テセントリク点滴静注1200 mg
（アテゾリズマブ（遺伝子組換え））
［非小細胞肺癌］

第2部　（モジュール2）：CTD の概要（サマリー）

2.6.6 毒性試験の概要文

中外製薬株式会社

略語一覧

略語	英名	和名
ATA	anti-therapeutic antibodies	抗薬物抗体
AUC	area under the concentration-time curve	濃度－時間曲線下面積
AUC_{ss}	AUC at steady state	定常状態における AUC
$AUC_{t1\text{-}t2}$	AUC from time day t1 to day t2	t1日から t2日までの AUC
C_{max}	maximum serum concentration	最高血清中濃度
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
FGFR3	fibroblast growth factor receptor 3	線維芽細胞増殖因子3
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor	顆粒球コロニー刺激因子
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
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子
ICH	International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for human use	医薬品規制調和国際会議
IFN-γ	interferon-γ	インターフェロンγ
IgG	immunogloblin G	免疫グロブリン G
IL	interleukin	インターロイキン
KC	keratinocyte chemoattractant	（好中球走化性作用を有するケモカイン）
LCMV	lymphocytic choriomeningitis virus	リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス
LPS	lipopolysaccharide	リポ多糖
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1	単球走化性蛋白質1
MIP-1α	macrophage inflammatory protein-1α	マクロファージ炎症性蛋白質1α
MHC	major histocompatibility complex	主要組織適合遺伝子複合体
PBMC	peripheral blood mononuclear cell	末梢血単核細胞
PD-1	programmed death-1	（PD-L1, PD-L2の受容体）
PD-L1	programmed death-ligand 1	（PD-1, B7-1のリガンド）
RANTES	regulated on activation normal T cell expressed and secreted	（血小板や T 細胞由来の好酸球走化性物質）
TNF-α	tumor necrosis factor-α	腫瘍壊死因子 α

目次

頁
2.6.6 毒性試験の概要文 4
2.6.6.1 まとめ 4
2.6.6.2 急性毒性試験 7
2.6.6.3 反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む） 7
2.6.6.3.1 マウス探索的 2 週間静脈内投与試験（4 週間回復性試験） 7
2.6.6.3.2 カニクイザル 8 週間静脈内及び皮下投与試験（12 週間回復性試験） 8
2.6.6.3.3 カニクイザル 26 週間静脈内投与試験（13 週間回復性試験） 9
2.6.6.4 遺伝毒性試験 11
2.6.6.5 がん原性試験 11
2.6.6.6 生殖発生毒性試験 11
2.6.6.7 局所刺激性試験 12
2.6.6.8 その他の毒性試験 12
2.6.6.8.1 *In vitro* サイトカイン放出試験 12
2.6.6.8.2 溶血性試験 12
2.6.6.8.3 組織交差反応性試験 12
2.6.6.9 考察及び結論 13
2.6.6.9.1 反復投与毒性 13
2.6.6.9.2 サイトカイン放出 15
2.6.6.9.3 組織交差反応性 15
2.6.6.9.4 生殖発生毒性 15
2.6.6.9.5 結論 17
2.6.6.10 参考文献 17

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6.1 まとめ

アテゾリズマブ（遺伝子組み換え）（以下，アテゾリズマブ又は本薬）は，PD-L1を標的としたヒト化 IgG1モノクローナル抗体であり，PD-L1と PD-1又は B7-1との相互作用を阻害する。本薬は298位のアミノ酸を改変することにより Fcγ 受容体に対する結合性をほとんど示さない（2.6.2.2.1.3）ため，Fc 領域を介したエフェクター機能による PD-L1発現免疫細胞の傷害を誘導しないと考えられる。

アテゾリズマブはヒト，カニクイザル及びマウスの PD-L1に対し，同程度の結合活性を示す（2.6.2.2.1.1）。ヒト及びカニクイザルにおける結合活性の同等性，並びに PD-L1/PD-1経路の生物学的類似性に基づき，本薬の全身毒性評価に最も適した動物種としてカニクイザルを選択した。

アテゾリズマブの毒性を評価するためのげっ歯類動物種としては，一般的に PD-L1/PD-1経路についてラットよりも詳細に研究されているマウスが適切であると考えられた。非臨床薬理試験はマウスを用いて実施され，その生物学的作用はヒトと類似していることが確認された（2.6.2.2.1）。更に，マウスにおいては多くの特異的試薬が入手可能であり，免疫反応に関する詳細な特性解析が可能であった。毒性試験については，C57BL/6及び CD-1マウスを用いた探索的反復投与試験を実施したが，本試験においてアテゾリズマブは高い免疫原性を示し，抗薬物抗体（ATA）の産生により，反復投与後の血中薬物濃度が急速に低下した。具体的には，本薬の3回目投与後の AUC（AUC_{14-21}）は，初回投与後7日までの AUC（AUC_{0-7}）の約1/2であり，本薬に対するこの免疫反応により，2週間を超える期間の反復投与による PD-L1/PD-1阻害に基づく毒性学的影響の解釈は困難と考えられた。このことから，マウスを用いた2週間を超える投与期間の毒性試験により得られる追加情報は限定的と判断し，GLP 下での更なる毒性試験は実施しなかった。

アテゾリズマブの悪性腫瘍患者における使用をサポートするために実施した各種毒性試験を表 2.6.6.1-1に示した。試験項目及び実施時期については ICH ガイドラインに準拠し，マウスを用いた探索的反復投与試験及び *in vitro* サイトカイン放出試験を除き，すべての毒性試験は米国 FDA の非臨床試験における GLP 規制（21 CFR, Part 58）を遵守して実施した。

表 2.6.6.1-1 アテゾリズマブの毒性試験一覧

試験項目	動物種	投与経路，期間 又は試験方法	投与量（mg/kg） 又は処理濃度	試験成績	GLP 適合性
反復投与毒性					
	マウス (C57BL/6及び CD-1)	静脈内, 2週間，週1回投与 (4週間回復)	0[a], 10, 50 (C57BL/6) 0[a], 50 (CD-1)	脾臓重量高値 坐骨神経の変化 (C57BL/6のみ)	非
	カニクイザル	静脈内及び皮下, 8週間，週1回投与 (12週間回復)	0[a] (静脈内/皮下) 5, 15, 50 (静脈内) 15, 50 (皮下)	無毒性量： 5 mg/kg/週 (静脈内)	適
	カニクイザル	静脈内, 26週間，週1回投与 (13週間回復)	0[b], 5, 15, 50	無毒性量： 5 mg/kg/週	適
その他の毒性					
In vitro サイトカイン放出	ヒト PBMC	24, 48時間	0.25-250 µg/mL	サイトカインの放出なし	非
溶血性	ヒト及びカニクイザル血液	NA	0[a], 125 mg/mL	溶血性なし	適
組織交差反応性	ヒト及びカニクイザル組織	NA	0.25, 1.25 µg/mL	胎盤，リンパ節，扁桃，胸腺（ヒト），リンパ節（カニクイザル）に交差反応	適

GLP = Good Laboratory Practice, PBMC = 末梢血単核細胞, NA = 該当なし
注：表中の GLP 試験については，米国 FDA の非臨床試験における GLP 規制（21 CFR, Part 58）を遵守して実施した。
a) 溶媒：[redacted] mM [redacted]，[redacted] mM [redacted]，[redacted]%[redacted] (pH [redacted])
b) 溶媒：20 mM ヒスチジン–酢酸，120 mM スクロース，0.04%ポリソルベート20 (pH 5.8)

急性毒性

アテゾリズマブの急性毒性試験は実施していないが，マウス及びカニクイザルを用いた反復投与毒性試験の初回投与後に明らかな毒性は認められなかった。

反復投与毒性

- アテゾリズマブを C57BL/6及び CD-1雌性マウスに50 mg/kg までの用量で2週間（計3回）投与したときの忍容性は良好であった。両系統のマウスの50 mg/kg 投与において，最終投与後2日の脾臓重量及び脾臓/脳重量比のわずかな高値が認められたが，最終投与後28日では対照群と比較して明らかな差はなかった。本薬投与による PD-L1/PD-1経路の阻害に関連して，異種タンパク（ヒト免疫グロブリン）に対する免疫反応が亢進し，脾臓重量が増加したものと考えられた。また，C57BL/6マウスの10及び50 mg/kg 投与において，軽微な坐骨神経病変が認められたが，CD-1マウスでは本薬投与による坐骨神経病変は認められなかった。
- アテゾリズマブを50 mg/kg までの用量でカニクイザルに8週間（計9回）反復静脈内又は皮下投与したときの忍容性は良好であった。皮下投与の15及び50 mg/kg，並びに静脈内投与の50 mg/kg において，60日目（最終投与後3日）に本薬投与に関連した軽微～中等度の動脈炎/動脈周囲炎が実質臓器（心臓，腎臓，肝臓，膵臓及び精巣上体）の間質，胃腸管，雌性生殖器等の管腔臓器，舌の粘膜下組織及び筋層に認められた。しかし，これらの所見は141日目

（12週間の休薬期間終了時）には認められず，上記の変化は休薬期間中に回復したか，休薬群の動物で発生していなかったことが考えられた。カニクイザルにおいては動脈炎/動脈周囲炎が自然発生性に生じることが報告されているが，本薬は PD-L1を阻害することにより末梢性免疫寛容の制御を解除する薬理作用を有することから，この免疫学的作用により上記の自然発生性病変の発生頻度を増加させた可能性が考えられた。本試験におけるアテゾリズマブの無毒性量は5 mg/kg/週（静脈内投与）であった。

- アテゾリズマブを50 mg/kg までの用量でカニクイザルに26週間（計27回）反復静脈内投与したとき忍容性は良好であった。50 mg/kg 群の雌で投与期間中に月経周期異常がみられ，この変化に関連して，投与期間終了時（186日目）に剖検した3例の卵巣では，新生黄体が認められなかった（月経周期の欠如を反映）。一方，50 mg/kg 群の他の2例は，休薬期間中に正常な月経周期に回復し，剖検時（274日目）の卵巣の病理組織学的所見は対照群と比較して差が認められなかったことから，本薬投与による月経周期に対する作用は回復性を有するものと考えられた。また，15 及び50 mg/kg 群の各1/6例（いずれも投与期間終了時剖検例）で，軽微～軽度の動脈炎/動脈周囲炎が，全身諸器官（心臓，膵臓，腎臓，膀胱，胆嚢，下顎腺，皮膚/皮下織，骨/骨髄，喉頭，腸間膜リンパ節，胃腸管及び雌性生殖器）において認められた。この変化は休薬期間終了時剖検例では認められなかった。本所見は8週間投与試験で認められた変化と同様であり，本薬の薬理作用に関連した変化と考えられた。本試験におけるアテゾリズマブの無毒性量は5 mg/kg/週であった。

