：カニクイザルにおける単回静脈内（ボーラス）投与毒性試験（試験番号APQ0007）

試験デザイン：

rIX-FP をカニクイザルに単回静脈内（ボーラス）投与して、全身毒性及びトキシコキネティクスを評価した。1 日目に 3 群（各群雌雄各 3 匹）のサルに、rIX-FP を 75、150 又は 500 IU/kg の用量で単回投与した。対照群には同様に生理食塩液を投与した。各群の雌雄各 2 匹を 6 日目に、残りの各群雌雄各 1 匹を 11 日目に屠殺した。

試験期間中に一般状態観察、体重測定、血液学的検査、血液生化学的検査、トキシコキネティクス測定、尿検査、器官重量測定、剖検及び病理組織学的検査を実施した。トキシコキネティクス測定のため rIX-FP の投与前、投与後 0.25、1、5、24、72 及び 120 時間に各群の全動物から、投与後 240 時間に各群の雌雄各 1 匹から血液を採取した。

トキシコキネティクス測定：

トキシコキネティクス測定の結果、被験物質を投与した動物では rIX-FP の全身曝露が確認されたが、対照群ではいずれの動物でも検出されなかった。全投与量の範囲で各動物の $t_{1/2}$ は、14.2～71.2 時間の範囲にあった（平均値：39.8～55.9 時間）。投与後 240 時間までの値が得られた 4 匹については、各動物の $t_{1/2}$ は全投与量の範囲で 49.7～83.4 時間であった。rIX-FP の最高 500 IU/kg までの単回静脈内（ボーラス）投与により、雌雄とも投与量の増加とともに C_{max} 及び AUC_{0-t} が上昇し、曝露量は用量に比例して増加した。$t_{1/2}$、分布容積及び総血漿クリアランスについては、用量依存性は認められなかった。

試験所見：

途中死亡例はみられなかった。軽微な血液生化学的変化として、rIX-FP の 150 及び 500 IU/kg 群の雌で軽度の血漿ビリルビン高値が認められた。これ以外には、投与に関連した所見及び／又は毒性所見は認められなかった。

結論：

以上より、サルに rIX-FP を最高 500 IU/kg の用量で単回静脈内（ボーラス）投与した結果、忍容性は良好であり、毒性学的意義のある変化は認められなかった。本試験条件下で、NOAEL は 500 IU/kg と推定された。

2.6.6.3.　反復投与毒性試験

ラット及びサルに rIX-FP を 75、150 及び 500 IU/kg/日の用量で 4 週間、さらに、ラットに 500 及び 2000 IU/kg/日の用量で 26 週間連日静脈内投与し、rIX-FP の反復投与毒性を評価した。

表 2.6.6-2 に反復投与毒性試験の一覧を示す。

表 2.6.6-2：　反復投与毒性試験

試験の種類／動物種・系統	試験番号	バッチ番号	使用製剤	GLP 適用
4 週間反復投与毒性試験／ラット（[redacted] (SD)）	APQ0009	[redacted]	rIX-FP	適用
APQ0009 試験、中和抗体アッセイ	09097			適用
26 週間反復投与毒性試験／ラット（[redacted] (SD)）	APQ0021	[redacted]	rIX-FP	適用
4 週間反復投与毒性試験／カニクイザル	APQ0001	[redacted]	rIX-FP	適用
APQ0001 試験、中和抗体アッセイ	09089			適用

2.6.6.3.1. rIX-FP：SD 系ラットにおける 4 週間静脈内（ボーラス）投与毒性試験及び 2 週間回復性試験（試験番号 APQ0009）

試験デザイン：

[redacted] (SD)系ラットに rIX-FP を最長 4 週間静脈内（ボーラス）投与し、rIX-FP の全身毒性及びトキシコキネティクスを評価した。投与後 2 週間の休薬期間を設けて回復性を検討した。免疫反応が発現する前の初期毒性について検討する目的で、中間評価の一環として各群雌雄各 5 匹を 6 日目に屠殺した。3 群（各群雌雄各 10 匹及び中間屠殺各 5 匹）のラットに、rIX-FP を 75、150 及び 500 IU/kg/日の用量で投与した。対照群には、同様に高用量群と同容量の生理食塩液を投与した。さらに、対照群に雌雄各 3 匹、各投与群に雌雄各 9 匹を割り付け、これらの動物を使用してトキシコキネティクス測定を実施した。28 日目の rIX-FP 投与前、投与後 0.25、1、3、8、24、72 及び 120 時間に、トキシコキネティクス測定のための血液を採取した。投与に関連した変化の回復性を評価するため、別途、対照群及び高用量群に雌雄各 3 匹を割り付け、これらの動物に 4 週間投与後 2 週間の休薬期間を設けた。

試験期間中に一般状態観察、体重及び摂餌量測定、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、トキシコキネティクス測定、抗薬物抗体（ADA）検査、尿検査、器官重量測定、剖検並びに病理組織学的検査を実施した。

トキシコキネティクス測定及び ADA 検査：

被験物質を投与した動物では rIX-FP の全身曝露が確認されたが、対照群ではいずれの動物でも検出されなかった。rIX-FP の反復静脈内投与後に、75～500 IU/kg/日の用量範囲で AUC_{τ} と C_{max} の線形性及び用量比例性が認められた。この用量範囲で、$t_{1/2}$ は血漿中濃度の算術平均を用いた場合 15.7～27.7 時間、最高血漿中濃度を用いた場合 20.8～28.5 時間の範囲にあった。$t_{1/2}$ 及び総血漿クリアランスは用量相関性がみられず、28 日間反復投与後の血漿中濃度に性差は認められなかった。

6 日目に、ヒトアルブミン及びヒト FIX（いずれも rIX-FP の成分）に対する免疫反応は認められなかった。しかし、16 日目に rIX-FP 投与群の 3 匹で反応が認められ（ヒトアルブミンに対する反応：1 匹、ヒト FIX に対する反応：2 匹）、免疫反応が発現した可能性が示唆された。rIX-FP に対する ADA が陽性を示した動物は、16 日目の 3%から 29/30 日目には 26%に増加した。

試験所見：

投与に関連すると考えられる死亡例や一般状態の変化は認められなかった。ただし、最終投与日（28 日目）に 500 IU/kg/日群の 2 匹が死亡したが、これらの動物では体重変動に影響がみられず、病理組織学的変化も認められなかったことから、投与との関連はないと判断された。

血液学的検査では、プロトロンビン時間の平均値が 500 IU/kg/日群で 6 日目の雌雄、5 週目の雌で対照群と比べて統計学的に有意な延長を示し、5 週目の雄ではそれより軽度ながら延長がみられた。2 週間の休薬期間終了後、プロトロンビン時間は基本的に対照群と同等であった。しかしながら、軽度のプロトロンビン時間延長は毒性を示す変化ではなく、被験物質の薬理作用によるものと考えられた。これ以外には、投与に関連した変化ないしは毒性学的意義のある変化はみられなかった。

結論：

以上より、ラットに rIX-FP を最高 500 IU/kg/日の用量で静脈内（ボーラス）投与した結果、忍容性は良好であり、毒性を示唆する所見は認められなかった。28 日間の投与後、ヒトアルブミン及びヒト FIX に対する抗体産生を示す免疫反応が rIX-FP 投与群で認められ、初期反応は 16 日目に 3 匹で認められた。本試験条件下で、NOAEL は 500 IU/kg/日と推定された。

2.6.6.3.2. SD 系ラットにおける 4 週間静脈内（ボーラス）投与毒性試験　中和抗体（抗ヒト FIX 抗体）アッセイ（試験番号 09097）

抗ヒト FIX 抗体が検出された rIX-FP 投与群のラット 15 匹から採取した血漿について、FIX による凝固作用の中和活性について検討するため追加アッセイを実施した。また、参考のために対照群の 4 匹の血漿もアッセイを行った。すべての ADA 陽性のラットで rIX-FP に対する中和抗体（Nab）が産生されたことから、ADA 陽性のラットでは ADA 陰性の動物と比べて rIX-FP の曝露量は低いことが推定された。

2.6.6.3.3. rIX-FP：SD 系ラットにおける 26 週間静脈内（ボーラス）投与毒性試験及び 4 週間回復性試験（試験番号 APQ0021）

試験デザイン：

[redacted] (SD)系ラットに rIX-FP を 26 週間静脈内（ボーラス）投与し、rIX-FP の全身毒性及びトキシコキネティクスを評価した。4 週間の休薬期間を設けて回復性を検討した。本試

験は重複する 2 相から構成され、第 1 相で ADA が適切な毒性評価を妨げることが明らかとなれば、第 2 相は実施しない計画であった。しかし、毒性評価を妨げる抗体は検出されなかったことから、第 2 相を実施し両相を統合して評価及び報告した。動物に生理食塩液（対照群）、又は被験物質の rIX-FP を 500 及び 2000 IU/kg/日の用量で 26 週間連日静脈内投与した。回復性試験の動物も同様に 26 週間投与し、その後 4 週間の休薬期間を設けた。中間評価の動物は 5 日間投与し、6 日目に屠殺した。

試験期間中にトキシコキネティクス測定、ADA 検査、一般状態観察、体重及び摂餌量測定、眼科学的検査、血液学的検査（末梢血）、血液生化学的検査、尿検査、器官重量測定、剖検並びに病理組織学的検査を実施した。被験物質を投与したすべての動物について、試験期間中定期的に投与後の曝露を確認したが、詳細なトキシコキネティクス評価は第 1 相の 2000 IU/kg/日群の動物についてのみ実施した。

トキシコキネティクス測定及び ADA 検査：

rIX-FP を投与した動物で全身曝露が確認された。第 1 相の 2000 IU/kg/日群では、雌雄ともに 9 週目まで C_{max} が増加し、それぞれ 77.50 及び 71.26 IU/mL に達した。9 週目の C_{max} の雌雄平均値は 74.38 IU/mL であった。雌雄ともに 9 週から 19 週目にかけて C_{max} が徐々に低下し、結果的に 7 週目の値を下回った。各投与間隔での AUC は、雌で 13 週目（1020.20 IU•h/mL）まで、雄で 11 週目（897.31 IU•h/mL）まで増加した。13 週目の AUC の雌雄平均値は 882.86 IU•h/mL であった。その後、21 週目まで AUC はわずかに低下した。21 週目に雌雄の AUC 値はそれぞれ 911.12 及び 762.47 IU•h/mL であり、雌雄ともに再び C_{max} 及び AUC の軽度の増加がみられたが、全体的には 9 週目から 13 週目にかけて C_{max} 及び AUC の低下が始まった。

全試験期間中、ADA をモニターした。500 IU/kg/日を投与した雌の 10%で、27 週目のみ抗ヒトアルブミン抗体が検出された。これ以外の 500 IU/kg/日群の雄及び 2000 IU/kg/日群の雌雄で各抗体は検出されなかった。

予期しない結果であるが、抗ヒトアルブミン抗体が 27 週目の対照群で雄の 67%及び雌の 56%の試料から検出され、休薬後に雄の 33%及び雌の 100%で検出された。また、抗ヒト FIX 抗体が、27 週目の対照群で雄の 22%、雌の 11%に認められ、休薬後に対照群雌雄の 33%で認められた。対照群では、27 週目以前に抗体は検出されていない。抗体を有した動物の一部では、ごく低濃度の rIX-FP が検出された。対照群の動物あるいはその試料のコンタミネーションは明らかであるが、本試験の目的や信頼性に悪影響を及ぼすものではないと判断された。試料コンタミネーションの原因は不明であるが、対照群の動物に rIX-FP を誤投与した可能性が考えられる。

9 週目から 13 週目の間に始まった曝露量（C_{max} 及び AUC）の全般的な低下は ADA 反応に起因すると考えられ、それがトキシコキネティクス特性に影響し、被験物質への曝露を低下させたと仮定される。ADA 陽性動物が存在しなかったことは、循環血中 rIX-FP のマスキング効果（急速な抗原－抗体複合体の形成）による可能性が考えられ、その結果、ADA が検出

されなかった動物では血漿中 rIX-FP 濃度が低下し、それに伴い抗 rIX-FP 抗体が低下したと考えられる。しかし、トキシコキネティクス及び曝露データでは、非常に高用量の rIX-FP 投与の結果、過度の血漿中 rIX-FP 濃度がもたらされ、rIX-FP を投与した動物で 26 週間の投与期間中、十分かつ臨床的意義のある rIX-FP の曝露が確認された。

