乾燥濃縮人プロトロンビン複合体

ケイセントラ静注用 500

ケイセントラ静注用 1000

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 3
2.6.6　毒性試験の概要文 4
2.6.6.1　まとめ 4
2.6.6.2　単回投与毒性試験 4
2.6.6.2.1　試験番号 139-11：# 旧製剤 A のマウスにおける静脈内投与急性毒性試験［M4.2.3.1］ 4
2.6.6.2.2　試験番号 139-12：# 旧製剤 A のラットにおける急性毒性試験［M4.2.3.1］ 4
2.6.6.2.3　試験番号 B23692：Beriplex® P/N の Wistar 系ラットにおける静脈内単回投与毒性試験［M4.2.3.1］ 5
2.6.6.3　反復投与毒性試験 7
2.6.6.4　遺伝毒性試験 7
2.6.6.5　がん原性試験 7
2.6.6.6　生殖発生毒性試験 7
2.6.6.7　局所刺激性試験 8
2.6.6.7.1　試験番号 139-24：# 旧製剤 Aを静脈内投与、動脈内投与及び静脈周囲投与したウサギにおける局所刺激性試験［M4.2.3.6］ 8
2.6.6.7.2　試験番号 174.1-24：Beriplex® HS/F を静脈内投与したウサギにおける局所刺激性試験［M4.2.3.6］ 9
2.6.6.7.3　試験番号 APQ0048：Beriplex®を静脈内投与、動脈内投与又は静脈周囲投与したウサギにおける局所刺激性試験［M4.2.3.6］ 9
2.6.6.8　その他の毒性試験 11
2.6.6.8.1　試験番号 V-369b：# 旧製剤 A（肝炎に対する安全性確保）製造工程の変更に起因する抗原成分形成に関する試験［M4.2.3.7］ 11
2.6.6.9　考察及び結論 12
2.6.6.10　図表 13

＃新薬承認情報提供時に置き換え

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）
IU	International unit	国際単位
kg	Kilogram	キログラム
mg	Milligram	ミリグラム
mL	Milliliter	ミリリッター
[redacted]	[redacted]	[redacted]
NOAEL	No-observed-adverse-effect level	無毒性量
PPSB	Prothrombin complex concentrate (prothrombin, proconvertin, Stuart-Prower Factor, antihemophilic globulin B)	プロトロンビン複合体製剤（プロトロンビン、プロコンバーチン、スチュアート・プロワー因子、抗血友病 B グロブリン）[redacted]で製造された本申請製剤の過去製剤＃ 旧製剤 A の略号
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス

＃新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.6　毒性試験の概要文

2.6.6.1　まとめ

本剤のマウス及びラットを用いた静脈内投与急性毒性試験を実施した。局所刺激性試験はウサギを用いて静脈内、静脈周囲及び動脈内投与により実施した。新たに形成される抗原性物質を検出する試験（ネオ抗原性試験）はウサギを用いて実施した。

2.6.6.2　単回投与毒性試験

マウスには＃ 旧製剤 A を投与量 20、60 及び 200 IU/kg、ラットには投与量 20、50、100 及び 500 IU/kg で静脈内単回投与した場合の毒性を評価した。

急性毒性試験の概要を表 2.6.6-1 に示す。

表 2.6.6-1：急性毒性試験

試験の種類	試験番号	バッチ番号	使用製剤	GLP 適合
急性毒性、マウス	139-11	[redacted]	＃ 旧製剤 A	適
急性毒性、ラット	139-12	[redacted]	＃ 旧製剤 A	適
急性毒性、ラット	B23692	[redacted]	Beriplex® P/N	適

2.6.6.2.1　試験番号 139-11：＃ 旧製剤 A のマウスにおける静脈内投与急性毒性試験［M4.2.3.1］

＃旧製剤 A を投与量 20、60 及び 200 IU/kg で 1 群当たり雌雄各 5 例（各群 10 例で投与群は 3 群）のマウスに静脈内単回投与した。対照群の雌雄各 5 例のマウスには等張生理食塩液を投与した。14 日間の観察期間中に動物の生死、一般状態観察及び体重測定を行った。観察期間終了後、動物を剖検し肉眼病理検査を実施した。

最高投与量（200 IU/kg）群の 10 例中 2 例で、投与後 3～5 日に削痩及び粗毛が観察された。投与後 3 日に削痩が観察された他 1 例では、それ以降に死亡が発見され、肉眼病理検査では血性の腸内容物が認められた。観察期間中、＃ 旧製剤 A 投与群の 30 例中 10 例の動物で投与翌日に体重が減少した。その後、最高投与群の雌では体重増加の時期が遅延した。観察期間終了時に剖検した動物では、＃ 旧製剤 A 投与に関連する所見は観察されなかった。

以上より、＃ 旧製剤 A の投与量 60 IU/kg における忍容性は良好であった。しかし、投与量 200 IU/kg では中等度な毒性が発現し、1 例の死亡が認められた。概略の致死量は 200 IU/kg であった。

2.6.6.2.2　試験番号 139-12：＃ 旧製剤 A のラットにおける急性毒性試験［M4.2.3.1］

＃旧製剤 A を投与量 20、50 及び 100 IU/kg で 1 群当たり雌雄各 5 例（各群 10 例で投与群は 3 群）のラットに静脈内単回投与した。対照群の雌雄各 5 例のラットには等張生

理食塩液を投与した。14 日間の観察期間中に動物の生死、一般状態観察及び体重測定を行い、観察期間終了後に剖検し肉眼病理検査を実施した。

観察期間中に全動物が生存し、一般状態に変化はみられなかった。# 旧製剤 A 投与群の体重増加量は溶媒対照群と同程度であった。14 日間の観察期間終了後の剖検では、# 旧製剤 A 投与に関連した所見は認められなかった。

