2.4　非臨床試験の概括評価

目次

2.4.1 非臨床試験計画概略 5
2.4.1.1 緒言 5
2.4.1.2 非臨床試験計画 8
2.4.2 薬理試験 11
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 11
2.4.2.2 副次的薬理試験 19
2.4.2.3 安全性薬理試験 20
2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験 21
2.4.3 薬物動態試験 22
2.4.3.1 まとめ 22
2.4.3.2 分析法 24
2.4.3.3 吸収 25
2.4.3.4 分布 25
2.4.3.5 代謝 25
2.4.3.6 排泄 25
2.4.3.7 薬物動態学的薬物相互作用 25
2.4.3.8 その他の薬物動態試験 25
2.4.4 毒性試験 26
2.4.4.1 単回投与毒性試験 28
2.4.4.2 反復投与毒性試験 32
2.4.4.3 遺伝毒性試験 37
2.4.4.4 がん原性試験 37
2.4.4.5 生殖発生毒性試験 37
2.4.4.6 局所刺激性試験 41
2.4.4.7 その他の毒性試験 42
2.4.5 考察及び結論 43
2.4.6 参考文献 47

図表目次

図 2.4.1　L-アスパラギナーゼが関与する反応 5
図 2.4.2　L-アスパラギナーゼの一般的分類 6
図 2.4.3　*Er chrysanthemi* 菌由来 L-アスパラギナーゼの構造 6
図 2.4.4　*Erwinia* 菌から分離された L-アスパラギナーゼの配列アライメント 7

表 2.4.1　*Erwinia* 菌から分離された L-アスパラギナーゼの配列の相同性 8
表 2.4.2　*Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼの抗腫瘍活性 12
表 2.4.3　血液中アスパラギン濃度 13
表 2.4.4　大腸菌由来及び *Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼのマウスにおける腫瘍増殖に対する作用 14
表 2.4.5　マイトジェン及び抗原刺激によって誘導したヒトリンパ球幼若化反応における ^{3}H-チミジン取り込みに対する *Er carotovora* 菌由来及び大腸菌由来 L-アスパラギナーゼの抑制作用の比較 15
表 2.4.6　*Er carotovora* 菌及び大腸菌由来 L-アスパラギナーゼをマウスに単回投与したときのヒツジ赤血球に対する免疫反応 16
表 2.4.7　*Er carotovora* 菌及び大腸菌由来 L-アスパラギナーゼをマウスに 4 日間反復投与したときのヒツジ赤血球に対する免疫反応 16
表 2.4.8　*Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼ及び大腸菌由来 L-アスパラギナーゼに対する遅延型皮膚反応 18
表 2.4.9　モルモットにおけるアナフィラキシー反応 19
表 2.4.10　*Er chrysanthemi* 菌由来 L-アスパラギナーゼの酵素反応速度 19
表 2.4.11　*Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼの酵素反応速度 20
表 2.4.12　サルの心血管系における試験 20
表 2.4.13　マウス，ラット，ウサギ，ヒツジ及びサルにおける消失半減期 24
表 2.4.14　毒性試験一覧表 27
表 2.4.15　マウスの単回投与毒性試験のまとめ 29
表 2.4.16　ラットの単回投与毒性試験のまとめ 30
表 2.4.17　ハムスターの単回投与毒性試験のまとめ 31
表 2.4.18　ウサギの単回投与毒性試験のまとめ 32
表 2.4.19　ウサギの 5 日間反復静脈内投与毒性試験のまとめ 33
表 2.4.20　イヌの 28 日間反復静脈内投与毒性試験のまとめ 33
表 2.4.21　サルの 5 日間反復静脈内投与毒性試験のまとめ-1 34
表 2.4.22　サルの 5 日間反復静脈内投与毒性試験のまとめ-2 35
表 2.4.23　サルの 5 日間反復静脈内投与毒性試験のまとめ-3 36
表 2.4.24　胎児の内臓及び骨格異常所見のまとめ 40

被験物質

コード番号	OP-01
JAN（日本医薬品一般名称）	日本名：クリサンタスパーゼ 英名：Crisantaspase
化学名	L-asparagine amidohydrolase（L-asparaginase）
由来	*Erwinia chrysanthem*i から産生される L-アスパラギンアミド加水分解酵素

構造式

クリサンタスパーゼのアミノ酸配列

ADKLPNIVIL ATGGTIAGSA ATGTQTTGYK AGALGVDTLI NAVPEVKKLA
NVKGEQFSNM ASENMTGDVV LKLSQRVNEL LARDDVDGVV ITHGTDTVEE
SAYFLHLTVK SDKPVVFVAA MRPATAISAD GPMNLLEAVR VAGDKQSRGR
GVMVVLNDRI GSARYITKTN ASTLDTFKAN EEGYLGVIIG NRIYYQNRID
KLHTTRSVFD VRGLTSLPKV DILYGYQDDP EYLYDAAIQH GVKGIVYAGM
GAGSVSVRGI AGMRKAMEKG VVVIRSTRTG NGIVPPDEEL PGLVSDSLNP
AHARILLMLA LTRTSDPKVI QEYFHTY

略語・用語の定義一覧

略語・用語	省略していない表現又は定義	日本語名称
ALL	Acute lymphoblastic leukemia	急性リンパ性白血病
BLA	Biologic Licensing Application	米国の生物製剤承認申請
E. coli	*Escherichia coli*	大腸菌
Er	*Erwinia*	エルウィニア
FCA	Freund's complete adjuvant	フロイント完全アジュバント
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
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
ICH	International Conference on Harmonization	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
K_m	Michaelis constant	酵素反応のミカエリス定数
ML	Malignant lymphoma	悪性リンパ腫
NCBI	National Center for Biotechnology Information	全米バイオテクノロジー情報センター
NCPPB	National Collection of Plant Pathogenic Bacteria	ナショナル コレクション オブ プラント パソジェニック バクテリア
NZW	New Zealand White	ニュージーランドホワイト(ウサギの系統名)
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
SD	Sprague-Dawley	スプラーグドーリー（ラットの系統名）
U	Unit	単位

2.4.1 非臨床試験計画概略

2.4.1.1 緒言

クリサンタスパーゼは，*Erwinia chrysanthemi*（*Er chrysanthemi*）菌から生産されるL-アスパラギナーゼ（EC 3.5.1.1）である．*Er chrysanthemi*菌は植物病原体で，1953年にキク科植物（*Chrysanthemum morifolium*）の軟腐病の病原菌として分離された．*Erwinia*菌についてはNCPPB 1066 Cell line designationに，*Pectobacterium carotovorum*（1961）及び*Erwinia carotovora*（1968）の名称で記載されている．その後，*Erwinia chrysanthemi*（1991，1996，2005，2007）として記載され，更に細菌遺伝子学に基づき，この菌は*Dickeya*（2007，2009）の名称で記載されている．*Erwinia chrysanthemi*（*Er chrysanthemi*）という名称は，公表科学論文で多く使用されていることから，優先して使用されている（NLM 2009a）．公表科学論文において*Erwinia*菌由来のL-アスパラギナーゼの由来生物名として*Er chrysanthemi*が使用されていることから，本製造販売承認申請においても，科学的な使用例に従い，*Er chrysanthemi*の名称で記載した．

L-アスパラギナーゼは，L-アスパラギンをL-アスパラギン酸とアンモニアへ分解する酵素である（図 2.4.1）．L-アスパラギナーゼの一般的な分類は図 2.4.2 に記載した．クリサンタスパーゼは，大腸菌由来のアスパラギナーゼに類似したType IIアスパラギナーゼの一種である．このクラスのアスパラギナーゼは，主にアスパラギンを基質とする．Type Iアスパラギナーゼはグルタミナーゼ-アスパラギナーゼとしても関与し，L-アスパラギン及びL-グルタミンの両方の加水分解を同程度に触媒する．Type Iアスパラギナーゼは副作用のリスクが高いことから臨床使用はされていない（Aghaiypour 2001）[1]．また，細菌由来のアスパラギナーゼ（bacterial-type asparaginase）は，植物内でL-アスパラギンを加水分解する植物由来アスパラギナーゼ（plant-type asparaginase）との間に相同性はないことが報告されている（Borek 2001）[7].

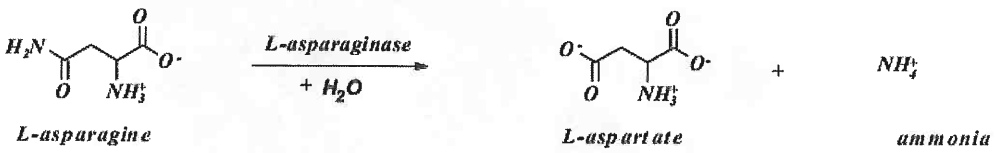


図 2.4.1　L-アスパラギナーゼが関与する反応

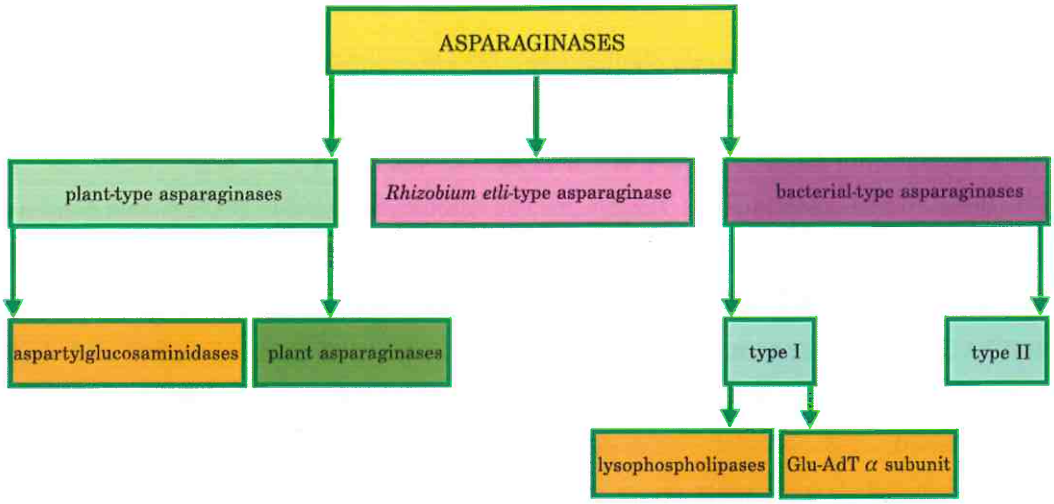


図 2.4.2　L-アスパラギナーゼの一般的分類

（Borek 2001 から引用）[7]

クリサンタスパーゼは，4 箇所の活性部位を持つホモ四量体である．それぞれの四量体は 327 個のアミノ酸から構成されている．単量体の二次構造を図 2.4.3 に示した．クリサンタスパーゼは中性 pH では 37°C で安定である．クリサンタスパーゼの熱に対する不活性化について時間推移を検討した試験では，37°C では極めて安定であるが，41°C での安定性は低い（Kotzia 2007）[29].

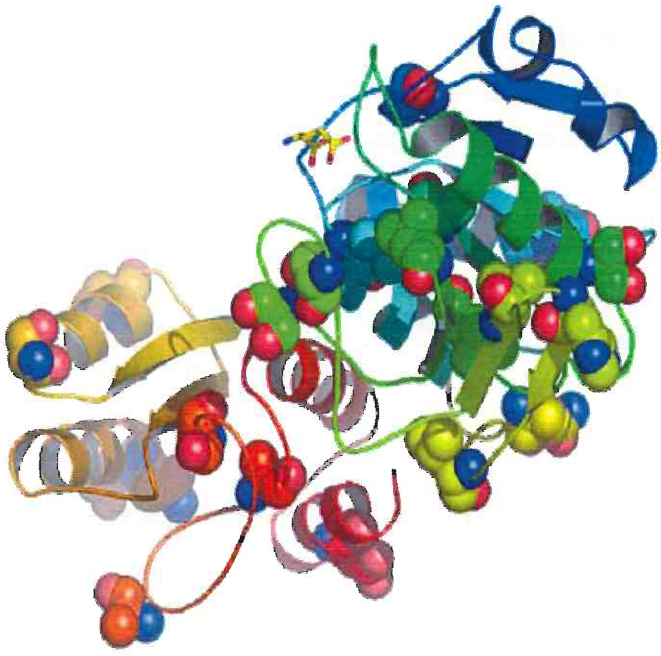


図 2.4.3　*Er chrysanthemi* 菌由来 L-アスパラギナーゼの構造

（Kotzia 2007 から引用）[29]

Erwinia 菌由来のアスパラギナーゼの毒性についての試験の多くは，*Erwinia carotovora*（*Er carotovora* 菌：植物軟腐病病原細菌）として知られている細菌から分離されたアスパラギナーゼで実施されている．*Er carotovora* 菌は 1901 年に分離されていたが，1960 年代には *Pectobacterium carotovorum* として記載され（NCPPB 1066 Cell line designation，1961），その後 *Erwinia carotovora* として記載されている（NCPPB 1066 Cell line designation，1968）．*Er carotovora* 菌由来アスパラギナーゼは，*Er chrysanthemi* 菌由来アスパラギナーゼとアミノ酸配列で約 77%の相同性を有している（図 2.4.4 及び表 2.4.1）（Kotzia 2007）[29]．*Er carotovora* 菌由来アスパラギナーゼは *Er chrysanthemi* 菌由来アスパラギナーゼと同様の生化学的特異性を示しており，*Er chrysanthemi* 菌由来アスパラギナーゼの非臨床での検討に十分代用可能と考えられた．したがって，*Er carotovora* 菌から分離されたアスパラギナーゼを使用した試験もまた，クリサンタスパーゼの非臨床効果を評価するには適切であると考えられる．

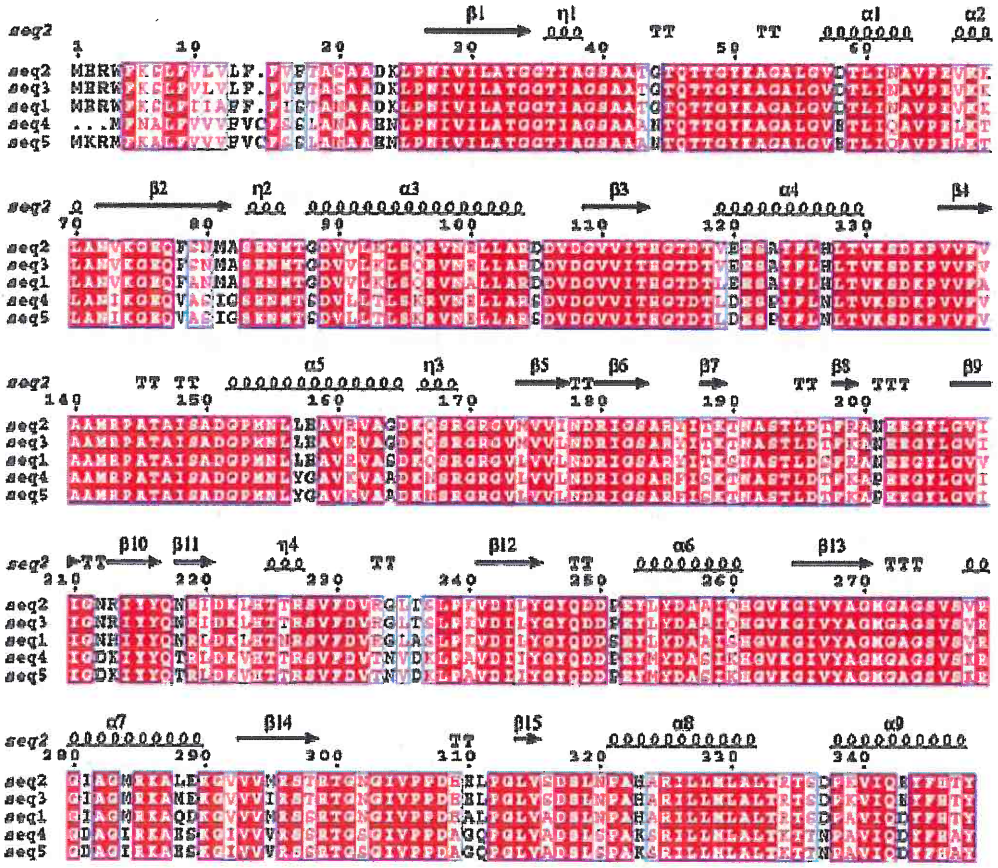


図 2.4.4　*Erwinia* 菌から分離された L-アスパラギナーゼの配列アライメント

*Erwinia*菌由来Type II L-アスパラギナーゼ配列アライメントを図2.4.4に示した．この配列アライメントは多重整列プログラム（ClustalW）を使用して作成された．*Er chrysanthemi*菌（PDB code 1hg0）のL-アスパラギナーゼの2次構造及び番号付けはアライメントの上に示した．αヘリックス及びβストランドはそれぞれヘリックス及び矢印で表記し，βターンはTTの記号で示した．L-アスパラギナーゼのNCBI（National Center for Biotechnology Information）アクセス番号は括弧で示した．