試験所見：

投与期間中、rIX-FP の 2000 IU/kg/日を投与した雌雄の動物で、対照群と比べて平均プロトロンビン時間の延長が観察された。しかし、この所見は休薬期間中に完全な回復がみられた。活性化血液凝固第 VII 因子／組織因子（FVIIa/TF）複合体による第 X 因子の活性化において、高濃度の第 IX 因子が第 X 因子の競合物質となることから、本所見はプロトロンビン時間アッセイに対する rIX-FP の影響の可能性が考えられる。したがって、本所見は高濃度の第 IX 因子によるアッセイの干渉が関連する可能性が考えられる（Lefkowitz et al., 1993）。

対照群を含むすべての群の動物で尾部の静脈内投与部位に、血管周囲炎、血管内皮炎及び血栓並びに血管内皮炎などの病理組織学的変化が観察された。これらの変化は投与手法により引き起こされた可能性が考えられ、被験物質投与群では投与により最小限の悪化が考えられる。しかし、これらの変化はすべて有害変化とは考えられず、4 週間休薬後に完全に回復あるいは回復傾向が認められた。

本試験では、対照群の動物 2 匹（動物番号 13 及び 116）、並びに rIX-FP 投与群の動物 3 匹（動物番号 23、106 及び 145）の合計 5 匹が安楽死又は死亡後に発見されたが、以下に示す死亡に至るまでの背景から、いずれも rIX-FP 投与に起因する死亡ではないと考えられた。

動物番号 116（対照群の雌）は、12 日目の死亡前の約 10 秒間に不安定な歩行が観察された。病理組織学的検査では、肝臓及び静脈内投与部位に変化が認められた。対照群の動物であり rIX-FP を投与していないことから、rIX-FP 投与に起因する死亡ではないと判断した。

動物番号 13（対照群の雄）は、不整呼吸、活動性低下及び一般状態の悪化が認められため、動物愛護の観点から 140 日目に安楽死させた。肉眼的病理所見として複数の器官に肥大が観察され、造血系器官のリンパ肉腫からの多発性転移の可能性が考えられた。この所見が安楽死させた主な原因であり、対照群の動物であることから、rIX-FP 投与に起因する死亡ではないと判断した。

動物番号 145（2000 IU/kg/日群の雌）は、1 日目の投与で拘束チューブから外した後に死亡した。病理組織学的検査では、静脈内投与部位に皮下出血が認められた。死因は特定されなかったが、動物が投与中の拘束に慣れておらず、投与によるストレスが死亡の要因となった可能性が考えられる。投与部位の軽微な皮下出血を除き、病理組織学的変化が認められなかったことからも、投与中の拘束に起因する死亡である可能性が支持される。

動物番号 23（500 IU/kg/日群の雄）は、40 日目の死亡発見の前に一般状態の変化はみられなかった。病理組織学的検査では、肺及び脳脈絡叢の炎症性変化、静脈内投与部位からの出血、並びに膵臓、舌及び腎臓に変化が認められた。死亡を説明する主な要因は特定されなかったが、病理組織学的所見が当該試験の多くの動物で認められる所見と一致せず、本例のみ

に認められる所見であることから、rIX-FP 投与の結果というより、むしろ偶発的要因による死亡と考えられた。

動物番号 106（2000 IU/kg/日群の雌）は、173 日目の死亡発見の前に一般状態の変化はみられなかった。病理組織学的検査では、肺の血管周囲の炎症性細胞浸潤、泡沫状肺胞マクロファージ集積及び肉芽腫、並びに静脈内投与部位の血管壁変性／壊死及び血栓等の変化が認められた。肺の病理組織学的変化は被験物質又は対照物質の静脈内投与に関連する可能性が高く、投与手法に起因すること、その結果、肺の炎症性細胞浸潤、肺胞マクロファージ集積及び肉芽腫が死亡の一因となった可能性が考えられた。また、投与部位の病理組織学的所見は静脈内投与でみられる所見と一致しており、血栓の存在は、肺所見が静脈内投与の手法に起因する二次的変化であることを示唆している。したがって、本例の死亡は rIX-FP 投与と関連がないと考えられた。

評価した他のパラメーターには、投与に関連すると考えられる所見は認められなかった。

結論：

以上より、rIX-FP を [redacted] (SD)ラットに 2000 IU/kg/日の用量で 5 日間、又は 500 及び 2000 IU/kg/日の用量で 26 週間静脈内（ボーラス）投与した結果、忍容性が良好であった。rIX-FP 投与に関連する毒性所見は認められなかった。無毒性量（NOAEL）は 2000 IU/kg/日と推定された。

2.6.6.3.4. rIX-FP：カニクイザルにおける 4 週間静脈内（ボーラス）投与毒性試験（試験番号 APQ0001）

試験デザイン：

カニクイザルに rIX-FP を静脈内（ボーラス）投与し、全身毒性及びトキシコキネティクスを 4 週間にわたり評価し、6 日目に中間評価を行った。3 群（各群雌雄 4 匹）のサルに rIX-FP を 75、150 及び 500 IU/kg/日の用量で最長 4 週間投与した。中間屠殺の動物には 5 日間投与し、それ以外の動物には 28 日間投与した。対照群には、同様に高用量群と同容量の生理食塩液を投与した。各群とも中間評価時（6 日目）に雌雄各 1 匹、28 日間投与の 1～2 日後（29 日目及び 30 日目）に雌雄各 2 匹、残りの雌雄各 1 匹を 38 日目に屠殺した。

試験期間中に一般状態観察、体重測定、眼科学的検査、心電図検査、血圧測定、血液学的検査、血液生化学的検査、トキシコキネティクス測定、ADA 検査、尿検査、器官重量測定、剖検並びに病理組織学的検査を実施した。

トキシコキネティクス測定及び ADA 検査：

トキシコキネティクス測定のため、血液の採取を以下のように実施した。

1 日目：投与前、投与後 0.25、1、5、24 時間（24 時間後の採血は 2 日目の投与前）及び投与後 72 時間（72 時間後の採血は 4 日目の投与前）、全動物が対象。

28 日目：投与前、投与後 0.25、1、5 及び 24 時間、各群とも中間屠殺後の残りの雌雄各 3 匹が対象。

28 日目：投与後 48、72、120 及び 240 時間、各群とも残りの雌雄各 1 匹が対象。

被験物質を投与した動物では rIX-FP の全身曝露が確認されたが、対照群ではいずれの動物でも検出されなかった。全投与量における各動物の $t_{1/2}$ は、1 日目が 14.0～28.9 時間（平均値：16.6～25.2 時間）、28 日目が 17.7～45.7 時間（平均値：18.6～33.3 時間）の範囲であった。例外として、500 IU/kg/日群の雄 1 匹は全身クリアランスが上昇した結果、28 日目に $t_{1/2}$ が 3.0 時間であったが、これは主として抗ヒトアルブミン抗体が上昇した結果と考えられた。28 日目の投与後 240 時間までの値が得られた 5 匹については、各動物の $t_{1/2}$ は全投与量の範囲で 21.6～69.1 時間であった。雌雄とも投与量の増加とともに C_{max} 及び AUC_{0-24}（1 日目）、AUC_{τ}（28 日目）が上昇し、単回及び反復投与後の曝露量は用量に比例して増加した。$t_{1/2}$ 及び総血漿クリアランスについては、用量依存性は認められなかった。反復投与後に雌雄とも 2～3 倍の曝露量上昇がみられ、蓄積性が認められた。試験期間を通して rIX-FP の持続的曝露が認められ、性差はみられなかった。ラットと同様に、多くの動物で抗ヒト FIX 抗体の産生が認められ、500 IU/kg/日群の 1 匹で抗ヒトアルブミン抗体の産生が認められた。全体として、14 日目には rIX-FP を投与した動物の 17%で抗 rIX-FP 抗体が陽性であったのに対し、28 日目には 67%が陽性であった。対照群では抗体陽性の動物はみられなかった。

試験所見：

途中死亡例はみられなかった。

500 IU/kg/日群の雄 1 匹で 3 週目以降、150 IU/kg/日群の雄 1 匹で 6 日目に aPTT の延長が認められたが、これらは薬理作用に起因する変化と考えられた。これ以外には、投与に関連した変化ないしは毒性学的意義のある変化はみられなかった。

結論：

以上より、サルに rIX-FP を最高 500 IU/kg/日の用量で最長 28 日間静脈内（ボーラス）投与した結果、忍容性は良好であり、有害な変化は認められなかった。rIX-FP を投与した多くの動物で抗ヒト FIX 抗体の産生が認められ、500 IU/kg/日群の 1 匹で抗ヒトアルブミン抗体の産生が認められた。本試験条件下で、NOAEL は 500 IU/kg/日と推定された。

2.6.6.3.5. カニクイザルにおける 4 週間静脈内（ボーラス）投与毒性試験　中和抗体（抗ヒト FIX 抗体）アッセイ（試験番号 09089）

抗ヒト FIX 抗体が検出された rIX-FP 投与群のサル 12 匹から採取した血漿について、FIX による凝固作用の中和活性について検討するため追加アッセイを実施した。また、参考のために対照群の 6 匹の血漿についてもアッセイを行った。分析した rIX-FP 投与群の 12 検体中 2 検体は対照群と同程度の抗体活性を示したことから、中和抗体（Nab）の産生は認められなかったと判断された。7 検体では、軽度の Nab 産生（対照群の最大 BU/mL の 1～2 倍）が観

察された。12 検体中 3 検体のみ、やや高濃度の Nab（対照群の最大 BU/mL の 2 倍超）が検出された。

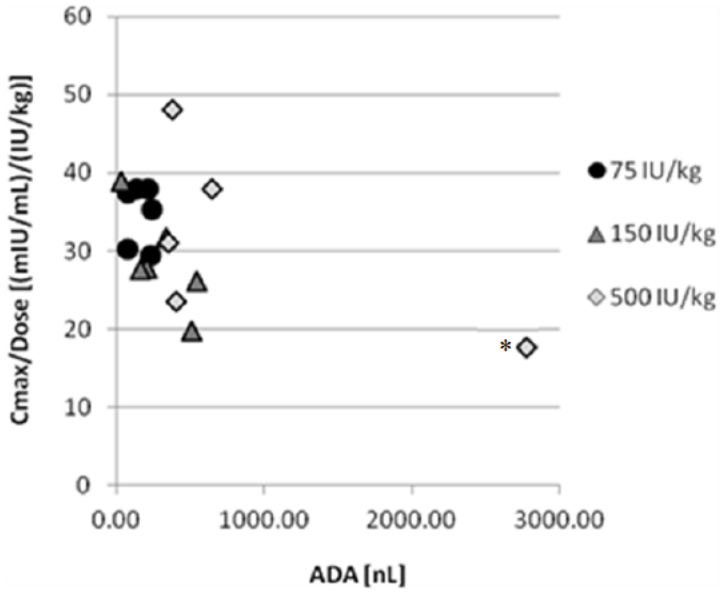
カニクイザルにおける曝露量データ（試験番号 APQ0001）より、表 2.6.6-3、図 2.6.6-1 及び図 2.6.6-2 にみられるように、ADA 産生の認められたサルは、C_{max}（R^2=0.25）及び AUC（R^2=0.53）に関して rIX-FP の血漿中濃度が低下することが示唆された。28 日間の反復投与により 500 IU/kg/日群では、ADA の存在下で C_{max} 及び AUC がそれぞれ最大 23%及び 40%低下した。曝露量については、ADA 濃度との相関が明瞭に認められたが、Nab の存在とは関連はみられなかった。rIX-FP の曝露量は明らかに ADA 濃度と相関するが、Nab の存在との関連がみられなかった。ADA は Nab よりクリアランスの決定要因として関連が深いと考えられ、rIX-FP の曝露量減少は Nab を介した rIX-FP の中和のみで行われるのではなく、ADA による抗原抗体複合体の形成とそれに続く急速なオプソニン化によっても rIX-FP のクリアランスが増加すると考えられた。

