ヘムライブラ皮下注30 mg
ヘムライブラ皮下注60 mg
ヘムライブラ皮下注90 mg
ヘムライブラ皮下注105 mg
ヘムライブラ皮下注150 mg
（エミシズマブ（遺伝子組換え））

[インヒビターを保有する先天性血友病A]

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
ADA	anti-drug antibody	抗薬物抗体
APTT	activated partial thromboplastin time	活性化部分トロンボプラスチン時間
AUC	area under the plasma concentration-time curve	血漿中濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}7d}$	area under the plasma concentration-time curve from 0 to 7 days	投与後7日までの AUC
C_0	the initial concentration at time 0 calculated by extrapolation	初期血漿中濃度
C_{max}	maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
CRP	C-reactive protein	C 反応性蛋白
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
FDP	fibrin and fibrinogen degradation product	フィブリン・フィブリノーゲン分解産物
FIXa	activated factor IX	活性型血液凝固第 IX 因子
FVIII	factor VIII	血液凝固第 VIII 因子
FX	factor X	血液凝固第 X 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
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IL	interleukin	インターロイキン
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
PT	prothrombin time	プロトロンビン時間
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 単回投与毒性試験 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 カニクイザル4週間皮下投与試験（用量設定試験） 7
2.6.6.3.2 カニクイザル13週間皮下投与試験 8
2.6.6.3.3 成熟カニクイザル26週間皮下投与試験 8
2.6.6.3.4 カニクイザル4週間静脈内投与試験 10
2.6.6.4 遺伝毒性試験 11
2.6.6.5 がん原性試験（トキシコキネティクス評価を含む） 11
2.6.6.6 生殖発生毒性試験（用量設定試験及びトキシコキネティクス評価を含む） 12
2.6.6.7 局所刺激性試験 12
2.6.6.8 その他の毒性試験 13
2.6.6.8.1 組織交差反応性試験 13
2.6.6.8.2 サイトカイン放出に関する *in vitro* 試験 13
2.6.6.8.3 幼若動物試験 14
2.6.6.9 添加物L-アスパラギン酸の安全性評価 14
2.6.6.9.1 単回投与毒性試験 15
2.6.6.9.2 反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む）及び局所刺激性試験 15
2.6.6.9.3 遺伝毒性試験 16
2.6.6.9.4 がん原性試験（トキシコキネティクス評価を含む） 16
2.6.6.9.5 生殖発生毒性試験（用量設定試験及びトキシコキネティクス評価を含む） 16
2.6.6.9.6 幼若動物試験 17
2.6.6.10 考察及び結論 17
2.6.6.11 図表 19
2.6.6.12 参考文献 19

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6.1 まとめ

エミシズマブ（以下，本薬）は，活性型血液凝固第 IX 因子（FIXa）及び血液凝固第 X 因子（FX）に対する遺伝子組換えヒト化二重特異性モノクローナル改変免疫グロブリン G4（IgG4）抗体である。

本薬の主要な毒性試験は，医薬品 GLP 省令「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」（厚生省令第21号 平成9年3月26日）を遵守し，また，医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイドラインに準拠し，実施された。

本薬は，マウス及びラットに交差反応性を示さず，カニクイザルに交差反応性を示すことから（2.6.2.2.3），局所刺激性試験及び安全性薬理試験の評価項目も含めた反復投与毒性試験については，カニクイザルを評価動物種として選択した。反復投与毒性試験の投与経路及び投与頻度は，臨床適用時の投与経路及び投与頻度を考慮し，皮下投与（週1回）とした。なお，静脈内投与による臨床試験を想定した静脈内投与（週1回）による反復投与毒性試験も実施した。本薬の毒性試験一覧を以下の表 2.6.6.1-1に示した。

表 2.6.6.1-1 本薬の毒性試験一覧

試験項目 資料番号（試験番号）	動物種又は試験系	投与方法	投与期間	投与量 又は適用濃度	GLP 適合性
反復投与毒性試験（用量設定試験） 4.2.3.2-1（TOX[redacted]-5089）	カニクイザル	皮下，週1回，計5回	4週間	0 [a], 1, 6, 30 mg/kg/週	非
反復投与毒性試験 4.2.3.2-2（TOX[redacted]-0057）	カニクイザル	皮下，週1回，計14回	13週間 （13週間回復）	0 [a], 1, 6, 30 mg/kg/週	適
反復投与毒性試験 4.2.3.2-3（TOX[redacted]-0007）	カニクイザル （成熟動物）	皮下，週1回，計27回	26週間 （13週間回復）	0 [a], 1, 6, 30 mg/kg/週	適
反復投与毒性試験 4.2.3.2-4（TOX[redacted]-0021）	カニクイザル	静脈内，週1回，計5回	4週間 （4週間回復）	0 [a], 10, 30, 100 mg/kg/週	適
その他の毒性試験（組織交差反応性試験［予備試験］） 4.2.3.7.7-1（[redacted]）	カニクイザル及びヒト組織	*In vitro*	該当せず	10, 20, 50, 100, 200 µg/mL	非
その他の毒性試験（組織交差反応性試験） 4.2.3.7.7-2（TOX[redacted]-0072）	ヒト組織	*In vitro*	該当せず	10, 50 µg/mL	適
その他の毒性試験（サイトカイン放出に関する *in vitro* 試験） 4.2.3.7.7-3（TOX[redacted]-0083）	ヒト全血	*In vitro*	該当せず	0.1, 1, 10, 100 µg/mL	非

GLP＝ 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準

[a] 溶媒である150 mmol/L アルギニン-アスパラギン酸及び0.5 mg/mL ポロクサマー188を含む20 mmol/L ヒスチジン-アスパラギン酸緩衝液（pH 6.0）を投与した

注：下線部で示された投与量は反復投与毒性試験の無毒性量である。

単回投与毒性試験

単回投与毒性試験は実施していないが，反復投与試験における初回投与後7日までの結果から単回投与毒性を評価した。

カニクイザルを用いた4週間皮下投与試験及び13週間皮下投与試験において，皮下投与による30 mg/kg/週までの用量で本薬投与に関連した毒性は認められなかった。また，4週間静脈内投与試験において，静脈内投与による100 mg/kg/週までの用量で本薬投与に関連した毒性は認められなかった。

反復投与毒性試験

カニクイザルを用いた13週間皮下投与試験及び26週間皮下投与試験を実施した。13週間皮下投与試験では，活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）の短縮（1，6及び30 mg/kg/週群）及び投与部位皮下織の脈管周囲における単核細胞浸潤（6及び30 mg/kg/週群）が認められた。26週間皮下投与試験では，投与部位に，皮下織の出血及び脈管周囲における単核細胞浸潤（1，6及び30 mg/kg/週群）が認められた。これらの変化には回復性が認められた。APTT の短縮は本薬の薬理作用によるものと考えられ，また，投与部位の変化は，13週間皮下投与試験の投与期間終了時に対照群を含む全群で投与部位反応（剖検での皮下の暗赤色部と，これに伴った組織学的な変化である皮下織の出血）が認められていること，タンパク質製剤の皮下投与による投与部位反応が一般に報告されていることから，本薬特異的な毒性ではないと判断した。いずれの試験においても，皮下投与による無毒性量（NOAEL）は30 mg/kg/週と判断された。