したがって、ラットでは # 旧製剤 A の投与量 100 IU/kg まで毒性を発現しなかった。概略の致死量は 100 IU/kg を超える用量であった。

2.6.6.2.3　試験番号 B23692：Beriplex® P/N の Wistar 系ラットにおける静脈内単回投与毒性試験［M4.2.3.1］

Beriplex® P/N を投与量 50、100 及び 500 IU/kg で 1 群当たり雌雄各 13 例（各群 26 例で投与群は 3 群）のラットに静脈内単回投与した。対照群の雌雄各 8 例のラットには等張生理食塩液を投与した。全群について各群 10 例の動物を主要な試験に割り付けた。Beriplex® P/N 投与群では 1 群当たり残り 16 例、溶媒対照群では 6 例の動物をトキシコキネティクス（TK）評価に割り当てた。観察期間中、動物の生死、一般状態観察、体重及び摂餌量測定を行った。さらに、血液学的検査、凝固系検査、血液生化学的検査及び尿検査を剖検前に実施した。投与後 5 日目に動物を剖検し、病理学的検査（剖検時の肉眼病理検査を含む）を行った。TK 測定は、投与前、投与後 0.25、1、3 及び 8 時間、並びに 1、3 及び 5 日に実施した。

Beriplex® P/N の投与量 500 IU/kg で 4 例が早期に死亡した。そのうち 2 例は、投与日に瀕死状態のために安楽死に供し、残り 2 例はそれぞれ 3 及び 4 日目に死亡を発見した。少なくとも 2 例は Beriplex® P/N 投与に関連のある死亡とみなされた。安楽死に供した 1 例の臨床徴候は投与後 1 時間以内に認められ、立毛、鎮静及び横臥／腹臥が観察された。残り 2 例の死亡は 3 及び 4 日目に認められた。途中死亡例のうち、病理組織学的評価の可能な個体の所見は次のとおりである。投与日に死亡した 1 例で小脳の中等度かつ限局性出血、脾臓の軽微なリンパ球枯渇及び胸腺の軽微なリンパ球融解が観察された。3 日目に死亡した 1 例で、Beriplex® P/N の直接的影響の可能性がある所見として腎臓の中等度な尿細管壊死及び硝子円柱、軽度の心室拡張、前胃の軽微なびらん、胸腺、前立腺及び精嚢の軽微な萎縮が観察された。早期死亡例におけるいくつかの病理所見は全身状態の悪化により二次的に認められた変化であった。出血の所見は、高投与量により予想される凝固系因子の過剰状態に反する変化と考えられた。

500 IU/kg 投与群の雄 10 例及び雌 6 例で立毛が観察され、雄 2 例及び雌 4 例では鎮静もみられた。雌 1 例では横臥／腹臥が観察された。雄 1 例の立毛及び鎮静は観察期間を通じて認められた。50 及び 100 IU/kg 投与群の動物では一般状態の変化はみられなかった。500 IU/kg 投与群では、体重当たりの相対摂餌量（g/kg 体重）は投与翌日の 50～60%の減少を最低に、3 日目まで減少し、体重も溶媒対照群と比較して減少した。50 及び 100 IU/kg 投与群では軽度の体重増加抑制がみられたが、顕著な変化ではなく毒性学的意義はないと考えられた。

臨床病理学的検査では、Beriplex® P/N 投与群の雄で赤血球パラメータの変化及び 500 IU/kg 投与群の雄で血小板数の変化が認められた。赤血球パラメータへの影響は 500 IU/kg 投与群で最も顕著であった。これらの所見は大腿骨（赤血球系細胞の過形成）及び肝臓における変化と関連していた。50 IU/kg 投与群の雄における血色素量はちょうど基準値の範囲内であり、同群雄におけるヘマトクリット値は背景データの範囲から僅かに逸脱していた。溶媒対照群のヘマトクリット値は背景データの下限値であった。当該試験に用いたラットは血液学的検査のための採血時には約 8 週齢であったが、参照した背景データは 8～12 週齢のラットのデータを使用した。50 及び 100 IU/kg 投与群の雄では、赤血球パラメータの変化に関連する病理組織学的変化は認められなかった。全身機能にも変化はなかったため、50 及び 100 IU/kg 投与群の雄でみられた赤血球パラメータの変化は適応反応であり、有害作用とは考えられなかった。100 及び 500 IU/kg 投与群の雌の脾臓に造血の軽微な増加が認められた。100 IU/kg 投与群の雌では、血液学的パラメータに関連性のある変化又はその他の影響もみられなかったため、本所見は適応性変化と考えられた。

剖検前の凝固系、血液生化学及び尿検査に毒性学的関連のある変化は認められなかった。

剖検時の主な所見として、500 IU/kg 投与群における脾臓重量（実重量及び体重に対する比重量）の増加が認められた。病理組織学的検査で認められた所見は、ほとんどが 500 IU/kg 投与群で観察され軽微ではあるが、Beriplex® P/N 投与と関連する可能性があった。500 IU/kg 投与群で肝臓の軽微な造血の出現頻度が僅かに上昇し、100 及び 500 IU/kg 投与群で脾臓の軽微ないし軽度な造血が認められた。また、500 IU/kg 投与群で骨髄の赤血球系細胞過形成の僅かな出現頻度上昇、軽微ないし軽度の腎尿細管の好塩基性変化、投与部位で混合細胞の軽微ないし軽度な浸潤の僅かな出現頻度上昇、並びに投与部位における軽微ないし重度な筋変性が観察された。100 IU/kg 投与群の雌及び 500 IU/kg 投与群の雌雄のうちそれぞれ 1 例で軽度ないし中等度の限局性痂疲形成が認められた。