表 2.6.6-3：　カニクイザルにおける rIX-FP 反復投与後の中和抗体、抗薬物抗体、C_{max}、AUC 及び aPTT（試験番号 APQ0001/09089）

投与量	動物番号	28 日目									
		中和抗体 (BU/mL)		抗薬物抗体 (nL)		C_{max} (mIU/mL)		AUC (mIU•h/mL)		aPTT (秒)	
0	751	na		na		na		na		na	
	753	3.38		blq		na		na		25.3	
	755	4.00		blq		na		na		26.1	
	757	3.66		blq		na		na		29.2	
	752	na		na		na		na		na	
	754	3.64		blq		na		na		23.7	
	756	3.96		blq		na		na		25.8	
	758	2.80		24.26		na		na		26.9	
	Mean ± S.D.	3.57	0.44	#na	#na	#na	#na	#na	#na	26.17	1.83
75	759	na		na		na		na		na	
	761*	3.64		236.32*		2201.50		41126.25		29.3	
	763*	4.48**		212.62*		2842.75		40652.47		32.3	
	765	na		77.55		2264.00		45647.63		31.0	
	760	na		na		na		na		na	
	762	na		79.61		2809.75		47477.44		25.4	
	764*	6.24**		241.56*		2645.25		48725.06		25.9	
	766	na		134.81		2844.25		56087.31		23.9	
	Mean ± S.D.	4.79	1.33	163.75	76.23	2601.25	295.40	46619.36	5683.92	27.97	3.38
150	767	na		na		na		na		na	
	769*	4.96**		336.28*		4764.25		89640.75		23.4	
	771*	5.84**		547.32*		3913.00		76106.69		23.7	
	773*	3.40		210.65*		4162.25		75445.56		23.7	
	768	na		na		na		na		na	
	770	na		31.20		5826.75		109120.75		25.2	
	772	na		162.36		4154.00		71976.00		24.8	
	774*	5.04**		505.53*		2968.75		54955.31		32.6	
	Mean ± S.D.	4.81	1.02	298.89	201.94	4298.17	949.61	79540.84	18260.44	25.57	3.52
500	775	na		na		na		na		na	
	777	na		39.81		20550.75		411412.38		25.6	
	779*	11.36***		377.73*		24003.25		397917.06		31.1	
	781*	9.44***		2779.40*		8934.25		54639.84		70.7	
	776	na		na		na		na		na	
	778*	8.80***		401.27*		11750.50		172845.13		27.1	
	780*	7.84**		648.11*		18994.25		320084.81		26.7	
	782*	4.96**		349.76*		15548.00		282677.31		23.7	
	Mean ± S.D.	8.48	2.35	766.01	1005.19	16630.17	5648.57	273262.76	137684.15	34.15	18.07

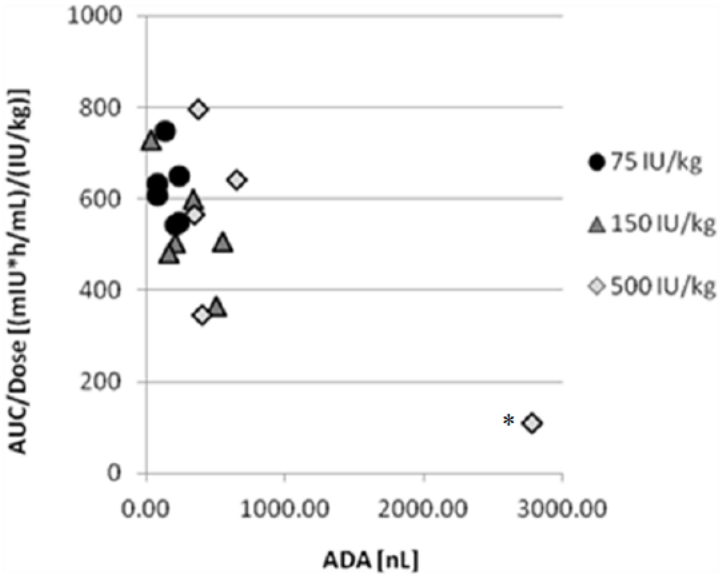
*　ADA 陽性動物　　S.D.　標準偏差
**　Nab　対照群の 1～2 倍　　na　該当せず
***　Nab　対照群の 2 倍超　　blq　定量限界未満

図 2.6.6-1:　カニクイザルの各個体における C_{max}/Dose と ADA の関係（試験番号 APQ0001）



*：動物番号 781（雄）、ADA：2779.40 nL

図 2.6.6-2:　カニクイザルの各個体における AUC/Dose と ADA の関係（試験番号 APQ0001）



*：動物番号 781（雄）、ADA：2779.40 nL

2.6.6.4.　遺伝毒性試験

細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames 試験）及び染色体異常試験の 2 種の *in vitro* 遺伝毒性試験を実施した。

表 2.6.6-4 に遺伝毒性試験の一覧を示す。

表 2.6.6-4：　遺伝毒性試験

試験の種類／試験系	試験番号	バッチ番号	使用製剤	GLP 適用
復帰突然変異試験／ネズミチフス菌、大腸菌	APQ0004	[redacted]	rIX-FP	適用
染色体異常試験／ヒトリンパ球	APQ0006	[redacted]	rIX-FP	適用

2.6.6.4.1.　非哺乳動物細胞系での In Vitro 試験

2.6.6.4.1.1.　rIX-FP：細菌を用いる復帰突然変異試験（試験番号 APQ0004）

Ames ら（Ames et al., 1975、Maron et al., 1983）の方法を用いる *in vitro* 試験により、rIX-FP の遺伝毒性を評価した。ネズミチフス菌のヒスチジン要求性変異株 TA1535、TA1537、TA98、TA100 及び大腸菌のトリプトファン要求性変異株 WP2 *uvrA*（pKM101）に、注射用水（WFI）に溶解し生理食塩液で希釈した rIX-FP を曝露した。陰性対照として生理食塩液を使用した。

フェノバルビタール及び 5,6-ベンゾフラボンを投与したラットから採取した肝ホモジネート（S9 mix）の存在下及び非存在下、独立した突然変異試験を 2 試験実施した。第 1 試験はプレート法、第 2 試験はプレインキュベーション法を用いた。

rIX-FP の濃度 0.1～200 IU/プレートの範囲で検討した。200 IU/プレートは、被験物質調製手順に基づく調製可能な最高濃度であり、各国規制当局の遺伝毒性試験ガイドラインで推奨されている基準に準拠している。これ以外の濃度は、最高濃度から希釈した一連の濃度を用いた。

rIX-FP の曝露によりいずれの試験においても試験菌株に毒性はみられず、rIX-FP の各濃度で突然変異誘発性を示すエビデンスは認められなかった。

陽性対照物質の結果から、本試験の感度及び肝ホモジネートの代謝活性が確認された。したがって、細菌を用いる復帰突然変異試験において、rIX-FP は本試験条件下で遺伝毒性を示さなかった。

2.6.6.4.2.　哺乳動物細胞系での In Vitro 試験

2.6.6.4.2.1.　rIX-FP：ヒトリンパ球を用いる In Vitro 染色体異常試験（試験番号 APQ0006）

rIX-FP の染色体異常誘発性を評価するため、*in vitro* で培養したヒトリンパ球を用いて染色体異常試験を実施した。

全血培養中のヒトリンパ球にフィトヘマグルチニンを添加することにより刺激して分裂させ、ラット肝由来の S9 mix の存在下及び非存在下で被験物質を曝露した。本試験では、被験物質に加えて陰性対照及び陽性対照の培養も実施した。培養期間終了の 2 時間前に Colcemid® を用いて細胞分裂を阻止し、採取した細胞をスライドに作製して、分裂中期細胞の染色体損傷を調べた。

rIX-FP の培養ヒトリンパ球に対する毒性を検討するため、被験物質及び陰性対照で処理したすべての培養について分裂指数を評価した（希釈液：生理食塩液）。濃度選択の根拠として、被験物質調製手順に基づいて調製可能な最高濃度 200 IU/mL を最高用量とした。これらのデータに基づき、分裂中期細胞の分析のための最高濃度として、以下の 3 濃度を設定した。

第 1 試験：

S9 mix 非存在下－3 時間処理、18 時間の回復：7.2、12、20 IU/mL

S9 mix（2% v/v）存在下－3 時間処理、18 時間の回復：7.2、12、20 IU/mL

第 2 試験：

S9 mix 非存在下－21 時間連続処理：7.2、12、20 IU/mL

S9 mix（5% v/v）存在下－3 時間処理、18 時間の回復：7.2、12、20 IU/mL

いずれの試験においても、S9 mix の存在下／非存在下にかかわらず rIX-FP のすべての濃度において、染色体異常を示す分裂中期細胞の比率は陰性対照と比較して統計学的に有意な増加は認められなかった。また、いずれの試験においても分裂中期細胞で統計学的に有意な倍数性細胞の増加は認められなかった。

すべての陽性対照が統計学的に有意な染色体異常を有する細胞の増加を誘発したことから、試験系の感度及び S9 mix の代謝活性が確認された。

以上より、*in vitro* 染色体異常試験において、rIX-FP が本試験条件下で染色体の構造的異常を誘発させることを示すエビデンスは認められなかった。

2.6.6.4.3.　哺乳動物系での In Vivo 試験

試験は実施していない。

2.6.6.4.4.　その他の試験系

試験は実施していない。

2.6.6.5.　がん原性試験

rIX-FP の有効成分は、天然のヒト血漿タンパク質の遺伝子組換えタンパク質である。rIX-FP は DNA との直接的な相互作用がないことから DNA 損傷は予測されず、DNA 結合タンパク質との相互作用もないことから、rIX-FP は変異原性を示さず、その結果として発がん性も有さないことが予測される。この予測に一致して、rIX-FP は 2 種の *in vitro* 遺伝毒性試験で遺伝毒性を示さず（CTD M2.6.6.4.1.1 及び M2.6.6.4.2.1、参照）、ラット及びカニクイザルを用いた反復投与毒性試験の病理学的検査において、発がん性を懸念するエビデンスやその根拠もみられなかった（CTD M2.6.6.3.1、M2.6.6.3.3 及び M2.6.6.3.4、参照）。また、他の FIX 製剤（血漿由来及び遺伝子組換え）の臨床使用経験からも、発がん性を示すエビデンスは認められない。このような事実や本剤が臨床で補充療法として使用されることから、rIX-FP のがん原性試験を実施する必要はないと判断した。

この結論は、バイオ医薬品においては標準的ながん原性試験は一般的に不適当であると示唆している ICH-S6(R1)ガイドラインの主旨と一致する。また、ICH-S1A ガイダンスによると、内因性物質を補充療法（すなわち生理的レベル）として適用する場合、これと同等な遺伝子組換えタンパク質である rIX-FP に対して、がん原性試験が必要になるとは考えられない。加えて、ヒトアルブミンと融合した rFIX は、アルブミン非融合の rFIX と比べても、薬力学的

活性（CTD M2.6.2.2.3 及び M2.6.2.2.4、参照）、体内分布あるいは異化作用（CTD M2.6.4.4.1 及び M2.6.4.6.1、参照）に有意な影響を及ぼさなかったことから、両者の生物学的活性に有意な差異は認められない。ヒトにおける FIX の局所的濃度又は全身的濃度（薬理学的活性レベル）を超えて、rIX-FP 濃度が上昇することは想定されない。

2.6.6.6.　生殖発生毒性試験

rIX-FP に含まれるタンパク質（ヒト FIX 及びヒトアルブミン）は、ヒトの体内に本来存在する構造及び機能がよく知られたタンパク質であることから、生殖発生毒性試験の実施は不要とした。また、単回投与及び反復投与毒性試験において生殖機能への影響を示唆する変化はみられず、生殖毒性、発生毒性、胚・胎児毒性あるいは幼若動物に対する毒性を評価する特殊毒性試験が必要となる所見も認められなかった。なお、単回投与毒性試験及び反復投与毒性試験（ラット及びサル）において、雌雄の生殖器の肉眼的・病理組織学的検査を実施しており、これらの組織への影響を示唆する所見は認められなかった。また、本剤は生体内に存在するタンパク質の補充療法として使用されることから、患者の年齢にかかわらず全般的な安全性に関する懸念はないと考えられる。幼若動物の発達に及ぼす影響を評価するため、数ヵ月にわたり幼若ラットに反復静脈内投与することは技術的に困難であることから、幼若動物を用いた毒性試験は実施しなかった。