Seq1：*Er chrysanthemi* 3937 (AAS67028)，Seq2：*Er chrysanthemi* NCPPB 1125 (CAA31239)，Seq3：*Er chrysanthemi* NCPPB 1066 (CAA32884), Seq4：*Er carotovora* subsp. Atroseptica (AAS67027), Seq5：*Er carotovora* (AAP92666).　（Kotzia 2007 から引用）[29]

表 2.4.1　*Erwinia* 菌から分離された L-アスパラギナーゼの配列の相同性

Sequence	Length	Sequence	Length	Score (% identity)
seq1	348	seq2	348	91
seq1	348	seq3	348	91
seq1	348	seq4	346	77
seq1	348	seq5	349	77
seq2	348	seq3	348	98
seq2	348	seq4	346	75
seq2	348	seq5	349	76
seq3	348	seq4	346	75
seq3	348	seq5	349	77
seq4	346	seq5	349	99

Seq1 : *Er chrysanthemi* 3937 (AAS67028), Seq2 : *Er chrysanthemi* NCPPB 1125 (CAA31239), Seq3 : *Er chrysanthemi* NCPPB 1066 (CAA32884), Seq4 : *Er carotovora* subsp. Atroseptica (AAS67027), Seq5 : *Er carotovora* (AAP92666).　(Kotzia 2007 から引用) [29]

なお，本剤の添加物の一つであるブドウ糖水和物は新添加物に該当する．本剤は薬液にブドウ糖水和物を添加し溶解した後に凍結乾燥し製造される．投与時には生理食塩水 1～2 mL に溶解することから，溶液中ではブドウ糖水和物とブドウ糖（無水物）を区別することができない．ブドウ糖の筋肉内注射における使用前例では 1 日最大投与量は 528 mg であり，本剤のブドウ糖水和物の 1 日最大投与量 20.625 mg を大きく上回る．

このことから，本剤の添加物であるブドウ糖水和物の安全性は問題ないと考える．

2.4.1.2　非臨床試験計画

クリサンタスパーゼは，*Er chrysanthemi* 菌由来の L-アスパラギナーゼであり，L-アスパラギンの分解酵素である．L-アスパラギナーゼは，急性リンパ性白血病（ALL）の治療薬として 1970 年代から広く国内外で使用されている．アスパラギンを必要とする白血病細胞の増殖のみでなく，他の新生物に対してもアスパラギンの枯渇が有効と考えられる．特に小児の ALL に対して優れた効果を示す．L-アスパラギナーゼ製剤は，海外ではクリサンタスパーゼ（*Er chrysanthemi* 菌由来 L-アスパラギナーゼ），大腸菌由来 L-アスパラギナーゼ及びポリエチレングリコール化した大腸菌由来 L-アスパラギナーゼの 3 製剤が臨床使用されている．クリサンタスパーゼは 1985 年に英国で承認されて以来，2016 年 8 月末時点まで米国を含め 18 カ国で製造販売承認を受けている．

本邦においては，大腸菌由来 L-アスパラギナーゼ（ロイナーゼ®注用 5000 及び同注用 10000，協和発酵キリン株式会社）が 1971 年 6 月に「急性白血病（慢性白血病の急性転化例を含む），悪性リンパ腫」を効能・効果とし，静脈内投与の用法にて承認されている．また，ロイナーゼ®注用 5000 及び同注用 10000 は，新投与経路医薬品として平成 25 年 2 月に筋肉内投与の用法で承認されている．L-アスパラギナーゼ製剤は，ALL 及び悪性リンパ腫（ML）の標準治療において他剤と併用される寛解導入治療の主要な薬剤であり，臨床使用におけ

る効果及び安全性プロファイルはよく知られている．しかし，L-アスパラギナーゼ製剤は，たん白製剤であることから，治療を受けている患者で大腸菌由来製剤に対するアレルギー反応を示し，投与の継続が不可能となることが知られている．クリサンタスパーゼは，*Erwinia* 菌由来 L-アスパラギナーゼ製剤であり，大腸菌由来 L-アスパラギナーゼとは免疫学的交差反応性は低いと考えられることから，大腸菌由来の製品による継続治療が困難になった患者にとって有用な代替薬であると考えられる．

本邦における本剤の開発は，「医療上の必要性の高い未承認薬・適応外薬検討会議」において，「医療上の必要性に係る基準」への該当性に関する専門作業班（WG）の評価＜抗がんWG＞の結果として医療上の必要性の基準に該当すると判断され，2010年12月に厚生労働省から本剤の開発要請を受けて開発に着手した．

本剤を開発するにあたり，医薬品[redacted]相談を実施した（平成[redacted]年[redacted]月[redacted]日）．本剤の製造販売承認申請のための非臨床データパッケージについて，外国で実施された非臨床成績の利用について相談した結果，以下の意見・助言を受けた．

1) [redacted]と考える．
2) [redacted]と考える．
3) [redacted]と考える．

それらの助言を受けて，本剤の製造販売承認申請にあたり添付を必要とする非臨床試験成績については以下のように判断した．L-アスパラギナーゼ製剤は，既に ALL の標準的な治療薬として国内外で 40 年以上にわたり使用されており，臨床における有効性及び薬剤プロファイルは広く知られている．ALL に対する抗腫瘍作用の薬理学的作用機序も多くの公表論文等で示されていることから，クリサンタスパーゼの効力を裏付ける試験，副次的薬理試験及び薬力学的薬物相互作用試験については，新たに非臨床試験を実施する意義は低いと判断した．薬物動態試験については，本剤がバイオ医薬品であることを踏まえて日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイドライン S6（R1）に基づいた「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」について（薬食審査発 0323 第 1 号，平成 24 年 3 月 23 日）を参考に，新たに非臨床薬物動態試験を実施する意義は低いと判断し，実施しなかった．毒性試験については，単回投与毒性試験，反復投与毒性試験，生殖発生毒性試験，局所刺激性試験及びその他の毒性試験から毒性の評価は可能と判断した．遺伝毒性試験及びがん原性試験は，ICH ガイドライン S6（R1）を参考にし，実施しなかった．また，本剤は，米国で 2011 年 11 月に承認されている．米国食品医薬品局（FDA）は，[redacted]

[redacted]を要求した（Pre BLA 議事録, [redacted] 20[redacted]）. その後, FDA は[redacted]を要求した（BLA approval letter, [redacted], 20[redacted]）.

したがって，本剤の製造販売承認申請資料は，米国での承認申請に用いた非臨床試験に加えて，新たにラット又はウサギの生殖発生毒性試験（4 試験）及び医薬品[redacted]相談（平成[redacted]年[redacted]月[redacted]日）における意見・助言に基づきサル心血管系の安全性薬理試験（1 試験）を追加し，さらに，本剤の臨床用法は筋肉内投与であることよりウサギの局所刺激性試験（2 試験）を追加し，非臨床の製造販売承認申請資料として取り纏めた．これら追加試験は全て医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準拠して実施した．

GLP に準拠して実施した安全性薬理試験，生殖発生毒性試験及び局所刺激性試験はいずれの試験においても，被験物質としてクリサンタスパーゼ（*Er chrysanthemi* 菌由来 L-アスパラギナーゼの凍結乾燥粉末製剤，Erwinase）を使用し，被験物質の名称としてはクリサンタスパーゼと記載した．

クリサンタスパーゼは，海外では長年にわたり臨床使用されている実績があり，本邦で使用されているロイナーゼ®注用 5000 及び同注用 10000（大腸菌由来 L-アスパラギナーゼ）とは由来菌種は異なるが，薬理的な作用機序は同様の L-アスパラギナーゼ製剤であり，国内臨床試験における有効性及び安全性成績が得られていることから，それらの成績とあわせて非臨床における有効性及び安全性を評価することは妥当であると判断した．

引用した公表論文成績の記載に際しては，使用した製剤名及び製剤単位は原著のとおり表記した．公表論文中で使用されている「アスパラギナーゼ」の名称については，その記載に問題がない限り「L-アスパラギナーゼ」と読み替えて表記した．

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

効力を裏付ける試験は実施していない．本項では公表論文を引用してL-アスパラギナーゼの抗腫瘍作用を取り纏めて記載した．

2.4.2.1.1 L-アスパラギナーゼの抗腫瘍の作用機序

L-アスパラギナーゼの抗腫瘍作用は約60年前に発見されており，正常モルモット血清をマウス及びラットに腹腔内投与した場合に，ある種の腫瘍細胞に対して抗腫瘍作用があることが示されていた．その現象はウマあるいはウサギ血清では再現することはできなかった（Kidd 1953a，Kidd 1953b）[26,27]．そのため，当時はこれらの腫瘍退縮は免疫学的な反応であると考えられていた．

その後，L-アスパラギナーゼがモルモット血清の抗腫瘍作用の活性因子であることが報告された（Broome 1963a，Broome 1963b，Broome 1968，Broome 1981）[8,9,10,11]．さらに，他の生物種から分離されたL-アスパラギナーゼにも同様に効果があることが示され，2種類（P1534白血病及びガードナーリンパ肉腫）のリンパ性白血病細胞を移植したマウスに大腸菌由来L-アスパラギナーゼを腹腔内投与すると，P1534白血病及びガードナーリンパ肉腫細胞の増殖を抑制した．しかし，別の腫瘍細胞タイプ（BW5147；マウスリンパ腫・T細胞リンパ芽球）に対する効果はみられなかった．この試験では，*Bacillus coagulans*菌由来L-アスパラギナーゼの効果はみられなかった（Mashburn 1964）[32]．

初期のL-アスパラギナーゼの抗腫瘍作用に関する試験はモルモット血清，ニワトリ肝臓及び大腸菌から遊離したL-アスパラギナーゼで実施された．1968年に，*Er carotovora*がL-アスパラギナーゼ生成に適した菌であることが示唆された（Wade 1968）[41]．C3Hマウスに*Er carotovora*菌由来L-アスパラギナーゼを500～600 U/kgの用量で腹腔内投与すると，リンパ腫6C3HED細胞を事前に移植したC3Hマウスの腫瘍形成を効果的に抑制した．

初期の*in vitro*試験で腫瘍細胞の増殖にはアスパラギンを必要とすることが示された．アスパラギンは正常な哺乳類の培養細胞の増殖には必ずしも必要ではないが，悪性腫瘍由来細胞株のWalker Carcinosarcoma 256では，その増殖にはアスパラギンを必要とすることが報告されている（Neuman 1956）[34]．同様の結果は，マウスリンパ腫 L5178Y細胞でもみられた（Haley 1961）[19]．アスパラギンはほとんどのたん白質の構成成分であり，アスパラギンが欠如している状況では，たん白質合成はできなくなることが示唆されている（Cooney 1970a）[14]．アスパラギナーゼはアスパラギンをアスパラギン酸とアンモニアに加水分解する酵素として作用し，正常細胞に対してはその影響を及ぼさずに，悪性腫瘍細胞から必須アミノ酸を効果的に欠乏させる．

2.4.2.1.2 *Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼの抗腫瘍作用（Wade 1968）[41]

*In vitro*試験では，*Er carotovora*菌由来L-アスパラギナーゼ及び大腸菌由来L-アスパラギナーゼの酵素活性を比較した．アンモニア生成量を酵素活性の指標とすると，*Er carotovora*菌由来L-アスパラギナーゼの活性は0.5～6 U/mg proteinであり，大腸菌由来L-アスパラギナーゼの酵素活性（0.2～0.6 U/mg protein）に比べて高いことが示された．また，6C3HEDリンパ腫細胞（2×10^4個）を移植したC3Hマウスに，*Er carotovora*菌由来L-アスパラギナーゼ500～600 U/kgを4日間腹腔内投与すると，マウスの腫瘍形成が抑制された．マウスで実施した追加の安全性試験では，*Er* carotovora菌由来L-アスパラギナーゼを200,000 U/kgの用量で投与したとき，有害な毒性所見はみられなかった（表2.4.2）．

表 2.4.2　*Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼの抗腫瘍活性

測定項目	*Er carotovora*菌由来L-アスパラギナーゼ	大腸菌由来L-アスパラギナーゼ
酵素活性*	0.5～6 U/mg protein	0.2～0.6 U/mg protein
マウスにおける抗腫瘍活性	500～600 U/kg	-
マウスにおける安全性	200,000 U/kgの用量で毒性所見なし	-

*：1 Uは1分間にアンモニアを1 μmol生成する活性
-：データなし
（Wade 1968から作成）[41]

2.4.2.1.3 L-アスパラギナーゼのマウス白血病細胞における増殖抑制作用（Nakashima 1976）[33]

In vitro 試験で，細胞増殖がアスパラギンに依存しているマウス白血病L5178Y細胞及びアスパラギン非依存性のL5178Y-R細胞を用いて，大腸菌由来L-アスパラギナーゼのRNA及びたん白質合成に対する作用より細胞増殖抑制作用を検討した．たん白質合成阻害については，L-アスパラギナーゼ（10 U/mL）を両細胞に処理し，^{3}H-ロイシン（1 μCi/mLを60分間インキュベーション）の細胞への取り込み量を指標として，たん白質合成阻害能を測定した．

細胞培養液からアスパラギンを除去した試験では，L5178Y細胞はコントロール値に対して細胞内たん白質合成が30～40%阻害され，L5178Y細胞ではリボゾームRNA産生量も同時に減少していたが，L5178Y-R細胞ではたん白質合成は阻害を受けなかった．L-アスパラギナーゼで処理したL5178Y細胞及びL5178Y-R細胞では，たん白質合成はともに80%以上阻害され，リボゾームRNA産生もまた両細胞で顕著に阻害された．したがって，L-アスパラギナーゼ処理によってアスパラギンの除去と同様にRNA及びたん白質合成が阻害され，細胞増殖が抑制されたと考えられたことから，L-アスパラギナーゼの治療効果は，アスパラギンの枯渇によることが示唆された．

2.4.2.1.4　ヒト及び動物のアスパラギン濃度と抗腫瘍作用（Cooney 1970b）[15]

動物及びヒトの血漿及び赤血球のアスパラギン濃度を測定した（表2.4.3）．ヒトの血漿中アスパラギン濃度は7.3 μg/mLであった．ウサギの血漿中濃度は他の動物及びヒトに比べて最も高かった．組織球性白血病患者の血漿中アスパラギン濃度は3.2 μg/mLで，健常人に比べて4.1 μg/mL低かった．自然発症した未分化リンパ肉腫を有する雌Dachshundイヌに L-アスパラギナーゼ（10 U/kg）を静脈内投与すると，急速かつ持続性の血漿中アスパラギン濃度の減少及びアスパラギン酸濃度の増加がみられた．また，腫瘍容積はアスパラギン濃度の顕著な減少とともに減少した．L-アスパラギナーゼの投与中止により，血漿中アスパラギン濃度は回復し，アスパラギン酸濃度の減少に伴い，腫瘍の再増殖がみられた．

表 2.4.3　血液中アスパラギン濃度

動物種	血漿（μg/mL）	赤血球（μg/mL）
マウス[A]	3.8 ± 0.1	6.3 ± 0.7
ラット[A]	10.2 ± 0.5	12.8 ± 0.9
ウサギ[B]	24 ± 9	ND
イヌ[A]	7.4 ± 0.5	5.8 ± 0.3
ヒト[A]	7.3 ± 1.6	14.7 ± 0.7