血液凝固第Ⅸ、Ⅹ、Ⅱ及びⅦ因子の TK 解析により、これらの血漿中最高濃度は用量依存的に増加した。Beriplex® P/N 投与群の全凝固因子はほぼ 1 日以内に投与前値まで低下した。投与後 15 分（TK 測定のための採血の最も早い時間）に、投与量 50、100 及び 500 IU/kg における第Ⅸ因子抗原の血漿中濃度は、それぞれ 0.4、0.8 及び 4 IU/mL であった。投与後 15 分では、投与量 50、100 及び 500 IU/kg における第Ⅹ因子抗原の血漿中濃度はそれぞれ約 0.7、1.6 及び 6 IU/mL であり、第Ⅱ因子の血漿中濃度上昇はそれぞれ約 0.8、2 及び 6 IU/mL であった。第Ⅶ因子の血漿中活性は静脈内投与後に典型的な推移を示さなかったため、動態学的解析を実施しなかった。しかし、測定値に変動がみられるものの、第Ⅶ因子の血漿中活性は用量依存的な増加傾向が認められた。ラットにおける半減期は、第Ⅱ、Ⅸ及びⅩ因子と比較して第Ⅶ因子が最も短く、ラットの内因性第Ⅶ因子の濃度が高いことを考慮すると、本剤投与後の第Ⅶ因子の血漿中濃度は投与前値に近いと推測される。

以上より、本試験条件下における無毒性量（NOAEL）は 100 IU/kg と推定され、また、概略の致死量は 500 IU/kg であった。

2.6.6.3　反復投与毒性試験

本剤は臨床的に反復して投与されないため、反復投与毒性試験は実施しなかった。また、本製剤中のヒトタンパク質がげっ歯類及び霊長類において免疫原性を有するため、反復投与により血液凝固因子に対する抗体産生が誘導される。その結果、非中和抗体及び中和抗体による血液凝固因子の阻害が起こり、さらに、抗薬物抗体複合体の形成により血液凝固因子が急速に消失するため、反復投与試験から適切かつ意義のある結果を得ることはできないと考えられる。

プロトロンビン複合体製剤は臨床的に長年にわたり使用されており、ヒトでは忍容性が良好であることが示されている（Hanke ら 2009；Hanke ら 2013）。さらに、反復投与毒性試験を実施しても、ヒトにおける Beriplex® P/N の安全性に関する重要な情報は得られないと考えられる。

2.6.6.4　遺伝毒性試験

本剤の成分はヒト血漿タンパクであり、遺伝毒性を示すエビデンスはないため、遺伝毒性試験を実施しなかった。

本剤は DNA 損傷を誘発するような DNA との直接的な相互作用を示さず、DNA 結合タンパクとの相互作用もないため、変異原性は予測されない。また、本剤の臨床使用経験からも遺伝毒性に関する安全性が確認されている。

従来の医薬品で通常実施されるような遺伝毒性試験の種類及び範囲は、本剤と類似するバイオテクノロジー応用医薬品には当てはまらないので必要とされない。さらに、ペプチド又はタンパクを大量投与すると、解釈不能な結果をもたらす可能性があることから、試験実施は適切とは考えられない。

2.6.6.5　がん原性試験

本剤のがん原性試験に関して、ヒト血漿中に通常に存在する血液凝固因子の腫瘍形成又は発がん性は予測されない。このクラスのタンパクが形質転換細胞の増殖又はクローン性増殖を裏付ける特性を示すことは報告されておらず、本剤の臨床使用経験より発がん性に関する安全性は確認されている。したがって、本剤の遺伝毒性又は発がん性についての懸念はなく、発がん性について本剤独自の評価が必要とは考えられない。

本剤中のヒトタンパク質がげっ歯類及び霊長類において免疫原性を有する結果、反復投与により血液凝固因子に対する抗体産生が誘導され、その結果、非中和抗体及び中和抗体による血液凝固因子の阻害が起こり、さらに、抗薬物抗体複合体の形成により血液凝固因子が急速に消失する。したがって、がん原性試験を実施することは毒性学的に不適切であり、がん原性試験から適切かつ意味のある情報は得られないと考えられる。

2.6.6.6　生殖発生毒性試験

本剤はヒト血漿から製造された製剤であるため、ヒトにおける受胎能、出生後の発生及び生殖能、並びに胚・胎児発生に及ぼす影響は予想されず、生殖発生毒性試験は実施しなかった。

本剤中のヒトタンパク質がげっ歯類及び霊長類のような実験動物において免疫原性を有する結果、反復投与により血液凝固因子に対する抗体が急速に産生されるため、生殖発生毒性試験を実施することは毒性学的に適切とは考えられない。本剤は異種タンパク質として認識され、結果として非中和抗体及び中和抗体により阻害され、抗薬物抗体複合体の形成により全身の血液循環から急速に消失するため、生殖発生毒性試験で予想される結果が、広範囲な毒性学的リスク評価を行う上で適切かつ意味のあるデータを導くとは考えられない。

2.6.6.7　局所刺激性試験

局所刺激性試験は、ウサギを用いて臨床投与経路である静脈内投与、並びに＃ 旧製剤 A 及び Beriplex® P/N の誤投与による影響を評価するために静脈周囲及び動脈内投与により実施した。

局所刺激性試験の概要を表 2.6.6-2 に示す。

表 2.6.6-2：局所刺激性試験

試験の種類	試験番号	バッチ番号	使用製剤	GLP 適合
静脈内、動脈内及び静脈周囲投与、ウサギ	139-24	[redacted]	＃ 旧製剤 A	適
静脈内投与、ウサギ	174.1-24	[redacted]	Beriplex® P/N	適
静脈内、動脈内及び静脈周囲投与、ウサギ	APQ0048	[redacted]	Beriplex® P/N（ウイルス除去膜フィルター[redacted]：[redacted]）	適
		[redacted]	Beriplex® P/N（ウイルス除去膜フィルター[redacted]：[redacted]）	