2.6.6.7.　局所刺激性試験

ウサギを用いて rIX-FP の静脈内、動脈内及び静脈周囲単回投与による局所刺激性試験を実施した（表 2.6.6-5、参照）。また、ラット及びサルを用いた単回投与毒性試験、反復投与毒性試験において、投与局所に対する影響を検討した。これらの試験では、被験物質に関連した局所刺激性は認められなかった。

表 2.6.6-5 に実施した局所刺激性試験を示す。

表 2.6.6-5：　局所刺激性試験

試験の種類／動物種・系統	試験番号	バッチ番号	使用製剤	GLP 適用
局所刺激性／NZW ウサギ	APQ0008	[redacted]	rIX-FP	適用

2.6.6.7.1.　rIX-FP：ウサギの静脈内、動脈内及び静脈周囲投与による局所刺激性試験（試験番号 APQ0008）

ウサギを用いて、臨床適用経路（静脈内）及び臨床上誤投与の可能性のある投与経路（動脈内又は静脈周囲）で rIX-FP の局所刺激性を評価した。

各群 4 匹の雌 NZW ウサギ 3 群に rIX-FP を投与した。

第 1 群：4 匹の右外側耳介静脈に、1.2 mL の rIX-FP を単回静脈内注射した（1 日目）。同様に 4 匹の左外側耳介静脈に生理食塩液を 1.2 mL 投与し、対照群とした。

第 2 群:4 匹の右耳介中央動脈に 1.3 mL の rIX-FP を血流と反対方向に単回動脈内注射した（1 日目）。同様に 4 匹の左耳介中央動脈に生理食塩液を 1.3 mL 投与し、対照群とした。

静脈内又は動脈内投与した液量は、臨床用量 75 IU/kg と同液量又はそれを上回る液量とした。

第 3 群:4 匹の右外側耳介静脈に沿って 0.2 mL の rIX-FP を単回静脈周囲注射した（1 日目）。同様に 4 匹の左外側耳介静脈に沿って生理食塩液を 0.2 mL 投与し、対照群とした。

すべての動物について 4 日間観察を行った。

観察期間中、いずれの動物にも毒性徴候及び一般状態の変化はみられず、体重にも投与の影響は認められなかった。いずれの投与経路においても、rIX-FP の注射部位に局所刺激性は認められなかった。投与 24 時間後に対照群の 1 匹で、動脈内注射部位に極めて軽度の紅斑が認められた。rIX-FP 及び生理食塩液のいずれにも認められた注射部位の変色は一般的にみられる変化であり、投与手技に起因するものと判断された。

投与に起因した肉眼的・病理組織学的所見は認められなかった。

ウサギにおいて rIX-FP の静脈内、動脈内及び静脈周囲投与での忍容性は良好であり、投与局所及び全身に投与に反応した所見は認められなかった。観察期間中に認められた変化及び肉眼的、病理組織学的所見は投与手技によるものと判断された。

2.6.6.8.　その他の毒性試験

FIX は血液凝固カスケードの酵素前駆体である。潜在的な血栓形成のリスクを評価するために、ウサギを用いて Giles の変法による Wessler モデル試験（Giles et al., 1980、Wessler et al., 1955）を実施した。本試験では静脈うっ血後の血栓形成について検討した。

表 2.6.6-6 に実施した試験を示す。

表 2.6.6-6：　その他の毒性試験

試験の種類／動物種・系統	試験番号	バッチ番号	使用製剤	GLP 適用
血栓形成性試験／NZW ウサギ	S22456	[redacted]	rIX-FP	適用

2.6.6.8.1.　ウサギにおける In Vivo 血栓形成性試験（試験番号 S22456）

ウサギを用いた静脈うっ血モデル（Wessler 試験）により、rIX-FP の血栓形成性を検討した。各群雌雄各 3 匹の NZW ウサギ 3 群に、rIX-FP を 75、150 及び 500 IU/kg の用量で静脈内投与した。対照群には生理食塩液を投与した。被験物質又は生理食塩液の投与後に頸静脈を結紮した。10 分及び 20 分後に、左右の頸静脈における血栓形成をスコア法により評価した。

本試験の結果、rIX-FP の 75、150 又は 500 IU/kg の静脈内投与により血栓形成性は認められなかった。

2.6.6.9.　考察及び結論

ラット及びサルに rIX-FP を最高 500 IU/kg の用量で単回静脈内投与した結果、忍容性は良好であり、毒性学的意義のある変化は認められなかった。NOAEL はいずれの動物種とも 500 IU/kg と推定された。パイロットスケール及び実生産スケールで製造した rIX-FP をラットに 500 IU/kg の用量で単回静脈内投与した結果、製造工程の変更に伴う製剤の安全性プロファイルへの影響は認められなかった。

ラットに rIX-FP を最高 500 IU/kg/日の用量で、最長 28 日間静脈内投与した結果、忍容性は良好であり、有害な作用を示唆する所見は認められなかった。28 日間の投与後、ヒトアルブミン及びヒト FIX に対する抗体産生を示す免疫反応が rIX-FP 投与群で認められ、初期反応は 16 日目に 3 匹で観察された。本試験条件下での NOAEL は 500 IU/kg/日と推定された。

ラットに rIX-FP を 2000 IU/kg/日の用量で 5 日間、又は 500 及び 2000 IU/kg/日の用量で 26 週間静脈内（ボーラス）投与した結果、忍容性が良好であった。26 週間の投与期間を通して rIX-FP の十分な全身曝露が維持されたが、rIX-FP 投与に関連する毒性所見は認められなかった。NOAEL は 2000 IU/kg/日と推定された。

サルに rIX-FP を最高 500 IU/kg/日の用量で、最長 28 日間静脈内投与した結果、忍容性は良好であり、毒性学的変化は認められなかった。rIX-FP を投与した多くの動物で抗ヒト FIX 抗体の産生が認められ、500 IU/kg/日群の 1 匹で抗ヒトアルブミン抗体の産生が観察された。本試験条件下での NOAEL は 500 IU/kg/日と推定された。

rIX-FP はラット及びサルの反復投与毒性試験において、最高 500 IU/kg/日までの投与量で多くの動物で rIX-FP に対する ADA の産生を特徴とする強い免疫反応を引き起こし、曝露量の減少につながることが明らかとなった。rIX-FP をラットに 2000 IU/kg/日の用量で投与した場合、ADA 産生の兆候がみられた。しかし、おそらく循環血中 rIX-FP のマスキング効果（急速な抗原－抗体複合体の形成）のために ADA を直接検出することができず、結果として血漿中 rIX-FP 濃度がわずかに低下し、検出できるほどの抗 rIX-FP 抗体が血漿中に存在しなかったと考えられる。

ウサギにおいて rIX-FP の静脈内、動脈内及び静脈周囲投与での忍容性は良好であり、投与局所の所見及び全身症状は認められなかった。

ウサギの Wessler うっ血モデルを用いて、rIX-FP の血栓形成性を評価した。rIX-FP は、検討した 3 用量（75、150 及び 500 IU/kg）で血栓形成性を示さなかった。

細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames 試験）及び哺乳類細胞（ヒトリンパ球）を用いる *in vitro* 染色体異常試験により、rIX-FP の遺伝毒性を検討した。細菌を用いた試験系で rIX-FP の変異原性を示すエビデンスは認められず、さらに、*in vitro* 細胞遺伝学的試験においても rIX-FP が染色体の構造的異常を誘発させることを示すエビデンスは認められなかった。

結論として、非臨床毒性試験及び安全性薬理試験により rIX-FP の優れた安全性プロファイルが示された。予定する臨床最高投与量及び非臨床試験での最高投与量 2000 IU/kg で、それぞれの曝露量に基づく安全域から、臨床用量で有害作用は発現しないと判断することが妥当

と考えられる。特に、C_{max} は rIX-FP の凝固活性に関連した有害作用の重要な指標であり、動物の曝露量は当初予定された臨床最高投与量におけるヒトの曝露量の最大 91 倍に相当し、また、臨床投与量 75 IU/kg におけるヒトの C_{max} から線形外挿した、現在予定する臨床最高投与量 100 IU/kg における C_{max} の最大 68 倍に相当することから、臨床での安全性は担保されると考えられた。したがって、rIX-FP は血友病 B 患者の治療に安全に使用できることが示唆された。

2.6.6.10. 参考文献

Ames BN, McCann J, Yamasaki, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test. Mutation Res. 1975; 31, 347-364.

Giles AR, Johnston M, Hoogendoorn H, Blajchman M, Hirsh J. The thrombogenicity of prothrombin complex concentrates: I. The relationship between in vitro characteristics and in vivo thrombogenicity in rabbits. Thromb Res. 1980; 17(3-4), 353-366.

Lefkowitz JB, Monroe DM, Kasper CK, Roberts HR. Comparison of the behavior of normal factor IX and the factor IX Bm variant Hilo in the prothrombin time test using tissue factors from bovine, human, and rabbit sources. Am J Hematol. 1993; 43(3), 177-182.

Maron DM, Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Res. 1983; 113, 173-215.

Wessler S, Ward K, Ho C. Studies in intravascular coagulation. III. The pathogenesis of serum-induced venous thrombosis. J.C.I. 1955; 34, 647-651.

イデルビオン静注用 250
イデルビオン静注用 500
イデルビオン静注用 1000
イデルビオン静注用 2000

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.7　毒性試験概要表

CSL ベーリング株式会社

目次

略語・略号一覧 4
2.6.7.　毒性試験概要表 5
2.6.7.1.　毒性試験：一覧表 5
2.6.7.2.　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表 7
2.6.7.3.　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧 8
2.6.7.4.　毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧 11
2.6.7.5.　単回投与毒性試験 13
2.6.7.6.　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 14
2.6.7.7.　反復投与毒性試験：重要な試験 15
2.6.7.8.　In Vitro 遺伝毒性試験 27
2.6.7.9.　In Vivo 遺伝毒性試験 34
2.6.7.10.　がん原性試験 34
2.6.7.11.　生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 34
2.6.7.12.　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 34
2.6.7.13.　生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 34
2.6.7.14.　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 34
2.6.7.15.　幼若動物を用いた試験 34
2.6.7.16.　局所刺激性試験 35
2.6.7.17.　その他の毒性試験 36

表目次

表 2.6.7-1：　毒性試験一覧表 5
表 2.6.7-2：　トキシコキネティクス試験の一覧表 7
表 2.6.7-3：　トキシコキネティクス試験成績の一覧 8
表 2.6.7-4：　毒性試験に使用した rIX-FP 製剤一覧 11
表 2.6.7-5：　毒性試験に使用した rIX-FP の製剤規格 12
表 2.6.7-6：　単回投与毒性試験 13
表 2.6.7-7：　SD 系ラットにおける 4 週間静脈内（ボーラス）投与毒性試験及び 2 週間回復性試験 15
表 2.6.7-8：　SD 系ラットにおける 26 週間静脈内（ボーラス）投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 18
表 2.6.7-9：　カニクイザルにおける 4 週間静脈内（ボーラス）投与毒性試験 25
表 2.6.7-10：　細菌を用いる復帰突然変異試験 27
表 2.6.7-11：　ヒトリンパ球を用いる In Vitro 染色体異常試験 31
表 2.6.7-12：　局所刺激性試験 35
表 2.6.7-13：　血栓形成性試験 36

略語・略号一覧

略語・略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
ADA	Anti-drug-antibody	抗薬物抗体
AUC	Area under the plasma concentration-time curve	血漿中濃度－時間曲線下面積
AUC_{τ}	Area under the plasma concentration-time curve during a dosing interval at steady state	定常状態時の投与間隔中の血漿中濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}24}$	Area under the plasma concentration-time curve from zero up to 24 hours	0 時間から 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
CL_{md}	Total plasma clearance of drug after intravenous administration (multiple dose)	反復静脈内投与後の総血漿クリアランス
C_{max}	Maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
DMSO	Dimethyl sulphoxide	ジメチルスルホキシド
F	Female	雌
FIX	Coagulation factor IX	血液凝固第 IX 因子
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
i.a.	Intra-arterial	動脈内
IU	International unit	国際単位
i.v.	Intravenous	静脈内
LLOQ	Lower limit of quantification	定量下限
M	Male	雄
NA	Not applicable	該当せず
NC	Not calculated	算出せず
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level	無毒性量
NZW	New Zealand White	－
p.v.	Perivenous	静脈周囲
rIX-FP	Recombinant human coagulation factor IX fused to human albumin	遺伝子組換えヒト血液凝固第 IX 因子－アルブミン融合タンパク質（CSL654）
SD	Sprague Dawley	－
$t_{1/2}$	Terminal half-life	半減期
WFI	Water for injection	注射用水