カニクイザルを用いた4週間静脈内投与試験を実施した。4週間静脈内投与試験では，APTT の短縮（10，30及び100 mg/kg/週群）が認められた。この変化には回復性が認められた。 APTT の短縮は本薬の薬理作用と考えられたため，本薬の毒性ではないと判断した。この試験において，静脈内投与による NOAEL は100 mg/kg/週と判断された。

遺伝毒性試験

本薬はバイオテクノロジー応用医薬品であることから，ICH S6(R1)ガイドライン「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」で示されている考え方に従い，遺伝毒性試験は実施していない。一般に IgG クラスの分子量の大きいヒト化抗体である本薬が，DNA や他の染色体成分に直接相互作用するとは考えにくいことから，本薬の遺伝毒性に関する懸念は低いと考えられた。

がん原性試験

本薬はバイオテクノロジー応用医薬品であることから，ICH S6(R1)ガイドライン「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」で示されている考え方に従い，がん原性を評価した。本薬は，マウス，ラットに交差反応性を示さず，カニクイザルに交差反応性を示すことから，標準的なげっ歯類を用いたがん原性試験は適切ではないと判断したため，実施していない。

カニクイザルを用いた反復投与試験の組織学的検査において，休薬期間を含め最長39週間にわたる本薬の曝露が確認されたが，検査したすべての器官・組織において，本薬投与に関連した増殖性変化は認められず，本薬に関連した免疫抑制作用や内分泌系への影響も認められなかった。また，エミシズマブ製剤（以下，本剤）の臨床試験の結果及び同効の製品での安全性プロファイルにおいて，これまで，がん原性に関する懸念は報告されていない。したがって，本薬のがん原性に関する懸念は低いと考えられた。

生殖発生毒性試験

受胎能に及ぼす影響について，カニクイザル（投与開始時3歳齢）を用いた13週間皮下投

与試験及び成熟カニクイザル（投与開始時4～6歳齢）を用いた26週間皮下投与試験において，30 mg/kg/週までの用量で，雌雄生殖器の病理学的検査に，本薬の毒性は認められなかった。26週間皮下投与試験においては，精子検査及び月経周期の確認からも，受胎能に及ぼす影響を評価した。その結果，皮下投与による本薬の毒性は認められなかった。また，カニクイザル（投与開始時3～4歳齢）を用いた4週間静脈内投与試験において，100 mg/kg/週までの用量で，雌雄生殖器の病理学的検査に，本薬の毒性は認められなかった。

同効の製品における安全性プロファイル及び文献情報（IgG の胎盤通過性，血液凝固亢進状態と不育症の関連性等）から，正常動物への本薬過量投与時に，凝固亢進による個体発生に関連した毒性発現の懸念があると評価したため，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ていない。

局所刺激性試験

カニクイザルを用いた13週間皮下投与試験及び26週間皮下投与試験において評価した。これらの試験では，臨床第 I 相試験使用製剤と同一処方の溶媒及び本薬溶液（高用量群用の投与液濃度は，臨床第 I 相試験使用製剤とほぼ同じ濃度である80.3 mg/mL あるいは81.7 mg/mL）を投与した。投与期間終了時の病理学的検査において，回復性のある投与部位反応（剖検での皮下の暗赤色部や赤色斑，組織学的検査での皮下織の出血及び脈管周囲における単核細胞浸潤）が認められた。

また，カニクイザルを用いた4週間静脈内投与試験においても評価した。この試験では，臨床第 I 相試験使用製剤と同一処方の溶媒及び本薬溶液（高用量群用の投与液濃度は，臨床第 I 相試験使用製剤とほぼ同じ濃度である81.7 mg/mL）を投与した。投与期間終了時の病理学的検査において，投与部位の異常は認められなかった。

その他の毒性試験

ヒト正常組織を用いた組織交差反応性試験を実施した結果，肝臓，副腎，甲状腺及び骨髄の細胞質内に特異的な染色が認められた。

健康成人の全血を用いたサイトカイン放出に関する *in vitro* 試験を実施した結果，本薬のサイトカイン誘導は低リスク対照薬であるパニツムマブと同程度であった。

幼若動物試験

ICH M3(R2)ガイドライン「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」で示されている考え方に従い，反復投与試験及び臨床試験の結果並びに同効の製品における小児集団での安全性プロファイルから，本薬の安全性に関する小児特異的な懸念はないと評価したため，幼若動物試験は実施していない。

添加物 L-アスパラギン酸の安全性評価

本剤に含まれる L-アスパラギン酸濃度[redacted] mg/mL から算出された1日最大使用量である25.9 mg（本薬の臨床推奨用量 最大3 mg/kg/週，投与液濃度150 mg/mL，投与液量0.02 mL/kgから，ヒト体重60 kg あたりの1日最大使用量は1.2 mL/箇所として算出）は，医薬品添加物としての皮下投与による使用前例はなく，簡易相談において， L-アスパラギン酸は新添加物に該当することが確認された。そこで，L-アスパラギン酸の皮下投与による安全性を，L-アスパラギン酸に関する文献情報及び本薬の反復皮下投与試験の対照群（臨床用製剤に含まれる添加剤と同一組成であり L-アスパラギン酸を含む溶媒を投与した群）の結果から評価した。その結果，L-アスパラギン酸の特異的な影響は認められなかったことから，本剤に含まれる L-アスパラギン酸の皮下投与による1日最大使用量25.9 mg について，安全性に関する懸念はないと判断した。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

単回投与試験は実施していないが，反復投与試験における初回投与後7日までの結果から単回投与毒性を評価した。

カニクイザルを用いた4週間皮下投与試験（2.6.6.3.1；各群雌雄各1例）及び13週間皮下投与試験（2.6.6.3.2；各群雌雄各5例）における初回投与後7日までの観察及び各種検査については，一般状態観察，摂餌状況の確認，体重，血液学的検査，血液生化学的検査，末梢血イムノフェノタイピング，血清中サイトカイン測定及び神経行動学的機能観察が実施された。なお，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は4週間皮下投与試験で，神経行動学的機能観察は13週間皮下投与試験で，実施された。その結果，皮下投与による30 mg/kg/週までの用量で，本薬に関連した毒性は認められなかった。また，4週間静脈内投与試験（2.6.6.3.4；各群雌雄各3例）における初回投与後7日までの観察及び各種検査については，一般状態観察，摂餌状況の確認，体重，血液学的検査，血液生化学的検査及び血清中サイトカイン測定が実施された。その結果，静脈内投与による100 mg/kg/週までの用量で，本薬に関連した毒性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）

2.6.6.3.1 カニクイザル4週間皮下投与試験（用量設定試験）

（資料番号4.2.3.2-1）

4週間皮下投与試験では，対照（溶媒）群，並びに1，6及び30 mg/kg/週群を設定した。各群雌雄各1例のカニクイザル（投与開始時3～4歳齢）に，4週間間歇皮下投与（週1回，計5回）を実施した。全群全例について，最終投与の3日後に剖検を実施した。この試験の投与経路及び投与頻度は，臨床適用経路及び適用頻度を考慮し，皮下投与（週1回）とした。投与用量は，非臨床薬理試験データから本薬の臨床推奨用量は最大3 mg/kg/週と想定していたため，その10倍である30 mg/kg/週を高用量群として設定した。