2.6.6.7.1　試験番号 139-24：＃ 旧製剤 Aを静脈内投与、動脈内投与及び静脈周囲投与したウサギにおける局所刺激性試験［M4.2.3.6］

1 群当たり 8 例のウサギ（雌雄各 4 例、体重約 2.3 kg）3 群に、＃ 旧製剤 Aを 100 IU/animal（投与液量：5 mL/animal、投与量：約 43.5 IU/kg）で静脈内及び動脈内投与 2 IU/animal（投与液量：0.1 mL/animal、投与量：約0.9 IU/kg）で静脈周囲投与した。＃ 旧製剤Aはウサギの片側耳介、溶媒対照（等張生理食塩液）は反対側の耳介に投与した。投与後 2 日間（静脈内投与及び動脈内投与）又は 7 日間（静脈周囲投与）、投与部位の臨床徴候を観察した。各群の動物の半数を＃ 旧製剤A 投与の翌日及び 2 日後（静脈内投与及び動脈内投与）、2 日後及び 7 日後（静脈周囲投与）に剖検した。すべての投与部位について病理組織学的検査を実施した。

全群において、等張生理食塩液投与側と比較して Beriplex® の静脈内投与、動脈内投与又は静脈周囲投与後の投与部位に中等度の刺激性変化が認められた。＃ 旧製剤Aを静脈内投与及び動脈内投与した直後に、数例の動物で血管周囲に発赤が観察された。＃ 旧製剤A 投与側

では、投与後 1 日（動脈内投与）又は 2 日まで（静脈内投与）発赤が認められた。# 旧製剤Aの静脈周囲投与により、ほとんどすべての動物で限局性発赤が投与後 2 日まで観察された。等張生理食塩液を静脈内及び動脈内投与した直後に血管周囲に発赤のみが認められた。主な病理組織学所見として各群のそれぞれ 1 例で炎症性浮腫が観察されたが、観察期間終了時にはほとんどすべての動物が回復していた。100 IU/animal（43.5 IU/kg）の静脈内投与群の 1 例で認められた 1 箇所の血栓形成は、高投与量の血液凝固因子と相まって、投与中の血管の損傷により形成された可能性が考えられた。

旧製剤A の静脈内投与又は動脈内投与（100 IU/animal）、静脈周囲投与（2 IU/animal）により、ほとんどの動物で刺激性変化からの回復性が認められたため、# 旧製剤Aは中等度の忍容性を示したと考えられる。

2.6.6.7.2　試験番号 174.1-24：Beriplex® HS/F を静脈内投与したウサギにおける局所刺激性試験［M4.2.3.6］

Beriplex® P/N（Beriplex® HS/F）を 125 IU/animal（5 mL/animal）で雄性ウサギ 5 例に静脈内単回投与した場合の局所刺激性を評価した。Beriplex® P/N を片側の耳介辺縁静脈に投与し、反対側の耳介には溶媒対照として等張生理食塩液を投与した。投与後 3 日間、投与部位の臨床徴候の観察を行った後、投与部位の病理組織学的検査を実施した。

Beriplex® P/N 投与後、被験物質に関連する変化はみられなかった。したがって、Beriplex® P/N は 125 IU/animal で静脈内投与された場合、投与局所における忍容性を示したと考えられた。

2.6.6.7.3　試験番号 APQ0048：Beriplex®を静脈内投与、動脈内投与又は静脈周囲投与したウサギにおける局所刺激性試験［M4.2.3.6］

当該試験は、ウイルス除去膜（フィルター[redacted]：[redacted]）処理した Beriplex® P/N を臨床投与経路（静脈内投与）及び臨床での誤投与の想定経路（動脈内投与又は静脈周囲投与）でウサギ耳介に投与し、本剤の局所刺激性を評価するために実施した。試験では 1 群当たり雌 3 例とした 6 群を設けた。第 1 及び 2 群には Beriplex® P/N（[redacted]）を注入速度 2 mL/min で単回投与、第 4～6 群には Beriplex® P/N を臨床適応で推奨されている注入速度 0.12 mL/kg/min で単回投与、第 3 群には Beriplex® P/N（[redacted]）の 0.2 mL を静脈周囲に投与した。第 1、4 及び 5 群には Beriplex® P/N を臨床投与経路の静脈内投与、第 2 及び 6 群（[redacted]）には静脈周囲投与の場合と共に臨床での誤投与を想定した動脈内投与で行った。ウイルス除去膜フィルター[redacted]の[redacted]と[redacted]を用いた Beriplex® P/N の影響に関する直接の比較は第 4 群（[redacted]）及び第 5 群（[redacted]）で行った。静脈内投与及び動脈内投与での総投与量は、推奨臨床最高用量の 50 IU/kg であった（投与液量：2 mL/kg）。静脈周囲投与での最大投与液量は 0.2 mL であり、投与量換算で 5 IU/animal になる。各動物の右耳介には Beriplex® P/N 投与液、左耳介には等張生理食塩液を同容量で投与した。

投与後 4 日間（投与日及びそれ以降 3 日間）、動物の生死、皮膚反応、一般状態観察及び体重測定を行った。投与後 72 時間に投与部位の肉眼病理検査及び病理組織学的検査を実施した。

観察期間中、いずれの動物でも毒性変化及び一般状態の悪化は認められず、体重増加量も投与による影響を受けなかったものと考えられた。

Beriplex® P/N を臨床推奨注入速度である 0.12 mL/kg/min で投与した結果、いずれの動物でも Beriplex® P/N と生理食塩液の投与部位に一貫性のある差異はみられなかったことから、臨床的に明確な影響は推察されなかった。また、剖検では Beriplex® P/N に関連した肉眼病理所見もみられなかった。