2.6.7. 毒性試験概要表

2.6.7.1.　毒性試験：一覧表

表 2.6.7-1：　毒性試験一覧表

被験物質：rIX-FP

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (IU/kg)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location
Single-dose toxicity	Rat/[redacted] (SD)	i.v.	Single dose	0, 75, 150 and 500	Yes	[redacted]	APQ0005	4.2.3.1.1
Single-dose toxicity	Rat/[redacted] (SD)	i.v.	Single dose	0, 500	Yes	[redacted]	8244656	4.2.3.1.2
Single-dose toxicity	Monkey/Cynomolgus	i.v.	Single dose	0, 75, 150 and 500	Yes	[redacted]	APQ0007	4.2.3.1.3
Repeat-dose toxicity	Ra[redacted] (SD)	i.v.	4 Weeks	0, 75, 150 and 500/day	Yes	[redacted]	APQ0009	4.2.3.2.1
Addendum to study no. APQ0009: Neutralization assay	NA	NA	NA	NA	Yes	[redacted]	09097	4.2.3.2.2
Repeat-dose toxicity	Rat/[redacted] (SD)	i.v.	26 Weeks	0, 500 and 2000/day	Yes	[redacted]	APQ0021	4.2.3.2.3
Repeat-dose toxicity	Monkey/Cynomolgus	i.v.	4 Weeks	0, 75, 150 and 500/day	Yes	[redacted]	APQ0001	4.2.3.2.4
Addendum to study no. APQ0001: Neutralization assay	NA	NA	NA	NA	Yes	[redacted]	09089	4.2.3.2.5

表 2.6.7-1：　毒性試験一覧表（続き）

被験物質：rIX-FP

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (IU/kg)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location
Genotoxicity (Ames test)	*In vitro*	NA	NA	0, 0.1 to 200 IU/plate	Yes	[redacted]	APQ0004	4.2.3.3.1.1
Genotoxicity (Chromosome aberration test)	*In vitro*	NA	NA	0, 0.1 to 20 IU/mL	Yes	[redacted]	APQ0006	4.2.3.3.1.2
Carcinogenicity	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Reproductive and developmental toxicity	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Local tolerance	Rabbit/NZW	i.v., i.a., p.v.	Single dose	1.2 mL/rabbit i.v. 1.3 mL/rabbit i.a. 0.2 mL/rabbit p.v.	Yes	[redacted]	APQ0008	4.2.3.6.1
Other toxicity: Thrombogenicity	Rabbit/NZW	i.v.	Single dose	0, 75, 150 and 500	Yes	[redacted]	S22456	4.2.3.7.7.1

2.6.7.2.　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表

表 2.6.7-2：　トキシコキネティクス試験の一覧表

被験物質：rIX-FP

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Doses (IU/kg)	GLP Compliance	Study Number	Location
Single-dose toxicity	Rat/[redacted] (SD)	i.v. bolus	0, 75, 150 and 500	Yes	APQ0005	4.2.3.1.1
Single-dose toxicity	Rat/[redacted] (SD)	i.v. bolus	0, 500	Yes	8244656	4.2.3.1.2
Single-dose toxicity	Monkey/Cynomolgus	i.v. bolus	0, 75, 150 and 500	Yes	APQ0007	4.2.3.1.3
4 weeks repeated-dose toxicity	Rat/[redacted] (SD)	i.v. bolus	0, 75, 150 and 500/day	Yes	APQ0009	4.2.3.2.1
26 weeks repeated-dose toxicity	Rat/[redacted] (SD)	i.v. bolus	0, 500 and 2000/day	Yes	APQ0021	4.2.3.2.3
4 weeks repeated-dose toxicity	Monkey/Cynomolgus	i.v. bolus	0, 75, 150 and 500/day	Yes	APQ0001	4.2.3.2.4

2.6.7.3.　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧

表 2.6.7-3：　トキシコキネティクス試験成績の一覧

C_{max} (mIU/mL)　　被験物質：rIX-FP

Daily dose (IU/kg)	Type of Study	Study No.	Batch No.	Rat		Monkey		Human
				Male	Female	Male	Female	
25	Dose-escalation study in hemophilia B patients	CSL654_2001		NA	NA	NA	NA	411.4
50				NA	NA	NA	NA	692.8
75				NA	NA	NA	NA	820.4
75	Single-dose toxicity	APQ0005	[redacted]	926.00	1113.17	NA	NA	NA
75	Single-dose toxicity	APQ0007	[redacted]	NA	NA	1022	1152	NA
75	4 weeks repeated-dose toxicity	APQ0009	[redacted]	1066.17 1242.00 [a]	1186.67 1405.00 [a]	NA	NA	NA
75	4 weeks repeated-dose toxicity	APQ0001	[redacted]	NA	NA	2436	2766	NA
150	Single-dose toxicity	APQ0005	[redacted]	2269.50	2497.00	NA	NA	NA
150	Single-dose toxicity	APQ0007	[redacted]	NA	NA	2180	2598	NA
150	4 weeks repeated-dose toxicity	APQ0009	[redacted]	3021.83 3438.00 [a]	2569.83 3245.00 [a]	NA	NA	NA
150	4 weeks repeated-dose toxicity	APQ0001	[redacted]	NA	NA	4280	4317	NA
500	Single-dose toxicity	APQ0005	[redacted]	6401.67	7520.00	NA	NA	NA
500	Single-dose toxicity	8244656	[redacted]	7639.84 [b] 6305.75 [b]	6183.46 [b] 6832.10 [b]	NA	NA	NA
500	Single-dose toxicity	APQ0007	[redacted]	NA	NA	7293	9451	NA
500	4 weeks repeated-dose toxicity	APQ0009	[redacted]	10094.17 12545.00 [a]	8356.67 10740.00 [a]	NA	NA	NA
500	4 weeks repeated-dose toxicity	APQ0001	[redacted]	NA	NA	17829 22277 [c]	15431	NA

a) Based on maximum plasma concentrations.　b) Normalized to 500 IU/kg.　c) Excluding animal No. 781.

表 2.6.7-3：　トキシコキネティクス試験成績の一覧（続き）

C_{max} (mIU/mL)　　被験物質：rIX-FP

Daily dose (IU/kg)	Type of Study	Study No.	Batch No.	Rat		Monkey		Human
				Male	Female	Male	Female	
2000	26 weeks repeated-dose toxicity	APQ0021	[redacted]	77500.00	71260.00	NA	NA	NA

表 2.6.7-3：　トキシコキネティクス試験成績の一覧（続き）

AUC (mIU•h/mL)　　被験物質：rIX-FP

Daily dose (IU/kg)	Type of Study	Study No.	Batch No.	Rat		Monkey		Human
				Male	Female	Male	Female	
25	Dose-escalation study in hemophilia B patients	CSL654_2001		NA	NA	NA	NA	41924.2
50				NA	NA	NA	NA	70898.7
75				NA	NA	NA	NA	89952.4
75	Single-dose toxicity	APQ0005	[redacted]	19574.90	20279.03	NA	NA	NA
75	Single-dose toxicity	APQ0007		NA	NA	41895	48492	NA
75	4 weeks repeated-dose toxicity	APQ0009		8525.10 15901.66 [a]	9767.50 15961.86 [a]	NA	NA	NA
75	4 weeks repeated-dose toxicity	APQ0001		NA	NA	42475	50763	NA
150	Single-dose toxicity	APQ0005		39437.35	31581.65	NA	NA	NA
150	Single-dose toxicity	APQ0007		NA	NA	97761	NC	NA
150	4 weeks repeated-dose toxicity	APQ0009		31670.31 38594.96 [a]	32772.34 46337.52 [a]	NA	NA	NA
150	4 weeks repeated-dose toxicity	APQ0001		NA	NA	80398	78684	NA
500	Single-dose toxicity	APQ0005		122732.40	112005.52	NA	NA	NA
500	Single-dose toxicity	8244656		108601.77 [b] 94189.37 [b]	84452.31 [b] 74252.01 [b]	NA	NA	NA
500	Single-dose toxicity	APQ0007		NA	NA	302460	402590	NA
500	4 weeks repeated-dose toxicity	APQ0009		79944.70 116316.31 [a]	70342.70 98309.23 [a]	NA	NA	NA
500	4 weeks repeated-dose toxicity	APQ0001		NA	NA	287990 404665 [c]	258536	NA
2000	26 weeks repeated-dose toxicity	APQ0021		911120.0	1020200.0	NA	NA	NA

a) Based on maximum plasma concentrations.　b) Normalized to 500 IU/kg.　c) Excluding animal No. 781.

2.6.7.4.　毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧

表 2.6.7-4：　毒性試験に使用した rIX-FP 製剤一覧

被験物質：rIX-FP

Products	Batch No.	Study Number	Type of Study
rIX-FP (pilot scale)	[redacted]	APQ0005	Single-dose toxicity, rat
		8244656	Single-dose toxicity, rat
		APQ0009	Repeat-dose toxicity, rat
		APQ0004	Genotoxicity, Bacterial reverse mutation test
		APQ0006	Genotoxicity, Chromosome aberration test
rIX-FP (pilot scale)	[redacted]	APQ0007	Single-dose toxicity, monkey
		APQ0001	Repeat-dose toxicity, monkey
		APQ0008	Local Tolerance, rabbit
		S22456	Thrombogenicity, rabbit
rIX-FP (commercial scale)	[redacted]	8244656	Single-dose toxicity, rat
rIX-FP (commercial scale)	[redacted]	APQ0021	Repeat-dose toxicity, rat

表 2.6.7-5：　毒性試験に使用した rIX-FP の製剤規格

被験物質：rIX-FP

Products	Batch No.	rIX-FP (IU/mL after reconstitution)	Additives / Impurities [a)]			
			Polysorbate 80 (% w/v)	Mannitol (mg/mL)	Sucrose (mg/mL)	Tri-sodium citrate (mM)
rIX-FP (pilot scale)	[redacted]	200	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
rIX-FP (pilot scale)	[redacted]	200	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
rIX-FP (commercial scale)	[redacted]	400	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
rIX-FP (commercial scale)	[redacted]	400	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
Nominal composition for submission products [b)]		250 IU	0.15 mg	45 mg	17.5 mg	18.4 mg
		500 IU	0.3 mg	72.5 mg	30 mg	18.4 mg
		1000 IU	0.6 mg	72.5 mg	30 mg	18.4 mg
		2000 IU	1.2 mg	145 mg	60 mg	36.8 mg

a) Impurities are presented in the quality section (CTD Module 2.3.P.5.5).
b) Contents per vial.