その結果，30 mg/kg/週までの用量で，一般状態観察，摂餌状況の確認，体重，尿検査，眼科学的検査，血液生化学的検査，末梢血イムノフェノタイピング，血清中サイトカイン測定，心電図検査，神経行動学的機能観察，器官重量，骨髄検査及び投与部位を除く器官・組織における病理学的検査において本薬の影響と考えられる毒性は認められなかった。血液学的検査において，本薬の薬理作用と考えられる APTT の短縮が，本薬投与全群で認められた。なお，APTT の短縮に伴い FX 濃度の増加（30 mg/kg/週群のみ），血液凝固第 VIII 因子（FVIII）活性の増加（6 mg/kg/週以上の群）並びに FIX 活性及び FX 活性の増加（30 mg/kg/週群のみ）が認められたものの，他の血液学的検査における関連項目（D-ダイマー，フィブリン・フィブリノーゲン分解産物 [FDP]，プロトロンビン時間 [PT] 及びフィブリノーゲン）の異常及び病理学的検査における本薬の薬理作用から危惧される所見（血栓及び出血）は認められなかった。病理学的検査において，本薬投与全群の投与部位に，剖検では皮下の暗赤色部がみられ，組織学的には皮下織の出血及び脈管周囲における単核細胞浸潤が認められた。投与部位の変化は，13週間皮下投与試験（2.6.6.3.2）の投与期間終了時に対照群を含む全群で投与部位反応（剖検での皮下の暗赤色部と，これに伴った組織学的な変化である皮下織の出血）が認められていること，タンパク質製剤の皮下投与による投与部位反応が一般に報告されていることから[1)-6)]，本薬特異的な毒性ではないと判断した。本試験では，投与期間中に，抗薬物抗体（ADA）は検出されなかった

以上，4週間皮下投与試験では本薬の薬理作用と考えられる変化及び皮下投与局所の変化が認められたのみであり，NOAEL は30 mg/kg/週と判断された。

2.6.6.3.2 カニクイザル13週間皮下投与試験

（資料番号4.2.3.2-2）

13週間皮下投与試験では，対照（溶媒）群，並びに1，6及び30 mg/kg/週群を設定した。各群雌雄各5例のカニクイザル（投与開始時3歳齢）に，13週間間歇皮下投与（週1回，計14回）を実施した。各群雌雄各3例については最終投与の3日後に，残りの各群雌雄各2例については投与期間終了後から13週間の休薬期間を設けた後に，剖検を実施した。この試験の投与経路及び投与頻度は，臨床適用経路及び適用頻度を考慮し，皮下投与（週1回）とした。投与用量は，非臨床薬理試験データから本薬の臨床推奨用量は最大3 mg/kg/週と想定していたため，その10倍であり，4週間皮下投与試験（2.6.6.3.1）のNOAELでもある30 mg/kg/週を高用量群として設定した。この試験の回復期間は，毒性の十分な回復性が認められることが予想される期間として，6 mg/kg/週及び1 mg/kg/週群の血漿中薬物濃度が，推定臨床用量におけるトラフ時の血漿中薬物濃度を下回ると予想された期間かつ投与期間を超えない期間である13週間とした。

その結果，30 mg/kg/週までの用量で，一般状態観察，摂餌状況の確認，体重，尿検査，眼科学的検査，血液生化学的検査，心電図検査，神経行動学的機能観察，器官重量，骨髄検査及び投与部位を除く器官・組織における病理学的検査において本薬の影響と考えられる毒性は認められなかった。血液学的検査において，本薬の薬理作用と考えられるAPTTの短縮が本薬投与全群で認められた。これらの変化には回復性が認められた。なお，他の血液学的検査における関連項目（D-ダイマー，FDP，PT及びフィブリノーゲン）の異常及び病理学的検査における本薬の薬理作用から危惧される所見（血栓及び出血）は認められなかった。投与期間終了時の病理学的検査において，対照群を含む全群の投与部位に，剖検では皮下の暗赤色部がみられ，組織学的には皮下織の出血，並びに本薬の6及び30 mg/kg/週群の投与部位に皮下織の脈管周囲における単核細胞浸潤が認められた。投与部位の変化には回復性が認められた。皮下の出血性変化は，本試験の対照群（雌1例）の投与部位においても認められた変化であること，タンパク質製剤の皮下投与による投与部位反応が一般に報告されていることから[1)-6)]，本薬特異的な毒性ではないと判断した。

ADAが，投薬期間では1 mg/kg/週群（雄2例，雌1例）及び6 mg/kg/週群（雄2例，雌1例）で検出された。ADAが確認された個体（1 mg/kg/週群の雌1例，6 mg/kg/週群の雌雄各1例）の血漿中エミシズマブ濃度は，それぞれ同群の他の個体の血漿中薬物濃度と比べ，低値を示した。

以上，13週間皮下投与試験では本薬の薬理作用と考えられる変化及び皮下投与局所の変化が認められたのみであり，NOAELは30 mg/kg/週と判断された。

なお，1 mg/kg/週群の雌1例（動物番号5201）は，初回投与後から炎症性変化が発現（C反応性蛋白 [CRP] の増加等）し，この炎症性変化による一般状態の悪化により，第7回目投与翌日に途中剖検を実施した。本個体の病理学的検査では，多発性関節炎（剖検では関節の腫脹，組織学的検査では関節の炎症性変化）が認められており，初回投与後から続いていた炎症性変化（CRPの増加等）及び一般状態悪化の原因と考えられた。多発性関節炎の発現機序は，初回投与直後から炎症性変化が認められていることもあり不明であった。しかしながら，多発性関節炎は，低用量群（1 mg/kg/週群）の雌1例のみで認められた変化であること（4週間皮下投与試験 [2.6.6.3.1]，13週間皮下投与試験，26週間皮下投与試験 [2.6.6.3.3]及び4週間静脈内投与試験 [2.6.6.3.4]における本薬投与群として，計88例中の1例），マカク類での自然発生の多発性関節炎の報告[7)-9)]もあることから，本薬投与との関連のない偶発的変化と判断した。

2.6.6.3.3 成熟カニクイザル26週間皮下投与試験

（資料番号4.2.3.2-3）

26週間皮下投与試験では，対照（溶媒）群，並びに1，6及び30 mg/kg/週群を設定した。各

群雌雄各5例の成熟カニクイザル（投与開始時4～6歳齢）に，26週間間歇皮下投与（週1回，計27回）を実施した。各群雌雄各3例については最終投与の3日後に，残りの各群雌雄各2例については投与期間終了後から13週間の休薬期間を設けた後に，剖検を実施した。この試験の投与経路及び投与頻度は，臨床適用経路及び適用頻度を考慮し，皮下投与（週1回）とした。投与用量は，非臨床薬理試験データから本薬の臨床推奨用量は最大3 mg/kg/週と想定していたため，その10倍であり，13週間皮下投与試験（2.6.6.3.2）の NOAEL でもある30 mg/kg/週を高用量群として設定した。この試験の回復期間は，毒性の十分な回復性が認められることが予想される期間として，6 mg/kg/週及び1 mg/kg/週群の血漿中薬物濃度が，推定臨床用量におけるトラフ時の血漿中薬物濃度を下回ると予想された期間かつ投与期間を超えない期間である13週間とした。