遺伝毒性及びがん原性

ICH S6(R1)（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）及び ICH S9ガイドライン（抗悪性腫瘍薬の非臨床評価）に従い，アテゾリズマブの遺伝毒性及びがん原性試験は実施していない。

生殖発生毒性

PD-L1/PD-1経路の阻害により，胚致死を含むヒト胎児発生に及ぼす安全性リスクが存在することが報告されており，アテゾリズマブは妊娠に悪影響を及ぼす可能性が高いと考えられるため，本薬に関する生殖発生毒性試験は実施していない。カニクイザル26週間静脈内投与試験において，雄では本薬投与による変化は認められなかったものの，雌では50 mg/kg 群の全例で月経周期異常及び卵巣の病理組織学的変化が認められた。

局所刺激性

カニクイザル8週間投与試験における皮下投与の15及び50 mg/kg では，投与期間終了時剖検例の投与部位の皮下組織に，軽微な血管周囲性の単核細胞浸潤が認められた。しかし，12週間の休薬期間終了時にこの所見は認められず，回復性を有する変化であることが示唆された。投与部位における病理組織学的変化は異種タンパクを皮下投与した際に認められる一般的な所見であり，回復性を有する変化であることから，有害な所見ではないと考えられた。

***In vitro* サイトカイン放出**

In vitro において，可溶性あるいは固相化したアテゾリズマブ存在下でヒト末梢血単核細胞（PBMC）をインキュベートし，本薬依存性のサイトカイン放出について検討した。その結果，初回臨床試験で想定されたアテゾリズマブのヒト血清中濃度の範囲（0.25～250 μg/mL）においてサイトカイン放出は認められず，ヒトへのアテゾリズマブ投与により過剰なサイトカイン放出が起こる可能性は低いものと考えられた。

溶血性

アテゾリズマブは，試験可能な最高濃度である125 mg/mL において，ヒト及びカニクイザル赤

血球に対し溶血作用を示さなかった。

組織交差反応性

ヒト組織において，ビオチン標識アテゾリズマブに特異的な染色が胎盤，リンパ節，扁桃及び胸腺において認められた。カニクイザル組織では，ビオチン標識アテゾリズマブに特異的な染色はリンパ節のみで認められた。

2.6.6.2 急性毒性試験

アテゾリズマブについて，独立した急性毒性試験は実施していない。本薬の急性毒性に関する情報は，マウス及びカニクイザルを用いた反復投与毒性試験の初回投与後の一般状態観察，体重推移，サイトカイン及びイムノフェノタイピング解析を含む臨床検査，並びに心血管系及び呼吸器系に対する評価により得られている。結果として，本薬の初回投与後に明らかな毒性所見は認められなかった。

2.6.6.3 反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

反復投与毒性試験として，マウスを用いた探索的2週間静脈内投与試験，カニクイザルを用いた8週間静脈内及び皮下投与試験，並びに26週間静脈内投与試験を実施した。

2.6.6.3.1 マウス探索的2週間静脈内投与試験（4週間回復性試験）

（資料番号 4.2.3.2-1）

アテゾリズマブを C57BL/6及び CD-1マウスに静脈内投与したときの毒性，潜在的な免疫変調及び全身曝露を明らかにするため，非 GLP 下での探索的毒性試験を実施した。本試験では4週間の休薬期間を設定し，休薬による回復性についても検討した。

C57BL/6及び CD-1雌性マウス（各群8例）にアテゾリズマブを週1回，計3回静脈内投与した。投与量は C57BL/6マウスでは0（溶媒），10及び50 mg/kg，CD-1マウスでは0及び50 mg/kg とした。各群について4例ずつ，投与期間終了時（17日目，最終投与後2日）及び休薬期間終了時（43日目）に剖検した。別途，TK 測定のためのサテライト群（各群9例）及び免疫学的検査（末梢血イムノフェノタイピング及び血清中サイトカイン測定）のためのサテライト群（各群15例）を設定し，経時的に血液を採取した。なお，サテライト群の剖検は実施しなかった。

試験期間中に死亡例は認められなかった。また，本薬投与に関連した一般状態，体重及び臨床検査における異常は認められなかった。

投与期間終了時の剖検において，C57BL/6及び CD-1マウスの50 mg/kg 群で，対照群と比較して脾臓重量及び脾臓/脳重量比の高値が認められた。これらの変化に関連した病理組織学的変化は認められなかった。すべての投与群において，休薬期間終了時における脾臓重量は対照群と同程度であり，上記所見は回復性を有する変化であると考えられた。脾臓重量の高値は，本薬投与による PD-L1/PD-1経路の阻害の結果として，投与された異種タンパクに対する免疫反応が亢進したことによるものと考えられた。上記に関連した病理組織学的変化はみられず，脾臓重量の高値は休薬により回復したことから，有害な所見ではないと考えられた。

C57BL/6マウスの10及び50 mg/kg 群において，本薬投与に関連した病理組織学的変化が坐骨神経に認められた。具体的には，投与期間終了時及び休薬期間終了時の両方で，軽微な神経病変（ニューロパチー：リンパ球浸潤を伴う空胞化病変）が認められた。この変化に関連した一般状態の異常は認められなかった。

両系統のマウスにおいて血清中エオタキシン及び IL-12 p40のみが検出されたが，試験期間を通じて，本薬投与群と対照群との間に明らかな差は認められなかった。評価したその他のサイトカイン（IL-1α，IL-1β，IL-2，IL-3，IL-4，IL-5，IL-6，IL-9，IL-10，IL-12 p70，IL-13，IL-17，

IFN-γ，G-CSF，GM-CSF，KC, MCP-1，MIP-1α，RANTES 及び TNF-α）については，いずれのマウス血清試料からも検出されなかった。

投与期間を通じて，末梢血中の CD4陽性ヘルパーT 細胞，CD8陽性細胞傷害性 T 細胞，B 細胞及び NK 細胞の比率及び絶対数に変化はみられなかった。また，いずれの T 細胞分画においても，活性化マーカーである CD25，CD69，CD40L 及び OX40の発現量に変化は認められなかった。

TK 解析においては，血清中アテゾリズマブ濃度の急速な低下が15日目（最終投与日）以降に確認され，22日目の血清中濃度は10 mg/kg 群で定量下限未満，50 mg/kg 群で1～10 μg/mL であった。血清中アテゾリズマブ濃度の低下に一致して，ATA が18日目（最終投与後3日）及び43日目にすべての動物から検出された。

本薬に対する強い免疫反応性により，想定した全身曝露は得られなかった。各投与群における $AUC_{0\text{-}7}$及び $AUC_{14\text{-}21}$は，537及び230 day•μg/mL（C57BL/6，10 mg/kg），2250及び1150 day•μg/mL（C57BL/6，50 mg/kg），3020及び1820 day•μg/mL（CD-1，50 mg/kg）であり，いずれの投与群においても $AUC_{14\text{-}21}$は $AUC_{0\text{-}7}$の約1/2と低値を示し，反復投与により曝露量が低下することが示され，この結果は ATA の産生に一致するものであった。

以上のとおり，アテゾリズマブをマウスに週1回，計3回静脈内投与したとき，軽微な病理学的所見がみられ，その内容は C57BL/6マウスにおける坐骨神経病変及び脾臓重量高値（10及び50 mg/kg），並びに CD-1マウスにおける脾臓重量高値（50 mg/kg）であった。脾臓重量の高値は回復性を有する変化であり，本薬投与による免疫反応亢進に関連した変化と考えられた。坐骨神経の変化も本薬の抗 PD-L1活性に関連したものと考えられたが，この変化は C57BL/6マウスのみで認められた変化であった。

2.6.6.3.2 カニクイザル8週間静脈内及び皮下投与試験（12週間回復性試験）

（資料番号 4.2.3.2-2）

アテゾリズマブをカニクイザルに週1回，8週間（計9回），静脈内あるいは皮下投与したときの毒性及び全身曝露を評価するための試験を GLP 下で実施した。また，12週間の休薬期間を設定し，休薬による回復性及び潜在的な遅延毒性も検討した。

雌雄各36例のカニクイザル（2.8～7.3歳）を使用し，以下の毒性評価群（各群雌雄各5例）及びテレメトリー評価群（各群雌雄各3例）に振り分けた。毒性評価群は5, 15及び50 mg/kg の静脈内投与，15及び50 mg/kg の皮下投与とし，各群雌雄各3例を投与期間終了時（60日目，最終投与後3日），残りの雌雄各2例を12週間の休薬期間終了時（141日目）に剖検した。最高用量の50 mg/kg/週については，臨床推奨用量投与時のヒトにおける曝露量を十分に上回ると推定される用量及び投与頻度として設定した。毒性評価群の対照群には溶媒（[redacted] mM [redacted]，[redacted] mM [redacted]，[redacted]%[redacted]，pH [redacted]）を静脈内及び皮下投与（0.67 mL/kg）した。また，テレメトリー評価群は0及び50 mg/kg/週の静脈内投与とし，試験終了後に試験施設のコロニーに戻した。

なお，本試験の毒性評価群については，剖検時の性腺及び骨格の成熟度を病理組織学的に評価した結果，一部の動物を除き，性腺は思春期前後あるいは成熟に達しており，骨格は，成長期，ほぼ成熟，成熟と，個体間でばらつきがみられたものの，骨格が成熟した個体については性腺も成熟していることが確認された。

アテゾリズマブの50 mg/kg までの用量の静脈内及び皮下投与による忍容性は良好であり，死亡例は認められなかった。また，一般状態，体重，摂餌量，中枢神経系，心血管系及び呼吸器系パラメータ，眼科学的検査，各種臨床検査（血液学的検査，血液化学的検査，血液凝固検査及び尿検査），免疫学的パラメータ（フローサイトメトリーを用いた末梢血イムノフェノタイピング，血清中サイトカイン及び自己抗体(抗核抗体及び抗二本鎖 DNA 抗体)），器官重量及び剖検所見において，対照群と比較して本薬投与に関連した変化は認められなかった。

静脈内投与50 mg/kg 群の1例で，投与前値と比較して29日目に IL-12/23 p40（5倍），TNF-α（定量下限未満～106.6 pg/mL）及び IFN-γ（22倍）の一過性の増加がみられ，これらに一致して，活性化マーカー（CD25及び CD69）を発現したヘルパーT 細胞（$CD4^+CD25^+$及び $CD4^+CD69^+$）の比率及び絶対数が増加した。上記サイトカインは36日目には若干低下し，その後の検査時期である57日目には活性化マーカーも含めて完全に回復した。この変化は一般状態の変化を伴わない自己制御可能な範囲内の変化であり，本薬の投与期間中に回復したこと，他の投与動物では認められなかったことから，毒性学的意義は明確でなかった。しかし，この変化は以下に記載する動脈炎/動脈周囲炎（病理組織学的検査において広範な器官/組織に認められた）に関連して生じた可能性があると考えられた。