2.6.7.5.　単回投与毒性試験

表 2.6.7-6：　単回投与毒性試験

被験物質：rIX-FP

Species and Strain	Method of Administration	Doses (IU/kg)	Gender and No. per Group	NOAEL Dose (IU/kg)	Approximate Lethal Dose (IU/kg)	Noteworthy Findings	Study Number
Rat/ [redacted] (SD)	i.v.	0, 75,150 and 500	5 M + 5 F	500	> 500	Single intravenous (bolus) injection of rIX-FP at doses up to 500 IU/kg was well tolerated in rats with no toxicologically significant changes.	APQ0005
Rat/ [redacted] (SD)	i.v.	0, 500	5 M + 5 F	500	> 500	Single intravenous (bolus) injection of rIX-FP pilot scale and commercial scale material at a dose of 500 IU/kg was well tolerated in rats with no toxicologically relevant changes. Despite the presence of increased bilirubin concentrations, there was no difference between pilot scale and commercial scale material regarding their toxicity or toxicokinetic profile.	8244656
Monkey/ Cynomolgus	i.v.	0, 75,150 and 500	3 M + 3 F	500	> 500	Single intravenous (bolus) injection of rIX-FP at doses up to 500 IU/kg was well tolerated in cynomolgus monkeys with no toxicologically significant changes.	APQ0007

2.6.7.6.　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

試験は実施していない。

2.6.7.7.　反復投与毒性試験：重要な試験

表 2.6.7-7：　SD 系ラットにおける 4 週間静脈内（ボーラス）投与毒性試験及び 2 週間回復性試験

Report Title: rIX-FP: Toxicity Study by Intravenous (Bolus) Administration to CD Rats for 4 Weeks Followed by a 2 Week Recovery Period						Test Article: rIX-FP			
Species/Strain: [redacted] (SD) Rats		Duration of Dosing: 4 Weeks				Study No. APQ0009 and 09097			
Initial Age: 5 Weeks		Duration of Postdose: 2 Weeks				Location in CTD: 4.2.3.2.1 and 4.2.3.2.2			
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]		Method of Administration: Intravenous (bolus) administration				GLP Compliance: Yes			
		Vehicle/Formulation: WFI / Solution							
Special Features: Examinations of anti-product antibodies were performed.									
No Observed Adverse Effect Level: 500 IU/kg/day									
Noteworthy findings: Administration of rIX-FP by intravenous injections on 28 consecutive days at doses up to 500 IU/kg/day was well tolerated in the rat with no findings indicative of adverse toxicity. An increasing number of animals positive for anti-human factor IX antibodies were detected from day 16 on, resulting in neutralization of rIX-FP activity and decreased exposure of rIX-FP in the anti-drug-antibody (ADA)-positive animals.									
Daily Dose (IU/kg/day)		0 (Control)		75		150		500	
Number of Animals		M: 18	F: 18	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 18	F: 18
Toxicokinetics: Day 28 (n = 9)									
$Mean_{ar}$ plasma concentrations	C_{max} (mIU/mL)	NC	NC	1066.17	1186.67	3021.83	2569.83	10094.17	8356.67
	AUC_{τ} (mIU•h/mL)	NC	NC	8525.10	9767.50	31670.31	32772.34	79944.70	70342.70
	$t_{1/2}$ (h)	NC	NC	20.30	27.68	15.74	NC	19.25	NC
	CL_{md} (mL/h/kg)	NC	NC	8.23	7.18	4.43	4.28	5.85	6.65
Maximum plasma concentrations	C_{max} (mIU/mL)	NC	NC	1242.00	1405.00	3438.00	3245.00	12545.00	10740.00
	AUC_{τ} (mIU•h/mL)	NC	NC	15901.66	15961.86	38594.96	46337.52	116316.31	98309.23
	$t_{1/2}$ (h)	NC	NC	28.49	24.86	21.40	NC	20.81	NC
	CL_{md} (mL/h/kg)	NC	NC	4.41	4.39	3.63	3.03	4.02	4.76

$Mean_{ar}$: Arithmetic mean

表 2.6.7-7：　SD 系ラットにおける 4 週間静脈内（ボーラス）投与毒性試験及び 2 週間回復性試験（続き）

Study No. APQ0009 and 09097

Daily Dose (IU/kg/day)		0 (Control)		75		150		500	
Number of Animals		M: 18	F: 18	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 18	F: 18
Noteworthy Findings									
Died or Sacrificed Moribund		0	0	0	0	0	0	1 [a]	1 [a]
Body Weight (% [b])	Day 28	373 g	224 g	+5.4	±0	+1.6	−2.7	+0.3	+2.7
Food Consumption		–	–	–	–	–	–	–	–
Clinical Observations		–	–	–	–	–	–	–	–
Ophthalmoscopy		–	–	–	–	–	–	–	–
Hematology									
PT (sec)	Day 6	13.3	13.8	13.8	14.3	14.1	14.6	14.5*	16.5**
	Week 5	14.8	14.1	15.0	14.2	14.6	13.9	15.7	15.3**
	Recovery Day 15	14.8	15.9	NA	NA	NA	NA	15.7	15.5
Blood Chemistry		–	–	–	–	–	–	–	–
Urinalysis		–	–	–	–	–	–	–	–
Organ Weights		–	–	–	–	–	–	–	–
Gross Pathology		–	–	–	–	–	–	–	–
Histopathology		–	–	–	–	–	–	–	–

−: No noteworthy findings.　PT: Prothrombin time

a) Not related to drug administration.　b) For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

Williams' test: * - $p < 0.05$　** - $p < 0.01$

表 2.6.7-7：　SD 系ラットにおける 4 週間静脈内（ボーラス）投与毒性試験及び 2 週間回復性試験（続き）

Study No. APQ0009 and 09097

Daily Dose (IU/kg/day)		0 (Control)		75		150		500	
Number of Animals		M: 18	F: 18	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 18	F: 18
Examinations of anti-product antibodies (Number of antibody positive animals/Number of examined animals)									
Anti-human FIX	Day 6	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Day 16	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10	1/10	0/10
	Day 29/30	0/10	0/10	1/10	3/10	2/10	5/10	2/9	2/9
Anti-human Alb	Day 6	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Day 16	0/10	0/10	0/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	Day 29/30	0/10	0/10	0/10	3/10	1/10	2/10	1/9	0/9
Postdose Evaluation		–	–	–	–	–	–	–	–

−: No noteworthy findings.　Alb: Albumin

表 2.6.7-8：　SD 系ラットにおける 26 週間静脈内（ボーラス）投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

<table>
<tr><td colspan="2">Report Title: rIX-FP: Toxicity Study by Intravenous (Bolus) Administration to CD Rats for 26 Weeks Followed by a 4 Week Recovery Period</td><td>Test Article: rIX-FP</td></tr>
<tr><td>Species/Strain: [redacted] (SD) Rats</td><td>Duration of Dosing: 26 Weeks</td><td>Study No. APQ0021</td></tr>
<tr><td>Initial Age:
Phase 1: 41 to 47 days old.
Phase 2 (main and recovery): 48 to 54 days old.
Phase 2 (interim): 51 to 57 days old.</td><td>Duration of Postdose: 4 Weeks</td><td>Location in CTD: 4.2.3.2.3</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Date of First Dose:
Phase 1: [redacted] 20[redacted]
Phase 2 (main and recovery) [redacted] 20[redacted]
Phase 2 (interim): [redacted] 20[redacted]</td><td>Method of Administration: Intravenous (bolus) administration</td><td rowspan="2">GLP Compliance: Yes</td></tr>
<tr><td>Vehicle/Formulation:
Control (Group 1 and 3): Isotonic solution (0.9%)
Group 2, 4 and 5 vehicle: Water for Injection</td></tr>
<tr><td colspan="3">Parameters collected:
Toxicokinetics, Anti-product antibodies, Body Weight, Food Consumption, Clinical Observations, Mortality, Ophthalmoscopy, Haematology (Peripheral blood), Blood Chemistry, Urinalysis, Organ Weights, Gross Pathology, Histopathology</td></tr>
<tr><td colspan="3">No Observed Adverse Effect Level: 2000 IU/kg/day</td></tr>
<tr><td colspan="3">Brief conclusion:
rIX-FP (a recombinant fusion protein linking coagulation factor IX with albumin) was well tolerated when given by daily intravenous (bolus) injection to Sprague Dawley [[redacted] (SD)] rats for 5 days at 2000 IU/kg/day or 26 weeks at doses of 500 and 2000 IU/kg/day. There were no toxicologically adverse findings associated with rIX-FP treatment. Five animals were sacrificed or found dead during the study but none of the deaths was considered to be due to treatment with rIX-FP. The No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) was therefore considered to be 2000 IU/kg/day.</td></tr>
</table>

表 2.6.7-8：　SD 系ラットにおける 26 週間静脈内（ボーラス）投与毒性試験及び 4 週間回復性試験（続き）

Study No. APQ0021

		Phase 1				Phase 2					
Daily Dose (IU/kg/day)		0 (Control)		2000		0 (Control)		500		2000	
Number of Animals		M: 3	F: 3	M: 9	F: 9	M: 18	F: 18	M: 13	F: 13	M: 13	F: 13[e]
Toxicokinetics:											
AUC (IU•h/mL)	Day 1	NA	NA	330.63	367.21	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Week 3	NA	NA	419.43	451.85	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Week 5	NA	NA	586.01	493.58	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Week 7	NA	NA	698.86	608.26	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Week 9	NA	NA	821.03	657.56	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Week 11	NA	NA	897.31	827.34	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Week 13	NA	NA	745.51	1020.20	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Week 15	NA	NA	678.53	770.40	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Week 17	NA	NA	686.30	551.92	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Week 19	NA	NA	687.59	593.92	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Week 21	NA	NA	911.12	762.47	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C_{max} (IU/mL)	Day 1	NA	NA	30.24	31.91	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Week 3	NA	NA	24.76	63.84	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Week 5	NA	NA	42.43	33.81	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Week 7	NA	NA	51.90	44.01	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Week 9	NA	NA	77.50	71.26	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Week 11	NA	NA	58.23	58.20	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Week 13	NA	NA	56.34	57.98	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Week 15	NA	NA	50.48	50.56	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Week 17	NA	NA	57.54	53.65	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Week 19	NA	NA	46.20	37.86	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Week 21	NA	NA	52.69	63.92	NA	NA	NA	NA	NA	NA

表 2.6.7-8：　SD 系ラットにおける 26 週間静脈内（ボーラス）投与毒性試験及び 4 週間回復性試験（続き）

Study No. APQ0021

		Phase 1				Phase 2					
Daily Dose (IU/kg/day)		0 (Control)		2000		0 (Control)		500		2000	
Toxicokinetics:											
t_{max} (h)	Day 1	NA	NA	0.083	0.083	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Week 3	NA	NA	0.083	3.000	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Week 5	NA	NA	1.000	1.000	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Week 7	NA	NA	3.000	3.000	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Week 9	NA	NA	3.000	1.000	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Week 11	NA	NA	3.000	0.083	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Week 13	NA	NA	0.083	8.000	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Week 15	NA	NA	3.000	0.083	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Week 17	NA	NA	1.000	0.083	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Week 19	NA	NA	3.000	0.083	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Week 21	NA	NA	3.000	0.083	NA	NA	NA	NA	NA	NA

表 2.6.7-8：　SD 系ラットにおける 26 週間静脈内（ボーラス）投与毒性試験及び 4 週間回復性試験（続き）

Study No. APQ0021

	Phase 1				Phase 2					
Daily Dose (IU/kg/day)	0 (Control)		2000		0 (Control)		500		2000	
Number of Animals	M: 3	F: 3	M: 9	F: 9	M: 18	F: 18	M: 13	F: 13	M: 13	F: 13[e]
Noteworthy Findings:										
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1
Antibodies against human albumin (% of animals with antibodies)										
Phase 1:										
Day 1:	LLOQ	LLOQ	LLOQ	LLOQ	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Week 3:	LLOQ	LLOQ	LLOQ	LLOQ	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Week 5:	LLOQ	LLOQ	LLOQ	LLOQ	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Week 7:	LLOQ	LLOQ	LLOQ	LLOQ	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Week 9:	LLOQ	LLOQ	LLOQ	LLOQ	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Week 11:	LLOQ	LLOQ	LLOQ	LLOQ	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Week 13:	LLOQ	LLOQ	LLOQ	LLOQ	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Week 15:	LLOQ	LLOQ	LLOQ	LLOQ	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Week 17:	LLOQ	LLOQ	LLOQ	LLOQ	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Week 19:	LLOQ	LLOQ	LLOQ	LLOQ	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Week 21:	LLOQ	LLOQ	LLOQ	LLOQ	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Termination: Main Study (Week 27)	LLOQ	LLOQ	LLOQ	LLOQ	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Termination: Recovery Animals	LLOQ	LLOQ	LLOQ	LLOQ	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Phase 2:										
Termination: Main Study Animals	NA	NA	NA	NA	67	56	0	10	0	0
Termination: Interim Animals	NA	NA	NA	NA	0	0	NA	NA	0	0
Termination: Recovery Animals	NA	NA	NA	NA	33	100	0	0	0	0