平均値 ± 標準誤差，[A]：Cooney 1970b表2から引用（表中の血液中濃度の単位は 原著のnmol/mLからμg/mLに変換して表記した）[15]，[B]：Ho 1988 から引用[22]
ND：実施していない

2.4.2.1.5　大腸菌由来及び *Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼの抗腫瘍作用の比較（Roberts 1976）[36]

大腸菌由来及び*Er carotovora*菌由来L-アスパラギナーゼのリンパ性白血病細胞EARAD-1及びL5178Y/CA55に対する抗腫瘍作用をそれぞれB6AF1/J系マウス又はBDF_1系マウスで比較した．EARAD-1細胞をマウスの皮下に移植し，移植後1日及び11日からL-アスパラギナーゼの0，125又は250 U/kgを5日間腹腔内投与した．また，L5178Y/CA55細胞を移植した試験では，移植後9日からL-アスパラギナーゼの0，250又は500 U/kgを5日間腹腔内投与した．大腸菌由来及び*Er carotovora*菌由来L-アスパラギナーゼともに対照群に比べて明らかな生存期間の延長がみられたが，大腸菌由来L-アスパラギナーゼは*Er carotovora*菌由来L-アスパラギナーゼより強い作用を示した（表2.4.4）．一方，本試験における大腸菌由来L-アスパラギナーゼ及び*Er carotovora*菌由来L-アスパラギナーゼの250 U/kgを腹腔内投与したときの血漿中消失半減期はそれぞれ，28時間及び24時間であり，大腸菌由来L-アスパラギナーゼの血漿中消失半減期の方がやや長かったが，投与後24時間の血漿中アスパラギン濃度はともに検出下限未満（<2 nmol/mL）であった．したがって，大腸菌由来L-アスパラギナーゼ及び*Er carotovora*菌由来L-アスパラギナーゼの生存期間に対する作用の違いの原因は明らかではなかったが，著者らは大腸菌由来のアスパラギナーゼの方が血管外領域への分布がより大きいことが原因である可能性を推察している．

表 2.4.4　大腸菌由来及び *Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼの
マウスにおける腫瘍増殖に対する作用

由来菌・投与量 (U/kg)	EARAD-1 細胞				L5178Y/CA 55細胞	
	投与期間；1～5 日		投与期間；11～15 日		投与期間；9～13 日	
	生存期間（日）[A]	90日生存数	生存期間（日）[A]	90日生存数	生存期間（日）[A]	90日生存数
生理食塩液	16 ± 0.8	0/10	16 ± 0.8	0/5	28 ± 2.4	0/5
大腸菌 125	>90	9/10	29 ± 2.1	0/5	ND	ND
大腸菌 250	>90	10/10	41 ± 2.9	2/5	>90	3/5
Erwinia 菌 125	32 ± 3.2	2/10	23 ± 1.0	0/5	ND	ND
Erwinia 菌 250	48 ± 2.0	5/10	29 ± 2.4	0/5	37 ± 2.4	0/5
Erwinia 菌 500	ND	ND	ND	ND	40 ± 2.2	0/5

[A]：中央値 ± 標準誤差，ND：実施していない　　（Roberts 1976 表 2 を改編 [36]）

2.4.2.1.6　*Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼによる幼若化反応の抑制作用（Han 1972）[21]

本試験ではヒト培養リンパ球を用い，マイトジェン及び抗原の刺激による幼若化反応について，*Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼ及び大腸菌由来 L-アスパラギナーゼを比較検討した．両 L-アスパラギナーゼの濃度は 0.001～1.0 U/mL とした．ヒトリンパ球にそれぞれの L-アスパラギナーゼとマイトジェン及び抗原を加えて 37°C で，それぞれ 5～6 日間及び 7～8 日間インキュベーション後，^{3}H-チミジン（1 μCi/tube）を添加し，24 時間後にリンパ球への ^{3}H-チミジン取り込み量を測定した（表 2.4.5）．

その結果，*Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼ及び大腸菌由来 L-アスパラギナーゼは，0.1 U/mL 以上の用量でマイトジェン及び抗原による幼若化反応を抑制した．*Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼでは，大腸菌由来 L-アスパラギナーゼに比べて強い抑制がみられた．また，フィトヘマグルチニン（PHA）で刺激した細胞の DNA 合成及び RNA 合成について，^{3}H-チミジン（DNA 合成）及び ^{3}H-ウリジン（RNA 合成）の細胞への取り込み量を比較検討した．両 L-アスパラギナーゼの濃度は 0.01～0.1 U/mL とした．その結果，*Er carotovora* 菌由来及び大腸菌由来 L-アスパラギナーゼともに DNA 合成及び RNA 合成を同程度抑制することが示された．この試験では，両 L-アスパラギナーゼは 100°C で 10 分間，加熱処理をすると酵素活性は消失した．また，大腸菌由来 L-アスパラギナーゼに比べ *Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼの方が幼若化反応の抑制作用は強かったことより，その原因を検討するために，両酵素の培養液中での安定性及びリンパ球への ^{3}H-ウリジン取り込み量を比較検討した．その結果，培養液中でのインキュベーションでは，両酵素とも 5 日間にわたり安定に維持されていた．リンパ球への ^{3}H-ウリジン取り込みに対する比較試験では，6C3HED マウスリンパ腫及びヒト ALL 患者（2 例）から採取したリンパ球を用いて，両 L-アスパラギナーゼ（0.002～0.2 U/mL）の細胞への ^{3}H-ウリジン（1 μCi/tube）

の取り込み量に対する作用を検討した結果，両 L-アスパラギナーゼの ^{3}H-ウリジン取り込み阻害作用は同程度であった．*Er carotovora* 菌由来及び大腸菌由来 L-アスパラギナーゼの L-グルタミナーゼ作用は，L-アスパラギナーゼの作用のそれぞれ 10.4 及び 2.5%であった．

アスパラギナーゼの免疫抑制の作用機序については，まだ，明確になっていない（Kafkewitz 1984）[25].

表 2.4.5　マイトジェン及び抗原刺激によって誘導したヒトリンパ球幼若化反応における ^{3}H-チミジン取り込みに対する *Er carotovora* 菌由来及び大腸菌由来 L-アスパラギナーゼの抑制作用の比較

			^{3}H-チミジン取り込み ×10^{3} DPM							
マイトジェン及び抗原	試験数	対照	*Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼ (U/mL)				大腸菌由来 L-アスパラギナーゼ (U/mL)			
			0.001	0.01	0.1	1.0	0.001	0.01	0.1	1.0
PHA	13	122 (16)	98 (23)	53 (16)*	0.8 (0.4)*	0.1 (0.05)	100 (18)	100 (21)*	29 (7.1)**	0.2 (0.09)
CCA	3	49 (20)	13 (6.0)	2 (0.2)*	0.6 (0.04)*	0.7 (0.03)	28 (6.0)	18 (7.4)*	12 (6.0)*	0.9 (0.2)
PWM	7	109 (22)	80 (12)	34 (14)	0.3 (0.1)*	0.1 (0.04)	90 (16)	67 (13)	13 (1.9)*	0.2 (0.09)
SF	3	74 (12)	60 (15)	16 (7.0)	0.9 (0.3)*	0.6 (0.1)	65 (9.2)	40 (16)	15 (4.5)*	0.8 (0.07)
2-way MLC	4	104 (25)	50 (12)	13 (5.2)*	2 (0.8)*	1 (0.2)	70 (12)	61 (13)*	27 (3.9)*	1 (0.04)
Varidase	3	30 (5.5)	20 (6)	8 (5.1)	0.2 (0.09)*	0.3 (0.1)	23 (8.4)	24 (6.5)	6 (0.2)*	0.1 (0.04)
PPD	1	56	9	0.4	0.3	0.3	25	20	4	0.3

数値は平均値（標準誤差），*：P<0.05，**：P<0.01（Wilcoxon t test，原著で 1.0 U/mL に有意差は記載されていない）.

PHA : phytohaemagglutinin, CCA : concanavalin A, PWM : pokeweed mitogen, SF : staphylococcal filtrate, 2-way MLC : two- way mixed lymphocyte culture, Varidase : streptokinase/streptdornase, PPD : purified protein derivatives.

（Han 1972 表 1 から引用）[21]

2.4.2.1.7　*Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼ及び大腸菌由来 L-アスパラギナーゼの免疫抑制作用の比較（Ashworth 1974）[2]

1)　L-アスパラギナーゼの単回投与によるマウスの免疫反応に対する作用

Er carotovora 菌由来 L-アスパラギナーゼ及び大腸菌由来 L-アスパラギナーゼをヒツジ赤血球とともに 1 群 10 例の C57BL 系マウスに 0，2，10，50 及び 250 U/動物の用量で単回腹腔内投与し，投与後 4 日に血清を採取し，ヘマグルチニンに対する抗体価を測定した．

その結果，大腸菌由来 L-アスパラギナーゼでは 2 U/動物以上の全ての用量で抗体産生を抑制したが，*Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼでは 250 U/動物の用量でのみ抗体産生を抑制した．250 U/動物の用量では両 L-アスパラギナーゼ間の抗体価抑制作用に違いはみられなかった（表 2.4.6）.

表 2.4.6　*Er carotovora* 菌及び大腸菌由来 L-アスパラギナーゼをマウスに単回投与したときのヒツジ赤血球に対する免疫反応

酵素投与量 (U/動物)	ヘマグルチニン抗体価	
	Er carotovora 菌由来 L-アスパラギナーゼ	大腸菌由来 L-アスパラギナーゼ
0	5.2（4.3～6.1）	
2	4.7（3.7～5.6）	1.5（0.9～2.2）
10	3.3（2.2～4.4）	1.4（0.5～2.3）
50	3.4（2.5～4.3）	0.7（0.2～1.2）
250	0.9（0.4～1.4）	0.8（0.04～1.5）

（）：95%信頼限界　　（Ashworth 1974 表 1 から引用）[2]

2)　L-アスパラギナーゼの反復投与によるマウスの免疫反応に対する作用

1 群 20 例の C3H 系マウスに大腸菌由来 L-アスパラギナーゼ及び *Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼをヒツジ赤血球とともに 0，2，10，50，250 及び 1,250 U/動物/日の用量で 4 日間腹腔内投与した. 投与終了後 1 日及び 2 日にそれぞれ 1 群 10 例より血液を採取し，ヘマグルチニンに対する抗体価を測定した.

反復投与では，*Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼ投与群の抗体価は，大腸菌由来 L-アスパラギナーゼ投与群の抗体価に比べて低かった（表 2.4.7）.

表 2.4.7　*Er carotovora* 菌及び大腸菌由来 L-アスパラギナーゼをマウスに 4 日間反復投与したときのヒツジ赤血球に対する免疫反応

酵素投与量 (U/動物/日)	ヘマグルチニン抗体価	
	Er carotovora 菌由来 L-アスパラギナーゼ	大腸菌由来 L-アスパラギナーゼ
0	6.6（6.1～7.1）	
2	3.9（3.2～4.7）	2.4（1.6～3.1）
10	2.3（1.4～3.1）	2.4（1.4～3.4）
50	1.7（1.0～2.3）	1.9（1.0～2.8）
250	0.6（-0.01～1.1）	1.5（0.6～2.3）
1,250	0.2（～0.7）	2.0（1.2～2.8）

（）：95%信頼限界　　（Ashworth 1974 表 2 から引用）[2]

3)　L-アスパラギナーゼの *in vitro* ウサギ白血球の幼若化反応に対する作用

*In vitro*試験ではフィトヘマグルチニンで刺激したウサギ白血球のリンパ球の幼若化反応について，^{3}H-チミジンの取り込みを指標として検討した.

その結果，フィトヘマグルチニンで刺激したウサギ白血球リンパ球の幼若化反応の抑制に対して，*Er carotovora*菌由来L-アスパラギナーゼは，大腸菌由来L-アスパラギナーゼより10倍強い抑制作用を示した.

2.4.2.1.8 *Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼ及び大腸菌由来 L-アスパラギナーゼの免疫抑制作用（Cavanna 1976）[12]

ラットのヒツジ赤血球（SRBC）に対する免疫反応における L-アスパラギナーゼの短期及び長期反復投与の抑制作用について脾臓内溶血斑形成細胞（HPFC）数の測定により検討した.

短期反復投与では Wistar 系ラット（雌雄各 9 例/群）に *Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼ及び大腸菌由来 L-アスパラギナーゼの 3,200 U/kg/日を SRBC で免疫する 2 日前から免疫後 4 日まで 7 日間腹腔内投与し，SRBC で免疫後 5 日に HPFC 数を測定した．その結果，対照群（生理食塩液）に比べ，HPFC 数はそれぞれ 90.7%及び 93.8%減少した.

また，長期反復投与では Wistar 系ラット（雌雄各 12 例/群）に *Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼ及び大腸菌由来 L-アスパラギナーゼの 0，800 及び 3,200 U/kg/日を 1 週間に 5 日間，3 ヶ月間反復腹腔内投与し，投与期間中に 15 日間隔で各群雌雄それぞれ 2 例に SRBC を投与し，SRBC 投与後 5 日に HPFC 数を測定した．その結果，*Er carotovora* 菌由来及び大腸菌由来 L-アスパラギナーゼの 3,200 U/kg/日投与により HPFC 数は著しく減少した（約 90%減少）．HPFC 数は両 L-アスパラギナーゼとも性差はなく，概ね用量に依存していた.

2.4.2.1.9 *Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼに対する免疫寛容（Ashworth 1973）[3]

*Er carotovora*菌由来L-アスパラギナーゼの免疫原性についてマウス及びウサギで検討した.

雄 C3H 系マウスに L-アスパラギナーゼを 0，1.6，10.4，54 及び 310 μg/動物（それぞれ 0，56，364，1,890 及び 10,850 U/kg）の用量で，1 週間に 3 日間，10 週間腹腔内投与し，各群の半数例に最終投与後 11 日に L-アスパラギナーゼ 1.8 mg を投与し，残りの半数例にはフロイント完全アジュバント（FCA）と混和した L-アスパラギナーゼ（50 μg）を投与した．その結果，L-アスパラギナーゼ最終投与後 10 日では，わずかな抗体価がみられ，310 μg/動物群では低用量群に比べて明らかに低い力価がみられたが，これは免疫寛容というよりむしろ免疫抑制の結果であると考えられた．この試験では特異的な免疫寛容が示され，血液クリアランスが血清抗体価の産生よりも早急に起こったことによると考えられた.

New Zealand White 系ウサギ（雄，対照群 8 例，被験物質及び薬剤投与群 14 例）に L-アスパラギナーゼを 0.6～0.7 mg/kg（420～490 U/kg）及びシクロホスファミドを 20 mg/kg の用量で 3 日間連日静脈内投与し，さらに L-アスパラギナーゼを 2～3 日毎に 10 回静脈内投与後，免疫原性について検討した．その結果，L-アスパラギナーゼ及びシクロホスファミドによる免疫寛容誘導においても免疫原性の低下はみられなかった.