主に皮下投与15 mg/kg 群において，一過性の NK 細胞活性の低下が3日目に認められた。この変化はほとんどの動物で8日目には回復傾向を示し，その後は最終投与時まで対照群の値と同程度で推移した。NK 細胞活性の変動は投与量に依存しておらず，また対照群の数例でも低下が認められており，この変化と本薬投与との関連性は明らかではなかった。

投与期間終了時剖検例の病理組織学的検査において，静脈内投与50 mg/kg 群及び皮下投与15 mg/kg 群の各1/6例，並びに皮下投与50 mg/kg 群の2/6例で全身諸器官における動脈炎/動脈周囲炎が認められた。これらの変化は主に実質臓器（心臓，腎臓，肝臓，膵臓及び精巣上体）の間質，及び胃腸管，雌性生殖器等の管腔臓器，舌の粘膜下組織及び筋層において認められた。組織変化は中程度のサイズの動脈における外膜及び内膜の肥厚であり，大型の核を有する紡錘形細胞で構成され，炎症性細胞の浸潤を伴っていた。この変化は本薬投与群のみで認められ，発生頻度に用量依存性（中及び高用量群で発生）がみられたこと，試験施設の背景値（約[redacted]%）を上回る発生頻度であったことから，本薬の投与に起因した変化であると考えられた。動脈炎/動脈周囲炎は休薬群の動物では認められなかったが，これらの変化は休薬により回復したか，元々発生頻度の低い所見であるため休薬群の動物では発生しなかった可能性が考えられた。

皮下投与群では，投与部位の皮下組織において，軽微な限局性又は多巣性の単核細胞浸潤（多くの場合血管周囲性）が15 mg/kg 群の3/6例，50 mg/kg 群の6/6例に認められ，本薬投与に関連したものと考えられた。投与部位における変化は休薬群では認められず，これらの変化は回復性を有するものと考えられた。異種タンパクを皮下投与することによる投与局所の変化は軽微で回復性を有するものであり，有害な変化ではないと考えられた。

本薬投与群における血清中薬物濃度推移に性差は認められず，$AUC_{0\text{-}7}$の平均値（雌雄合算）は，静脈内投与5, 15及び50 mg/kg 群で486，1860及び6990 day•μg/mL，皮下投与15及び50 mg/kg 群で1010及び3620 day•μg/mL であり，いずれの投与経路においても用量依存的な増加が確認された。また，$AUC_{0\text{-}56}$の平均値は，静脈内投与5, 15及び50 mg/kg 群で4870，28700及び104000 day•μg/mL，皮下投与15及び50 mg/kg 群で11700及び61400 day•μg/mL であった。

本薬を投与した56例中50例（89%）で ATA の産生が認められた。ATA は低用量の動物の薬物動態に影響を与えたものの，高用量の ATA 陽性及び陰性動物の平均曝露量は同程度であった（2.6.4.3.2.2）。ATA 力価と本薬投与に関連した作用との間に，明確な関連性は認められなかった。

以上のとおり，アテゾリズマブをカニクイザルに週1回，計9回静脈内あるいは皮下投与したとき，静脈内投与の50 mg/kg 及び皮下投与の15及び50 mg/kg の数例で，全身諸器官における動脈炎/動脈周囲炎，皮下投与の15及び50 mg/kg 群において投与部位における血管周囲性の単核細胞浸潤が認められた。上記の所見は対照群（溶媒）及び5 mg/kg（静脈内投与）では認められず，本試験におけるアテゾリズマブの無毒性量は5 mg/kg/週（静脈内投与）と判断した。

2.6.6.3.3 カニクイザル26週間静脈内投与試験（13週間回復性試験）

（資料番号 4.2.3.2-3）

アテゾリズマブをカニクイザルに週1回，26週間（計27回），静脈内投与したときの毒性及び

全身曝露を評価するための試験を GLP 下で実施した。また，13週間の休薬期間を設定し，休薬による回復性及び潜在的な遅延毒性も検討した。

各群雌雄各5例の性成熟したカニクイザルに本薬の5, 15及び50 mg/kg を反復静脈内投与した。対照群には溶媒（20 mM ヒスチジン–酢酸，120 mM スクロース，0.04%ポリソルベート20，pH 5.8）を投与した。各群雌雄各3例を投与期間終了時（186日目，最終投与後3日），残りの各群雌雄各2例を13週間の休薬期間終了時（274日目）に剖検した。

アテゾリズマブの26週間反復静脈内投与による忍容性は良好であり，死亡例は認められなかった。また，一般状態，中枢神経系，心血管系，及び呼吸器系パラメータ，眼科学的検査，末梢血イムノフェノタイピング，血清中ホルモン（雄のみ）及び雄性生殖機能検査において，本薬投与に関連した変化は認められなかった。更に，血清中 IL-2，IL-4，IL-6，IL-8，IL-10，IFN-γ，GM-CSF，TNF-α 及び IL-1β 濃度において，本薬投与に関連した変化は認められなかった。血清中 GM-CSF，IL-4及び IL-8濃度は，すべての測定時点で定量下限未満であった。

5 mg/kg の雄1例で113日目，15 mg/kg 群の雄1例で141日目に，それぞれ免疫介在性の過敏症反応（投与後の活動性低下，運動失調，全身状態不良及び心拍数増加）が認められた。これらの所見は回復し，また，予防薬による処置をしなかったにも関わらず，以後のアテゾリズマブ投与時に異常は認められなかったことから，有害ではないと考えられた。

本薬投与に関連した軽度の体重増加抑制が雄のすべての投与群で認められ，投与期間終了時（185日目）の体重は，対照群と比較して10～15%低値であった。しかし，投与前から185日目までの体重増加量（平均値）は，対照群の0.8 kg に対し，本薬投与群では0.3～0.5 kg とその差はわずかであり，急激な変化ではなかったこと，関連するその他の検査項目に異常は認められなかったことから，有害な変化ではないと考えられた。雌では体重への影響は認められなかった。

50 mg/kg 群の雌において，月経周期（1日1回の膣のふき取りによりモニター）に対する影響が認められた。具体的には，投与期間中に月経周期異常（月経周期の停止を伴う不規則な月経パターン）がみられ，8～14週目ではほぼ全例に観察された。この変化に関連して，投与期間終了時剖検例の卵巣では，新生黄体が認められなかった（月経周期の欠如を反映）。50 mg/kg 群の休薬終了時剖検例については，休薬期間中に正常な月経周期に回復し，剖検時の卵巣の病理組織学的所見は対照群と比較して差が認められなかったことから，本薬投与による月経周期に対する作用は回復性を有するものと考えられた。

本薬投与に関連した病理組織学的変化として，投与期間終了時剖検の2例で，全身諸器官における動脈炎/動脈周囲炎（組織学的に軽微～軽度，慢性活動性の多巣性病変）が認められた。この変化は15 mg/kg 群の雌1例では心臓，胃及び膣にみられ，50 mg/kg 群の雌1例では心臓，膵臓，腎臓，膀胱，胆嚢，下顎腺，皮膚/皮下織，骨/骨髄，喉頭，腸間膜リンパ節，胃腸管及び雌性生殖器で認められた。上記の動脈炎/動脈周囲炎が発現した機序の詳細は不明であるが，自己免疫素因が関係している可能性が推察される。5 mg/kg 群では，動脈炎/動脈周囲炎を示唆する組織学的変化は認められなかった。

本薬投与に関連した臨床検査における変化は，50 mg/kg 群で動脈炎/動脈周囲炎が認められた個体に限定していた。血液学的検査における白血球数増加（軽微な好中球数増加）及び血液化学的検査における中等度の C 反応性タンパクの増加は，病理組織学的検査における血管の炎症に関連するものと考えられた。同様の動脈炎/動脈周囲炎が認められた15 mg/kg 群の雌では，臨床検査における異常は認められなかった。

休薬期間終了時剖検例においては，いずれの動物においても動脈炎/動脈周囲炎は認められなかったが，これらの動物では，休薬期間中に所見が回復したか，もともと発生していなかった可能性が考えられた。

本薬投与による全身曝露（C_{max} 及び AUC）の雌雄差は概ね2倍以内であり，5～50 mg/kg の用量範囲で概ね用量に応じて増加した。初回投与時の AUC（AUC_{0-3}）の平均値（雌雄合算）は，5, 15及び50 mg/kg 群でそれぞれ243, 693及び2790 day•μg/mL であり，最終投与時の AUC（AUC_{182-}

$_{185}$）の平均値（雌雄合算）は，5, 15及び50 mg/kg 群でそれぞれ378, 3350及び8400 day•μg/mL であった。15及び50 mg/kg 群では反復投与による曝露の蓄積がみられ，最終投与時の C_{max} 及び AUC の平均値（雌雄合算）は，初回投与時の3.0～5.3倍であった（2.6.5.4-3）。

アテゾリズマブに対する ATA の産生が，対照群の0/10例に対し，5，15及び50 mg/kg 群でそれぞれ10/10例，8/10例及び3/10例に認められた（最終的な陽性率70%(21/30例)）。ATA が検出された個体では血清中薬物濃度が低下する傾向がみられ，この変化は低用量の5 mg/kg 群で明らかであった。

以上のとおり，アテゾリズマブをカニクイザルに週1回，計27回静脈内投与したとき，15及び50 mg/kg の各1例で，全身諸器官における動脈炎/動脈周囲炎が認められた。また，50 mg/kg の雌全例では，投与期間中に月経周期異常が認められた。これらの所見は対照群（溶媒）及び5 mg/kg では認められず，本試験におけるアテゾリズマブの無毒性量は5 mg/kg/週と判断した。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床試験における安全性評価に関するガイドライン（ICH S6(R1)）に準拠し，アテゾリズマブの遺伝毒性試験は実施していない。通常の医薬品で適用される定型的な遺伝毒性試験は，バイオ医薬品においては適切なものではなく，実施の必要はないと考えられる。更に，これらの試験系において大量のペプチド及びタンパク質を適用することは解釈不能な結果を生じる可能性がある。本薬は，DNA 及び他の染色体関連分子に対して直接作用する可能性はないものと考えられる。

2.6.6.5 がん原性試験

ICH S6(R1) ガイドライン及び抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン（ICH S9）に準拠し，アテゾリズマブのがん原性試験は実施していない。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

PD-L1/PD-1経路の阻害により，胚致死を含むヒト胎児発生に及ぼす安全性リスクが存在することがこれまでの文献報告で示されており（2.6.6.9.4），アテゾリズマブは妊娠に悪影響を及ぼす可能性が高いと考えられるため，本薬に関する生殖発生毒性試験は実施していない。