その結果，26週間皮下投与試験では，13週間皮下投与試験（2.6.6.3.2）と，ほぼ同様な変化が認められた。30 mg/kg/週までの用量で，一般状態観察（雌については月経周期の評価含む），摂餌量，体重，尿検査，眼科学的検査，血液学的検査，血液生化学的検査，心電図検査，精子検査（精巣サイズの計測含む）及び器官・組織における剖検（投与部位は除く）において本薬投与の影響と考えられる毒性は認められなかった。投与期間終了時の剖検において，1 mg/kg/週群の投与部位に皮下の赤色斑が認められた。投与期間終了時の組織学的検査において，本薬の1，6及び30 mg/kg/週群の投与部位に皮下織の出血及び脈管周囲における単核細胞浸潤が認められた。投与部位の変化には回復性が認められた。投与部位の変化は，13週間皮下投与試験（2.6.6.3.2）の投与期間終了時に対照群を含む全群で投与部位反応（剖検での皮下の暗赤色部と，これに伴った組織学的な変化である皮下織の出血）が認められていること，タンパク質製剤の皮下投与による投与部位反応が一般に報告されていることから[1)-6)]，本薬特異的な毒性ではないと判断した。26週間皮下投与試験では，13週間皮下投与試験（2.6.6.3.2）で認められた本薬の薬理作用と考えられる APTT の短縮が認められなかった。本事象については，APTT 試薬（Actin FSL 及び Actin）に関する *in vitro* 試験[10)]から，この結果は，26週間皮下投与試験で使用した APTT 測定試薬が，13週間皮下投与試験で使用した APTT 測定試薬と異なったために生じたものであることが確認された[11)]。

ADA の産生が，投与期間中，1 mg/kg/週群（雄1例及び雌2例），6 mg/kg/週群（雌雄各1例）及び30 mg/kg/週群（雄1例）に確認された。この内，1 mg/kg/週群の雄1例及び雌2例，6 mg/kg/週群の雄1例で，投与期間終了時の血漿中薬物濃度が低下し，これらの個体の ADA が本薬活性中和能を持つことが確認された。ADA の産生が確認された6例のうち，休薬期間を設定した3例中2例では引き続き ADA が確認され，1 mg/kg/週群の雄1例，6及び30 mg/kg/週群の雌各1例では，新たに ADA の産生が確認された。

以上，26週間皮下投与試験では皮下投与局所の変化が認められたのみであり，NOAEL は 30 mg/kg/週と判断された。

なお，6 mg/kg/週群の雄1例（動物番号10303）は，第20回，第21回及び第22回投与後に投与部位の腫脹が認められた（投与後，一過性に発現）。本個体については，ADA が第3回投与の投与前検査で確認され，第7回投与時点から抗体価が非常に高値となり，血漿中薬物濃度は検出限界以下となっていたこともあり，第22回目投与翌日に途中剖検を実施した。投与部位の組織学的検査では，重度な出血性変化を伴う急性壊死性血管炎及び慢性血管炎が認められた。投与部位の腫脹についての発現経過及び組織学的検査の所見から，異種タンパク質を投与したことによるアルサス反応（III 型アレルギー）であると考えられた。しかしながら，本変化は，カニクイザルに異種タンパク質を長期間大量投与したこと，かつ本薬の曝露がなかった状況での変化であることから，ヒトへの外挿性はないと判断した。

その他，30 mg/kg/週群の雄1例（動物番号10401）で認められた精巣重量及び生殖器関連の器官・組織における組織学的変化が，本薬の影響によるものか，個体変動の影響によるものかについての議論が過去2回にわたる当局相談（1.13.2-3，1.13.2-4）で展開され，関連する文献等，本個体の毒性評価に利用可能な情報の収集及び承認申請時の資料における説明・考

察を求められるに至った。本個体の変化は，以下に示した（1）から（8）の情報に基づいて，本薬による影響ではなく，個体変動による影響と考えられた。したがって，生殖器関連の器官・組織に対する本薬の安全性に関する懸念はないと判断した。

（1）本個体の精巣重量については試験施設の背景データと同等の値を示しており（1.13.2-4）個体変動の範囲内と判断したため，いずれの器官重量データについても「異常なし」と評価していること。

（2）本個体の組織学的検査では，生殖器関連の器官・組織（精巣，前立腺及び精嚢）において未成熟（軽微～軽度）が認められているが，精巣径の計測では投与開始前後で差は認められていないため（1.13.2-4），これらの組織学的な変化に伴う精巣の小型化は認められていないと考えていること。

（3）生殖器関連の組織学的変化を含め本個体での組織学的変化は，本個体で認められている副腎の組織学的な変化（副腎の束状帯における中等度な脂質性過形成）に伴った二次的変化とも考察した。脂質性過形成は，糖質コルチコイドによるネガティブフィードバック機構により副腎皮質刺激ホルモン放出が抑制されることにより生じることが知られている[12]。これは，コレステロールやステロイドホルモン前駆体の細胞内への蓄積に関連したものであり，脂質性過形成の発現に関与していると考えられている。成熟カニクイザル（投与開始時4～6歳齢）を用いた26週間皮下投与試験における本個体以外の個体，カニクイザル（投与開始時3歳齢）を用いた13週間皮下投与試験及びカニクイザル（投与開始時3～4歳齢）を用いた4週間静脈内投与試験において，本薬に関連した副腎・生殖器関連の組織学的な変化は特に認められていないため，本個体で認められた組織学的変化は，偶発的な変化と判断していること。

（4）26週間皮下投与試験では受胎能の一部を評価項目としているため成熟動物を使用しており，成熟動物の選定基準は，「雄については，少なくとも片側の精巣短径が2 cm 以上であること，かつ4～6年齢であること」としていたが，4～6年齢の個体を用いても，場合によっては精巣の未成熟が組織学的検査所見として認められる[13]こと（1.13.2-4）。

（5）本個体の一般状態，体重，摂餌量，精子検査（精子数検査，精子形態異常検査及び運動精子率検査）及び器官重量について，本薬に関連した異常は特に認められておらず，雄性生殖器に本薬の毒性変化は認められなかったと評価していること。

（6）一般に血液精巣上体関門を IgG は通過せず[14]，血液精巣関門によっても IgG の通過は制限されているということが報告[15)-17)]されていることから，本薬が精巣や精巣上体へ移行する可能性は低いと考えられること。

（7）本薬の組織交差反応性試験（2.6.6.8.1）において，前立腺及び精巣を含め35種類のヒト正常組織の凍結切片（3ドナー／組織）を用いて実施されており，雄性生殖器関連の器官・組織には特異的な染色が認められなかったこと。