2.4.2.1.10 *Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼの免疫学的特性

（MacLennan 1971）[31]

1） 遅延型アレルギー反応

Dunkin-Hartley 系モルモット（300～400 g）で，FCA を用いて *Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼ及び大腸菌由来 L-アスパラギナーゼで感作した遅延型アレルギー反応における免疫交差性について検討した．1 群 6 例のモルモットの四肢に *Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼ又は大腸菌由来 L-アスパラギナーゼを FCA とともに皮下投与した．2 週間後に，それぞれ 6 例に *Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼ又は大腸菌由来 L-アスパラギナーゼ 10 μg 及び精製ツベルクリンたん白質（0.1 mL 生理食塩液）を皮内投与した．

その結果，*Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼ又は大腸菌由来 L-アスパラギナーゼで感作されたモルモットは，ともに同一 L-アスパアラギナーゼ投与では皮膚に炎症反応がみられたが，遅延型アレルギー反応における免疫交差性はみられなかった（表 2.4.8）．

表 2.4.8 *Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼ及び大腸菌由来 L-アスパラギナーゼに対する遅延型皮膚反応

感作抗原	誘発後 24 時間での皮膚の厚さの増加（%）		
	精製ツベルクリンたん白質	*Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼ	大腸菌由来 L-アスパラギナーゼ
対照群（生理食塩液）：FCA	71	0	0
Er carotovora 菌由来 L-アスパラギナーゼ：FCA	35	69	0
大腸菌由来 L-アスパラギナーゼ：FCA	29	0	66

（MacLennan 1971 表 2 から引用）[31]

2） 即時型アレルギー反応（アナフィラキシー反応）

Dunkin-Hartley 系モルモット（400～500 g）で，*Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼ（600 U/動物）又は大腸菌由来 L-アスパラギナーゼ（600 U/動物）を 2～3 日間隔で 4 回皮下投与し，その 5 週間後に同用量の *Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼ又は大腸菌由来 L-アスパラギナーゼを静脈内投与して，免疫交差性について検討した（アナフィラキシー反応）．

即時型アレルギー反応においても，*Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼ及び大腸菌由来 L-アスパラギナーゼともに同一 L-アスパラギナーゼ投与ではアナフィラキシー反応により死亡例がみられたが，*Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼ投与動物に大腸菌由来 L-アスパラギナーゼを投与，又は大腸菌由来 L-アスパラギナーゼ投与動物に *Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼを投与したときにはアナフィラキシーはみられなかったことより，免疫交差性は示さないものと考えられた（表 2.4.9）．

表 2.4.9　モルモットにおけるアナフィラキシー反応

感作抗原	誘発後 5 分以内の死亡動物数／感作動物数	
	Er carotovora 菌由来 L-アスパラギナーゼ	大腸菌由来 L-アスパラギナーゼ
Er carotovora 菌由来 L-アスパラギナーゼ	4/9	0/8
大腸菌由来 L-アスパラギナーゼ	0/8	8/8

（MacLennan 1971 表 1 から引用）[31]

2.4.2.2　副次的薬理試験

副次的薬理試験は実施していない．公表論文より *Er carotovora* 菌由来及び *Er chrysanthemi* 菌由来 L-アスパラギナーゼの基質特異性及び酵素特性について下記に引用した．

Er chrysanthemi 菌由来 L-アスパラギナーゼはアスパラギンの他にアスパラギン類似物を加水分解するが，L-アスパラギンへの特異性が高く，L-アスパラギンに対する K_m 値はグルタミンに対する K_m 値に比べ 1/116 であった（表 2.4.10）（Kotzia 2007）[29]．また，*Er chrysanthemi* 菌由来 L-アスパラギナーゼの L-アスパラギンに対する K_m 値は *Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼの L-アスパラギンに対する K_m 値より低かった（Howard 1972, Krasotkina 2004, Kotzia 2005）[24,30,28]．一方，*Er chrysanthemi* 菌由来 L-アスパラギナーゼのグルタミンに対する K_m 値は，*Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼより高かった（Krasotkina 2004）[30]．

L-アスパラギナーゼの毒性は，部分的には L-グルタミナーゼ活性に起因しているとも考えられており，L-グルタミンへの低親和性は重要であると考えられる（Howard 1972）[24]．L-アスパラギナーゼが L-アスパラギンに高親和性を示し，L-グルタミンには低親和性を示していることから，がん治療においては副作用は少なくなることが示唆される（Hawkins 2004）[23]．しかし，L-グルタミナーゼ活性が L-アスパラギナーゼの臨床効果に寄与するとの報告もあり（Avramis 2005）[4]，*Er chrysanthemi* 菌由来 L-アスパラギナーゼによる治療において，L-グルタミンへの低親和性が果たす役割については明らかではない．

表 2.4.10　*Er chrysanthemi* 菌由来 L-アスパラギナーゼの酵素反応速度

基質	K_m (mM)	k_{cat} ($\times 10^3$ s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\times 10^3$ mM^{-1} s^{-1})
L-アスパラギン	0.058 ± 0.0131	23.8 ± 1.1	411.8
L-グルタミン	6.7 ± 1.1	4.3 ± 0.5	0.6
スクシンアミド酸	18.8 ± 4.8	23.9 ± 4.5	1.3
N^{α}-アセチル-L-アスパラギン	0.80 ± 0.09	10.8 ± 0.2	13.4
ß-アラニンアミド	ND	ND	ND

ND：活性は認められない

（Kotzia 2007表2から引用）[29]

Er carotovora 菌由来 L-アスパラギナーゼの基質特異性及び酵素プロファイルを検討した結果を表 2.4.11 に示した．L-アスパラギンへの K_m 値（0.01 mM）は，*Er chrysanthemi* 菌由来 L-アスパラギナーゼ（0.058 mM）よりも低く，スクシンアミド酸に対する K_m 値は *Er carotovora* 菌由来及び *Er chrysanthemi* 菌由来 L-アスパラギナーゼでほぼ同じであった．

表 2.4.11　*Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼの酵素反応速度

基質	K_m（mM）	V_{max}（μmol/min/unit）
L-アスパラギン	0.01	0.923
D-アスパラギン	62	0.177
L-グルタミン	1.1	0.09
D-グルタミン	180	0.002
スクシンアミド酸	15	0.24

V_{max}：最大速度　　（Howard 1972 表 3 から引用）[24]

2.4.2.3　安全性薬理試験

安全性薬理試験として，クリサンタスパーゼのサルの心血管系に及ぼす作用を GLP に準拠して検討した（表 2.4.12）．

表 2.4.12　サルの心血管系における試験

試験項目	試験系	投与経路（期間）	試験番号	記載箇所
心血管系に及ぼす作用	カニクイザル	筋肉内（単回）	OD12311	4.2.1.3.1

2.4.2.3.1　サルの心血管系に対する作用

（添付資料：4.2.1.3.1）

カニクイザル（雄 4 例）を用いて，クリサンタスパーゼの心血管系に対する作用を，テレメトリー法を用いて記録した（OD12311 試験）．試験は GLP に準拠して実施した．心血管系測定パラメータとして，心拍数，血圧（収縮期血圧，拡張期血圧及び平均血圧）並びに心電図（PR 間隔，QRS 時間，QT 間隔及び QTc 間隔）を測定した．測定ポイントは，各投与日の投与前，投与後 1，2，4，8 及び 24 時間（6 ポイント）とした．媒体（生理食塩液），クリサンタスパーゼの 2,000 及び 5,000 U/kg（臨床用量の 2.5 倍に相当）を 7 日間間隔で漸増筋肉内投与した．

その結果，クリサンタスパーゼを 2,000 及び 5,000 U/kg の用量で筋肉内投与後 24 時間まで心拍数，血圧（収縮期，拡張期及び平均血圧）並びに心電図パラメータ（PR 間隔，QRS 時間，QT 間隔及び QTc 間隔）に，被験物質投与に起因すると考えられる変動は認められなかった．一般状態では，2,000 U/kg で 4 例中 1 例に投与後 8 時間の採血時に少量の嘔吐物（白色泡沫液）が認められた．5,000 U/kg では，4 例中 4 例に中等量から多量の嘔吐物が認められた．

以上より，クリサンタスパーゼをサルに臨床用量の 2.5 倍量相当の 5,000 U/kg まで投与しても心血管系に影響は及ぼさないと判断された.

2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施していない.

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 まとめ

L-アスパラギナーゼ製剤は，既に ALL の標準的な治療薬として国内外で 40 年以上にわたり使用されており，臨床における有効性及び薬剤プロファイルは広く知られている．クリサンタスパーゼは大腸菌由来 L-アスパラギナーゼの代替薬としてのバイオ医薬品であり，ICH ガイドライン S6（R1）を参考にして，新たに非臨床薬物動態試験を実施する意義は低いと判断し，クリサンタスパーゼについては医薬品の製造販売承認申請のために通常実施される薬物動態試験は実施していない．但し，吸収については生殖発生毒性試験においてトキシコキネティクスを検討して，その結果を 2.6.6 項に記載した．*Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼの公表論文から消失半減期についての情報を以下に記載する．

2.4.3.1.1 L-アスパラギナーゼの消失半減期の検討

1) マウス

(1) 雄 $BD2F_1$ 系マウスに *Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼを 10 U（マウスの体重を 25 g と想定した場合，400 U/kg に相当）の用量で腹腔内投与したときの血漿中消失半減期は 5 時間であった（Uren 1979）[39].

(2) 雄 T/O 系マウス（25～30 g）に，*Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼを 1mg の用量で静脈内投与したときの血漿中消失半減期は 15 時間であった．一方，*Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼの 20 μg を 1 週間間隔で 3 回筋肉内投与して免疫したマウスでは血漿中消失半減期は 7 時間であった（Fernandes 2001）[18].

(3) C3H 系マウス（性別は不明）に *Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼ約 40 U（1,600 U/kg に相当）の用量で腹腔内投与したときの血液中消失半減期は 7.5 時間であった（Benbough 1979）[5].

2) ラット

(1) 雄 Wistar 系ラット（約 200 g）に *Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼ又は大腸菌由来アスパラギナーゼを 8,000 U/kg の用量で静脈内投与したときの血液中消失半減期はそれぞれ 1.5 時間及び約 3 時間であった（Hall 1970）[20].

(2) ラット（系統及び性別は不明）に *Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼ及び大腸菌由来アスパラギナーゼを 300 U（ラットの体重を 250 g と想定した場合，1,200 U/kg に相当）で静脈内投与したときの血液中消失半減期はそれぞれ 1.6 ± 0.1 時間及び 1.4 ± 0.1 時間であった（Blazek 1981）[6].

3) ウサギ

(1) ウサギ（1.5～2.5 kg，系統及び性別は不明）に *Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼを 5 mg/kg（約 2,500 U/kg）の用量で静脈内投与したときの血漿中消失半減期は 626 分（約 10.5 時間）であった（Rutter 1971b）[38].

(2) ウサギ（2.5～3.6 kg，交雑種，性別は不明）に *Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼを約 2,000 U/動物（約 670 U/kg）の用量で静脈内投与したときの血液中消失半減期は 11±1 時間であった（Benbough 1979）[5].

4) ヒツジ

(1) ヒツジ（系統及び性別は不明）に *Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼを 17,000 U の用量で静脈内投与したときの血液中消失半減期は 2 時間であった（Hall 1970）[20].

5) サル

(1) アカゲザル（7.7 kg，性別は不明）に *Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼを 1,000 U（130 U/kg）の用量で静脈内投与したときの血漿中消失半減期は 1.6 時間であった（Uren 1982）[40].

(2) 雄アカゲザル（6.5～8.1 kg）に *Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼを 1,000 U/m^2（約 83 U/kg）の用量で髄腔内に投与し，脳脊髄液中でのクリアランスを調べた結果，*Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼの脳脊髄液中消失半減期は 5.8～6.1 時間で，脳脊髄液流のマーカーである DTPA（ジエチレントリアミンペンタ酢酸）の消失半減期と同様であった（Riccardi 1981）[35].

各動物種における消失半減期を表 2.4.13 にまとめた.

表 2.4.13　マウス，ラット，ウサギ，ヒツジ及びサルにおける消失半減期

動物種 系統（性別）	L-アスパラギナーゼ由来菌種	投与量・投与経路 （単回投与）	消失半減期： 時間（組織）	文献
マウス				
BD2F$_1$（雄）	*Er carotovora*菌	10 U（400 U/kgに相当）・腹腔内	5 （血漿）	Uren 1979[39]
T/O（雄）	*Er carotovora*菌	1mg・静脈内	15 免疫*：7 （血漿）	Fernandes 2001[18]
C3H（性別不明）	*Er carotovora*菌	約40 U（1,600 U/kgに相当）・腹腔内	7.5 （血液）	Benbough 1979[5]
ラット				
Wistar（雄）	*Er carotovora*菌 大腸菌	8,000 U/kg・静脈内	1.5 約3 （血液）	Hall 1970[20]
系統及び性別不明	*Er carotovora*菌 大腸菌	300 U・静脈内	1.6 ± 0.1, 1.4 ± 0.1 （血液）	Blazek 1981[6]
ウサギ				
系統及び性別不明	*Er carotovora*菌	5 mg/kg・静脈内	約10.4 （血漿）	Rutter 1971b[38]
交雑種（性別不明）	*Er carotovora*菌	約 2,000 U（約 670 U/kg）・静脈内	11 ± 1 （血液）	Benbough 1979[5]
ヒツジ				
系統及び性別不明	*Er carotovora*菌	17,000 U・静脈内	2 （血液）	Hall 1970[20]
サル				
アカゲザル（性別不明）	*Er carotovora*菌	1,000 U（130 U/kg）・静脈内	1.6 （血漿）	Uren 1982[40]
アカゲザル（雄）	*Er carotovora*菌	1,000 U/m^2（約 83 U/kg）・髄腔内	5.8～6.1 （脳脊髄液）	Riccardi 1981[35]

*：*Er carotovora*菌由来L-アスパラギナーゼの20 μgを1週間間隔で3回筋肉内投与して免疫したマウス

Er carotovora 菌由来 L-アスパラギナーゼを，その酵素活性を維持したまま，等電点（pH3.3～9.7）が変化するようにアシル化，脱アミノ化及びカルボジイミド化による化学修飾をした．等電点の測定は等電点電気泳動法を用いて実施した（LKB 法）．ウサギ（1.5～2.5 kg，系統及び性別は不明）に化学修飾した *Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼを 5 mg/kg（約 2,500 U/kg）の用量で静脈内投与し，血液試料を 24 時間採取し，血漿中消失半減期を求めた．

その結果，等電点の変化は消失半減期に大きく影響を及ぼし，血漿中の酵素の消失半減期は等電点がpH6.0において最大であった（1,125分）．化学修飾しないアスパラギナーゼの等電点はpH8.7で消失半減期は626分であった（Rutter 1971b）[38]．

2.4.3.2　分析法

試験は実施していない．

2.4.3.3 吸収

試験は実施していない.

2.4.3.4 分布

試験は実施していない.

2.4.3.5 代謝

試験は実施していない.

2.4.3.6 排泄

試験は実施していない.

2.4.3.7 薬物動態学的薬物相互作用

試験は実施していない.

2.4.3.8 その他の薬物動態試験

試験は実施していない.