アテゾリズマブはマウスの PD-L1に対し，ヒト PD-L1と同程度の親和性で結合することから，本薬の生殖発生毒性について，マウスを用いて評価できる可能性が考えられた。しかし，本薬はマウスにおいて免疫原性が高く，2週間を超える投与期間で血清中薬物濃度を維持することができなかった（2.6.6.3.1）。また，本薬の安全性評価に適した動物種としてカニクイザルを選択しているが，上記文献報告より，本薬について追加の非臨床試験を実施しても，PD-L1阻害に関連した生殖発生毒性のリスクについて新たな知見を提供できる可能性は小さいと考えられたこと，及び毒性試験に非ヒト霊長類を用いることについての倫理的配慮（3Rs）に基づき，カニクイザルを用いた胚・胎児発生に関する試験，及び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は実施しなかった。受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験も実施していないが，カニクイザル26週間静脈内投与試験において，本薬の雌雄生殖器系に対する影響の評価を実施した。雌については膣の拭き取り（毎日）により月経周期をモニターしたが， 50 mg/kg 群で月経周期に対する影響がみられ，投与期間中の月経周期異常（月経周期の停止を伴う不規則な月経パターン）が，8～14週目ではほぼ全例に観察された。この変化に関連して，投与期間終了時剖検例（3例）の卵巣では，新生黄体が認められなかった（月経周期の欠如を反映）。50 mg/kg 群の休薬終了時剖検例（2例）については，休薬期間中に正常な月経周期に回復し，剖検時の卵巣の病理組織学的所見は対照群と比較して差が認められなかったことから，本薬投与による月経周期に対する作用は回復性を有するものと考えられた。雄については，精子検査，超音波による精巣検査，

精巣の病理学的検査（精子形成ステージ解析を含む）及び血清テストステロン濃度の評価を行い，本薬投与による変化は認められなかった。

2.6.6.7 局所刺激性試験

アテゾリズマブの局所刺激性は，カニクイザル8週間投与試験における投与部位の肉眼的及び病理組織学検査により評価した（4.2.3.2-2）。投与期間終了時の検査において，本薬の皮下投与による組織学的変化が15 mg/kg 群の3/6例，及び50 mg/kg 群の6/6例に認められた。これらの変化は，投与部位の皮下組織における軽微な限局性又は多巣性の単核細胞浸潤（多くの場合血管周囲性）であった。投与部位における病理組織学的変化は休薬期間終了時剖検例では認められず，上記の所見は回復性を有するものと考えられた。投与部位に認められた所見は異種タンパクを皮下投与した際にみられる変化に一致しており，休薬期間中に回復したことから有害な変化ではないと考えられた。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 *In vitro* サイトカイン放出試験

（資料番号 4.2.3.7.7-1）

アテゾリズマブ処置によるヒト PBMC からのサイトカイン放出の可能性について *in vitro* で評価した。3名の健康成人から採取した血液より分離した PBMC を可溶性あるいは固相化した種々の濃度のアテゾリズマブの存在下で24又は48時間インキュベートし，上清中のサイトカインを測定した。

初回臨床試験において想定された本薬のヒト血清中濃度の範囲（0.25～250 μg/mL）において，ヒト PBMC からのサイトカイン放出は認められなかった。可溶性あるいは固相化したアテゾリズマブ存在下でヒト PBMC を24又は48時間インキュベートしたときの上清中の GM-CSF，TNF-α，IL-8，IL-2，IFN-γ，IL-6，IL-1β，IL-4，IL-10及び IL-12の濃度は，培養液のみあるいは陰性対照（抗 FGFR3抗体）と同程度であった。一方，PBMC を抗 CD3抗体あるいは LPS（いずれもヒトにおいてサイトカイン放出を誘導することが知られている）とインキュベートしたとき，前者では IFN-γ，IL-10，IL-1β，IL-2，IL-6及び TNF-α の産生が誘導され，後者では IL-10，IL-1β，IL-6及び TNF-α の産生が誘導された。なお，本試験では培養液のみを含めてすべての上清中に高濃度の IL-8が検出されたが，これは PBMC が培養用プラスチックプレートに接着した際の影響によるものと考えられた[1)]。本試験結果から，アテゾリズマブをヒトに投与したときの過剰なサイトカイン放出リスクは低いものと考えられた。

2.6.6.8.2 溶血性試験

（資料番号 4.2.3.7.7-2）

アテゾリズマブとヒト又はカニクイザル血液とを等量混合してインキュベートすることにより，溶血性の有無を評価した。

その結果，溶媒及び試験可能な本薬の最高濃度である125 mg/mL（最終濃度62.5 mg/mL）において，ヒト及びカニクイザル赤血球に対する溶血作用は認められなかった。

2.6.6.8.3 組織交差反応性試験

（資料番号 4.2.3.7.7-3）

アテゾリズマブのヒト及びカニクイザル正常組織に対する交差反応性を，各種組織の凍結切片を用いて検討した。0.25及び1.25 μg/mL の濃度のビオチン標識アテゾリズマブを用いて，ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン及びジアミノベンチジンを用いた免疫組織化学により可視化し，光学顕微鏡下での観察により評価した。

ヒト組織では，ビオチン標識アテゾリズマブによる特異的染色が胎盤，リンパ節，扁桃及び

胸腺で確認された。胎盤の合胞体性栄養膜細胞では，内腔側の細胞質及び細胞膜に中等度の染色が高頻度に認められた。リンパ節及び扁桃の類洞細胞では，細胞質に軽微～軽度の染色がごく低頻度に観察された。胸腺の皮質及び髄質細胞では，細胞質に軽度～中等度の染色が低頻度～高頻度に観察された。

カニクイザル組織では，ビオチン標識アテゾリズマブによる特異的染色がリンパ節のみで検出された。リンパ節の類洞細胞において，細胞質に軽微～中等度の染色が，低頻度～高頻度に観察された。

2.6.6.9 考察及び結論

アテゾリズマブの悪性腫瘍患者への反復静脈内投与をサポートするため，毒性プロファイルを評価するための一連の試験を実施した。

2.6.6.9.1 反復投与毒性

(1) 曝露量比較（毒性試験における投与量/臨床推奨用量）

マウス探索的2週間静脈内投与試験，カニクイザル8週間静脈内及び皮下投与試験，並びに26週間静脈内投与試験において，アテゾリズマブの50 mg/kg/週までの用量での良好な忍容性が確認された。

マウス及びカニクイザルを用いた反復投与毒性試験における曝露量（C_{max} 及び AUC）と，臨床推奨用量（1200 mg/3週）における曝露量との比較を表 2.6.6.9.1-1に示した。マウス2週間投与試験の50 mg/kg，並びにカニクイザル26週間投与試験の15及び50 mg/kg における3週間当たりの曝露量（AUC_{0-7}又は $AUC_{0-3}/AUC_{182-185}$の3倍値）は，臨床推奨用量における曝露量と比較して同程度以上であることが確認された。また，カニクイザル26週間投与試験の無毒性量（5 mg/kg）における3週間当たりの曝露量は，臨床推奨用量における曝露量のおよそ0.1～0.2倍であった。

表 2.6.6.9.1-1 マウス及びカニクイザルを用いた反復投与毒性試験における曝露量と臨床推奨用量における曝露量比較

動物種 試験の種類	投与量	C_{max}		AUC		
		雌雄平均 (μg/mL)	曝露量比 [a)]	雌雄平均 (day•μg/mL)	AUC × 3	曝露量比 [a)]
マウス 2週間 1回/週，静脈内	10 mg/kg 50 mg/kg	— —	— —	537[b)] 2250[b)]	1611 6750	0.24 1.01
カニクイザル 26週間 1回/週，静脈内	5 mg/kg 15 mg/kg 50 mg/kg	123[c)] / 61.4[d)] 301[c)] / 1290[d)] 1200[c)] / 3680[d)]	0.07 – 0.15 0.36 – 1.55 1.44 – 4.42	243[c)] / 378[d)] 693[c)] / 3350[d)] 2790[c)] / 8400[d)]	729 / 1134 2079 / 10050 8370 / 25200	0.11 – 0.17 0.31 – 1.51 1.25 – 3.78
臨床推奨用量 1回/3週，静脈内	1200 mg	832[e)]		6670[e)]		

—: 未測定又は未算出

a) 曝露量比 = 動物曝露量/ヒト曝露量

b) C57BL/6雌性マウスにおける初回投与時の AUC（AUC_{0-7}）

c) 初回投与時の C_{max} 又は AUC（AUC_{0-3}）

d) 最終投与時の C_{max} 又は AUC（$AUC_{182-185}$）。ATA 産生による曝露低下例（5 mg/kg 群で明らか）を含む

e) 国際共同第 II 相試験（GO28754試験）に登録された日本人に1200 mg/body（3週間に1回）を投与した際の定常状態における C_{max} 及び AUC_{ss} を，母集団薬物動態モデルを用いて推定した[2)]。

(2) マウスで認められた末梢神経病変（ニューロパチー）について

マウス探索的2週間静脈内投与試験では，本薬の10及び50 mg/kg を投与した C57BL/6雌性マウスにおける坐骨神経病変（ニューロパチー：リンパ球浸潤を伴う空胞化病変）が投与期間終了時（17日目）及び休薬期間終了時（43日目）の両方で認められた。本所見は，C57BL/6マウスと同一の MHC ハプロタイプ（H-2^b）を有する PD-1欠損マウス（雌性 NOD-*H2*$^{b/b}$*Pdcd1*$^{-/-}$マウス）に

おける，Yoshida らの報告[3]に一致している。すなわち，本マウスでは末梢神経を含む全身諸器官における自然発生性の炎症性変化が20～25週齢で認められ，同週齢の PD-1非欠損マウスでは炎症性変化は認められなかった。PD-1欠損マウスの病理組織学的検査では，坐骨神経における広範な CD4陽性 T 細胞の浸潤及び中等度の CD8陽性 T 細胞及び B 細胞の浸潤が認められた。以上の結果から，MHC ハプロタイプ（H-2^b）の遺伝子背景において産生される自己反応性 T 細胞は，PD-1の非存在下でのみ標的組織を傷害し，PD-1の欠損は系統特異的に存在する潜在的な自己免疫状態を顕在化させる作用を有するものと考えられた。本薬投与により C57BL/6雌性マウスで認められた変化は，軽微なリンパ球浸潤を伴う末梢神経の空胞化のみであったが，これは抗体投与と遺伝子ノックアウトの違い，PD-1阻害と PD-L1阻害との違い，あるいは PD-L1/PD-1阻害の持続時間の違い（マウス毒性試験の2～6週間に対し，NOD-*H2*$^{b/b}$*Pdcd1*$^{-/-}$マウスでは20～25週間）を反映している可能性が推察された。CD-1マウスにおいて末梢神経病変が認められなかったことについては，本系統のマウスは，PD-L1を阻害しても自己免疫状態へ誘導されにくい可能性が示唆された。以上の結果をまとめると，マウスを用いた毒性試験の結果は文献報告と一致するものであり，自己免疫素因を背景とした潜在的な自己免疫性有害事象の同定に有益な情報を提供するものと考えられた。