（8）臨床試験において，本薬による雄性生殖器関連の副作用は特に報告されていないこと（2.5.5）。

2.6.6.3.4 カニクイザル4週間静脈内投与試験

（資料番号4.2.3.2-4）

4週間静脈内投与試験では，対照（溶媒）群，並びに10，30及び100 mg/kg/週群を設定した。対照群及び100 mg/kg/週群では各群雌雄各5例，10及び30 mg/kg/週群では各群雌雄各3例のカニクイザル（投与開始時3～4歳齢）に，4週間間歇静脈内投与（週1回，計5回）を実施した。各群雌雄各3例については最終投与日の翌日に，対照群及び100 mg/kg/週群の残りの各群雌雄各2例については投与期間終了後から4週間の休薬期間を設けた後に，剖検を実施した（10及び30 mg/kg/週群は休薬期間の設定なし）。この試験の投与経路及び投与頻度は，臨床適用経路及び適用頻度を考慮し，静脈内投与（週1回）とした。投与用量は，本薬の臨床推奨用量は最大10 mg/kg/週と想定していたため，その10倍である100 mg/kg/週を高用量群として設定した。この試験の回復期間は，毒性の十分な回復性が認められることが予想される期間

として，投与期間を超えない期間である4週間とした。

その結果，100 mg/kg/週までの用量で，一般状態観察，摂餌状況の確認，体重，尿検査，眼科学的検査，血液生化学的検査，心電図検査，器官重量，骨髄検査及び病理学的検査において本薬の影響と考えられる毒性は認められなかった。血液学的検査において，本薬の薬理作用と考えられる APTT の短縮が本薬投与全群で認められた。これらの変化には回復性が認められた。なお，他の血液学的検査における関連項目（D-ダイマー，FDP，PT 及びフィブリノーゲン）の異常及び病理学的検査における本薬の薬理作用から危惧される所見（血栓及び出血）は認められなかった。

投与期間及び休薬期間にいずれの投与群においても ADA は検出されなかった。

以上，4週間静脈内投与試験では本薬の薬理作用と考えられる変化が認められたのみであり，NOAEL は100 mg/kg/週と判断された。

なお，100 mg/kg/週群の雌1例（動物番号50403）に，第4回投与日の投与前（Day 22）検査から，血液学的検査（白血球，血小板，好中球の低値及びフィブリノーゲン，FDP，D-ダイマーの高値等）及び血液生化学的検査（CRP の高値等）の異常値が認められた。第4回投与日の翌日（Day 23）には赤血球，ヘモグロビン等の低値も認められた。血小板及び好中球の低値並びに CRP の高値については，第5回投与日の投与前（Day 29）の検査において正常値に近い値となった。本個体の病理学的検査では，多発性動脈炎（組織学的検査では肝臓，膵臓，胃及び脾臓における動脈周囲炎が認められたため多発性動脈炎と診断）が認められており，第4回投与日の投与前（Day 22）検査から認められた異常値は，炎症性変化によるものと考えられた。多発性動脈炎の発現機序は不明であったが，本変化は，以下に示した文献報告及び発現状況から，自然発症（遺伝要因及び環境要因による）の多発性動脈炎（血管炎）と考えられた。

（1）本事象と類似したカニクイザルにおける自然発症の多発性動脈炎の文献報告[18),19)]があること。

（2）本薬の曝露が持続していた状況で一部の異常値が軽減していること。

（3）本試験において雌1例のみの変化であること（本薬投与群として計22例中の1例。本試験の他の個体では，一般状態，摂餌量，体重，尿検査，眼科学的検査，心電図検査，血液学的検査，血液生化学的検査，剖検及び組織学的検査において，APTT 短縮以外に本薬投与の影響と考えられる変化は認められていない）。

（4）これまでの皮下投与による反復投与試験において血管炎の発現はないこと（4週間皮下投与試験 [2.6.6.3.1]，13週間皮下投与試験 [2.6.6.3.2]及び26週間皮下投与試験 [2.6.6.3.3]における本薬投与群計66例中に発現なし）。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

本薬はバイオテクノロジー応用医薬品であることから，ICH S6(R1)ガイドライン「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」で示されている考え方に従い，遺伝毒性試験は実施していない。一般に IgG クラスの分子量の大きいヒト化抗体である本薬が，DNA や他の染色体成分に直接相互作用するとは考えにくいことから，本薬の遺伝毒性についての懸念は低いと考えられた。

2.6.6.5 がん原性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

本薬はバイオテクノロジー応用医薬品であることから，ICH S6(R1)ガイドライン「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」で示されている考え方に従い，がん原性を評価した。本薬は，マウス，ラットに交差反応性を示さず，カニクイザルに交差反応性を示すことから，標準的なげっ歯類を用いたがん原性試験は適切ではないと判断したため実施していない。

カニクイザルを用いた反復投与試験の組織学的検査において，休薬期間を含め最長39週間にわたる本薬の曝露が確認されたが，検査したすべての器官・組織において，本薬投与に関連した増殖性変化は認められず，本薬に関連した免疫抑制作用や内分泌系への影響も認められなかった。また，がん原性に関する懸念は，これまで，本剤の臨床試験において報告されていない（2.5.5）。更に，本薬は新規薬効機序（FIXa と FX に結合するヒト化二重特異性抗体であり，FVIII の補因子機能を代替する活性を有している）を持つものの，同効の製品（遺伝子組換え型血液凝固第 VIII 因子製剤）と生物学的作用のプロファイル（FIXa，FX への結合，及び FIXa による FX の活性化促進，血漿凝固促進作用及び FVIII 欠乏病態における出血傾向の抑制等）が基本的に異ならないことが本薬の非臨床薬理試験データ（2.6.2.2）から示されており，同効の製品の使用実績において，これまで，がん原性に関する懸念は報告されていない[20)-25)]。したがって，本薬のがん原性に関する懸念は低いと考えられた[26)]。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験（用量設定試験及びトキシコキネティクス評価を含む）

受胎能に及ぼす影響について，カニクイザル（投与開始時3歳齢）を用いた13週間皮下投与試験（2.6.6.3.2）及び成熟カニクイザル（投与開始時4～6歳齢）を用いた26週間皮下投与試験（2.6.6.3.3）において，30 mg/kg/週までの用量で，雌雄生殖器の病理学的検査に，本薬の毒性は認められなかった。26週間皮下投与試験においては，受胎能に及ぼす影響を精子検査及び月経周期の確認からも評価した。その結果，皮下投与による本薬の毒性は認められなかった。また，カニクイザル（投与開始時3～4歳齢）を用いた4週間静脈内投与試験（2.6.6.3.4）において，100 mg/kg/週までの用量で，雌雄生殖器の病理学的検査に，本薬の毒性は認められなかった。

正常動物への本薬過量投与時に，凝固亢進による個体発生に関連した毒性発現の懸念があると評価したため，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ていない。以下に示した（1）から（3）の情報に基づいて，妊婦，産婦，授乳婦等への投与に関する安全性は確認されていないと判断した。