Beriplex® P/N を高速の注入速度 2 mL/min で静脈内投与すると、投与部位周辺に軽微から中等度の血栓形成が認められた。これに対し、注入速度 0.12 mL/kg/min の静脈内投与では、ウイルス除去膜フィルター[redacted]の[redacted]及び[redacted]を用いた Beriplex® P/N のいずれの投与部位でも Beriplex® P/N に関連した病理組織学的所見は認められなかった。さらに、等張生理食塩液を 0.12 mL/kg/min で静脈内投与した際にも 6 例中 4 例の動物で軽度ないし中等度の血栓形成が認められたため、血栓形成は静脈内投与後に一般的にみられる投与手法に起因する所見であることが示唆された。

Beriplex® P/N を注入速度 2 mL/min で動脈内投与すると、投与後 24、48 及び 72 時間に 1 例の投与部位に痂疲形成が観察された。肉眼病理検査では、他の動物で右耳介（Beriplex® P/N 投与側）に皮膚の肥厚が認められた。病理組織学的検査では、この動物に血栓形成、うっ血／血管のうっ血及び著しい組織損傷（壊死、出血、浮腫、炎症性浸潤、潰瘍及び小膿疱）が観察された。しかし、Beriplex® P/N を注入速度 0.12 mL/kg/min で動脈内投与した場合には、Beriplex® P/N に関連した病理組織学的所見はみられなかった。

Beriplex® P/N の 0.2 mL を静脈周囲に投与した動物では、Beriplex® P/N 投与による肉眼変化及び病理組織学的所見は認められなかった。

以上の成績より、Beriplex® P/N を静脈内投与、動脈内投与及び静脈周囲投与すると、全身の臨床徴候は認められず、忍容性は良好であった。Beriplex® P/N を臨床推奨最高注入速度 3 IU/kg/min に相当する注入速度 0.12 mL/kg/min で静脈内投与及び動脈内投与すると、投与局所の肉眼的及び病理組織学的変化は認められなかった。Beriplex® P/N を注入速度 2 mL/min で静脈内投与した際にみられた血栓形成については、生理食塩液投与後（注入速度：0.12 mL/kg/min）にも同様な所見がみられたことから、血栓形成の毒性学的意義は不明である。Beriplex® P/N を注入速度 0.12 mL/kg/min 及び 2 mL/min で静脈内又は動脈内投与した場合の局所刺激性を比較すると、全般的に注入速度 0.12 mL/kg/min では 2 mL/min と比べて局所刺激性変化は認められなかった。

本試験成績より、Beriplex® P/N のウイルス除去膜フィルター[redacted][redacted]を使用する工程は、本製剤の投与局所における忍容性に影響を及ぼさないことが確認された。

2.6.6.8　その他の毒性試験

＃ 旧製剤Ａの製造工程におけるパスツリゼーション処理で新たな抗原決定基が形成される可能性を検討するため、ネオ抗原性試験を実施した。

ネオ抗原性試験の概要を表 2.6.6-3 に示す。

表 2.6.6-3：ネオ抗原性試験

試験の種類	試験番号	バッチ番号	使用製剤	GLP 適合
ネオ抗原性、ウサギ、モルモット	V-369b	[redacted]	＃ 旧製剤Ａ	不適

2.6.6.8.1　試験番号 V-369b：＃ 旧製剤Ａ（肝炎に対する安全性確保）製造工程の変更に起因する抗原成分形成に関する試験［M4.2.3.7］

本剤の製造工程でパスツリゼーション処理を組み込むことによる新たな抗原（ネオ抗原）の形成についてウサギ及びモルモットで検討した。1 群当たり雌雄各 5 例のウサギ 10 例に、＃ 旧製剤Ａ 又はパスツリゼーション非処理の旧製剤でそれぞれ免疫した。

免疫は 1～5 日及び 15～19 日目に、本製剤を 0.1 mg 含有する 0.05%エアロシル懸濁液の 3.0 mLをウサギに静脈内投与することにより行った。免疫後、各群の動物から心臓穿刺により血液を採取し、その血清を用いて各製造工程で形成される抗原を検出するためにオクタロニー試験（マイクロオクタロニー法）を実施した。試験結果が得られた後、各動物から血清を個別に採取した。

免疫後、全動物で抗原に対する沈降抗体が検出された。2 回の吸着ステップでは、これらのすべての抗体は除去されなかった。各吸着ステップで抗＃ 旧製剤Ａ 血清に含まれる抗体がパスツリゼーション非処理製剤で吸着されたため、各抗＃ 旧製剤Ａ 血清の5 mL に対して100 IU のパスツリゼーション非処理製剤を加え 3 回目の吸着を行った

＃ 旧製剤Ａに対する抗体を含む抗血清の 3 回目吸着後（パスツリゼーション非処理製剤で吸着）、不十分な吸着のために両被験製剤に対する抗体が認められた 1 例を除き、沈降抗体は検出されなかった。

オクタロニー試験の結果、パスツリゼーション処理によりネオ抗原の形成は認められなかった。この *in vitro* モデルの感度は低いと考えられているため、モルモット（雄 20 例）を用いた異種受身皮膚アナフィラキシー反応を実施した。各吸着抗血清の 1 mL を雄モルモット 2 例に静脈内投与した（総動物数：雄 20 例）。1 時間後、＃ 旧製剤Ａ の2、0.2 及び 0.02 IU を含有する抗原液の 0.1 mL を剃毛した動物の腹部側面に皮内投与した。その 30 分後に Evans blue 溶液を静脈内投与し、10 分後に動物を剖検し投与部位の皮膚に形成される青色色素斑の径を測定した。

吸着血清投与後の動物の反応に、同一条件下で正常ウサギ血清を投与した対照動物の反応との違いはみられなかった。

したがって、これらのネオ抗原性試験において、本剤の製造工程のパスツリゼーション処理によりネオ抗原の形成を示唆する結果は得られなかった。

ウイルス除去膜処理は混入不純物を除く工程であるため、この追加工程により Beriplex® P/Nに含まれるタンパク質が変化することは考え難い。したがって、# 旧製剤A のネオ抗原性試験の結果は Beriplex® P/N にも適用されると考えられる。