(3) カニクイザルで認められた動脈炎/動脈周囲炎について

カニクイザルでは，8週間静脈内及び皮下投与試験（週1回，計9回投与）の投与期間終了時剖検において，静脈内投与50 mg/kg 及び皮下投与15 mg/kg の各1/6例，並びに皮下投与50 mg/kg の2/6例で，本薬投与に関連した軽微～中等度の動脈炎/動脈周囲炎が実質臓器（心臓，腎臓，肝臓，膵臓及び精巣上体）の間質，胃腸管，雌性生殖器等の管腔臓器，舌の粘膜下組織及び筋層において認められた。同様に，26週間静脈内投与試験（週1回，計27回投与）では，15及び50 mg/kg の投与期間終了時剖検例（各1/6例）で，全身諸器官における軽微～軽度の動脈炎/動脈周囲炎が認められた。この変化は15 mg/kg 群の雌1例では心臓，胃及び膣にみられ，50 mg/kg 群の雌1例では心臓，膵臓，腎臓，膀胱，胆嚢，下顎腺，皮膚/皮下織，骨/骨髄，喉頭，腸間膜リンパ節，胃腸管及び雌性生殖器で認められた。カニクイザルにおいて同様の動脈炎/動脈周囲炎（一般状態の異常を伴わず，炎症部位の分布が類似）が自然発生性に認められることが報告されている[4),5)]が，これらの所見は本薬投与動物のみで認められ，用量依存性がみられたこと，発生頻度が試験施設における背景値を超えていたことから，本薬投与に関連したものと考えられた。動脈炎/動脈周囲炎は12週間又は13週間の休薬期間終了時には認められず，これらの変化は休薬により回復したか，休薬群の動物において発生していなかったことが考えられた。本薬投与により動脈炎/動脈周囲炎が発現した機序の詳細は不明であるが，自己免疫素因が関連している可能性が推察される。また，自然発生性病変の発生頻度の増加は，本薬の薬理作用である PD-L1阻害及び末梢性免疫寛容の制御解除に一致するものと考えられた。

以上のとおり，PD-L1/PD-1経路は末梢性免疫寛容と関連することが知られており，アテゾリズマブ投与による本経路の阻害により，自己免疫状態を含む免疫介在性有害事象の発現頻度の増加が懸念される。PD-L1/PD-1相互作用は，下記の2つの機序を介して末梢性免疫寛容を制御し維持していると考えられている[6),7)]。第1に，抗原提示細胞上に発現した PD-1のリガンドは，自己反応性 T 細胞を抑制し維持することに貢献している。第2に，実質細胞上の PD-1のリガンドは末梢における T 細胞のエフェクター機能を阻害することにより組織破壊を阻害している。PD-1欠損マウスに関する報告，及び報告数は少ないものの PD-L1欠損マウスに関する報告では，免疫寛容の欠損により，自然発生的な自己免疫反応が系統特異的に惹起されることが示されている。更に，ヒト PD-1遺伝子である PDCD1の遺伝子多型が同定されており，これらに関連したいくつかの病態（I 型糖尿病，全身性エリテマトーデス，関節リウマチ及び多発性硬化症）が報告されている[6)]。

これまでに実施したアテゾリズマブの *in vivo* 毒性試験で得られた所見は，PD-L1/PD-1経路の

阻害に一致したものと考えられ，免疫反応の亢進及び免疫介在性の炎症性病変の増加が，本薬投与患者における潜在的な安全性リスクとして示唆された。

(4) その他の潜在的毒性について

PD-L1/PD-1経路の阻害に基づき理論的に想定されるリスクとして，急性の感染症に対する免疫反応を変調させることにより，免疫病理学的病態や免疫系防御の調節不全が誘発される可能性が考えられる。これらに関しては，2.6.2.3.1，2.6.3.3及び2.4.4.6にアテゾリズマブのキメラ抗体を用いたLCMV感染モデルの試験成績及び考察を記載した。

2.6.6.9.2 サイトカイン放出

PD-L1/PD-1相互作用は，T 細胞活性化の調節及び T 細胞エフェクター機能に対する抑制性の制御に必須の役割を果たしている。PD-L1/PD-1経路の阻害により，炎症性サイトカインの放出を含む T 細胞の活性化が誘導される可能性が考えられるため，アテゾリズマブについての *in vitro* サイトカイン放出試験を実施した。ヒト PBMC を，可溶性又は固相化したアテゾリズマブ，及びサイトカイン放出を誘導することが知られている抗 CD3抗体又は LPS の存在下でインキュベートした。初回臨床試験において想定されたヒト血清中濃度の範囲（0.25～250 μg/mL）において，本薬はヒト PBMC からのサイトカイン放出を誘発しなかった。更に，マウス及びカニクイザルを用いた毒性試験において，本薬の50 mg/kg までの用量における過剰なサイトカイン放出及び血清中サイトカインプロファイルの変化は認められなかった。カニクイザル8週間投与試験の静脈内投与50 mg/kg 群の1例において，本薬の5回目～6回目投与の期間（29～36日目）に血清中 IL-12/23 p40，TNF-α 及び IFN-γ の一過性の増加がみられ，この変化に一致して T 細胞活性化マーカーである CD25及び CD69を発現したヘルパーT 細胞（$CD4^+CD25^+$及び $CD4^+CD69^+$）の比率及び絶対数の増加が認められた。本例は剖検時の病理組織学的検査で全身諸器官における動脈炎/動脈周囲炎が認められた個体であった。上記の変化はアテゾリズマブの薬理作用である PD-L1/ PD-1経路阻害に関連したものであると推察されるが，一般状態の異常を伴わない自己制御可能な範囲内の変化であり，本薬の投与を継続したにもかかわらず57日目には投与前値まで回復した。また，他の投与動物において上記の変化は認められなかった。

以上の *in vitro* 及び *in vivo* 試験結果から，アテゾリズマブは過剰なサイトカイン放出を誘発せず，臨床での本薬投与において，薬理作用に基づく過剰なサイトカイン放出の可能性は低いものと考えられた。

2.6.6.9.3 組織交差反応性

組織交差反応性試験では，アテゾリズマブ特異的な染色性がヒトの胎盤，リンパ節，扁桃及び胸腺で認められた。ビオチン標識アテゾリズマブによる上記の特異的染色の結果は，PD-L1発現がリンパ組織及び非リンパ組織で認められるという報告に一致している。その他のヒト組織における PD-L1の発現が遺伝子発現解析及びアテゾリズマブとは異なる抗 PD-L1抗体を用いたフローサイトメトリー及び免疫組織化学による研究において報告されている[7)-10)]が，これらの異なる結果は，免疫組織化学に用いた一次抗体や染色条件の違い等を反映したものと考えられた。カニクイザルにおいては，リンパ節のみでビオチン標識アテゾリズマブに特異的な染色性が確認された。

2.6.6.9.4 生殖発生毒性

カニクイザル26週間静脈内投与試験において，50 mg/kg 群の雌で月経周期に対する影響がみられ，投与期間中の月経周期異常（月経周期の停止を伴う不規則な月経パターン）が，8～14週目ではほぼ全例に観察された。この変化に関連して，投与期間終了時剖検例（3例）の卵巣では，新生黄体が認められなかった（月経周期の欠如を反映）。50 mg/kg 群の休薬終了時剖検例（2例）

については，休薬により正常な月経周期に回復し，剖検時の卵巣の病理組織学的所見は対照群と比較して差が認められなかったことから，本薬投与による月経周期に対する作用は回復性を有するものと考えられた。雄については精子検査，超音波による精巣検査，精巣の病理学的検査（精子形成ステージ解析を含む）及び血清テストステロン濃度の評価を行い，本薬投与による変化は認められなかった。

PD-L1/PD-1経路の阻害により，胚致死を含むヒト胎児発生に及ぼす安全性リスクが存在することが示されており，アテゾリズマブは妊娠に悪影響を及ぼす可能性が高いと考えられるため，本薬に関する生殖発生毒性試験は実施していない。

母体の胎児免疫寛容の維持における PD-L1/PD-1経路の重要な役割は，母体及び胎児由来細胞の両方で構成される，胎盤の独特な構造によるものと考えられている。胎盤の主要な機能は，母体/胎児境界における免疫機構の維持であり，母体の血液及び組織と近接しているこの部位では，絨毛性合胞体性栄養膜細胞，栄養膜細胞及び胎児細胞に PD-L1が発現している[11),12)]。PD-L1の発現は，妊娠第1三半期においては低いが，胎盤に母体血流の供給が増加する妊娠第2三半期に移行すると上昇する。この胎盤発生に付随して，母体免疫系は胎児が保有する父系遺伝子由来のアロ抗原に持続的に曝露され，胎児抗原は母体の脾臓やリンパ節で検出される[13)]。ヒトの妊娠期間中に，胎盤組織の PD-L1発現が特異的に増加することは，この経路が母体の T 細胞に父系由来抗原に対する特異的な免疫寛容を誘導するための役割を果たし，妊娠維持のための基軸となっていることを示唆する[14),15)]。このことから，PD-L1/PD-1経路を阻害するアテゾリズマブの投与は，母体における胎児免疫寛容の誘導を阻害し，妊娠成立に有害な作用をもたらすことが予想される。