表 2.6.7-8：　SD 系ラットにおける 26 週間静脈内（ボーラス）投与毒性試験及び 4 週間回復性試験（続き）

Study No. APQ0021

	Phase 1				Phase 2					
Daily Dose (IU/kg/day)	0 (Control)		2000		0 (Control)		500		2000	
Antibodies against human factor IX (% of animals with antibodies)										
Phase 1:										
Day 1	0	0	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Week 3	0	0	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Week 5	0	0	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Week 7	0	0	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Week 9	0	0	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Week 11	0	0	22	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Week 13	0	0	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Week 15	0	0	11	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Week 17	0	0	11	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Week 19	0	0	11	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Week 21	0	0	11	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Week 27	0	0	11	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Phase 2:										
Termination: Main Study Animals	NA	NA	NA	NA	22	11	0	0	0	0
Termination: Interim Animals	NA	NA	NA	NA	0	0	NA	NA	0	0
Termination: Recovery Animals	NA	NA	NA	NA	33	33	0	0	0	0
Prolonged prothrombin times										
Day 6 (Interim)[d]	NA	NA	NA	NA	21.3	24.0	NA	NA	28.6**	30.7**
Week 6[b]	NA	NA	NA	NA	21.4	22.9	22.5	23.7	28.4**	27.8**
Week 13[c]	NA	NA	NA	NA	24.7	21.5	25.0	21.7	28.5*	23.8
Week 26[b]	22.5	22.1	34.4**	29.1**	A	A	22.6	21.0	A	A

表 2.6.7-8：　SD 系ラットにおける 26 週間静脈内（ボーラス）投与毒性試験及び 4 週間回復性試験（続き）

Study No. APQ0021

	Phase 1				Phase 2					
Daily Dose (IU/kg/day)	0 (Control)		2000		0 (Control)		500		2000	
Postdose Evaluation: Histopathology, Venous injection sites – Tail:										
Day 6 (Interim)										
Number Evaluated	NA	NA	NA	NA	5	5	NA	NA	5	5
Inflammation, Perivascular										
Minimal	NA	NA	NA	NA	0	0	NA	NA	2	3
Inflammation, Vascular, Medial										
Minimal	NA	NA	NA	NA	1	0	NA	NA	0	2
Thrombus(i)										
Present	NA	NA	NA	NA	0	0	NA	NA	0	2
Week 26 (Main and recovery)										
Number Evaluated	12	12	12	12	A	A	9	10	A	A
Prominent Collagen, Perivascular										
Minimal	7	7	1	5	A	A	2	9	A	A
Slight	4	5	7	5	A	A	5	1	A	A
Moderate	0	0	4	2	A	A	2	0	A	A

表 2.6.7-8：　SD 系ラットにおける 26 週間静脈内（ボーラス）投与毒性試験及び 4 週間回復性試験（続き）

Study No. APQ0021

	Phase 1				Phase 2					
Daily Dose (IU/kg/day)	0 (Control)		2000		0 (Control)		500		2000	
Postdose Evaluation: Histopathology, Venous injection sites – Tail:										
Week 26 (Main and recovery) Number Evaluated	12	12	12	12	A	A	9	10	A	A
Fibrosis, Perivascular										
Minimal	1	5	7	6	A	A	4	6	A	A
Slight	1	6	2	5	A	A	3	2	A	A
Moderate	0	0	3	1	A	A	1	0	A	A
Degeneration/Necrosis, Vascular Mural										
Minimal	0	4	4	5	A	A	5	3	A	A
Slight	1	2	4	5	A	A	2	4	A	A
Moderate	0	0	2	0	A	A	0	0	A	A
Inflammation, Perivascular										
Minimal	4	7	7	7	A	A	3	4	A	A
Slight	0	2	4	2	A	A	4	2	A	A
Necrosis, Perivascular										
Minimal	0	0	2	2	A	A	4	1	A	A
Slight	0	0	4	1	A	A	0	0	A	A
Thrombus(i)										
Present	0	2	6	5	A	A	1	2	A	A

* - $p < 0.05$　　** - $p < 0.01$

A: Groups 1 and 3 were combined and Groups 2 and 5 were combined for this occasion.

b: Shirley's statistical method was applied.

c: Williams' statistical method was applied.

d: T-test statistical method was applied.

e: Total number of animals presented as 13, this does not include Animal Number 145 that died immediately after dosing on Day 1.

表 2.6.7-9：　カニクイザルにおける 4 週間静脈内（ボーラス）投与毒性試験

Report Title: rIX-FP: Toxicity Study by Intravenous (Bolus) Administration to Cynomolgus Monkeys for 4 Weeks							Test Article: rIX-FP	
Species/Strain: Cynomolgus monkey			Duration of Dosing: 4 Weeks				Study No. APQ0001 and 09089	
Initial Age: 30 - 32 Months			Duration of Postdose: None				Location in CTD: 4.2.3.2.4 and 4.2.3.2.5	
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]			Method of Administration: Intravenous (bolus) administration				GLP Compliance: Yes	
			Vehicle/Formulation: WFI / Solution					
Special Features: Examinations of anti-product antibodies were performed.								
No Observed Adverse Effect Level: 500 IU/kg/day								
Noteworthy findings: Repeat-dose toxicity in cynomolgus monkeys after intravenous (bolus) injection of rIX-FP at doses up to 500 IU/kg/day for up to 28 days was well tolerated with no adverse changes. An increasing number of animals positive for anti-human factor IX antibodies were detected from day 14 on, resulting in neutralization of rIX-FP activity and decreased exposure of rIX-FP in the ADA-positive animals.								
Daily Dose (IU/kg/day)		0 (Control)		75		150		500	
Number of Animals		M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4
Toxicokinetics									
Day 1 (n = 4)	C_{max} (mIU/mL)	NC	NC	980	1095	2101	2017	8530 (8947) [b]	7111
	$AUC_{0\text{-}24}$ (mIU•h/mL)	NC	NC	14847	17303	32994	31503	115778 (120037) [b]	100782
	$t_{1/2}$ (h)	NC	NC	18.6 [a]	25.2 [a]	20.3	23.8	16.6 (17.5) [b]	20.8
Day 28 (n = 3)	C_{max} (mIU/mL)	NC	NC	2436	2766	4280	4317	17829 (22277) [a, c]	15431
	AUC_{τ} (mIU•h/mL)	NC	NC	42475	50763	80398	78684	287990 (404665) [a, c]	258536
	$t_{1/2}$ (h)	NC	NC	33.3	NC	31.3	27.1	18.6 [a]	21.9
	CL_{md} (mL/h/kg)	NC	NC	1.54	1.29	1.63	1.79	3.37 (1.08) [a, c]	1.80
Noteworthy Findings									
Died or Sacrificed Moribund		0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (% [d])	Day 29	3.01 kg	2.54 kg	−1.0	+12.2	−6.0	+3.1	−4.7	+2.8
Clinical Observations		−	−	−	−	−	−	−	−

−: No noteworthy findings.

a) n = 2　b) n = 3　c) Excluding animal No. 781.　d) For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

表 2.6.7-9：　カニクイザルにおける 4 週間静脈内（ボーラス）投与毒性試験（続き）

Study No. APQ0001 and 09089

Daily Dose (IU/kg/day)		0 (Control)		75		150		500	
Number of Animals		M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4
Ophthalmoscopy		–	–	–	–	–	–	–	–
Electrocardiography		–	–	–	–	–	–	–	–
Blood pressure		–	–	–	–	–	–	–	–
Hematology									
aPTT (sec)	Day 6	31.5	30.4	30.2	26.8	33.8	31.5	28.4	27.7
	Week 2	32.6	32.9	34.2	30.0	28.3	34.4	33.0	30.3
	Week 3	33.2	31.7	36.7	32.3	29.7	33.5	44.5	34.0
	Week 4	26.9	25.5	30.9	25.1	23.6	27.5	42.5	25.8
PT (sec)	Day 6	10.4	10.1	9.9	10.2	10.5	10.5	13.5**	12.3**
	Week 4	10.8	9.5	9.9	9.9	10.1	10.7	12.1	11.2*
Blood Chemistry		–	–	–	–	–	–	–	–
Urinalysis		–	–	–	–	–	–	–	–
Organ Weights		–	–	–	–	–	–	–	–
Gross Pathology		–	–	–	–	–	–	–	–
Histopathology		–	–	–	–	–	–	–	–
Examinations of anti-product antibodies (Number of antibody positive animals/Number of examined animals)									
Anti-human FIX	Day 6	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	Day 14	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	2/3
	Day 29/30/38	0/3	0/3	2/3	1/3	3/3	1/3	2/3	3/3
Anti-human Alb	Day 6	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	Day 14	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	Day 29/30/38	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3

−: No noteworthy findings.　Alb: Albumin　aPTT: Activated partial thromboplastin time　PT: Prothrombin time
Williams' test: * - $p < 0.05$　** - $p < 0.01$

2.6.7.8.　In Vitro 遺伝毒性試験

表 2.6.7-10：　細菌を用いる復帰突然変異試験

Report Title: rIX-FP: Bacterial Reverse Mutation Test		Test Article: rIX-FP
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells	No. of Independent Assays: 2	Study No. APQ0004
Strains: *S. typhimurium* and *E. coli*	No. of Replicate Cultures: 3	Location in CTD: 4.2.3.3.1.1
Metabolizing System: phenobarbital and 5,6-benzoflavone-induced rat liver S9 mix	No. of Cells Analyzed/Culture: −	GLP Compliance: Yes
Vehicles: Test Article: WFI/ Isotonic Saline (0.9%)　Positive Controls: DMSO		Date of Treatment: [redacted] 20[redacted] (Start Date)
Treatment: The first test (Test 1) was a standard plate incorporation assay; the second (Test 2) included a pre-incubation stage.		
Cytotoxic Effects: None.		
Genotoxic Effects: None.		
Noteworthy findings: The genotoxicity potential of rIX-FP was assessed in the bacterial reverse mutation test (Ames assay). rIX-FP showed no evidence of mutagenic activity in the bacterial system.		

Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (IU/plate)**	**Test 1 Revertant Colony Counts (Mean ± S.D.)**				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2 *uvrA*
Without Activation (-S9 Mix)	Isotonic saline	0	41.3 ± 4.2	167.7 ± 12.7	25.7 ± 1.5	18.3 ± 1.5	166.7 ± 12.7
	rIX-FP	0.1	41.0 ± 4.6	122.0 ± 12.3	24.7 ± 4.0	15.7 ± 6.4	127.7 ± 39.2
		0.25	34.0 ± 6.0	189.0 ± 9.6	21.7 ± 1.2	16.0 ± 5.3	129.3 ± 15.8
		0.5	35.3 ± 5.7	174.0 ± 3.0	22.7 ± 0.6	14.7 ± 4.6	130.7 ± 4.0
		1.0	34.0 ± 4.6	158.0 ± 14.7	23.3 ± 5.5	16.7 ± 4.0	147.7 ± 18.8
		2.5	28.7 ± 3.1	171.7 ± 21.1	20.3 ± 5.5	17.0 ± 2.6	161.3 ± 24.2
		5	32.0 ± 3.0	193.7 ± 11.0	21.7 ± 6.5	18.0 ± 3.0	124.3 ± 14.0
		10	39.7 ± 4.0	126.7 ± 17.9	20.3 ± 4.6	13.7 ± 3.8	121.3 ± 25.5
		25	39.7 ± 9.6	145.0 ± 10.1	16.0 ± 1.0	14.3 ± 2.9	137.0 ± 5.2
		50	34.3 ± 3.5	184.0 ± 4.6	21.3 ± 10.1	16.3 ± 4.7	148.0 ± 11.1
		100	31.3 ± 0.6	139.7 ± 6.7	17.3 ± 3.2	11.7 ± 2.9	146.7 ± 19.7

S.D.: Standard deviation.