（1）IgG の胎盤通過性は，器官形成期には低いが妊娠中期から増加し，妊娠後期に最大となること[27)]。

（2）一般に血液凝固亢進状態が不育症（妊娠はするが，流産，死産や新生児死亡などを繰り返して結果的に子供をもてないこと）のリスク要因の一つであり，血液凝固第 XII 因子の低下による血栓形成が不育症のリスク要因となることが知られており[28)]，本薬の正常動物への過量投与による凝固亢進により個体発生に関連する毒性が発現するリスクは想定可能であること。

（3）一般に IgG は母乳中に分泌されること。

2.6.6.7 局所刺激性試験

局所刺激性は，カニクイザルを用いた13週間皮下投与試験（2.6.6.3.2）及び26週間皮下投与試験（2.6.6.3.3）において評価した。これらの試験では，臨床第 I 相試験使用製剤と同一処方の溶媒及び本薬溶液（13週間皮下投与試験では2.7，16.2及び80.3 mg/mL；26週間皮下投与試験では2.7，16.3及び81.7 mg/mL；高用量群用の投与液濃度は臨床第 I 相試験使用製剤とほぼ同じ濃度）を投与し，最終投与後3日に剖検を実施した。なお，背部の皮膚を，13週間皮下投与試験では14分割し投与1回につき1箇所を使用，26週間皮下投与試験では14分割し投与2回につき1箇所を使用した。

投与期間終了時の病理学的検査において，13週間皮下投与試験では，本薬の6及び30 mg/kg/週群（投与液濃度：16.2及び80.3 mg/mL）の投与部位に，組織学的には皮下織の脈管周囲における単核細胞浸潤が認められた。26週間皮下投与試験では，本薬投与群の投与部位

に，剖検では皮下の赤色斑（1 mg/kg/週群；投与液濃度：2.7 mg/mL）が，組織学的には皮下織の出血及び脈管周囲における単核細胞浸潤（1，6及び30 mg/kg/週群；投与液濃度：2.7，16.3及び81.7 mg/mL）が認められた。これらの変化には回復性が認められた。投与部位の変化は，13週間皮下投与試験の投与期間終了時に対照群を含む全群で投与部位反応（剖検での皮下の暗赤色部と，これに伴った組織学的な変化である皮下織の出血）が認められていること，タンパク質製剤の皮下投与による投与部位反応が一般に報告されていることから[1)-6)]，本薬特異的な毒性ではないと判断した。

また，カニクイザルを用いた4週間静脈内投与試験（2.6.6.3.4）においても局所刺激性を評価した。この試験では，本薬溶液（8.2，24.6及び81.7 mg/mL）を投与（投与部位は伏在静脈を使用，投与速度は約4 mL/分）し，最終投与日の翌日に剖検を実施した。投与期間終了時の病理学的検査において，本薬投与全群の投与部位に異常は認められなかった。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 組織交差反応性試験

（資料番号4.2.3.7.7-1，4.2.3.7.7-2）

本薬，抗ヒト FIX 抗体及び抗ヒト FX 抗体を用いた凍結組織切片の免疫組織化学的染色について，条件検討のための予備試験を実施した。組織は，ヒト及びカニクイザルの肝臓及び小脳，並びにヒトの神経膠芽細胞腫を使用した（1～3ドナー／組織）。その結果，ヒト組織交差反応性試験で用いる抗体濃度は，本薬で50 μg/mL，抗ヒト FIX 抗体で20 μg/mL，及び抗ヒト FX 抗体で100 μg/mL が適切と考えられた。なお，条件検討において，カニクイザル肝臓の本薬及び抗ヒト FX 抗体に対する特異的な染色は認められず，本薬の結合部位は免疫組織化学的染色では技術的に検出不可能と判断されたため，カニクイザルの組織交差反応性試験は実施していない。

本薬（10及び50 μg/mL）の組織交差反応性試験を，35種類のヒト正常組織の凍結切片（3ドナー／組織）を用いて実施した。その結果，肝臓（肝細胞及びクッパー細胞），副腎（網状帯の皮質細胞），甲状腺（濾胞上皮細胞）及び骨髄（骨髄細胞）において，本薬に対する特異的な染色が認められた。これらの特異的な染色は細胞質内に認められたこと，本薬の薬理学的特性（ヒト化抗体である本薬が細胞膜を通過して特異的な染色を示した組織の細胞質内に直接相互作用する可能性は低いと考えられること，本薬は抗原に対する中和作用はないこと，本薬は細胞傷害性作用を有していないこと）から，これらの器官に関連する本薬の副作用が発現する可能性は低いと考えられた。

2.6.6.8.2 サイトカイン放出に関する *in vitro* 試験

（資料番号4.2.3.7.7-3）

本薬によるサイトカイン放出に関する *in vitro* 試験では，本薬，低リスク対照薬パニツムマブ[29)]あるいは高リスク対照薬アレムツズマブ[30),31)]を血液（健康成人各群10ドナーの新鮮な全血）に，0.1，1，10及び100 μg/mL となるように添加し，24時間培養後のサイトカイン（interleukin [IL]-8，IL-6及び TNF-α）を測定した。本薬処置群とパニツムマブ処置群との比較では，いずれのサイトカイン誘導においても有意差は認められなかった。また，リン酸緩衝液処置群との比較では，本薬処置群及びパニツムマブ処置群ともに，IL-8誘導に有意差が認められ，IL-6及び TNF-α 誘導に有意差は認められなかった。なお，アレムツズマブ処置群については，パニツムマブ処置群あるいはリン酸緩衝液処置群との比較では，すべてのサイトカイン誘導に有意差が認められた。本試験の条件下において，本薬によるサイトカイン誘導は低リスク対照薬と同程度であること，また，高リスク対照薬アレムツズマブにおいても，静脈内投与した場合に infusion reaction が認められるものの，皮下投与した場合には認められなかったとの報告[32)]があることから，本薬の皮下投与によるサイトカイン放出症候群

の発症リスクは低いと考えられた。

2.6.6.8.3 幼若動物試験

ICH M3(R2)ガイドライン「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」では，「同じ薬理学的分類に属する他の薬物のデータを含めて，既存の動物データ及びヒトの安全性データが小児の臨床試験を実施するのに十分でないと判断された場合にのみ，実施を考慮すべきである。」と記載されている。本薬の安全性について小児特異的な懸念はないと評価したことから，当該ガイダンスに準じて，幼若動物試験は実施していない。本薬の安全性に関する小児特異的な懸念はないと評価した根拠は，以下のとおりである。

（1）カニクイザルを用いた反復投与毒性試験における本薬の毒性変化は，投与部位反応及び APTT の短縮のみであり，FDA ガイダンス（Guidance for Industry Nonclinical Safety Evaluation of Pediatric Drug Products）において，小児の発達過程にあるとされる器官・組織は，本剤の標的器官・組織とはなっていないこと。

（2）これまでに実施された13週間反復投与毒性試験では投与開始時年齢で3歳のカニクイザルが使用されているため，12歳以上の患者集団の安全性は担保されていること[33]。