いくつかの非臨床研究において，PD-L1/PD-1シグナル伝達経路が，母体における胎児免疫寛容の誘導により妊娠期間中の胚及び胎児の生存に必須の機能を果たしていることが示されている[16)-18)]。Guleria らは，異系統間妊娠モデルマウス（CBA/CaJ × C57BL/6）に抗 PD-L1モノクローナル抗体を投与して PD-L1/PD-1経路を阻害したとき，同系統間妊娠モデルマウス（CBA/CaJ × CBA/CaJ）への抗体投与時と比較して胎児吸収率が増加することを示した[16)]。CBA × CBA の同系統間妊娠モデルマウスでは抗 PD-L1抗体の投与による吸収率増加は認められなかった。また，本モデルにおける一腹胎児数は対照（コントロール IgG 投与）と抗 PD-L1抗体投与とで差は認められなかった（いずれも9.0例）。一方，CBA × C57BL の異系統間妊娠モデルマウスにおける自然吸収率は18%であり，抗 PD-L1抗体の投与により吸収率が86%まで増加した。また，一腹胎児数は，対照の5.5例に対し，抗 PD-L1抗体投与では1.2例であった。同様の吸収率増加は，異系統の野生型雄マウスと交配した PD-L1欠損雌マウスにおいても認められた（一腹胎児数は，同系統間交配時の8.0例に対して，異系統間交配時は2.7例）。更に，異系統の雄と交配した野生型妊娠マウス（抗 PD-L1抗体投与）又は PD-L1欠損妊娠マウスから採取した脾臓細胞を用いた混合リンパ球反応において，父系アロ抗原に対する IFN-γ 産生リンパ球の増加が確認され，抗 PD-L1抗体投与マウス及び PD-L1欠損マウスから採取した胎盤組織ホモジネートにおいては，IFN-γ 産生量の増加が認められた。また，B 細胞欠損マウス及び B 細胞/T 細胞欠損マウスを用いた追加実験において，胎児拒絶反応は，B 細胞ではなく T 細胞に依存した機序により発生することが確認された[16)]。

別の異系統間妊娠モデル（Bm12雄マウスと交配した Thy1.1 B6雌マウス）を用いた研究では，妊娠した Thy1.1 B6雌マウスに抗 PD-L1抗体を投与すると，胎児吸収率が対照の1.4 ± 10%に対して34 ± 10%まで増加し，その結果，一腹胎児数が対照の8.5 ± 1例に対して抗 PD-L1抗体投与では5.8 ± 0.4例に低下した[18)]。胎児の Bm12抗原に対する母体由来 T 細胞の反応を追跡するため，この抗原を認識する性質を有する ABM-tg T 細胞を妊娠マウスに養子移植すると，移植後7日において，脾臓における活性化した ABM-tg T エフェクター細胞の比率が，対照と比較して抗 PD-L1抗体投与マウスでは増加した（それぞれ65 ± 1.7%及び72 ± 1.8%）。

これらの研究報告をまとめると，妊娠期間中の PD-L1/PD-1経路の阻害により，母体における胎児抗原特異的 T 細胞反応が増強され，このことにより T 細胞介在性の胎児拒絶反応が惹起されるものと考えられた。

PD-L1/PD-1経路阻害による催奇形作用についての報告はない。PD-L1/PD-1ノックアウト動物の発生は正常であり[19),20)]，PD-L1/PD-1経路阻害による催奇形作用は示唆されなかった。出生児の成長及び発達に関しては，2.6.6.9.1に記載のとおり，免疫寛容機構の喪失による免疫反応の亢進（自己免疫などの発現）が，潜在的リスクとして示唆される。抗 PD-L1抗体を投与して妊娠期間中のみ PD-L1/PD-1経路を阻害した異系統間妊娠モデル由来の出生児について，長期生存性や発達障害の可能性に関するデータはないが，これらの胎児においては免疫介在性有害事象及び自己免疫状態のリスクが高まる可能性は否定できない。

以上，PD-L1/PD-1阻害と免疫介在性の胎児拒絶反応の発生頻度増加との関連性について，これまでに得られた知見からその重要性（weight of evidence）を考察すると，アテゾリズマブ投与において，胚致死を含むヒト胎児に対する安全性リスクが存在することが示唆される。このリスクについては，本薬の添付文書に記載し，注意喚起する予定である。

2.6.6.9.5 結論

アテゾリズマブ投与による主要な非臨床安全性所見は，C57BL/6マウスにおける末梢神経病変並びにカニクイザルにおける血管炎（動脈炎/動脈周囲炎）及び月経周期異常であった。末梢神経病変及び血管炎は PD-L1/PD-1経路の阻害に関連した免疫反応の亢進により生じたものと考えられ，本薬投与患者における潜在的な安全性リスクとして，免疫反応の亢進及び炎症性病態の増加が示唆された。これらの所見は臨床での安全性プロファイルにおいても一貫している。臨床では過度の免疫反応に起因すると考えられる様々な病態や疾患があらわれる可能性があり，また，自己免疫疾患のある患者又は自己免疫疾患の既往症のある患者では，それらの疾患が増悪するおそれがあることから，添付文書で注意喚起する予定である。

2.6.6.10 参考文献

1) Kasahara K, Strieter RM, Chensue SW, Standiford TJ, Kunkel SL. Mononuclear cell adherence induces neutrophil chemotactic factor/interleukin-8 gene expression. J Leukoc Biol 1991;50:287-95.
2) [redacted]. GO28754 薬物動態解析報告書（C_{max}, AUC_{ss} 予測）. 中外製薬株式会社 社内報告書, [redacted].
3) Yoshida T, Jiang F, Honjo T, Okazaki T. PD-1 deficiency reveals various tissue-specific autoimmunity by H-2^b and dose-dependent requirement of H-2^{g7} for diabetes in NOD mice. Proc Natl Acad Sci U S A 2008;105:3533-8.
4) Beach JE, Blair AMJN, Pirani CL, Cox GE, Dixon FJ. An unusual form of proliferative arteriopathy in macaque monkeys (Macacca sps). Exp Mol Path 1974;21:322-38.
5) Chamanza R, Parry NMA, Rogerson P, Nicol JR, Bradley AE. Spontaneous lesions of the cardiovascular system in purpose-bred laboratory nonhuman primates. Toxicol Pathol 2006;34:357-63.
6) Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. Int Immunol 2007;19:813-24.
7) Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. Annu Rev Immunol 2008;26:677-704.
8) Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. Nat Med 1999;5:1365-9.
9) Brown JA, Dorfman DM, Ma F-R, Sullivan EL, Munoz O, Wood CR, et al. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. J Immunol 2003;170:1257-66.
10) Selenko-Gebauer N, Majdic O, Szekeres A, Höfler G, Guthann E, Korthäuer U, et al. B7-H1

(programmed death-1 ligand) on dendritic cells is involved in the induction and maintenance of T cell anergy. J Immunol 2003:170;3637-44.

11) Petroff MG, Chen L, Phillips TA, Azzola D, Sedlmayr P, Hunt JS. B7 family molecules are favorably positioned at the human maternal-fetal interface. Biol Reprod 2003;68:1496-504.

12) Holets LM, Hunt JS, Petroff MG. Trophoblast CD274 (B7-H1) is differentially expressed across gestation: influence of oxygen concentration. Biol Reprod 2006;74:352-8.

13) Erlebacher A, Vencato D, Price KA, Zhang D, Glimcher LH. Constraints in antigen presentation severely restrict T cell recognition of the allogeneic fetus. J Clin Invest 2007;117:1399-411.

14) Petroff MG, Perchellet A. B7 family molecules as regulators of the maternal immune system in pregnancy. Am J Reprod Immunol 2010;63:506-19.

15) Riley JK. Trophoblast immune receptors in maternal-fetal tolerance. Immunol Invest 2008;37:395-426.

16) Guleria I, Khosroshahi A, Ansari MJ, Habicht A, Azuma M, Yagita H, et al. A critical role for the programmed death ligand 1 in fetomaternal tolerance. J Exp Med 2005;202:231-7.

17) Wafula PO, Teles A, Schumacher A, Pohl K, Yagita H, Volk H-D, et al. PD-1 but not CTLA-4 blockage abrogates the protective effect of regulatory T cells in a pregnancy murine model. Am J Reprod Immunol 2009;62:283-92.

18) D'Addio F, Riella LV, Mfarrej BG, Chabtini L, Adams LT, Yeung M, et al. The link between the PDL1 costimulatory pathway and Th17 in fetomaternal tolerance. J Immunol 2011;187:4530-41.

19) Latchman YE, Liang SC, Wu Y, Chernova T, Sobel RA, Klemm M, et al. PD-L1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates T cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101:10691-6.

20) Nishimura H, Minato N, Nakano T, Honjo T. Immunological studies on PD-1-deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses. Int Immunol 1998;10:1563-72.

テセントリク点滴静注1200 mg
（アテゾリズマブ（遺伝子組換え））
［非小細胞肺癌］

第2部　（モジュール2）：CTD の概要（サマリー）

2.6.7 毒性試験概要表

中外製薬株式会社

略語一覧

略語	英名	和名
ATA	anti-therapeutic antibodies	抗薬物抗体
AUC	area under the concentration-time curve	濃度－時間曲線下面積
$AUC_{t1\text{-}t2}$	AUC from time day t1 to day t2	t1日から t2日までの AUC
C_{max}	maximum serum concentration	最高血清中濃度
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
F	female	雌
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
[redacted]	[redacted]	[redacted]
IFN-γ	interferon-γ	インターフェロンγ
IL	interleukin	インターロイキン
IV	intravenous	静脈内
[redacted]	[redacted]	[redacted]
M	male	雄
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1	単球走化性蛋白質1
MIP-1α	macrophage inflammatory protein-1α	マクロファージ炎症性蛋白質1α
NA	not applicable	該当なし
NC	not calculated	算出せず
NKC	natural killer cell	ナチュラルキラー細胞
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
NT	not tested	測定なし
PBMC	peripheral blood mononuclear cell	末梢血単核細胞
SC	subcutaneous	皮下
T_{max}	time to reach maximum concentration	最高濃度到達時間
TNF-α	tumor necrosis factor-α	腫瘍壊死因子α

目次

頁

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試験の一覧表 5
2.6.7.3 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（バッチ毎）一覧 7
2.6.7.5 急性毒性試験 8
2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 9
2.6.7.6.1 マウス探索的 2 週間静脈内投与試験（4 週間回復性試験） 9
2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験 10
2.6.7.7.1 カニクイザル 8 週間静脈内及び皮下投与試験（12 週間回復性試験） 10
2.6.7.7.2 カニクイザル 26 週間静脈内投与試験（13 週間回復性試験） 14
2.6.7.8 *In Vitro* 遺伝毒性試験 16
2.6.7.9 *In Vivo* 遺伝毒性試験 16
2.6.7.10 がん原性試験 16
2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 16
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 16
2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 16
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 16
2.6.7.15 新生児を用いた試験 16
2.6.7.16 局所刺激性試験 17
2.6.7.17 その他の毒性試験 18
2.6.7.17.1 *In vitro* サイトカイン放出試験 18
2.6.7.17.2 溶血性試験 19
2.6.7.17.3 組織交差反応性試験 20

2.6.7 毒性試験概要表

2.6.7.1 毒性試験一覧表

表 2.6.7.1-1 毒性試験一覧表

Test Article: MPDL3280A (Atezolizumab)

	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg[a])	GLP Status	Testing Facility	Study No. (CTD No.)
Repeat-Dose Toxicity	C57BL/6 and CD-1 Mice	IV	2 weeks	0, 10, or 50 (C57BL/6), 0, or 50 (CD-1), weekly	No	Genentech, Inc.	[redacted]-0806 (4.2.3.2-1)
Repeat-Dose Toxicity	Cynomolgus monkey	IV or SC	8 weeks	0 (IV/SC), 5, 15, or 50 (IV), 15 or 50 (SC), weekly	Yes	[redacted]	[redacted]-1148 (4.2.3.2-2)
Repeat-Dose Toxicity	Cynomolgus monkey	IV	26 weeks	0, 5, 15, or 50, weekly	Yes	[redacted]	[redacted]-3278 (4.2.3.2-3)
Other Toxicity Studies: cytokine release	Human PBMC	*In vitro*	NA	0.25, 2.5, 25, or 250 µg/mL	No	Genentech, Inc.	[redacted]-1827 (4.2.3.7.7-1)
Other Toxicity Studies: hemolytic potential	Cynomolgus monkey and human whole blood	*In vitro*	NA	0, 125 mg/mL	Yes	[redacted]	[redacted]-1172 (4.2.3.7.7-2)
Other Toxicity Studies: tissue cross-reactivity	Cynomolgus monkey and human tissues	*In vitro*	NA	0.25 or 1.25 µg/mL	Yes	[redacted]	[redacted]-1174 (4.2.3.7.7-3)

GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous; SC = subcutaneous; NA = not applicable ; PBMC = peripheral blood mononuclear cell

[a] Doses in mg/kg unless otherwise specified.