2.6.6.9　考察及び結論

静脈内投与による急性毒性試験はマウス及びラットで実施した。静脈内投与の最高投与量は、ラットで 500 IU/kg、マウスで 200 IU/kg であった。# 旧製剤A を投与量 200 IU/kg でマウスに投与した場合、いくつかの毒性所見が認められた。数例の動物に粗毛が観察され、マウス 1 例が死亡し、体重増加の時期が遅延した。マウスでは # 旧製剤A の 60 IU/kg まで忍容性が良好であった（M4.2.3.1　試験番号 139-11）。

ラットでは# 旧製剤Aの100 IU/kgまで忍容性が良好であった（M4.2.3.1　試験番号139-12）。引き続き実施した Beriplex® P/N のラット試験では、最初に実施した試験の成績を確認し、NOAEL は 100 IU/kg と推定された。投与量 500 IU/kg では 26 例中 4 例は死亡又は瀕死状態のために安楽死に供した。相対摂餌量は投与後 3 日まで減少し、脾臓重量が増加した。病理組織学的所見として、肝臓及び脾臓でのごく軽微な髄外造血の増加が組織全体に観察された（M4.2.3.1 試験番号 B23692）。

急性毒性試験の結果に基づき、本剤は推定臨床用量の数倍の投与量で良好な忍容性を示すと考えられた。

本剤の局所刺激性を評価するため、製剤を臨床投与経路（静脈内投与）、誤投与を想定した投与経路（すなわち、動脈内投与及び静脈周囲投与）でウサギに投与した。# 旧製剤Aは静脈内及び動脈内投与（100 IU/animal 又は約 43 IU/kg）、静脈周囲投与（2 IU/animal 又は約 0.9 IU/kg）で忍容性があると考えられた（M4.2.3.6　試験番号 139-24）。現在の製剤である Beriplex® P/N の静脈内投与（125 IU/animal 又は約 50 IU/kg）による局所刺激性試験で局所刺激性は認められず、Beriplex® P/N はこの投与量での静脈内投与により、局所の忍容性があると考えられた（M4.2.3.6 試験番号 174.1-24）。追加の局所刺激性試験では、ウイルス除去膜フィルター[redacted]を[redacted]から[redacted]に変更しても Beriplex® P/N の局所忍容性に影響を及ぼさなかった。さらに、Beriplex® P/N を静脈内、動脈内及び静脈周囲投与しても全身の臨床徴候が観察されず、忍容性は良好であった。Beriplex® P/N を静脈内及び動脈内投与した場合の局所の肉眼変化及び病理組織学的変化は、臨床で推奨される最高注入速度の 3 IU/kg/min に相当する注入速度 0.12 mL/kg/min では観察されなかった。

旧製剤A のパスツリゼーション処理により、プロトロンビン複合体のいずれのタンパクにもネオ抗原決定基は検出されなかった。ウイルス除去膜処理はタンパクの分子構造に変化を誘発するとは考えられないため、Beriplex® P/N について追加のネオ抗原性試験は実施しなかった（M4.2.3.7　試験番号 V-369b）。

2.6.6.10　図表

該当なし

乾燥濃縮人プロトロンビン複合体

ケイセントラ静注用 500

ケイセントラ静注用 1000

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 3
2.6.7　毒性試験概要表 4
2.6.7.1　毒性試験：一覧表 4
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 6
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 6
2.6.7.4　毒性試験：被験物質一覧 8
2.6.7.5　単回投与毒性試験 9
2.6.7.6　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 10
2.6.7.7　反復投与毒性試験：重要な試験 10
2.6.7.8　In Vitro 遺伝毒性試験 10
2.6.7.9　In Vivo 遺伝毒性試験 10
2.6.7.10　がん原性試験 10
2.6.7.11　生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 10
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 11
2.6.7.13　生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 11
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 11
2.6.7.15　新生児を用いた試験 11
2.6.7.16　局所刺激性試験 12
2.6.7.17　その他の毒性試験 14

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）
AUC	Area under the plasma concentration-time curve	血漿中濃度-時間曲線下面積
b.w.	Body weight	体重
C_{max}	Maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
CHB	Chinchilla bastard	チンチラ種
F	Female	雌
F II	Coagulation factor II	血液凝固第Ⅱ因子
F VII	Coagulation factor VII	血液凝固第Ⅶ因子
F IX	Coagulation factor IX	血液凝固第Ⅸ因子
F X	Coagulation factor X	血液凝固第Ⅹ因子
i.a.	Intraarterial	動脈内
IU	International unit	国際単位
i.c.	Intracutaneous	皮内
i.v.	Intravenous	静脈内
kg	Kilogram	キログラム
NOAEL	No-observed-adverse-effect level	無毒性量
M	Male	雄
mg	Milligram	ミリグラム
mL	Milliliter	ミリリッター
NZW	New Zealand White	ニュージーランド白色種
PPSB	Prothrombin complex concentrate (prothrombin, proconvertin, Stuart-Prower Factor, antihemophilic globulin B)	プロトロンビン複合体製剤(プロトロンビン、プロコンバーチン、スチュアート・プロワー因子、抗血友病Bグロブリン)[redacted]で製造された本申請製剤の過去製剤、 #旧製剤Aの略号
p.v.	Paravenous	静脈周囲