（3）本薬の12 歳以上の血友病 A 患者を対象とする臨床試験，12 歳未満の小児血友病 A 患者を対象とする臨床試験について，これらの試験における血友病 A 患者の安全性を評価した結果，忍容性は良好と考えられたこと（2.5.5）。

（4）本薬は，新規薬効機序（FIXa と FX に結合するヒト化二重特異性抗体であり，FVIII の補因子機能を代替する活性を有している）を持つものの，同効の製品（遺伝子組換え型 FVIII 製剤）と生物学的作用のプロファイルは基本的に異ならないことが，これまでの本剤の非臨床薬理試験データで示されており，同効の製品と同様な安全性のプロファイルを示したこと。なお，同効の製品は小児集団においても使用実績があり，その生物学的作用のプロファイルによる安全性に関する懸念は特に報告されていない[34)-40)]。

（5）凝固・線溶系の加齢に伴う変化に関して，新生児と児童～成人を比べた場合に差があるとする報告[41)]はあるものの，加齢に伴う変化は6カ月齢までに完了し，その時期以降には明らかな差がないとする報告[42)]があること。

2.6.6.9 添加物 L-アスパラギン酸の安全性評価

本剤中に添加物として，L-アスパラギン酸，L-アルギニン，L-ヒスチジン及びポリオキシエチレン（160）ポリオキシプロピレン（30）グリコール（以下，ポロクサマー188）が含まれている。本剤に含まれる L-アスパラギン酸濃度[redacted] mg/mL から算出された1日最大使用量である25.9 mg（本薬の臨床推奨用量 最大3 mg/kg/週，投与液濃度150 mg/mL，投与液量0.02 mL/kg から，体重60 kg あたりの1日最大使用量は1.2 mL/箇所として算出）は，医薬品添加物としての皮下投与による使用前例はなく，当局相談において，L-アスパラギン酸は新添加物に該当することが確認された[43)]。

食品添加物のみならず医薬品としても L-アスパラギン酸は用いられており，さまざまな分野における使用実績に関して，これまで安全性に関する懸念は特に認められていない。L-アスパラギン酸の食品からの摂取量6540 mg/日が大きいことを考慮して，L-アスパラギン酸の安全性上の懸念はないと判断されている[44), 45)]。

L-アスパラギン酸の皮下投与による安全性を，L-アスパラギン酸に関する文献情報及び本薬の反復皮下投与試験の対照群（臨床用製剤に含まれる添加剤と同一組成であり L-アスパラギン酸を含む溶媒を投与した群）の結果を用いて評価した。その結果，本剤に含まれる L-アスパラギン酸の皮下投与による1日最大使用量25.9 mg について，安全性に関する懸念はないと判断した。そのため，L-アスパラギン酸単独での皮下投与毒性試験の実施は不要と判

断している。L-アスパラギン酸の使用量及び使用前例についての詳細は，表 2.6.6.9-1に示した。

表 2.6.6.9-1 本剤に含まれるL-アスパラギン酸の使用量及び使用前例

有効成分名及び添加物名（CAS 番号）	1 mL 中の含量	体重60 kg あたりの1日最大使用量 a)	使用前例（最大使用量，皮下注射）	簡易相談結果[43]（平成[redacted]年[redacted]月[redacted]日実施）
本薬	150 mg	180 mg/箇所 3 mg/kg/週	該当せず	該当せず
L-アスパラギン酸（56-84-8）	q.s.（[redacted] mg）	25.9 mg/箇所 0.432 mg/kg/週	データなし	使用前例が確認できず，新添加物に該当する。

q.s. = quantum satis (as much as may suffice)

a) 本薬の臨床推奨用量 最大3 mg/kg，投与液濃度 150 mg/mL，投与液量 0.02 mL/kg から，体重60 kg あたりの1日最大使用量は1.2 mL/箇所として算出

2.6.6.9.1 単回投与毒性試験

L-アスパラギン酸の単回投与毒性は，本薬のカニクイザルを用いた4週間皮下投与試験（2.6.6.3.1；L-アスパラギン酸の投与量は[redacted] mg/mL × 0.25 mL/kg = 5.395 mg/kg）及び13週間皮下投与試験（2.6.6.3.2；L-アスパラギン酸の投与量は[redacted] mg/mL × 0.37 mL/kg = 7.985 mg/kg）の対照群データにより評価した。本薬の反復投与試験では，対照群に，臨床使用製剤に含まれている添加物と同一組成の溶媒（150 mmol/L アルギニン-アスパラギン酸及び0.5 mg/mL ポロクサマー188を含む20 mmol/L ヒスチジン-アスパラギン酸緩衝液，pH 6.0）を投与した。初回投与後7日までの観察及び各種検査は，一般状態観察，摂餌状況の確認，体重，血液学的検査，血液生化学的検査，末梢血イムノフェノタイピング，血清中サイトカイン測定及び神経行動学的機能観察が実施されている。なお，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は4週間皮下投与試験での結果を，神経行動学的機能観察は13週間皮下投与試験での結果を評価した。その結果，4週間皮下投与試験及び13週間皮下投与試験の対照群において，皮下投与による溶媒（L-アスパラギン酸を含む）の毒性は認められなかった。

なお，単回投与毒性は，カニクイザルを用いた4週間静脈内投与試験（2.6.6.3.4；L-アスパラギン酸の投与量は[redacted] mg/mL × 1.22 mL/kg = 26.328 mg/kg）の対照群データによっても評価した。初回投与後7日までの観察及び各種検査は，一般状態観察，摂餌状況の確認，体重，血液学的検査，血液生化学的検査及び血清中サイトカイン測定が実施されている。その結果，対照群において，静脈内投与による溶媒（臨床使用製剤に含まれる添加剤と同一組成でありL-アスパラギン酸を含む）の毒性は認められなかった。

2.6.6.9.2 反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む）及び局所刺激性試験

L-アスパラギン酸の反復投与毒性は，本薬のカニクイザルを用いた13週間皮下投与試験（2.6.6.3.2）及び26週間皮下投与試験（2.6.6.3.3；L-アスパラギン酸の投与量は[redacted] mg/mL × 0.37 mL/kg = 7.985 mg/kg）の対照群データにより評価した。本薬の反復投与試験では，対照群に，臨床使用製剤に含まれている添加物と同一組成の溶媒（150 mmol/L アルギニン-アスパラギン酸及び0.5 mg/mL ポロクサマー188を含む20 mmol/L ヒスチジン-アスパラギン酸緩衝液，pH 6.0）を投与した。また，投与部位の組織学的検査による局所刺激性も併せて評価した。

13週間皮下投与試験の対照群について，投与期間終了時の剖検では，対照群を含めた投与全群において皮下投与手技の影響と考えられる暗赤色部が認められたが，組織学的検査では異常は認められなかった。26週間皮下投与試験の対照群では，軽微な投与部位反応（組織学