Notes: [redacted]

2.6.7.2　トキシコキネティクス試験の一覧表

表 2.6.7.2-1　トキシコキネティクス試験の一覧表

Test Article: MPDL3280A (Atezolizumab)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (mg/kg)	GLP Status	Study No.
Repeat-Dose Toxicity (2-week with 4-week recovery)	C57BL/6 and CD-1 Mice	IV	0, 10, or 50 (C57BL/6), 0, or 50 (CD-1), weekly	No	[redacted]-0806
Repeat-Dose Toxicity (8-week with 12-week recovery)	Cynomolgus monkey	IV or SC	0 (IV/SC) 5, 15, or 50 (IV), 15, or 50 (SC), weekly	Yes	[redacted]-1148
Repeat-Dose Toxicity (26-week with 13-week recovery)	Cynomolgus monkey	IV	0, 5, 15, or 50, weekly	Yes	[redacted]-3278

IV = intravenous; SC = subcutaneous

2.6.7.3　トキシコキネティクス試験成績の一覧

表 2.6.7.3-1　トキシコキネティクス試験成績の一覧

Test Article: MPDL3280A (Atezolizumab)

Doses (mg/kg/week)	Method of Administration	AUC_{0-7} (day•μg/mL)	AUC_{0-7} (day•μg/mL)	AUC_{0-7} (day•μg/mL)	AUC_{0-56} (day•μg/mL)	AUC_{0-3} (day•μg/mL)	$AUC_{182-185}$ (day•μg/mL)
		Mouse/C57BL/6	Mouse/CD-1	Cynomolgus Monkey		Cynomolgus Monkey	
5	IV			486[b]	4870[b]	243[c]	378[c]
10	IV	537[a]					
15	IV			1860[b]	28700[b]	693[c]	3350[c]
50	IV	2250[a]	3020[a]	6990[b]	104000[b]	2790[c]	8400[c]
15	SC			1010[b]	11700[b]		
50	SC			3620[b]	61400[b]		
1200 mg every three weeks	IV	6670[d]					

IV = intravenous; SC = subcutaneous

[a] 2-week intravenous toxicity study in female mice, [b] 8-week intravenous/subcutaneous toxicity study in cynomolgus monkeys (males and females combined), [c] 26-week intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (males and females combined), [d] Steady-state exposure in Japanese patients enrolled in Global Phase II study (GO28754) was estimated based on the population pharmacokinetics model.

2.6.7.4　毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧

表 2.6.7.4-1　毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧

Test Article: MPDL3280A (Atezolizumab)

Batch or Lot No.	Purity (area%)	Specified Impurities (area%)	Study No.	Type of Study
Proposed Specification:				
[redacted]	[redacted]	NT	[redacted]-0806	Repeat-Dose Toxicity (2-week with 4-week recovery)
[redacted]	[redacted]	NT	[redacted]-1148	Repeat-Dose Toxicity (8-week with 12-week recovery)
[redacted]	[redacted]	NT	[redacted]-1172	Other Toxicity Studies (hemolytic potential)
[redacted]	NA	NT	[redacted]-1174	Other Toxicity Studies (tissue cross-reactivity)
[redacted]	NA	NT	[redacted]-1827	Other Toxicity Studies (cytokine release)
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]-3278	Repeat-Dose Toxicity (26-week with 13-week recovery)

NT = not tested; [redacted]

2.6.7.5　急性毒性試験

該当試験なし。

2.6.7.6　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

2.6.7.6.1　マウス探索的2週間静脈内投与試験（4週間回復性試験）

表 2.6.7.6-1　マウス探索的2週間静脈内投与試験（4週間回復性試験）

Test Article: MPDL3280A (Atezolizumab)

Species/Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	No./Sex/ Group	NOAEL (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study No. (CTD No.)
C57BL/6 and CD-1 Mice	IV	2 weeks	0, 10, or 50 (C57BL/6), 0, or 50 (CD-1), weekly	32F	Not determined	Spleen weight and spleen to brain weight ratios from both C57BL/6 and CD-1 animals dosed 50 mg/kg of MPDL3280A were greater (approximately 20%) compared to controls animals. There was no histology correlated to this changes, thus the significance of this weight change is uncertain. Minimal neuropathy was noted in only C57BL/6 mice on Days 17 and 43 in both dose groups (10 and 50 mg/kg). MPDL3280A serum concentrations dropped rapidly after Day 15 at both dose levels due to a formation of ATA.	[redacted]-0806 (4.2.3.2-1)

F = Female; NOAEL = no observed adverse effect level.

2.6.7.7　反復投与毒性試験：重要な試験

2.6.7.7.1　カニクイザル8週間静脈内及び皮下投与試験（12週間回復性試験）

表 2.6.7.7.1-1　カニクイザル8週間静脈内投与及び皮下投与試験（12週間回復性試験）

Test Article: MPDL3280A (Atezolizumab)

Species/Strain: Monkeys/Cynomolgus Initial Age: 2.8 to 7.3 years Date of First Dose: [redacted] Special Features: Cardiovascular evaluations via telemetry No Observed Adverse Effect Level: 5 mg/kg/week	Duration of Dosing: Once weekly over 8 consecutive weeks (9 total doses) Duration of Postdose: 12 Weeks Method of Administration: intravenous bolus and/or subcutaneous injection Vehicle/Formulation: MPDL3280A vehicle; [redacted] mM [redacted], [redacted] mM [redacted], [redacted]% [redacted], pH [redacted]	Study No.: [redacted]-1148 CTD No.: 4.2.3.2-2 Study Title: An Eight-Week Toxicity, Toxicokinetic and Safety Pharmacology Study of MPDL3280A Administered by Intravenous Injection or Subcutaneous Injection to Cynomolgus Monkeys, with a 12-Week Recovery Period GLP Compliance: Yes

Weekly Dose (mg/kg):	0 (Control)		5		15		50		15		50		0 (Control)		50	
Dose Route:	IV/SC[a]		IV		IV		IV		SC		SC		IV		IV	
Number of Animals:	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5	M:3	F:3	M:3	F:3
Toxicokinetics (Mean):																
AUC_{0-7} (day•µg/mL)	—		486		1860		6990		1010		3620		—		NC	
AUC_{0-56} (day•µg/mL)	—		4870		28700		104000		11700		61400		—		NC	
AUC_{0-140} (day•µg/mL)[b]	—		5630		43800		170000		13400		115000		—		NA	
C_{max} (µg/mL)	—		187		959		3310		363		1640		—		NC	
T_{max} (day)	—		NA		NA		NA		23.4		47.6		—		NC	
No. of ATA positive animals	7/10		10/10		10/10		8/10		10/10		8/10		0/6		4/6	
Noteworthy Findings																
Died or Sacrificed Moribund	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Body Weight (%)[c], Week 8	3.9 kg	2.5 kg	- 1	+9	+2	+9	+13	+10	+20	+19	+12	+28	4.8 kg	3.8 kg	+4	-6

表 2.6.7.7.1-1　カニクイザル8週間静脈内投与及び皮下投与試験（12週間回復性試験）（続）

Test Article: MPDL3280A (Atezolizumab)

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		5		15		50		15		50		0 (Control)		50	
Dose Route:	IV/SC[a]		IV		IV		IV		SC		SC		IV		IV	
Number of Animals:	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5	M:3	F:3	M:3	F:3
Noteworthy Findings (cont'd)																
Clinical Observations, Day -7 thru 60	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Food Consumption	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Post Dose Observations	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	NA	NA	NA	NA
Physical Examinations	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	NA	NA	NA	NA
Respiration Rate, Heart Rate, Body Temperature, and Blood Pressure	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	NA	NA	NA	NA
Pulse Oximetry	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	NA	NA	NA	NA
Neurological Exams	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	NA	NA	NA	NA
Electrocardiograms	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	NA	NA	NA	NA
Ophthalmic Exams (slit lamp and indirect)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	NA	NA	NA	NA
Electrocardiograms, Arterial Pressure, Heart Rate, and Body Temperature (via Telemetry)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	—	—	—	—
Serum Chemistry	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	NA	NA	NA	NA
Hematology	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	NA	NA	NA	NA
Coagulation	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	NA	NA	NA	NA
Urinalysis	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	NA	NA	NA	NA

表 2.6.7.7.1-1　カニクイザル8週間静脈内投与及び皮下投与試験（12週間回復性試験）（続）

Test Article: MPDL3280A (Atezolizumab)

Weekly Dose (mg/kg):	0 (Control)		5		15		50		15		50		0 (Control)		50	
Dose Route:	IV/SC[a]		IV		IV		IV		SC		SC		IV		IV	
Number of Animals:	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5	M:3	F:3	M:3	F:3
Noteworthy Findings (cont'd)																
Natural Killer Cell (NKC)[c,d]																
Cytolytic Activity (% Lysis), Day 3	23.0	25.7	-20	-21	-18	-17	+22	+14	-21	-38	-11	+17	NA	NA	NA	NA
Cytolytic Activity (% Lysis), Day 8	24.5	26.8	-31	-27	+15	-40	-1	+28	+20	-46	+5	-5	NA	NA	NA	NA
Immunophenotyping (Flow Cytometry)	—	—	—	—	—	—	—	—[e]	—	—	—	—	NA	NA	NA	NA
Cytokine Analysis	—	—	—	—	—	—	—	—[e]	—	—	—	—	NA	NA	NA	NA
Auto-antibody Analysis and Double Stranded DNA Analysis	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	NA	NA	NA	NA
Number Evaluated:	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	0	0	0	0
Gross Pathology	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	NA	NA	NA	NA
Organ Weights	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	NA	NA	NA	NA
Histopathology[f]																
Various Tissues:[g]																
Arteritis/Periarteritis; Mixed Cell; Focal to Multifocal; Submucosa, Interstitium, Muscularis and/or Adventitia; Minimal to Moderate	—	—	—	—	—	—	—	1/3	1/3	—	2/3	—	NA	NA	NA	NA

表 2.6.7.7.1-1　カニクイザル8週間静脈内投与及び皮下投与試験（12週間回復性試験）（続）

Test Article: MPDL3280A (Atezolizumab)

Weekly Dose (mg/kg):	0 (Control)		5		15		50		15		50		0 (Control)		50	
Dose Route:	IV/SC[a]		IV		IV		IV		SC		SC		IV		IV	
Number of Animals:	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5	M:3	F:3	M:3	F:3
Noteworthy Findings (cont'd)																
Histopathology[f] (cont'd)																
Injection Site:[h]																
Infiltrate, Mononuclear Cell; Subcutaneous:																
Focal; Minimal	—	—	—	—	—	1/3[i]	—	—	—	1/3	—	—	NA	NA	NA	NA
Perivascular; Multifocal; Minimal	—	—	—	—	—	2/3[i]	—	—	2/3	—	3/3	3/3	NA	NA	NA	NA
Postdose Evaluation Number Evaluated:	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

— = No noteworthy findings; NA = not applicable; NC = not calculated; NKC = natural killer cell.