表 2.6.7-10：　細菌を用いる復帰突然変異試験（続き）

Study No. APQ0004

Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (IU/plate)**	**Test 1 Revertant Colony Counts (Mean ± S.D.)**				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2 *uvrA*
Without Activation (-S9 Mix)	rIX-FP	200	27.3 ± 1.2	139.7 ± 2.3	15.3 ± 0.6	10.0 ± 3.0	91.3 ± 29.1
	2-Nitrofluorene	2 µg	267.3 ± 66.5	NA	NA	NA	NA
	Sodium azide	2 µg	NA	863.0 ± 79.2	NA	NA	NA
	Sodium azide	2 µg	NA	NA	1696.3 ± 227.7	NA	NA
	9-Aminoacridine	50 µg	NA	NA	NA	671.3 ± 349.2	NA
	4-Nitroquinoline-1-oxide	2 µg	NA	NA	NA	NA	2880.7 ± 306.6
With Activation (+S9 Mix)	Isotonic saline	0	55.7 ± 1.2	195.7 ± 8.1	23.3 ± 4.6	33.3 ± 5.1	176.0 ± 19.2
	rIX-FP	0.1	56.3 ± 10.5	168.3 ± 15.7	20.0 ± 3.5	27.3 ± 7.5	209.3 ± 21.0
		0.25	55.3 ± 8.1	177.0 ± 13.0	20.7 ± 3.1	28.3 ± 5.9	156.7 ± 23.5
		0.5	53.0 ± 6.1	187.0 ± 19.1	22.3 ± 0.6	29.7 ± 11.6	108.7 ± 2.5
		1.0	53.0 ± 12.1	179.3 ± 10.7	17.3 ± 3.2	29.7 ± 11.6	139.3 ± 7.2
		2.5	58.0 ± 5.3	175.3 ± 10.8	23.3 ± 2.3	24.7 ± 3.1	122.7 ± 3.1
		5	54.0 ± 5.6	180.3 ± 2.1	22.0 ± 1.0	32.0 ± 3.6	121.3 ± 13.4
		10	57.3 ± 7.1	169.0 ± 17.4	23.7 ± 2.5	39.3 ± 5.0	140.7 ± 3.8
		25	60.0 ± 6.1	165.3 ± 15.5	24.0 ± 2.0	28.7 ± 3.1	146.7 ± 15.6
		50	61.3 ± 1.2	172.7 ± 8.3	22.0 ± 4.0	25.0 ± 6.6	184.7 ± 7.5
		100	48.0 ± 7.9	171.0 ± 10.5	21.7 ± 0.6	28.3 ± 4.6	191.7 ± 6.4
		200	40.3 ± 7.8	177.3 ± 9.0	18.7 ± 2.1	28.0 ± 7.8	177.7 ± 20.2
With Activation (+S9 Mix)	Benzo[a]pyrene	5 µg	202.7 ± 14.0	NA	NA	NA	NA
	2-Aminoanthracene	5 µg	NA	2714.7 ± 217.3	NA	NA	NA
	2-Aminoanthracene	5 µg	NA	NA	402.0 ± 94.9	NA	NA
	Benzo[a]pyrene	5 µg	NA	NA	NA	202.0 ± 13.5	NA
	2-Aminoanthracene	10 µg	NA	NA	NA	NA	390.7 ± 46.4

S.D.: Standard deviation.

表 2.6.7-10：　細菌を用いる復帰突然変異試験（続き）

Study No. APQ0004

Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (IU/plate)**	**Test 2 Revertant Colony Counts (Mean ± S.D.)**				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2 *uvrA*
Without Activation (-S9 Mix)	Isotonic saline	0	39.7 ± 2.1	144.0 ± 1.7	27.0 ± 5.0	9.0 ± 1.7	154.3 ± 1.2
	rIX-FP	0.1	37.0 ± 3.0	135.7 ± 13.7	23.7 ± 3.8	12.0 ± 5.0	148.3 ± 5.5
		0.5	40.7 ± 3.1	154.0 ± 16.1	24.3 ± 10.6	10.7 ± 0.6	152.0 ± 18.1
		2.5	40.3 ± 3.2	131.0 ± 12.2	27.0 ± 9.5	9.3 ± 2.1	153.0 ± 9.5
		10	39.7 ± 6.0	148.7 ± 18.8	19.7 ± 5.5	11.0 ± 1.0	142.7 ± 6.1
		50	32.7 ± 1.2	126.0 ± 8.7	22.7 ± 2.3	11.0 ± 2.0	152.7 ± 12.0
		100	30.3 ± 7.6	145.3 ± 12.1	25.7 ± 5.7	9.3 ± 2.9	120.3 ± 16.2
		200	36.3 ± 4.9	143.7 ± 15.5	23.0 ± 2.6	8.7 ± 1.5	119.7 ± 9.5
Without Activation (-S9 Mix)	2-Nitrofluorene	2 µg	173.0 ± 37.0	NA	NA	NA	NA
	Sodium azide	2 µg	NA	555.7 ± 75.0	NA	NA	NA
	Sodium azide	2 µg	NA	NA	993.3 ± 79.0	NA	NA
	9-Aminoacridine	50 µg	NA	NA	NA	688.7 ± 50.1	NA
	4-Nitroquinoline-1-oxide	2 µg	NA	NA	NA	NA	3433.7 ± 687.0
With Activation (+S9 Mix)	Isotonic saline	0	54.3 ± 11.6	208.0 ± 17.6	31.0 ± 4.4	35.7 ± 2.1	166.7 ± 3.1
	rIX-FP	0.1	55.7 ± 4.2	188.7 ± 30.0	32.0 ± 2.6	31.7 ± 5.5	164.3 ± 24.3
		0.5	50.7 ± 2.9	183.0 ± 16.0	25.7 ± 1.5	32.3 ± 3.8	156.7 ± 30.1
		2.5	53.0 ± 3.6	167.3 ± 9.9	31.7 ± 6.4	34.7 ± 5.9	144.3 ± 19.0
		10	56.0 ± 9.2	150.0 ± 23.5	25.0 ± 7.9	37.0 ± 3.5	178.3 ± 9.5
		50	50.7 ± 8.3	185.7 ± 25.6	28.7 ± 2.5	40.0 ± 4.4	153.7 ± 8.1
		100	47.0 ± 2.6	194.0 ± 23.1	21.0 ± 3.0	32.0 ± 9.8	119.0 ± 26.9
		200	53.3 ± 2.9	179.0 ± 17.6	25.3 ± 4.0	32.0 ± 5.2	128.3 ± 2.5

S.D.: Standard deviation.

表 2.6.7-10：　細菌を用いる復帰突然変異試験（続き）

Study No. APQ0004

Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (IU/plate)**	**Test 2 Revertant Colony Counts (Mean ± S.D.)**				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2 *uvrA*
With Activation (+S9 Mix)	Benzo[a]pyrene	5 µg	227.3 ± 22.2	NA	NA	NA	NA
	2-Aminoanthracene	5 µg	NA	3052.7 ± 670.8	NA	NA	NA
	2-Aminoanthracene	5 µg	NA	NA	535.0 ± 179.2	NA	NA
	Benzo[a]pyrene	5 µg	NA	NA	NA	143.3 ± 13.7	NA
	2-Aminoanthracene	10 µg	NA	NA	NA	NA	506.0 ± 35.3

S.D.: Standard deviation.

表 2.6.7-11：　ヒトリンパ球を用いる In Vitro 染色体異常試験

Report Title: rIX-FP: *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test in Human Lymphocytes		Test Article: rIX-FP
Test for Induction of: Chromosome aberrations	No. of Independent Assays: 2	Study No. APQ0006
Strains: Primary human lymphocytes	No. of Replicate Cultures: 2	Location in CTD: 4.2.3.3.1.2
Metabolizing System: phenobarbital and 5,6-benzoflavone-induced rat liver S9 mix	No. of Cells Analyzed/Culture: 100	GLP Compliance: Yes
Vehicles: Test Article: WFI/ Isotonic Saline (0.9%)　Positive Controls: Sterile purified water		Date of Treatment: [redacted] 20[redacted] (Start Date)
Treatment: Continuous treatment for 21 h without S9; pulse treatment 3 h and recovery time 18 h with and without S9.		
Cytotoxic Effects: None.		
Genotoxic Effects: None.		
Noteworthy findings: rIX-FP has shown no evidence of causing an increase in the frequency of structural chromosome aberrations in the *in vitro* cytogenetic test system.		

Metabolic Activation	**Test Article**	**Concentration (IU/mL)**	**Cytotoxicity [a)] (% of control)**	**Cells with aberrations excluding gaps (%)**	**Cells with aberrations including gaps (%)**	**Polyploidy (%)**
First Test Without Activation 3 h treatment, 18 h recovery	Isotonic saline	0	100	1.0	1.5	0.0
	rIX-FP	7.2	101	2.5	4.0	0.0
		12	107	2.0	3.5	1.5
		20	108	1.5	2.5	1.0
	Mitomycin C	0.2 µg/mL	NA	31.3***	32.8***	3.1
First Test With Activation (2% S9 mix) 3 h treatment, 18 h recovery	Isotonic saline	0	100	3.5	4.0	1.0
	rIX-FP	7.2	135	2.0	4.5	0.0
		12	129	1.5	2.5	0.5
		20	120	4.5	6.0	0.0
	Cyclophosphamide	5 µg/mL	NA	32.8***	34.4***	1.6

a) Based on mitotic indices.

*** $p < 0.001$ (One-tailed Fisher's exact test)

S.D.: Standard deviation.

表 2.6.7-10：　細菌を用いる復帰突然変異試験（続き）

Study No. APQ0004

Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (IU/plate)**	**Test 2 Revertant Colony Counts (Mean ± S.D.)**				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2 *uvrA*
With Activation (+S9 Mix)	Benzo[a]pyrene	5 µg	227.3 ± 22.2	NA	NA	NA	NA
	2-Aminoanthracene	5 µg	NA	3052.7 ± 670.8	NA	NA	NA
	2-Aminoanthracene	5 µg	NA	NA	535.0 ± 179.2	NA	NA
	Benzo[a]pyrene	5 µg	NA	NA	NA	143.3 ± 13.7	NA
	2-Aminoanthracene	10 µg	NA	NA	NA	NA	506.0 ± 35.3

S.D.: Standard deviation.

表 2.6.7-11：　ヒトリンパ球を用いる In Vitro 染色体異常試験（続き）

Study No. APQ0006

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (IU/mL)	Cytotoxicity [a)] (% of control)	Cells with aberrations excluding gaps (%)	Cells with aberrations including gaps (%)	Polyploidy (%)
Second Test Without Activation 21 h continuous treatment	Isotonic saline	0	100	1.5	2.5	1.0
	rIX-FP	7.2	136	2.0	3.5	1.5
		12	147	2.0	3.0	0.5
		20	146	3.5	3.5	0.5
	Mitomycin C	0.1 μg/mL	NA	20.4***	21.4***	0.0
Second Test With Activation (5% S9 mix) 3 h treatment, 18 h recovery	Isotonic saline	0	100	0.5	0.5	0.5
	rIX-FP	7.2	100	0.5	0.5	0.0
		12	118	0.0	0.5	0.0
		20	126	0.0	0.0	1.0
	Cyclophosphamide	5 μg/mL	NA	9.8***	9.8***	0.7

a) Based on mitotic indices.

*** $p < 0.001$ (One-tailed Fisher's exact test)

2.6.7.9.　In Vivo 遺伝毒性試験

試験は実施していない。

2.6.7.10. がん原性試験

試験は実施していない。

2.6.7.11. 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

試験は実施していない。

2.6.7.12. 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

試験は実施していない。

2.6.7.13. 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

試験は実施していない。

2.6.7.14. 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

試験は実施していない。

2.6.7.15. 幼若動物を用いた試験

試験は実施していない。

2.6.7.16. 局所刺激性試験

表 2.6.7-12：　局所刺激性試験

被験物質：rIX-FP

Species and Strain	Method of Administration	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Rabbit/NZW	i.v., i.a., p.v.	1.2 mL/rabbit i.v. 1.3 mL/rabbit i.a. 0.2 mL/rabbit p.v.	4 F	Intravenous, intra-arterial and perivenous injection of rIX-FP was well tolerated in rabbits with no local or systemic signs of reaction to treatment.	APQ0008

2.6.7.17. その他の毒性試験

表 2.6.7-13：　血栓形成性試験

被験物質：rIX-FP

Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (IU/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Rabbit/NZW	i.v.	Single dose	0, 75, 150 and 500	3 M + 3 F	The thrombogenic potential of rIX-FP was evaluated in the Wessler stasis model in rabbits. rIX-FP showed no thrombogenic activity at the three doses tested, i.e.75, 150 and 500 IU/kg.	S22456