2.4.4 毒性試験

毒性試験として，非 GLP 下で単回投与毒性試験，反復投与毒性試験並びにその他の毒性試験として糖尿病誘発試験及び発熱性物質試験を実施した．なお，単回及び反復投与毒性試験については，GLP 施行前に実施された試験であり，また「医薬品毒性試験法ガイドライン」も存在しなかったことより，試験報告書に単回投与毒性試験では概略の致死量が，反復投与毒性試験では無毒性量が記載されていない．しかし，本製造販売承認申請では，試験報告書の結果より評価し，単回投与毒性試験では概略の致死量及び最大非致死量，反復投与毒性試験では無毒性量についても記載した．

また，生殖発生毒性試験を ICH 及び経済協力開発機構（OECD）ガイドライン並びに GLP に準拠して実施し，さらに局所刺激性試験も GLP に準拠して実施した．実施した毒性試験一覧を以下に示す（表 2.4.14）．

表 2.4.14　毒性試験一覧表

試験項目	動物種･系統	投与経路（期間）	試験番号（L-アスパラギナーゼ由来菌種）	GLP適合	記載箇所
単回投与毒性試験	CFLP マウス	腹腔内	11/71/D409 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	非適合	4.2.3.1.1
	CFLP マウス	腹腔内	4016/71/174 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	非適合	4.2.3.1.2
	CD マウス	腹腔内	031-665-6881 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	非適合	4.2.3.1.3
	CFY ラット	静脈内	12/71/D410 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	非適合	4.2.3.1.4
	CFY ラット	静脈内	4015/71/173 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	非適合	4.2.3.1.5
	Swiss ラット	静脈内	031-665-6881 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	非適合	4.2.3.1.3
	ラット（系統は不明）	静脈内	SSARL-DPH-72-05 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	非適合	4.2.3.1.6
	ハムスター（系統は不明）	腹腔内	SSARL-DPH-72-05 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	非適合	4.2.3.1.6
	NZW ウサギ	静脈内	13/71/D411 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	非適合	4.2.3.1.7
	NZW ウサギ	静脈内	4017/71/175 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	非適合	4.2.3.1.8
	NZW ウサギ	静脈内	031-665-6881 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	非適合	4.2.3.1.3
	ウサギ（系統は不明）	静脈内	SSARL-DPH-72-02 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	非適合	4.2.3.2.1
	ウサギ（系統は不明）	静脈内	SSARL-DPH-72-05 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	非適合	4.2.3.1.6
反復投与毒性試験	ウサギ（系統は不明）	静脈内（5 日間）	SSARL-DPH-72-02 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	非適合	4.2.3.2.1
	ビーグル犬	静脈内（28 日間）	HRC1969 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	非適合	4.2.3.2.2
	アカゲザル	静脈内（5 日間）	SSARL-DPH-69-00 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	非適合	4.2.3.2.3
	アカゲザル	静脈内（5 日間）	SSARL-DPH-71-2 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	非適合	4.2.3.2.4
	アカゲザル	静脈内（5 日間）	SSARL-DPH-71-1 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	非適合	4.2.3.2.5
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	SD ラット	筋肉内（雄：交配前 4 週～剖検前日，雌：交配前 2 週～妊娠 6 日）	11-4368 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	適合	4.2.3.5.1.1
胚・胎児発生に関する試験	SD ラット（用量設定試験）	筋肉内（妊娠 6 日～16 日）	11-4369 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	非適合	4.2.3.5.2.1

表 2.4.14　毒性試験一覧表（続き）

試験項目	動物種･系統	投与経路（期間）	試験番号（L-アスパラギナーゼ由来菌種）	GLP適合	記載箇所
胚･胎児発生に関する試験	SD ラット	筋肉内（妊娠 6 日～16 日）	11-4370 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	適合	4.2.3.5.2.2
	NZW ウサギ（用量設定試験）	筋肉内（妊娠 6 日～18 日）	11-4371 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	非適合	4.2.3.5.2.3
	NZW ウサギ	筋肉内（妊娠 6 日～18 日）	11-4372 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	適合	4.2.3.5.2.4
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	SD ラット	筋肉内（妊娠 6 日～授乳 20 日）	11-4373 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	適合	4.2.3.5.3.1
局所刺激性試験	Kbl:JW ウサギ	筋肉内（単回，2 回）	OD12312 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	適合	4.2.3.6.1
	Kbl:JW ウサギ	筋肉内（単回）	OD13086 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	適合	4.2.3.6.2
その他の毒性試験 糖尿病誘発試験	ウサギ（系統は不明）	静脈内（単回）	SSARL-DPH-70-07 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	非適合	4.2.3.7.7.1
	アカゲザル	静脈内（5 日間）	SSARL-DPH-70-07 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	非適合	4.2.3.7.7.1
発熱性物質試験	ウサギ（系統は不明）	静脈内（単回）	HRC 97 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	非適合	4.2.3.7.7.2
	NZW ウサギ	静脈内（単回）	031-665-6881 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	非適合	4.2.3.1.3

SD：Sprague-Dawley，NZW：New Zealand White，Kbl:JW：日本白色種.

2.4.4.1　単回投与毒性試験

2.4.4.1.1　マウス

マウスの単回投与毒性試験は非 GLP 下で 3 試験を実施した（表 2.4.15）.

（添付資料：4.2.3.1.1，4.2.3.1.2，4.2.3.1.3）

1) CFLP 系マウスに 5%デキストロースを含む生理食塩液に溶解した *Erwinia* 菌由来 L-アスパラギナーゼの 0，200,000，500,000 及び 1,000,000 U/kg を腹腔内投与し，投与後 21 日間観察した．その結果，500,000 及び 1,000,000 U/kg 投与群では死亡例がみられ，本試験における概略の致死量は 500,000 U/kg，最大非致死量は 200,000 U/kg であった（11/71/D409 試験）.
2) CFLP 系マウスに生理食塩液に溶解した *Erwinia* 菌由来 L-アスパラギナーゼの 0, 200,000, 500,000 及び 1,000,000 U/kg を腹腔内投与し，投与後 21 日間観察した．その結果，1,000,000 及び 500,000 U/kg 投与群では死亡例がみられ，本試験における概略の致死量は 500,000 U/kg，最大非致死量は 200,000 U/kg であった（4016/71/174 試験）.
3) CD 系マウスに *Erwinia* 菌由来 L-アスパラギナーゼの 200,000, 500,000 及び 1,000,000 U/kg を腹腔内投与し，投与後 21 日間観察した．その結果，1,000,000 及び 500,000 U/kg 投与群では死亡例がみられ，本試験における概略の致死量は 500,000 U/kg，最大非致死量は 200,000 U/kg であった（031-665-6881 試験）.

表 2.4.15　マウスの単回投与毒性試験のまとめ

系統	性別・動物数/群	投与経路（L-アスパラギナーゼ由来菌種）	特記すべき所見	概略の致死量（試験番号）
CFLP	雄 10 雌 10	腹腔内 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	死亡： 0 U/kg：雄（0/10），雌（0/10） 200,000 U/kg：雄（0/10），雌（0/10） 500,000 U/kg：雄（2/10），雌（0/10） 1,000,000 U/kg：雄（4/10），雌（3/10） 一般状態： 500,000 U/kg 以上：嗜眠	500,000 U/kg （11/71/D409）
CFLP	雄 10 雌 10	腹腔内 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	死亡： 0 U/kg：雄（1/10），雌（0/10） 200,000 U/kg：雄（0/10），雌（0/10） 500,000 U/kg：雄（1/10），雌（0/10） 1,000,000 U/kg：雄（2/10），雌（4/10） 一般状態： 500,000 U/kg 以上：排尿	500,000 U/kg （4016/71/174）
CD	雄 10 雌 10	腹腔内 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	死亡： 200,000 U/kg：雄（0/10），雌（0/10） 500,000 U/kg：雄（0/10），雌（2/10） 1,000,000 U/kg：雄（1/10），雌（1/10） 一般状態： 200,000 U/kg 以上：鎮静，排尿 500,000 U/kg：横転 1,000,000 U/kg：立毛，痙攣，眼瞼下垂，下痢	500,000 U/kg （031-665-6881）

2.4.4.1.2　ラット

ラットの単回投与毒性試験は非 GLP 下で 4 試験を実施した（表 2.4.16）.

（添付資料：4.2.3.1.3，4.2.3.1.4，4.2.3.1.5，4.2.3.1.6）

1) CFY 系ラットに 5%デキストロースを含む生理食塩液に溶解した *Erwinia* 菌由来 L-アスパラギナーゼの 0，200,000，500,000 及び 1,000,000 U/kg を静脈内投与し，投与後 21 日間観察した．その結果，1,000,000 U/kg 投与群では 10 例全例，500,000 U/kg では雄 5 例全例が死亡した．200,000 U/kg では死亡例はみられなかった．本試験における概略の致死量は 500,000 U/kg，最大非致死量は 200,000 U/kg であった（12/71/D410 試験）.

2) CFY 系ラットに生理食塩液に溶解した *Erwinia* 菌由来 L-アスパラギナーゼの 0, 200,000, 500,000 及び 1,000,000 U/kg を静脈内投与し, 投与後 21 日間観察した. その結果, 500,000 及び 1,000,000 U/kg 投与群ではともに全例，200,000 U/kg では 4 例死亡がみられた．本試験における概略の致死量は 200,000 U/kg，最大非致死量は 200,000 U/kg 未満であった（4015/71/173 試験）.

3) Swiss 系ラットに *Erwinia* 菌由来 L-アスパラギナーゼの 200,000，500,000 及び 1,000,000 U/kg を静脈内投与し，投与後 21 日間観察した．その結果，1,000,000 U/kg では全例，500,000 U/kg では 3/9 例（1 例は安楽殺）及び 200,000 U/kg では 2/10 例の死亡がみられ，本試験における概略の致死量は 200,000 U/kg，最大非致死量は 200,000 U/kg 未満であっ

た（031-665-6881 試験）.

4) ラット（系統は不明）にマンニトール生理食塩液に溶解した *Erwinia* 菌由来 L-アスパラギナーゼの 0 及び 5,000 U/kg を静脈内投与し，投与後 2 日間観察した．5,000 U/kg 投与群では死亡例はみられず，本試験における概略の致死量は 5,000 U/kg を超える量，最大非致死量は 5,000 U/kg であった（SSARL-DPH-72-05 試験）.

表 2.4.16　ラットの単回投与毒性試験のまとめ

系統	性別・動物数/群	投与経路（L-アスパラギナーゼ由来菌種）	特記すべき所見	概略の致死量（試験番号）
CFY	雄 5 雌 5	静脈内 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	死亡： 0 U/kg：雄（0/5），雌（0/5） 200,000 U/kg：雄（0/5），雌（0/5） 500,000 U/kg：雄（5/5），雌（0/5） 1,000,000 U/kg：雄（5/5），雌（5/5） 一般状態： 500,000 U/kg 以上：振戦，歩行失調，筋協調性の消失	500,000 U/kg （12/71/D410）
CFY	雄 5 雌 5	静脈内 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	死亡： 0 U/kg：雄（0/5），雌（0/5） 200,000 U/kg：雄（3/5），雌（1/5） 500,000 U/kg：雄（5/5），雌（5/5） 1,000,000 U/kg：雄（5/5），雌（5/5） 一般状態： 200,000 U/kg 以上：嗜眠，振戦，立毛，排尿，不規則呼吸	200,000 U/kg （4015/71/173）
Swiss	雄 4～5 雌 4～5	静脈内 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	死亡： 200,000 U/kg：雄（0/5），雌（2/5） 500,000 U/kg：雄（1/5），雌（2/4） 1,000,000 U/kg：雄（4/4），雌（5/5） 一般状態： 200,000 U/kg 以上：鎮静，横転，異常分泌，眼瞼下垂，下痢，排尿 500,000 U/kg 以上：立毛	200,000 U/kg （031-665-6881）
系統不明	雄 3	静脈内 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	死亡： 0 U/kg：雄（0/3） 5,000 U/kg：雄（0/3）	>5,000 U/kg （SSARL-DPH-72-05）

2.4.4.1.3　ハムスター

ハムスターの単回投与毒性試験は非 GLP 下で 1 試験を実施した（表 2.4.17）.

（添付資料：4.2.3.1.6）

ハムスター（系統は不明）にマンニトール添加生理食塩液に溶解した *Erwinia* 菌由来 L-アスパラギナーゼの 0 及び 5,000 U/kg を腹腔内投与し，投与後 2 日間観察した．その結果，死亡例はみられなかった．本試験における概略の致死量は 5,000 U/kg を超える量，最大非致死量は 5,000 U/kg であった（SSARL-DPH-72-05 試験）.

表 2.4.17　ハムスターの単回投与毒性試験のまとめ

系統	性別・動物数/群	投与経路（L-アスパラギナーゼ由来菌種）	特記すべき所見	概略の致死量（試験番号）
系統不明	雄 3	腹腔内 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	死亡： 0 U/kg：雄（0/3） 5,000 U/kg：雄（0/3） 一般状態：変化なし	>5,000 U/kg (SSARL-DPH-72-05)

2.4.4.1.4　ウサギ

ウサギの単回投与毒性試験は非 GLP 下で 5 試験を実施した（表 2.4.18）.

（添付資料：4.2.3.1.3，4.2.3.1.6，4.2.3.1.7，4.2.3.1.8，4.2.3.2.1）

1) New Zealand White 系ウサギ（雌雄各 3 例/群）に 5%デキストロースを含む生理食塩液に溶解した *Erwinia* 菌由来 L-アスパラギナーゼの 0，5,000，10,000 及び 20,000 U/kg を静脈内投与し，投与後 21 日間観察した．その結果，10,000 及び 20,000 U/kg では，ともに 5/6 例，5,000 U/kg では 4/6 例が死亡した．本試験における概略の致死量は 5,000 U/kg，最大非致死量は 5,000 U/kg 未満であった（13/71/D411 試験）.

2) New Zealand White 系ウサギ（雌雄各 3 例/群）に生理食塩液に溶解した *Erwinia* 菌由来 L-アスパラギナーゼの 0，2,000，5,000 及び 10,000 U/kg を静脈内投与し，投与後 21 日間観察した．その結果，0，2,000，5,000 及び 10,000 U/kg で，それぞれ 1，2，4 及び 5 例が死亡した．本試験における概略の致死量は 2,000 U/kg，最大非致死量は 2,000 U/kg 未満であった（4017/71/175 試験）.

3) New Zealand White 系ウサギ（雌雄各 6 例/群）に *Erwinia* 菌由来 L-アスパラギナーゼの 4,000, 8,000 及び 12,000 U/kg を静脈内投与し, 投与後 21 日間観察した. その結果, 4,000, 8,000 及び 12,000 U/kg でそれぞれ 3，7 及び 8 例の死亡例がみられた．本試験における概略の致死量は 4,000 U/kg，最大非致死量は 4,000 U/kg 未満であった（031-665-6881 試験）.

4) New Zealand White 系ウサギ（雄 2～3 例, 雌 2～3 例/群）に生理食塩液に溶解した *Erwinia* 菌由来 L-アスパラギナーゼの 1,000，2,000 及び 5,000 U/kg を静脈内投与し，投与後 35 日間観察した．その結果，2,000 及び 5,000 U/kg でそれぞれ 2 及び 5 例の死亡例がみられた．本試験における概略の致死量は 2,000 U/kg，最大非致死量は 1,000 U/kg であった（SSARL-DPH-72-02 試験）.

5) ウサギ（系統不明，雄 2 例，雌 1 例/群）にマンニトール生理食塩液に溶解した *Erwinia* 菌由来 L-アスパラギナーゼの 0 及び 5,000 U/kg を静脈内投与し，投与後 2 日間観察した. いずれの投与群でも死亡例はみられなかった. 本試験における概略の致死量は 5,000 U/kg を超える量，最大非致死量は 5,000 U/kg であった（SSARL-DPH-72-05 試験）.

表 2.4.18　ウサギの単回投与毒性試験のまとめ

系統	性別・動物数/群	投与経路（L-アスパラギナーゼ由来菌種）	特記すべき所見	概略の致死量（試験番号）
NZW	雄 3 雌 3	静脈内 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	死亡： 0 U/kg：雄（0/3），雌（0/3） 5,000 U/kg：雄（2/3），雌（2/3） 10,000 U/kg：雄（2/3），雌（3/3） 20,000 U/kg：雄（2/3），雌（3/3） 一般状態： 5,000 U/kg 以上：食欲不振，歩行失調	5,000 U/kg （13/71/D411）
NZW	雄 3 雌 3	静脈内 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	死亡： 0 U/kg：雄（0/3），雌（1/3） 2,000 U/kg：雄（2/3），雌（0/3） 5,000 U/kg：雄（3/3），雌（1/3） 10,000 U/kg：雄（2/3），雌（3/3） 一般状態： 2,000 U/kg 以上：食欲不振，歩行失調	2,000 U/kg （4017/71/175）
NZW	雄 6 雌 6	静脈内 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	死亡： 4,000 U/kg：雄（1/6），雌（2/6） 8,000 U/kg：雄（4/6），雌（3/6） 12,000 U/kg：雄（4/6），雌（4/6） 一般状態： 4,000 U/kg 以上：下痢	4,000 U/kg （031-665-6881）
NZW	雄 2～3 雌 2～3	静脈内 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	死亡： 1,000 U/kg：雄（0/3），雌（0/2） 2,000 U/kg：雄（1/2），雌（1/3） 5,000 U/kg：雄（2/2），雌（3/3） 一般状態： 5,000 U/kg：筋力低下，歩行失調，呼吸困難，振戦，痙攣	2,000 U/kg （SSARL-DPH-72-02）
系統不明	雄 2 雌 1	静脈内 (*Er chrysanthemi* NCPPB1066)	死亡： 0 U/kg：雄（0/2），雌（0/1） 5,000 U/kg：雄（0/2），雌（0/1） 一般状態：変化なし	>5,000 U/kg （SSARL-DPH-72-05）

2.4.4.2　反復投与毒性試験

Erwinia 菌由来 L-アスパラギナーゼの反復投与毒性試験として，非げっ歯類のウサギ，イヌ及びサルを用いた 5 試験を非 GLP 下で実施した．

2.4.4.2.1　ウサギの 5 日間反復静脈内投与毒性試験

（添付資料：4.2.3.2.1）

ウサギ（系統不明，雄 3 例，雌 2 例/群）に生理食塩液に溶解した *Erwinia* 菌由来 L-アスパラギナーゼの 1,000 U/kg/日を 5 日間反復静脈内投与し，投与終了後さらに 30 日間観察した．この試験では，対照群は設けなかった（SSARL-DPH-72-02 試験）．