#新薬承認情報提供時に置き換え

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:乾燥濃縮人プロトロンビン複合体製剤

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location / Section
Single-dose toxicity	Mouse / NMRI	i.v. bolus	Single	0, 20, 60, and 200 IU/kg	Yes	Behringwerke AG	139-11	4.2.3.1.1
Single-dose toxicity	Rat / Wistar	i.v. bolus	Single	0, 20, 50, and 100 IU/kg	Yes	Behringwerke AG	139-12	4.2.3.1.2
Single-dose toxicity	Rat / Wistar	i.v. bolus	Single	0, 50, 100 and 500 IU/kg	Yes	[redacted]	B23692	4.2.3.1.3
Repeat-dose toxicity	-	-	-	-	-	-	-	-
Genotoxicity	-	-	-	-	-	-	-	-
Carcinogenicity	-	-	-	-	-	-	-	-
Reproductive and developmental toxicity	-	-	-	-	-	-	-	-
Local tolerance	Rabbit / CHB	i.v. bolus i.a. bolus p.v. bolus	Single Single Single	100 IU/rabbit 100 IU/rabbit 2 IU/rabbit	Yes	Behringwerke AG	139-24	4.2.3.6.1
Local tolerance	Rabbit / NZW	i.v. bolus	Single	125 IU/rabbit	Yes	Behringwerke AG	174.1-24	4.2.3.6.2
Local tolerance	Rabbit / NZW	i.v. bolus i.v. infusion i.a. bolus i.a. infusion p.v. bolus	Single Single Single Single Single	50 IU/kg 50 IU/kg [a] 50 IU/kg 50 IU/kg 5 IU/rabbit	Yes	[redacted]	APQ0048	4.2.3.6.3

-, No studies were performed.

[a], Due to a dose preparation error, the animals received a total intravenous dose of 60 IU/kg instead of 50 IU/kg of Beriplex® [redacted].

表 2.6.7-1：　毒性試験一覧表（続き）

被験物質:乾燥濃縮人プロトロンビン複合体製剤

Type of Study	**Species and Strain**	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Doses**	**GLP Compliance**	**Testing Facility**	**Study Number**	**Location / Section**
Other Neoantigenicity	Rabbit / CHB Guinea pig / Albino	i.v. bolus i.v. / i.c.	days 1-5 days 15-19	0.1 mg/rabbit	No	Behringwerke AG	V-369b	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:乾燥濃縮人プロトロンビン複合体製剤

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location / Section
Single-dose toxicity	Rat	Intravenous	0, 50, 100 and 500 IU/kg	Yes	[redacted]	B23692	4.2.3.1.3

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

被験物質:乾燥濃縮人プロトロンビン複合体製剤

Factor II					
Dose (IU/kg)	**Type of Study**	**AUC_{fitted} [a), b)](IU•h/mL)**		**$C_{max, fitted}$ [a)](IU/mL)**	
		Male Rat	**Female Rat**	**Male Rat**	**Female Rat**
50	Single-dose toxicity	4.9	–	0.82	–
100		13.1	10.1	1.85	1.86
500		26.7	36.2	6.63	6.28

Factor IX					
Dose (IU/kg)	**Type of Study**	**AUC_{fitted} [c)](IU•h/mL)**		**$C_{max, fitted}$ [c)](IU/mL)**	
		Male Rat	**Female Rat**	**Male Rat**	**Female Rat**
50	Single-dose toxicity	1597	1375	704	371
100		3232	2883	891	933
500		17249	13372	4047	4172

表 2.6.7-3：　トキシコキネティクス試験成績の一覧（続き）

被験物質:乾燥濃縮人プロトロンビン複合体製剤

Factor X					
Dose (IU/kg)	**Type of Study**	**AUC_{fitted} [a)](IU•h/mL)**		**$C_{max, fitted}$ [a)](IU/mL)**	
		Male Rat	**Female Rat**	**Male Rat**	**Female Rat**
50	Single-dose toxicity	2256	1932	806	674
100		4862	4295	1643	1692
500		27197	22257	6639	7004

a）A one-compartment model for intravenous bolus administration was fitted to the data.
b）Area above the fitted baseline value
c）A two-compartment model for intravenous bolus administration was fitted to the data.
−, The data from female rats treated with 50 IU/kg did not yield reliable kinetic results.

The plasma concentration of factor VII activity did not show a typical profile after intravenous administration. Therefore, no kinetic analysis was performed for factor VII. However, in spite of the variations observed with the detection of the factor VII plasma levels a dose-depending increase could also be concluded for F VII. As compared to F IX, F X and F II, F VII had the shortest half-life in rats. Taking into account that the rat has high endogenous F VII levels, the plasma levels after Beriplex® P/N administration were close to baseline values.

2.6.7.4　毒性試験：被験物質一覧

表 2.6.7-4：　使用製剤名及びバッチ番号

被験物質:乾燥濃縮人プロトロンビン複合体製剤

Study No.	Product	Batch No. / Lot No.	Filter size ([redacted])
139-11 139-12 139-24	# 旧製剤A	[redacted]	[redacted]
B23692	Beriplex® P/N 250 (Beriplex® P/N)	[redacted]	[redacted]
174.1-24	Beriplex® HS/F (Beriplex® P/N)	[redacted]	[redacted]
APQ0048	Beriplex® P/N 250 (Beriplex® P/N)	[redacted]	[redacted]
	Beriplex® P/N 250 (Beriplex® P/N)	[redacted]	[redacted]
V-369b	# 旧製剤A	[redacted]	[redacted]
	# 旧製剤B	[redacted]	[redacted]

n/a, not applicable

The specification of concentration factors and excipients for these products is listed in the table below.