[a] Animals in Control group received IV and SC doses of the vehicle.

[b] Recovery animals only: n=4.

[c] For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from relative controls are shown.

[d] NKC data for three dilutions (100:1, 50:1, 25:1) averaged for each group/sex shown.

[e] A single female monkey in the 50 mg/kg IV dose group had a transient elevation in the percentage and absolute number of T helper cells expressing the activation markers CD25 and CD69 (i.e. $CD4^+CD25^+$ and $CD4^+CD69^+$) between the 5th and 6th doses (Day 29 to 36). During the same time period, this animal also had a transient elevation in IL-12/23 p40 (5-fold), TNFα (below limit of quantitation to 106.6 pg/mL), and IFN-γ (22-fold). None of the other cytokines evaluated (IL-2, MCP-1 and MIP-1α) were affected during this period. None of the changes for this animal were associated with any clinical observations and all returned to baseline values by the terminal necropsy (Day 57), even in the presence of continued dosing. Therefore, the toxicological significance of these findings is uncertain.

[f] Number of findings/number of animals evaluated.

[g] Aorta, cecum, cervix, epididymis, heart, kidney, liver, pancreas, rectum, stomach, tongue, uterus, vagina.

[h] Possible relationship of this finding to the test article.

[i] This finding not seen in 50 mg/kg group and is potentially the result of unintentional administration of small amounts of the test article subcutaneously during intravenous dosing.

2.6.7.7.2　カニクイザル26週間静脈内投与試験（13週間回復性試験）

表 2.6.7.7.2-1　カニクイザル26週間静脈内投与試験（13週間回復性試験）

Test Article: MPDL3280A (Atezolizumab)

Species/Strain: Monkeys/Cynomolgus Initial Age: 4 to 5 years Date of First Dose: [redacted] Special Features: Assessment of reproductive function (semen assessments, testicular evaluations, and serum testosterone level in males, menstrual cycles in females) No Observed Adverse Effect Level: 5 mg/kg/week	Duration of Dosing: Once weekly over 26 consecutive weeks (27 total doses) Duration of Postdose: 13 weeks Method of Administration: Intravenous injection Vehicle/Formulation: MPDL3280A vehicle; 20 mM histidine acetate, 120 mM sucrose, 0.04% polysorbate 20, pH 5.8				Study No.: [redacted]-3278 CTD No.: 4.2.3.2-3 Study Title: A 26-week Toxicity and Toxicokinetic Study with MPDL3280A, Administered by Intravenous Injection to Cynomolgus Monkey with a 13-week Recovery Phase GLP Status: Yes			
Weekly Dose (mg/kg):	0 (Control)		5		15		50	
Number of Animals:	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5
Toxicokinetics:								
First dose, C_{max} (μg/mL)	—	—	139	107	351	251	1290	1110
First dose, $AUC_{0\text{-}3}$ (day•μg/mL)	—	—	263	224	758	629	2880	2690
Last dose, C_{max} (μg/mL)	—	—	7.28	116	1220	1350	4060	3300
Last dose, $AUC_{182\text{-}185}$ (day•μg/mL)	—	—	NA	378	4250	2810	10100	6740
No. of ATA positive Animals	0/5	0/5	5/5	5/5	4/5	4/5	1/5	2/5
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund	—	—	—	—	—	—	—	—
Body Weight (%) [a], Week 26 (Day 185)	6.6 kg	3.4 kg	–10.6	0.0	–10.6	–2.9	– 15.2	+2.9
Clinical Observations	—	—	1/5[b]	—	1/5[b]	—	—	—
Physical and Neurologic Examination	—	—	—	—	—	—	—	—
Respiratory Rate	—	—	—	—	—	—	—	—
Ophthalmoscopy	—	—	—	—	—	—	—	—
Electrocardiography	—	—	—	—	—	—	—	—
Blood Pressure	—	—	—	—	—	—	—	—

表 2.6.7.7.2-1　カニクイザル26週間静脈内投与試験（13週間回復性試験）（続）

Test Article: MPDL3280A (Atezolizumab)

Weekly Dose (mg/kg):	0 (Control)		5		15		50	
Number of Animals:	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5
Noteworthy Findings (cont'd)								
Immunophenotyping	—	—	—	—	—	—	—	—
Hormone Analysis (males only)	—	NA	—	NA	—	NA	—	NA
Male Reproductive Assessment	—	NA	—	NA	—	NA	—	NA
Menstrual Cycles	NA	—	NA	—	NA	—	NA	5/5[c]
Hematology	—	—	—	—	—	—	—	1/5[d]
Serum Chemistry	—	—	—	—	—	—	—	1/5[d]
Urinalysis	—	—	—	—	—	—	—	—
Cytokine	—	—	—	—	—	—	—	—
Number Evaluated:	3	3	3	3	3	3	3	3
Organ Weights	—	—	—	—	—	—	—	—
Gross Pathology	—	—	—	—	—	—	—	—
Histopathology								
Various Tissues[e]	—	—	—	—	—	1/3	—	1/3
Arteritis/Periarteritis; Multifocal; Chronic-Active; Minimal to Slight								
Postdose Evaluation Number Evaluated:	2	2	2	2	2	2	2	2
	—	—	—	—	—	—	—	—

— = No noteworthy findings; NA = not applicable.

[a] For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

[b] One male each with signs of immune-mediated hypersensitivity reaction on one day.

[c] All females in this group showed an irregular cycle pattern during the dosing phase with disturbed cycles especially between Weeks 8 to 14 of the dosing phase. Histopathology at terminal necropsy (3 females) showed a lack of fresh corpora lutea in the ovaries, with only old corpora lutea present.

[d] One female only with minimal increases in neutrophils with concurrent increases in white blood cells and moderate increases in C-reactive protein concentrations

[e] Heart, pancreas, kidney, urinary bladder, gall bladder, mandibular salivary gland, skin/subcutis, bone/marrow, larynx, mesenteric lymph node, gastrointestinal tract, female reproductive organ.

2.6.7.8 *In Vitro* 遺伝毒性試験

該当試験なし。

2.6.7.9 *In Vivo* 遺伝毒性試験

該当試験なし。

2.6.7.10 がん原性試験

該当試験なし。

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

該当試験なし。

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

該当試験なし。

2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

該当試験なし。

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

該当試験なし。

2.6.7.15 新生児を用いた試験

該当試験なし。

2.6.7.16　局所刺激性試験

該当試験なし。

2.6.7.17　その他の毒性試験

2.6.7.17.1　*In vitro* サイトカイン放出試験

表 2.6.7.17.1-1　*In vitro* サイトカイン放出試験

Test Article: MPDL3280A (Atezolizumab)

Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	No./Sex/Group	Noteworthy Findings	Study No. (CTD No.)
Human PBMC	*In vitro*	NA	0.25, 2.5, 25, or 250 µg/mL	NA	No apparent MPDL3280A-dependent cytokine release was detected following 24- and 48-hour incubations with human PBMC.	[redacted]-1827 (4.2.3.7.7-1)

NA = not applicable; PBMC = peripheral blood mononuclear cell.

2.6.7.17.2　溶血性試験

表 2.6.7.17.2-1　溶血性試験

Test Article: MPDL3280A (Atezolizumab)

Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses	No./Sex/Group	Noteworthy Findings	Study No. (CTD No.)
Cynomolgus Monkey and Human[a]	*In vitro*	NA	0, 125[b] mg/mL	NA	MPDL3280A in MPDL3280A Vehicle or MPDL3280A Vehicle alone did not cause hemolysis when introduced to cynomolgus or human whole blood.	[redacted]-1172 (4.2.3.7.7.2)

NA = not applicable

[a] Whole blood collected from fasted, naïve cynomolgus monkeys (Chinese origin) and a fasted human volunteer.　Sodium heparin used as an anticoagulant.

[b] MPDL3280A (Lot No. [redacted]) was prepared in MPDL3280A Vehicle ([redacted] mM [redacted], [redacted] mM [redacted], [redacted]% [redacted], pH [redacted]) at a concentration of 125 mg/mL.　The final concentration in whole blood was 62.5 mg/mL.

2.6.7.17.3　組織交差反応性試験

表 2.6.7.17.3-1　組織交差反応性試験

Test Article: MPDL3280A (Atezolizumab)

Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses	No./Sex/Group	Noteworthy Findings	Study No. (CTD No.)
Human and Cynomolgus Monkey Tissues	*In vitro*	NA	0.25 or 1.25 µg/mL	NA	In human tissues, biotin-MPDL3280A-specific staining was detected in the placenta, lymph node, tonsil, and thymus. Frequent, moderate, apical cytoplasmic and membranous staining was observed in syncytiotrophoblasts of the placenta. Very rare, minimal to mild, cytoplasmic staining was observed in sinusoidal cells of lymph nodes and tonsil. Rare to frequent, mild to moderate, cytoplasmic staining was observed in thymic cortical and medullary cells. In cynomolgus monkey tissues, biotin-MPDL3280A-specific staining was detected only in the lymph node. Rare to frequent, minimal to moderate, cytoplasmic staining was observed in sinusoidal cells of lymph nodes.	[redacted]-1174 (4.2.3.7.7.3)

NA = not applicable