1 例に体重減少がみられたため，安楽死させた．この動物では剖検前に血糖，血中アラニンアミノトランスフェラーゼ及び血中尿素窒素の増加及び尿糖等がみられ，病理組織学的検査では，肝細胞空胞化がみられた．生存例では，投与期間終了時に血糖の増加及び尿

糖がみられたが，剖検で異常はみられなかった．本試験における無毒性量は 1,000 U/kg/日未満と考えられた（表 2.4.19）．

表 2.4.19　ウサギの 5 日間反復静脈内投与毒性試験のまとめ

投与量：U/kg/日 （由来菌種）	0，1,000（*Er chrysanthemi* NCPPB1066）
検査項目	主な所見
死亡	1 例（安楽死） 死亡例の変化：体重減少，血糖，血中アラニンアミノトランスフェラーゼ及び血中尿素窒素の増加，尿糖，肝細胞空胞化
一般状態	異常なし
体重	異常なし
血液学的検査	異常なし
血液生化学的検査	血糖：増加
尿検査	尿糖
剖検	異常なし
病理組織学的検査	異常なし
無毒性量	1,000 U/kg/日未満

2.4.4.2.2　イヌの 28 日間反復静脈内投与毒性試験

（添付資料：4.2.3.2.2）

ビーグル犬（雌雄各 2 例）に *Erwinia* 菌由来 L-アスパラギナーゼの 5,000 U/kg/日を 28 日間反復静脈内投与した．本試験では，対照群は設定しなかった（HRC 1969 試験）．

その結果，死亡例はみられなかった．投与 1 週では，嘔吐（投与後 15～60 分）が頻繁に観察されたが，投与 2 週以降は嘔吐の発現頻度は減少した．嘔吐がみられた例では投与後 3 時間に鎮静がみられた．投与 1 週では，摂餌量の減少及び体重の減少がみられた．投与期間終了時には削痩及び被毛の乾燥がみられた．剖検及び病理組織学的検査では変化はみられなかった．本試験における無毒性量は 5,000 U/kg/日未満と考えられた（表 2.4.20）．

表 2.4.20　イヌの 28 日間反復静脈内投与毒性試験のまとめ

投与量：U/kg/日 （由来菌種）	5,000（*Er chrysanthemi* NCPPB1066）
検査項目	主な所見
死亡	なし
一般状態	嘔吐及び嘔吐後鎮静（投与 1 週），削痩及び被毛の乾燥
体重・摂餌量	体重・摂餌量の減少（投与 1 週）
剖検	異常なし
病理組織学的検査	異常なし
無毒性量	5,000 U/kg/日未満

2.4.4.2.3　サルの 5 日間反復静脈内投与毒性試験-1

（添付資料：4.2.3.2.3）

アカゲザル（雄 2 例）に *Erwinia* 菌由来 L-アスパラギナーゼの 1,000 U/kg/日を 5 日間反復静脈内投与し，最終投与後 4 日及び 14 日に各 1 例ずつ剖検した．対照群（雌 1 例）には生理食塩液を同様に投与し，最終投与後 4 日に剖検した（SSARL-DPH-69-00 試験）．

その結果，病理組織学的検査を含むいずれの検査項目においても被験物質投与に関連した変化はみられなかった．本試験における無毒性量は 1,000 U/kg/日と考えられた（表 2.4.21）．

表 2.4.21　サルの 5 日間反復静脈内投与毒性試験のまとめ-1

投与量：U/kg/日 （由来菌種）	1,000（*Er chrysanthemi* NCPPB1066）
検査項目	主な所見
死亡	なし
一般状態	異常なし
体重・摂餌量	異常なし
血液学的検査	異常なし
血液生化学的検査	異常なし
尿検査	異常なし
剖検	異常なし
器官重量	異常なし
病理組織学的検査	異常なし
無毒性量	1,000 U/kg/日

2.4.4.2.4　サルの 5 日間反復静脈内投与毒性試験-2

（添付資料：4.2.3.2.4）

アカゲザル（雄 1 例）に *Erwinia* 菌由来 L-アスパラギナーゼの 1,000 U/kg/日を 5 日間反復静脈内投与し，最終投与後 4 日に剖検した．本試験では，対照群は設定しなかった（SSARL-DPH-71-2 試験）．

その結果，投与 3 日に一過性の摂餌量及び体重減少がみられたが，いずれも投与 5 日には回復した．血液学的検査，血液生化学的検査，尿検査及び器官重量には，投与に関連した変化はみられなかった．病理組織学的検査で肝小葉中間帯に脂質を伴った軽度の細胞質空胞化がみられた．本試験における無毒性量は 1,000 U/kg/日未満と考えられた（表 2.4.22）．

表 2.4.22　サルの 5 日間反復静脈内投与毒性試験のまとめ-2

投与量：U/kg/日 （由来菌種）	1,000（*Er chrysanthemi* NCPPB1066）
検査項目	主な所見
死亡	なし
一般状態	異常なし
体重・摂餌量	体重・摂餌量の一過性の減少（投与 5 日に回復）
血液学的検査	異常なし
血液生化学的検査	異常なし
尿検査	異常なし
剖検	異常なし
器官重量	異常なし
病理組織学的検査	肝小葉中間帯に脂質を伴った軽度の細胞質空胞化
無毒性量	1,000 U/kg/日未満

2.4.4.2.5　サルの 5 日間反復静脈内投与毒性試験-3

（添付資料：4.2.3.2.5）

アカゲザルに *Erwinia* 菌由来 L-アスパラギナーゼの 0（雄 2 例），1,000（雌 3 例），2,000（雌 1 例）及び 10,000（雄 1 例）U/kg/日を 5 日間反復静脈内投与した．さらに，アカゲザル（雄 2 例，雌 1 例）に大腸菌由来 L-アスパラギナーゼの 1,000 U/kg/日を 5 日間反復静脈内投与した（SSARL-DPH-71-1 試験）．観察項目として，一般状態，体重，血液学的検査，血液生化学的検査及び尿検査を投与 5 日に実施し，投与 9 日（最終投与後 4 日）に剖検し，器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した．ブドウ糖負荷試験及び肝臓中物質（L-アスパラギン酸，L-アスパラギン，L-グルタミン，アデノシン三リン酸，総脂質，コレステロール，トリグリセリド及びリン脂質）を測定した．

その結果，死亡例はみられなかった．試験期間中の頻回採血により，軽度の貧血がみられた．*Erwinia* 菌由来 L-アスパラギナーゼの 10,000 U/kg/日群で一過性の白血球の減少がみられた．体重，血液生化学的検査及び尿検査においては，被験物質投与に関連した変化はみられなかった．全投与群で肝細胞空胞化がみられたが，*Erwinia* 菌由来 L-アスパラギナーゼの 10,000 U/kg/日群の雄及び大腸菌由来 L-アスパラギナーゼの 1,000 U/kg/日群で最も顕著であった．肝臓中物質濃度に影響はみられず，アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ，アラニンアミノトランスフェラーゼ及びビリルビンに対する影響はみられなかったことから，肝細胞空胞化の毒性学的な意義は明確ではなかった．10,000 U/kg/日で肝細胞空胞化がみられたことより，本試験における無毒性量は 2,000 U/kg/日と考えられた（表 2.4.23）．

表 2.4.23　サルの 5 日間反復静脈内投与毒性試験のまとめ-3

投与量：U/kg/日 （由来菌種）	0 1,000，2,000，10,000（*Er chrysanthemi* NCPPB1066） 1,000（大腸菌由来）
検査項目	主な所見
死亡	なし
一般状態	異常なし
体重・摂餌量	異常なし
血液学的検査	10,000（*Erwinia* 菌由来）：一過性の白血球数減少
血液生化学的検査	異常なし
尿検査	異常なし
剖検	異常なし
器官重量	異常なし
病理組織学的検査	全投与群（対照群を含む）：肝細胞空胞化 10,000（*Erwinia* 菌由来）及び 1,000（大腸菌由来）で顕著
肝臓中物質濃度	異常なし
無毒性量	2,000 U/kg/日（*Erwinia* 菌由来）

2.4.4.2.6　公表論文による L-アスパラギナーゼの反復投与毒性試験の情報

L-アスパラギナーゼの急性白血病の治療において，高血糖や代謝性アシドーシス等の副作用がみられることより，その可能性についてウサギを用いて検討した．ウサギ（10 例，系統及び性別は不明）に *Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼ 7,500 U/kg を静脈内投与し，その翌日に 10,000 U/kg を静脈内投与したところ，10,000 U/kg 投与後 5 日までに 10 例中 9 例が死亡した．投与後，血液中及び尿中の糖をモニターしたが，明らかな血糖及び尿糖の増加はみられず，血糖の増加と死亡との明確な因果関係はみられなかった．一方，0，150，300，700 及び 1,500 U/kg の静脈内投与により，用量に依存した血液 pH の低下（対照群では 7.4，高用量群では 7.2）及び血中尿素窒素の増加を伴った重炭酸塩濃度の減少がみられた．これらの所見は L-アスパラギナーゼの反応の生成物であるアスパラギン酸アンモニウムの投与により再現された（Rutter 1971a）[37]．また，ウサギに 1,000～5,000 U/kg の用量を静脈内投与したときには血中尿素窒素の変化には一貫した変化はみられなかった（SSARL-DPH-72-02 試験）．

本剤の潜在的な標的臓器のひとつとして肝臓が考えられている．BALB/c 系マウスに *Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼの 50 U/日（マウスの体重を 25 g と仮定したとき，約 2,000 U/kg/日）を 1 週間に 5 日間，4 週間反復腹腔内投与した．血漿中トリグリセリド，コレステロール及び肝臓関連たん白質（アンチトロンビン III，アルブミン）を毎週測定した．肝脂肪含量も同様に毎週測定した．*Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼは肝機能パラメータに対して明らかな影響を及ぼさなかった（Durden 1983）[16]．

Wistar 系ラット（雌雄各 12 例/群）に *Er carotovora* 菌由来及び大腸菌由来 L-アスパラギナーゼの 0，800 及び 3,200 U/kg/日を 1 週間に 5 日間，3 ヶ月間反復腹腔内投与し，投与 15 日毎に各群雌雄各 2 例のラットを安楽死させ，アルカリフォスファターゼ，アミラーゼ，アラニンアミノトランスフェラーゼ，アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ及びビルビリンを測定した．その結果，大腸菌由来 L-アスパラギナーゼの 3,200 U/kg/日群で 6 例が，

その他の投薬群で各 2 例が死亡した．体重及び血液生化学的検査パラメータには影響はみられなかった．病理組織学的検査では，800 U/kg/日以上の投与群の各時点の剖検例 4 例中 1～3 例に肝臓の変化（門脈周囲の脂肪浸潤，実質細胞の変性及び壊死，線維芽細胞増殖）がみられた．重度の膵臓毒性（実質細胞壊死及び散在性の細胞浸潤）が 3,200 U/kg/日投与群の 1 例にみられた（投与 60 日の剖検例）（Cavanna 1976，Celle 1977）[12,13]．

これらの反復投与毒性試験は，GLP に準拠して実施された試験ではないが，多くの臨床での安全性の成績を考え合わせると，これらの非臨床試験成績は *Er chrysanthemi* 菌由来 L-アスパラギナーゼの安全性を裏付けると判断される．

2.4.4.3　遺伝毒性試験

クリサンタスパーゼはバイオ医薬品であり，ICH ガイドライン S6（R1）を参考にして本承認申請に際して遺伝毒性試験は実施していない．

2.4.4.4　がん原性試験

クリサンタスパーゼはバイオ医薬品であり，ICH ガイドライン S6（R1）を参考にして本承認申請に際してがん原性試験は実施していない．

2.4.4.5　生殖発生毒性試験

クリサンタスパーゼの生殖発生毒性試験は，非 GLP 下で用量設定試験 2 試験並びに GLP に準拠した 4 試験を実施した．

クリサンタスパーゼの投与方法及び投与経路は，今回申請する臨床用法・用量案が「他の抗悪性腫瘍剤との併用において，通常，1 日 1 回 体表面積 1 m^2 あたり 25,000 U を週 3 回，筋肉内投与する．」ことに準じて，いずれの試験においても，1 日おきに 1 日 1 回筋肉内投与とした．

2.4.4.5.1　ラットの筋肉内投与による受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

（添付資料：4.2.3.5.1.1）

SD 系ラット（雌雄各 22 例/群）にクリサンタスパーゼの 0，500，1,000 及び 2,000 U/kg/日を 1 日おきに 1 日 1 回，筋肉内投与した（11-4368 試験）．雄は交配前 4 週間，交配期間及び剖検前日（交配期間後 25 日）まで投与し，安楽死させ剖検した．雌は交配前 2 週間，交配期間及び妊娠 6 日まで投与し，妊娠 14 日に安楽死させ，帝王切開により黄体及び着床部位を計数し，剖検した．投与 1 日及び 71 日にトキシコキネティクス並びに投与 72 日に被験物質に対する中和抗体についても評価した．

雌雄ともに，2,000 U/kg/日まで忍容性は良好であり，一般状態，体重，交尾行動，受胎能又は性周期及び剖検所見，並びに帝王切開においても黄体数，着床数及び生存胚数に影響はみられなかった．雄では 1,000 U/kg/日以上で精巣重量及び精巣上体重量の有意な増加並びに精巣内精子数の有意な減少がみられたが，受胎能，精子運動性及び精子形態並びに

精巣及び精巣上体の病理組織学的検査でいずれの投与量においても投与に関連した毒性学的に意義ある変化はみられなかった.

トキシコキネティクスでは，投与 1 日で全体的に投与量に応じた又はそれより大きい全身曝露の増加がみられた．投与 71 日では 500 及び 1,000 U/kg/日で数例に，2,000 U/kg/日の雌全例，雄 7/12 例に全身曝露が確認された．全身曝露は全体的に投与 71 日では投与 1 日に比べて低く，また，雌雄差の可能性が示唆された．投与 72 日では被験物質に対する中和抗体の存在が確認され，投与 71 日でみられた全身曝露の低下と一致していた.

結論として，雌雄ともに，一般毒性及び受胎能に対する無毒性量はいずれも 2,000 U/kg/日と考えられた.

2.4.4.5.2　ラットの筋肉内投与による胚・胎児発生に関する用量設定試験

（添付資料：4.2.3.5.2.1）

SD 系妊娠ラット（8 例/群）にクリサンタスパーゼの 0，100，300 及び 1,000 U/kg/日を 1 日おきに 1 日 1 回，妊娠 6 から 16 日まで筋肉内投与した（11-4369 試験）．妊娠 6 及び 16 日にトキシコキネティクスについても評価した.

母動物の一般毒性及び生殖能，胚・胎児発生に対するいずれの検査においても，クリサンタスパーゼの1,000 U/kg/日まで投与に関連した毒性はみられなかった.

トキシコキネティクスでは，1,000 U/kg/日の妊娠6日における血清中濃度を除いて，全体的に血清中濃度は低く，100及び300 U/kg/日の妊娠6日では血清中濃度を測定できたのは数例のみであった.

2.4.4.5.3　ラットの筋肉内投与による胚・胎児発生に関する試験

（添付資料：4.2.3.5.2.2）

SD 系妊娠ラット（21～22 例/群）にクリサンタスパーゼの 0，500，1,000 及び 2,000 U/kg/日を 1 日おきに 1 日 1 回，妊娠 6 から 16 日まで筋肉内投与した（11-4370 試験）．妊娠 6 及び 16 日にトキシコキネティクス並びに妊娠 20 日に被験物質に対する中和抗体についても評価した.

母動物では死亡はなく，一般状態及び剖検所見に変化はみられなかった．2,000 U/kg/日では妊娠 6 から 18 日に，被験物質投与に関連した体重，体重増加量及び摂餌量の減少がみられた．黄体数，着床数及び子宮重量に被験物質投与による影響はみられなかった．胎児観察では，2,000 U/kg/日で胸腺の頸部残留の軽度の増加がみられた.