表 2.6.7-5：　Beriplex®製剤に含有する凝固因子及び添加物の規格

被験物質:乾燥濃縮人プロトロンビン複合体製剤

F II	F VII	F IX	F X	P-C	P-S	AT III	ALB	HEP
20-48 IU/mL	10-25 IU/mL	20-31 IU/mL	22-60 IU/mL	15-45 IU/mL	12-38 IU/mL	0.2-1.5 IU/mL	2-4 mg/mL	0.4-2.0 IU/mL

P-C, Protein C;　P-S, Protein S;　AT III, Antithrombin III;　ALB, Albumin;　HEP, Heparin

新薬承認情報提供時に置き換え

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:乾燥濃縮人プロトロンビン複合体製剤

Species/ Strain	Method of Administration	Doses	Gender and No. per Group	Observed Maximum Non-Lethal Dose	Approxi-mate Lethal Dose	Noteworthy Findings	Study Number CTD Section
Mouse / NMRI	intravenous	0, 20, 60 and 200 IU/kg	5 M + 5 F	60 IU/kg	200 IU/kg	# 旧製剤A administered at a dose of 60 IU/kg b.w. was well tolerated. Whereas, the administration of 200 IU/kg # 旧製剤A demonstrated moderate toxicity and one animal died.	139-11 4.2.3.1.1
Rat / Wistar	intravenous	0, 20, 50 and 100 IU/kg	5 M + 5 F	100 IU/kg	> 100 IU/kg	# 旧製剤A was well tolerated in rats at doses up to 100 IU/kg. No adverse clinical signs and no treatment related findings at necropsy were recorded.	139-12 4.2.3.1.2
Rat / Wistar	intravenous	0, 50, 100 and 500 IU/kg	13 M + 13 F for vehicle: 8 M + 8 F	100 IU/kg	500 IU/kg	The NOAEL for Beriplex® P/N was established at 100 IU/kg b.w. At 500 IU/kg 4 of 26 rats died or were euthanized. The relative food consumption (g/kg b.w./day) was reduced up to day 3 following treatment and at necropsy a gained spleen weight was recorded. Histopathological findings were mostly minimal, encompassing increased hematopoiesis in liver and spleen. Ruffled fur was recorded in ten males and six females treated with 500 IU/kg b.w. after the administration, in some animals in combination with sedation. Red cell and platelet parameters were affected, most pronounced in males following 500 IU/kg b.w.	B23692 4.2.3.1.3

新薬承認情報提供時に置き換え

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

試験は実施していない。

2.6.7.8　In Vitro 遺伝毒性試験

試験は実施していない。

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　新生児を用いた試験

試験は実施していない。

2.6.7.16　局所刺激性試験

表 2.6.7-7：　局所刺激性試験

験物質:乾燥濃縮人プロトロンビン複合体製剤

Species / Strain	**Method of Administration**	**Doses**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number CTD Section**
Rabbit / CHB	i.v. bolus i.a. bolus p.v. bolus	100 IU/rabbit 100 IU/rabbit 2 IU/rabbit volume: 5 mL/rabbit i.v., 5 mL/rabbit i.a., 0.1 mL/rabbit p.v.	4 M + 4 F	The i.v., i.a. and p.v. injection of # 旧製剤A caused slight to moderate tissue alteration up to 24 hours in comparison with physiological saline. # 旧製剤A was regarded as moderately tolerable after an i.v. or p.v. injection.	139-24 4.2.3.6.1
Rabbit / NZW	i.v. bolus	125 IU/rabbit volume: 5 mL/rabbit	5 M	Beriplex® P/N did not exhibit any relevant clinical or histopathological alteration in the injected area. Beriplex® P/N can therefore be regarded as locally tolerable after an i.v. injection.	174.1-24 4.2.3.6.2

新薬承認情報提供時に置き換え

表 2.6.7-7：　局所刺激性試験（続き）

被験物質:乾燥濃縮人プロトロンビン複合体製剤

Species / Strain	Method of Administration	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number CTD Section
Rabbit / NZW	i.v. bolus i.v. infusion i.a. bolus i.a. infusion p.v. bolus	50 IU/kg (2 mL/min) 50 IU/kg* (0.12 mL/kg/min) 50 IU/kg (2 mL/min) 50 IU/kg (0.12 mL/kg/min) 5 IU/rabbit * A direct comparison between Beriplex® P/N virus filtered using [redacted] and [redacted] was made at doses of 50 IU/kg [a].	3 F	An i.v. administration of Beriplex® P/N (50 IU/kg) at a dosing rate of 2 mL/min resulted in minimal to moderate thrombus formation around the injection site. Similar findings in the saline control group (0.12 mL/kg/min) made the interpretation of findings difficult. At i.v. dose-rate of 0.12 mL/kg/min, there was no test item related microscopic finding at sites receiving Beriplex® P/N [redacted] and [redacted]. An i.a. administration of Beriplex® P/N (50 IU/kg) at a dose rate of 2 mL/min resulted in eschar formation in one animal and thickened skin together with thrombus formation and tissue injury in another animal. An i.a. infusion of Beriplex® P/N at a dose rate of 0.12 mL/kg/min did not result in any test item related microscopic finding. A p.v. bolus dose of 0.2 mL (5 IU)/rabbit was also well tolerated without any clinical or histopathological test item related changes. An i.v. and i.a. administration of 50 IU/kg Beriplex® P/N was well tolerated when given at a rate of 0.12 mL/kg/min, translating to the maximum recommended infusion rate of 3 IU/kg/min.	APQ0048 4.2.3.6.3

[a], Due to a dose preparation error, the animals received a total intravenous dose of 60 IU/kg instead of 50 IU/kg of Beriplex® [redacted].

2.6.7.17　その他の毒性試験

表 2.6.7-8：　ネオ抗原性試験

被験物質:乾燥濃縮人プロトロンビン複合体製剤

Species/ Strain	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Doses**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number CTD Section**
Rabbit / CHB	i.v.	days 1-5 days 15-19	0.1 mg/rabbit*	5 F + 5M	Absence of neoantigens in # 旧製剤A due to the pasteurization process.	V-369b 4.2.3.7.7.1
Guinea pig / Albino	i.v. / i.c.			2 M		

* For immunization rabbits received ten injections of 0.1 mg # 旧製剤A or Non-heated product per animal independent of body weight.

新薬承認情報提供時に置き換え