トキシコキネティクスでは，妊娠 6 日では全体的に投与量に応じた全身曝露の増加がみられたが，妊娠 16 日では 1,000 及び 2,000 U/kg/日の数例のみで全身曝露が確認された．妊娠 20 日には被験物質に対する中和抗体の存在が確認され，妊娠 16 日でみられた全身曝露の低下と一致していた.

結論として，母動物の一般毒性に対する無毒性量は体重，体重増加量及び摂餌量の減少がみられたことより 1,000 U/kg/日，生殖能に対する無毒性量は 2,000 U/kg/日，胚・胎児発

生に対する無毒性量は 2,000 U/kg/日で胸腺の頸部残留の軽度の増加がみられたことより 1,000 U/kg/日と考えられた.

2.4.4.5.4　ウサギの筋肉内投与による胚・胎児発生に関する用量設定試験

（添付資料：4.2.3.5.2.3）

New Zealand White 系妊娠ウサギ（6～8 例/群）にクリサンタスパーゼの 0，25，50 及び 100 U/kg/日を 1 日おきに 1 日 1 回，妊娠 6 から 18 日まで筋肉内投与した（11-4371 試験）. 100 U/kg/日では妊娠 11 日に摂餌量及び体重の著しい減少がみられたため，妊娠 12 日に全例，安楽殺した．その他の全生存例は妊娠 29 日に安楽死させ，帝王切開後，剖検した．妊娠 6 及び 18 日にトキシコキネティクスについても評価した.

母動物では，100 U/kg/日で体重，体重増加量及び摂餌量の著しい減少並びに糞便量の減少，50 U/kg/日で体重，体重増加量及び摂餌量の軽度な減少がみられた．25 U/kg/日以上で着床前死亡率の増加及び生存胎児数の減少がみられ，25 及び 50 U/kg/日で，子宮重量及び 1 腹あたりの胎児重量の減少等がみられ，50 U/kg/日では吸収胚数及び着床後死亡率の増加がみられた.

トキシコキネティクスでは，25 U/kg/日の妊娠 18 日の 2 例を除き，妊娠 6 及び 18 日では全身曝露が確認された．妊娠 6 日では投与量に応じた全身曝露の増加がみられたが，妊娠 18 日では投与量に応じた増加はみられなかった. 100 U/kg/日では早期に安楽殺したため，妊娠 18 日のデータは得られなかった.

結論として，母動物の最大耐量は 50 U/kg/日と考えられ，重要な試験における高投与量は 50 U/kg/日未満，低投与量は 25 U/kg/日未満と考えられた.

2.4.4.5.5　ウサギの筋肉内投与による胚・胎児発生に関する試験

（添付資料：4.2.3.5.2.4）

New Zealand White 系妊娠ウサギ（18～21 例/群）にクリサンタスパーゼの 0，10，25 及び 40 U/kg/日を 1 日おきに 1 日 1 回，妊娠 6 から 18 日まで筋肉内投与した（11-4372 試験）. 全動物を妊娠 29 日に安楽死させ，帝王切開後，剖検した．妊娠 6 及び 18 日にトキシコキネティクス並びに妊娠 29 日に被験物質に対する中和抗体を評価した.

母動物では死亡はなく，一般状態及び肉眼的観察に変化はみられなかった．40 U/kg/日では投与期間中，被験物質投与に関連した体重の減少及び摂餌量の減少がみられ，25 及び 40 U/kg/日では妊娠 6 から 20 日まで体重増加抑制がみられたが，投与期間終了後は体重の増加がみられ，妊娠 29 日では対照群との差はみられなかった．10 U/kg/日以上で吸収胚数及び着床後死亡数の増加及び生存胎児数の減少がみられた．胎児では，10 U/kg/日以上で妊娠子宮重量及び 1 腹あたりの胎児重量の減少，内臓異常（鎖骨下動脈の過剰起始，副肺葉の欠損）及び骨化遅延がみられ，40 U/kg/日では腎の欠損及び脾臓の小型化がみられた（表 2.4.24）.

表 2.4.24　胎児の内臓及び骨格異常所見のまとめ

投与量（U/kg/日）	0		10		25		40	
所見	F	L	F	L	F	L	F	L
鎖骨下動脈の過剰起始	0	0	4	3	3	3	4	3
副肺葉の欠損	7	6	28	12	22	10	43	15
骨化遅延*								
頚椎中心の骨化遅延	6	4	34	10	18	9	9	8
前肢中手骨の未骨化	14	7	18	6	28	6	39	14
腎の欠損	0	0	0	0	1	1	8	6
脾臓の小型化	0	0	0	0	0	0	4	3

F：胎児数，L：腹数，*：骨化遅延は一部の所見について記載（2.6.7.13B参照）.

トキシコキネティクスでは，妊娠 6 及び 18 日ともに全体的に投与量に応じた全身曝露の増加がみられ，妊娠 18 日では妊娠 6 日と比較して低かった．妊娠 29 日に被験物質に対する中和抗体の存在が確認され，妊娠 18 日における全身曝露の低下と一致していた．

結論として，母動物の一般毒性に対する無毒性量は 25 U/kg/日以上で体重増加抑制がみられたことより 10 U/kg/日，母動物の生殖能に対する無毒性量は 10 U/kg/日以上で吸収胚数及び着床後死亡数の増加並びに生存胎児数の減少がみられたことより，10 U/kg/日未満であった．胚・胎児発生に対する無毒性量は，10 U/kg/日以上で妊娠子宮重量及び 1 腹あたりの胎児重量の減少，並びに胎児の内臓異常及び骨化遅延がみられたため，10 U/kg/日未満と考えられた．

2.4.4.5.6　ラットの筋肉内投与による出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

（添付資料：4.2.3.5.3.1）

SD 系妊娠ラット（21～22 例/群）にクリサンタスパーゼの 0，600，1,200 及び 2,400 U/kg/日を 1 日おきに 1 日 1 回，筋肉内投与した（11-4373 試験）．妊娠 6 日から授乳 20 日まで投与し，授乳 21 日に安楽死させ，剖検した．

母動物では，妊娠期間及び授乳期間ともに，2,400 U/kg/日まで忍容性は良好で，一般症状，体重及び摂餌量に影響はみられなかった．出生前及び出生後では，2,400 U/kg/日まで妊娠，分娩及び授乳に関する検査並びに F_1 出生児の死亡率に影響はみられなかった．F_1 出生児では雌雄ともに生存率，一般状態，体重，摂餌量（離乳後），機能発達（離乳前：正向反射，瞳孔反射，聴覚性驚愕反応，離乳後：オープンフィールド，自発運動，学習･記憶試験），性成熟，交尾行動及び受胎能，剖検及び器官重量に影響はみられなかった．

結論として，母動物及び F_1 出生児に対する無毒性量はいずれも 2,400 U/kg/日と考えられた．

2.4.4.6　局所刺激性試験

2.4.4.6.1　ウサギの局所刺激性試験

（添付資料：4.2.3.6.1）

Kbl:JW 系ウサギ（雄 6 例/群）を用いてクリサンタスパーゼの筋肉内投与による局所刺激性試験を実施した（OD12312 試験）．クリサンタスパーゼの 0.5 mL/site（生理食塩液にて 10,000 U/mL 溶液；1,799～2,058 U/kg）を右大腿部外側広筋に単回及び 2 日間投与し，反対側の大腿部外側広筋に媒体対照群として生理食塩液の同容量を投与した．陽性対照群として，0.106 vol%酢酸の 2 日間投与群を設定し，一般状態の観察，剖検及び病理組織学的検査を実施した．

その結果，単回投与群において投与後 1 又は 2 日に 6 例中 5 例が，2 日間投与群では 2 回目投与後 1 日までに 6 例中 3 例が死亡又は瀕死状態となった．投与部位の病理組織学的所見は，単回投与群においては，被験物質及び生理食塩液投与部位ともに 3 例でごく軽度な細胞浸潤並びにごく軽度又は軽度な変性及び壊死が，2 例でごく軽度又は軽度な出血が認められ，刺激性変化は対照部位と被験物質投与部位で同程度であった．2 日間投与群の被験物質投与部位では，全例でごく軽度又は軽度な出血，細胞浸潤，変性及び壊死が認められ，生理食塩液投与部位では，6 例中 5 例でごく軽度又は軽度な出血，4 例でごく軽度又は軽度な細胞浸潤，変性及び壊死が認められた．0.106 vol%酢酸投与部位では，全例にごく軽度な出血，軽度又は中等度の細胞浸潤，中等度の変性及び壊死が認められた．

以上の結果より，被験物質の筋肉内投与による刺激性は，単回投与では生理食塩液と同等，2 日間投与では，生理食塩液よりもわずかに強く，0.106 vol%酢酸よりも弱いことが示唆された．

2.4.4.6.2　ウサギの局所刺激性試験

（添付資料：4.2.3.6.2）

先に実施したクリサンタスパーゼの 0.5 mL/site（生理食塩液にて 10,000 U/mL 溶液；1,799～2,058 U/kg）投与（OD12312 試験）では，単回投与で 6 例中 5 例が投与後 2 日までに死亡又は瀕死状態となったため，投与量を減量し，投与回数も 1 回として，単回筋肉内投与による刺激性試験を追加実施した（OD13086 試験）．

Kbl:JW 系ウサギ（雄 6 例/群）を用いて，クリサンタスパーゼの 0.2 mL/site（生理食塩液にて 10,000 U/mL 溶液；637～690 U/kg）を右大腿部外側広筋に，反対側の大腿部外側広筋に媒体対照として同容量の生理食塩液を投与した．陽性対照として，同容量の 0.106 vol%酢酸を単回投与した．投与部位の外観的観察を含め一般状態の観察，剖検及び病理組織学的検査を実施した．

その結果，被験物質投与後 2 日（投与後約 42 時間）に 6 例中 5 例の死亡がみられた．

投与部位の病理組織学的検査では，被験物質投与部位では，投与後 2 日の死亡例 5 例全例でごく軽度な細胞浸潤，ごく軽度又は軽度な変性及び壊死，3 例でごく軽度又は軽度な出血が認められた．投与後 7 日では生存例 1 例で，軽度な細胞浸潤，鉱質沈着及び再生が認

められた．生理食塩液投与部位では，投与後 2 日に，5 例中 2 例でごく軽度な細胞浸潤，ごく軽度又は軽度な変性及び壊死，1 例でごく軽度な出血が認められたが，投与後 7 日では生存例 1 例で，組織変化は認められなかった．0.106 vol%酢酸の投与部位では，投与後 2 日に，3 例全例でごく軽度な出血，軽度な細胞浸潤，変性及び壊死が認められたが，投与後 7 日では 3 例中 2 例でごく軽度な再生が認められた．

以上の結果，クリサンタスパーゼの筋肉内投与では，投与後 2 日では 0.106 vol%酢酸よりもやや弱いか同程度の刺激性変化がみられ，投与後 7 日では，組織修復像が認められたことから，クリサンタスパーゼの 10,000 U/mL 溶液はウサギの筋肉に対して軽度な一次刺激性を有するが，可逆的な変化であることが示された．

2.4.4.7　その他の毒性試験

2.4.4.7.1　サル及びウサギの糖尿病誘発作用

（添付資料：4.2.3.7.7.1）

アカゲザル（雌 1 例）に *Erwinia* 菌由来 L-アスパラギナーゼの 2,000 U/kg/日を 5 日間静脈内投与し，ウサギ（系統及び性別は不明，1 例）には 10,000 U/kg を単回静脈内投与した（SSARL-DPH-70-07 試験）．サルではブドウ糖負荷試験を投与前（-1 日）及び投与 5 日に実施した．血漿中グルコース及びインスリン濃度に影響はみられなかった．ウサギでは投与後 10 日まで血液生化学的検査を実施した結果，血漿中グルコース及びインスリン濃度に影響はみられなかった．

結論として，これらの試験系では*Erwinia*菌由来L-アスパラギナーゼ投与による糖尿病誘発性作用はみられなかった．

2.4.4.7.2　ウサギの発熱性物質試験

（添付資料：4.2.3.7.7.2，4.2.3.1.3）

Erwinia 菌由来 L-アスパラギナーゼのウサギを用いた単回静脈内投与による発熱性物質試験 2 試験を実施した．HRC 97 試験では *Erwinia* 菌由来 L-アスパラギナーゼをウサギ（3 例/群，系統及び性別は不明）に，031-665-6881 試験では *Erwinia* 菌由来 L-アスパラギナーゼを New Zealand White 系ウサギ（雌 3 例/群）にそれぞれ 2,000 U/kg を投与した．その結果，両試験ともに 2,000 U/kg で，*Erwinia* 菌由来 L-アスパラギナーゼ投与による発熱性はみられなかった．

2.4.5 考察及び結論

クリサンタスパーゼは *Er chrysanthemi* 菌由来 L-アスパラギナーゼである．クリサンタスパーゼは，大腸菌由来 L-アスパラギナーゼに対してアレルギー症状を示す ALL 及びアスパラギン枯渇が有用な新生物（ML 及びリンパ芽球性リンパ腫等）に対して多剤化学療法レジメンの一つとしての代替治療薬として使用されている．

クリサンタスパーゼの薬理学的作用機序として，白血病細胞はアスパラギン合成酵素活性が不十分であり，そのたん白質代謝及び細胞の生存性を外因性のアスパラギンに依存している．そのため，クリサンタスパーゼの投与により血中 L-アスパラギンが枯渇し，白血病細胞が増殖できなくなることが考えられている．クリサンタスパーゼによる治療では，血液中のアスパラギン濃度を 3 μM 以下になるまで減少させる． ML でも，そのたん白質代謝及び細胞の生存性を外因性のアスパラギンに依存しているため，アスパラギンの枯渇により細胞死が誘導される．アスパラギンの産生が可能な正常細胞は L-アスパラギナーゼの影響は受けない．

クリサンタスパーゼは L-アスパラギンに対して高い親和性を示すが，グルタミンに対する親和性は幾分低い．これは，薬剤の主な作用である L-アスパラギンに対する作用以外のグルタミン酸代謝を介した毒性発現の可能性は少ないことを示唆している．非臨床薬理試験に関する報告のうち副作用と考えられるのは免疫抑制作用であった．*Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼを投与すると，*in vitro* では幼若化反応を抑制し，*in vivo* では免疫応答を抑制した．免疫抑制の機序に関する文献的な報告は明らかでないが，おそらく循環血液中のアスパラギンの減少に関係していると考えられる．ラットでの免疫抑制作用は，800 U/kg の用量の腹腔内投与でもみられた．この用量は筋肉内投与における臨床用量（1,000 U/kg）よりも低かった．これは，臨床使用において免疫抑制作用が生じる可能性があることを示唆している．

安全性薬理試験では，サルの筋肉内投与による心血管系に対する影響を検討した結果，クリサンタスパーゼの臨床用量の 2.5 倍量相当（5,000 U/kg）まで，影響はみられなかった．

Erwinia 菌由来 L-アスパラギナーゼのげっ歯類における急性毒性は低く，静脈内投与による最大非致死量は，100,000～200,000 U/kg，概略の致死量は 200,000 U/kg と考えられた．

一方，ウサギの静脈内投与では，2,000 U/kg の低い用量でも死亡例がみられた．この動物種による毒性の違いの原因は不明である．L-アスパラギナーゼの血中の消失半減期はラットでは短く約 1.5 時間，ウサギでは約 11 時間であった．ウサギ血液中のアスパラギン濃度（24 μg/mL）はラット及びマウス（それぞれ 10.2 及び 3.8 μg/mL）に比べて高く，ウサギに投与した L-アスパラギナーゼの血液中濃度は長時間にわたり高く維持されることになる．そのため，ウサギにおける毒性発現は，高濃度の血液中に存在するアスパラギンが，L-アスパラギナーゼにより長時間にわたり代謝を受け続けることにより，その影響がウサギに強

く現れている可能性があると考えられるが，詳細は不明である．ヒト血液中のアスパラギン濃度は，げっ歯類のそれとほぼ同じ程度であり（7.3 μg/mL），クリサンタスパーゼが安全に臨床使用されていることを考慮すると，ヒトではウサギよりも L-アスパラギナーゼ投与に対して忍容性があることから，ウサギよりもげっ歯類のほうが L-アスパラギナーゼの急性毒性を検討するためのより適切な動物種であることが示唆される．

反復投与毒性試験はウサギ，イヌ及びサルで実施した．イヌ及びサルでは，死亡及び毒性所見をもとに判断すると，静脈内投与でそれぞれ 28 日間及び 5 日間投与したときには 5,000 及び 10,000 U/kg/日で忍容性を示した．一方，ウサギでは *Erwinia* 菌由来 L-アスパラギナーゼ 1,000 U/kg/日の 5 日間反復静脈内投与で 5 例中 1 例に死亡（安楽死）がみられた．臨床では同程度の用量でも安全に使用されていることを考慮すると，ウサギの試験成績の持つ意義は不明である．サルの反復静脈内投与試験での無毒性量は 2,000 U/kg/日と考えられた．クリサンタスパーゼの今回申請する臨床用法・用量案は，25,000 U/ m^2 を週 3 回の筋肉内投与である．この臨床用量は小児患者の体重を約 20 kg と想定した場合，U/kg で表記された用量は U/m^2 を 25 で除した値で算出できることになり（FDA 2005）[17]，1,000 U/kg/日に相当し，サルにおける無毒性量（2,000 U/kg/日）から算出した安全域は，2 倍である．

ラットを用いたクリサンタスパーゼの筋肉内投与による受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験成績から，2,000 U/kg/日まで忍容性は良好であった．一般状態，体重，交尾行動及び受胎能，又は性周期，及び剖検所見に被験物質投与に関連した変化はみられなかった．雄では 1,000 U/kg/日以上で精巣重量・精巣上体重量の有意な増加，並びに精巣内精子数の有意な減少がみられたが，受胎能に影響はなく，精子運動性及び精子形態に影響はみられなかった．さらに精巣及び精巣上体の病理組織学的検査に変化はみられなかった．したがって，雌雄ともに一般毒性及び受胎能に対する無毒性量はいずれも 2,000 U/kg/日と考えられる．トキシコキネティクスでは，投与 1 日で全体的に投与量に応じた又はそれより大きい全身曝露の増加がみられたが，投与 71 日では投与 1 日に比べ低く，また，雌雄差の可能性が示唆された．投与 72 日では被験物質に対する中和抗体の存在がみられ，投与 71 日でみられた全身曝露の低下と一致していた．

ラットを用いたクリサンタスパーゼの筋肉内投与による胚・胎児発生に関する試験では，母動物の一般毒性に対する無毒性量は体重，体重増加量及び摂餌量の減少がみられたことより 1,000 U/kg/日，また生殖能に対する無毒性量は 2,000 U/kg/日と考えられた．胎児観察では，2,000 U/kg/日で胸腺の頸部残留の軽度の増加がみられたことより，胚・胎児発生に対する無毒性量は 1,000 U/kg/日と考えられた．トキシコキネティクスでは，妊娠 6 日では全体的に投与量に応じた全身曝露の増加がみられたが，妊娠 16 日では 1,000 及び 2,000 U/kg/日の数例のみで全身曝露が確認された．妊娠 20 日では被験物質に対する中和抗体の存在が確認され，妊娠 16 日でみられた全身曝露の低下と一致していた．

ウサギを用いたクリサンタスパーゼの筋肉内投与による胚・胎児発生に関する試験では，母動物の一般毒性に対する無毒性量は 25 U/kg/日以上で体重増加抑制がみられたことにより 10 U/kg/日と考えられた．母動物の生殖能に対する無毒性量は 10 U/kg/日以上で吸収胚数及び着床後死亡数の増加，及び生存胎児数の減少がみられたことより，10 U/kg/日未満と考えられた．胚・胎児発生に対する無毒性量は，10 U/kg/日以上で妊娠子宮重量及び 1 腹あたりの胎児重量の減少，並びに胎児の内臓異常及び骨化遅延がみられたため，10 U/kg/日未満と考えられた．トキシコキネティクスでは，妊娠 6 及び 18 日ともに全体的に投与量に応じた全身曝露の増加がみられ，妊娠 18 日では妊娠 6 日と比較して低かった．妊娠 29 日に被験物質に対する中和抗体の存在が確認され，妊娠 18 日における曝露量の低下と一致していた．

ラットを用いたクリサンタスパーゼの筋肉内投与による出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験では，2,400 U/kg/日まで，母動物及び出生児ともにいずれの検査項目においてもクリサンタスパーゼ投与に関連した影響はみられなかったことより，母動物及び出生児に対する無毒性量はいずれも 2,400 U/kg/日と考えられた．

以上，生殖発生毒性試験では，ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験では雌雄ともに 2,000 U/kg/日まで一般毒性及び受胎能に影響はみられず，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においても，2,400 U/kg/日まで母動物及び出生児に対する影響はみられなかった。ラットの胚・胎児発生に関する試験では胎児観察において，2,000 U/kg/日で胸腺の頸部残留の軽度の増加がみられた．ウサギの胚・胎児発生に関する試験では、25 U/kg/日以上で母動物の体重増加抑制がみられ，10 U/kg/日以上で吸収胚数及び着床後死亡数の増加，生存胎児数の減少，妊娠子宮重量及び 1 腹あたりの胎児重量の減少，胎児の内臓異常及び骨化遅延がみられた．ウサギでは他の動物種に比べ，原因は明確ではないが単回及び反復投与毒性試験において毒性が強くみられ，生殖発生毒性試験においても母動物及び胎児に影響がみられた．

ウサギ及びサルで肝細胞空胞化などがみられたことから，L-アスパラギナーゼの毒性において，肝臓が標的臓器である可能性が検討された．サルの 5 日間反復静脈内投与試験では，*Erwinia* 菌由来 L-アスパラギナーゼの 1,000 U/kg/日（SSARL-DPH-71-2 試験）及び 10,000 U/kg/日（SSARL-DPH-71-1 試験）で，病理組織学的検査において肝細胞空胞化がみられたが，血液中の肝酵素レベルに変化はみられなかった．ラットに *Er carotovora* 菌由来及び大腸菌由来 L-アスパラギナーゼを 3,200 U/kg/日の用量で 1 週間に 5 日間，3 ヶ月間反復腹腔内投与したとき（Celle 1977）[13]，あるいはマウスに *Er carotovora* 菌由来 L-アスパラギナーゼの 2,000 U/kg/日を 1 週間に 5 日間，4 週間反復腹腔内投与したときに（Durden 1983）[16]，循環血液中のアラニンアミノトランスフェラーゼのような肝酵素量，あるいは肝臓で生成さ

れるアルブミンのような血漿たん白質濃度の変化はみられなかった．以上より，肝臓は L-アスパラギナーゼの重要な標的臓器ではないものと考えられた．

クリサンタスパーゼを用い生理食塩液及び 0.106 vol%酢酸を対照としたウサギにおける局所刺激性試験では，クリサンタスパーゼの 0.5 mL/site（1,799～2,058 U/kg）で，単回筋肉内投与により投与後 2 日までに 6 例中 5 例，2 日間投与では 2 回目投与後 1 日までに 6 例中 3 例で死亡又は瀕死状態がみられたため，投与量を減量（0.2 mL/site ; 637～690 U/kg）し，単回投与した結果，投与後 2 日に 6 例中 5 例の死亡がみられた．これらの 2 試験における死亡例及び生存例からクリサンタスパーゼの局所刺激性を総合的に評価した結果，本薬の筋肉内投与における局所刺激性は，生理食塩液よりやや強く，0.106 vol%酢酸と同程度の刺激性がみられたが，病理組織学的検査で組織修復像がみられたことより，可逆的な変化であることが示された．

白血病治療におけるクリサンタスパーゼの安全性については，海外での長年にわたる臨床経験により安全性特性が得られている．クリサンタスパーゼはアスパラギンに対する特異性が高く，アスパラギン代謝を標的とする反応以外には，本薬に起因する副作用が発現する可能性は低いことが示唆される．また，クリサンタスパーゼは大腸菌由来 L-アスパラギナーゼとの免疫交差性がないことから，その代替製剤として有用であると判断された．

2.4.6 参考文献

1. Aghaiypour K, Wlodawer A, Lubkowski J. (2001) Structural basis for the activity and substrate specificity of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase. Biochemistry. 40(19):5655-64.
2. Ashworth LA, MacLennan AP. (1974) Comparison of the L-asparaginases from *Escherichia coli* and *Erwinia carotovora* as immunosuppressants. Cancer Res. 34(6):1353-9.
3. Ashworth LA, MacLennan AP. (1973) Immunological tolerance to *Erwinia carotovora* L-asparaginase. Int Arch Allergy. 45: 915-29.
4. Avramis VI, Panosyan EH. (2005) Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of asparaginase formulations: The past, the present and recommendations for the future. Clin Pharmacokinet. 44(4):367-93.
5. Benbough JE, Wiblin CN, Rafter TNA, Lee J. (1979) The effect of chemical modification of L-asparaginase on its persistence in circulating blood of animals. Biochem Pharmacol. 28:833-9.
6. Blazek R, Benbough JE. (1981) Improvement in the persistence of microbial asparaginase and glutaminase in the circulation of the rat by chemical modifications. Biochim Biophys Acta. 677:220-4.
7. Borek D, Jaskólski M. (2001) Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity. Acta Biochim Pol. 48(4):893-902.
8. Broome JD. (1963a) Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. I. Properties of the L-asparaginase of guinea pig serum in relation to those of the antilymphoma substance. J Exp Med. 118:99-120.
9. Broome JD. (1963b) Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. II. Lymphoma 6C3HED cells cultured in a medium devoid of L-asparagine lose their susceptibility to the effects of guinea pig serum *in vivo*. J Exp Med. 118:121-48.
10. Broome JD. (1968) Studies on the mechanism of tumor inhibition by L-asparaginase. Effects of the enzyme on asparagine levels in the blood, normal tissues, and 6C3HED lymphomas of mice: differences in asparagine formation and utilization in asparaginase-sensitive and -resistant lymphoma cells. J Exp Med. 127(6):1055-72.
11. Broome JD. (1981) L-Asparaginase: Discovery and development as a tumor-inhibitory agent. Cancer Treat Rep. 65(Suppl 4):111-4.
12. Cavanna M, Celle G, Dodero M, Picciotto A, Pannacciulli I, Brambilla G. (1976) Comparative experimental evaluation of immunodepressive and toxic effects of L-asparaginase (NSC-109229) from *Escherichia coli* and from *Erwinia carotovora*. Cancer Treat Rep. 60(3):255-7.
13. Celle G, Dodero M, Cuneo P, Picciotto A, Brambilla G, Cavanna M, Pannaciulli I. (1977) Toxic and immunodepressive effects of L-asparaginase from *E. coli* and from *Erwinia carotovora*

following chronic administration in rats. Arzneim-Forsch Drug Res. 27(11):2046-50.

14. Cooney DA, Handschumacher RE. (1970a) L-Asparaginase and L-asparagine metabolism. Annu Rev Pharmacol. 10:421-40.
15. Cooney DA, Capizzi RL, Handschumacher RE. (1970b) Evaluation of L-asparagine metabolism in animals and man. Cancer Res. 30(4):929-35.
16. Durden DL, Salazar AM, Distasio JA. (1983) Kinetic analysis of hepatotoxicity associated with antineoplastic asparaginases. Cancer Res. 43(4):1602-5.
17. FDA. (2005) Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers.
18. Fernandes AI, Gregoriadis G. (2001) The effect of polysialylation on the immunogenicity and antigenicity of asparaginase: Implication in its pharmacokinetics. Int J Pharm. 217:215-24.
19. Haley EE, Fischer GA, Welch AD. (1961) The requirement for L-asparagine of mouse leukemia cells L5178Y in culture. Cancer Res. 21:532-6.
20. Hall JG. (1970) The partitioning of L-asparaginase between blood and lymph. Recent Results in Cancer Res. 33:75-80.
21. Han T, Onuma T. (1972) *In vitro* blastogenesis inhibited by *Erwinia carotovora* L-asparaginase. Nature New Biol. 239:50-1.
22. Ho DHW, Wang CY, Lin JR, Brown N, Newman RA, Krakoff IH. (1988) Polyethylene glycol-L-asparaginase and L-asparaginase studies in rabbits. Drug Metab Dispos. 16(1):27-9.
23. Hawkins DS, Park JR, Thomson BG, Felgenhauer JL, Holcenberg JS, Panosyan EH, Avramis VI. (2004) Asparaginase pharmacokinetics after intensive polyethylene glycol-conjugated L-asparaginase therapy for children with relapsed acute lymphoblastic leukemia. Clin Cancer Res. 10:5335-41.
24. Howard JB, Carpenter FH. (1972) L-Asparaginase from *Erwinia carotovora.* Substrate specificity and enzymatic properties. J Biol Chem. 247(4):1020-30.
25. Kafkewitz D, Bendich A. (1984) The inhibition of lymphocyte mitogenesis by asparaginase: A still unexplained phenomenon. Experientia. 40:1173-7.
26. Kidd JG. (1953a) Regression of transplanted lymphomas induced *in vivo* by means of normal guinea pig serum. I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum, or rabbit serum. J Exp Med. 98:565-83.
27. Kidd JG. (1953b) Regression of transplanted lymphomas induced *in vivo* by means of normal guinea pig serum. II. Studies on the nature of the active serum constituent: Histological mechanism of the regression: Tests for effects of guinea pig serum on lymphoma cells *in vitro*: Discussion. J Exp Med. 98:583-611.
28. Kotzia GA, Labrou NE. (2005) Cloning, expression and characterisation of *Erwinia carotovora* L-asparaginase. J Biotechnol. 119:309-23.
29. Kotzia GA, Labrou NE. (2007) L-Asparaginase from *Erwinia chrysanthemi* 3937: Cloning,

expression and characterization. J Biotechnol. 127:657-69.

30. Krasotkina J, Borisova AA, Gervaziev YV, Sokolov NN. (2004) One-step purification and kinetic properties of the recombinant L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. Biotechnol Appl Biochem. 39:215-21.
31. MacLennan AP, Wade HE, Hawkins DC. (1971) The immunological specificity of bacterial L-asparaginases. Colloq Internat CNRS. 197:409-24.
32. Mashburn LT, Wriston JC. (1964) Tumor inhibitory effect of L-asparaginase from *Escherichia coli*. Arch Biochem Biophys. 105:450-2.
33. Nakashima T, Kuwano M, Akiyama S, Endo H. (1976) Effect of L-asparaginase and asparagine deprivation on RNA metabolism in mouse leukemia L5178Y cells in suspension culture. Cancer Res. 36:3616-21.
34. Neuman RE, McCoy TA. (1956) Dual requirement of Walker carcinosarcoma 256 *in vitro* for asparagine and glutamine. Science. 124:124-5.
35. Riccardi R, Holcenberg JS, Glaubiger DL, Wood JH, Poplack DG. (1981) L-Asparaginase pharmacokinetics and asparagine levels in cerebrospinal fluid of rhesus monkeys and humans. Cancer Res. 41:4554-8.
36. Roberts J, Schmid FA, Old LJ, Stockert E. (1976) A comparative study of the antitumor effectiveness of *E. coli* and *Erwinia* asparaginases. Cancer Biochem Biophys. 1:175-8.
37. Rutter DA. (1971a) Some Effects of L-asparaginase in rabbits. Colloq Internat CNRS. 197:355-60.
38. Rutter DA, Wade HE. (1971b) The influence of the iso-electric point of L-asparaginase upon its persistence in the blood. Br J Exp Pathol. 52:610-4.
39. Uren JR, Ragin RC. (1979) Improvement in the therapeutic, immunological, and clearance properties of *Escherichia coli* and *Erwinia carotovora* L-asparaginases by attachment of poly-DL-alanyl peptides. Cancer Res. 39:1927-33.
40. Uren JR, Hargis BJ, Beardsley P. (1982) Immunological and pharmacological characterization of poly-DL-alanyl-modified *Erwinia carotovora* L-asparaginase. Cancer Res. 42:4068-71.
41. Wade HE, Elsworth R, Herbert D, Keppie J, Sargeant K. (1968) A new L-asparaginase with antitumour activity. Lancet. 2(7571):776-7.