的変化として，回復性のある軽微な皮下織における単核細胞浸潤，これに関連した脈管周囲における単核細胞浸潤。皮下投与手技による影響と考察）が認められた。

L-アスパラギン酸単独を投与した際の局所刺激性については，考察に利用可能な文献情報はない。しかしながら，L-アスパラギン酸を含む物質を投与した際の局所刺激性については考察に利用可能な文献があることから，その文献情報による評価も行った。小児 TPN 用総合アミノ酸製剤（プレアミン®-P 注射液）の静脈内注射による臨床使用において，局所刺激性関連の副作用は報告されていない[46)–49)]。したがって，L-アスパラギン酸による局所刺激性は臨床上許容範囲内の投与部位反応と想定できることから，本剤に含まれる L-アスパラギン酸の使用量による皮下投与時の局所刺激性に関する懸念は低いと考えられた。

26週間皮下投与試験における L-アスパラギン酸の無毒性量は，投与開始時（Day 1）における対照群雄の群内最大体重 5.0 kg を使用した場合，投与部位1箇所あたりの投与液量は，1.85 mL/箇所（0.37 mL/kg × 5.0 kg = 1.85 mL/箇所）となる。したがって，L-アスパラギン酸の無毒性量は，39.923 mg と算出された（[redacted] mg/mL × 1.85 mL/箇所 = 39.923 mg/箇所，39.923 mg/箇所／5.0 kg = 7.985 mg/kg）。この無毒性量である39.923 mg（7.985 mg/kg）は，臨床における L-アスパラギン酸の体重60 kg あたりの1日最大使用量である25.9 mg（0.432 mg/kg） を超えるものである。なお，これまで実施された臨床試験において，投与部位反応は認められているものの，いずれも重症度は軽度であり回復が認められている（2.5.5）。

2.6.6.9.3 遺伝毒性試験

L-アスパラギン酸の遺伝毒性は，文献情報により評価した。その結果，L-アスパラギン酸の変異原性試験[50)]及び染色体異常試験[44)]が実施され，いずれの試験においても陰性であった。

2.6.6.9.4 がん原性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

L-アスパラギン酸のがん原性は，本薬の反復投与毒性試験の対照群（L-アスパラギン酸を含む溶媒を投与）データ及び文献情報によりにより評価した。

13週間皮下投与試験（2.6.6.3.2）及び26週間皮下投与試験（2.6.6.3.3）の対照群の組織学的検査では，検査したすべての器官・組織において，溶媒（臨床使用製剤に含まれる添加剤と同一組成であり L-アスパラギン酸を含む）投与に関連した増殖性変化は認められていない。また，さまざまな分野における使用実績において，がん原性に関する懸念は特に認められていない[44),45)]。

2.6.6.9.5 生殖発生毒性試験（用量設定試験及びトキシコキネティクス評価を含む）

カニクイザル（投与開始時3歳齢）を用いた13週間皮下投与試験（2.6.6.3.2）及び成熟カニクイザル（投与開始時4～6歳齢）を用いた26週間皮下投与試験（2.6.6.3.3）の対照群（臨床使用製剤に含まれる添加剤と同一組成であり L-アスパラギン酸を含む溶媒を投与した群）において，雌雄生殖器の病理学的検査に，L-アスパラギン酸の影響と考えられる毒性は認められなかった。26週間皮下投与試験においては，精子検査及び月経周期の確認からも受胎能に及ぼす影響を評価した結果，対照群（臨床使用製剤に含まれる添加剤と同一組成であり L-アスパラギン酸を含む溶媒を投与した群）において，L-アスパラギン酸の影響と考えられる毒性は認められなかった。また，カニクイザル（投与開始時3～4歳齢）を用いた4週間静脈内投与試験（2.6.6.3.4）の対照群において，雌雄生殖器の病理学的検査に，L-アスパラギン酸の影響と考えられる毒性は認められなかった。

12歳未満の小児集団における L-アスパラギン酸の生殖器に及ぼす影響については，新生児，乳・幼児集団における静脈内投与によるアミノ酸輸液の安全性データ[46)–49)]から評価し，L-アスパラギン酸の特異的な影響は認められなかったことから，小児集団における懸念は低いと

判断した。

2.6.6.9.6 幼若動物試験

L-アスパラギン酸の幼若動物試験は，特に実施していない。

12歳未満の小児集団における L-アスパラギン酸の全身毒性に関する懸念は，本剤の臨床適応時の投与経路とは同一投与経路ではないものの，調査した静脈内注射あるいは経口投与による使用前例，すなわち小児用 L-アスパラギン酸含有製品における安全性データ[46)-49),51)]から評価し，新生児，乳・幼児の小児集団において L-アスパラギン酸の特異的な影響は認められなかったことから，本剤の L-アスパラギン酸使用量であれば，12歳未満の小児集団の全身毒性に関する懸念は低いと考えられた。

12歳未満の小児集団における L-アスパラギン酸の局所毒性については，（1）皮下投与における局所毒性に影響する要因に関して小児と成人の間で明らかな差異があるとの報告はないこと，（2）FDA ガイダンス（Guidance for Industry Nonclinical Safety Evaluation of Pediatric Drug Products）においても小児における発達過程にある器官・組織に皮膚は挙げられていないこと，（3）添加物としてアミノ酸を含有しているオマリズマブ（遺伝子組換え）注射用凍結乾燥製剤の小児における臨床試験の安全性データ[52)]において，成人の臨床試験の安全性データに比べ新たな安全性に関する懸念は特に認められていないことから，本薬の成熟カニクイザルを用いた26週間皮下投与試験（2.6.6.3.3）の対照群（臨床使用製剤に含まれる添加剤と同一組成の溶媒を投与する群）の結果を用いて評価した。26週間皮下投与試験の対照群で認められた投与部位反応は，皮下投与手技に関連したもののみであり，これらの投与部位反応は臨床上許容可能な範囲の変化と考えられた。したがって，L-アスパラギン酸の12歳未満の小児集団における局所刺激性に関する懸念は低いと考えられた。

2.6.6.10 考察及び結論

カニクイザルを用いた13週間皮下投与試験（2.6.6.3.2）及び成熟カニクイザルを用いた26週間皮下投与試験（2.6.6.3.3）を実施した結果，13週間皮下投与試験では APTT の短縮（1，6及び30 mg/kg/週群）及び投与部位皮下織の脈管周囲における単核細胞浸潤（6及び30 mg/kg/週群），26週間皮下投与試験では投与部位皮下織の出血及び脈管周囲における単核細胞浸潤（1，6及び30 mg/kg/週群）が認められ，皮下投与による NOAEL は30 mg/kg/週と判断された。カニクイザルを用いた4週間静脈内投与試験（2.6.6.3.4）を実施した結果，APTT の短縮（10，30及び100 mg/kg/週群）が認められ，静脈内投与による NOAEL は100 mg/kg/週と判断された。

APTT の短縮

血液学的検査において，本薬の薬理作用と考えられる APTT の短縮が本薬投与全群で認められた。これらの変化には回復性が認められた。なお，他の血液学的検査における関連項目（D-ダイマー，FDP，PT 及びフィブリノーゲン）の異常及び病理学的検査における本薬の薬理作用から危惧される所見（血栓及び出血）は認められなかった。

投与部位反応

臨床第 I 相試験使用製剤と同一処方の溶媒及び本薬溶液（高用量群用の投与液濃度は臨床第 I 相試験使用製剤とほぼ同じ濃度である80.3 mg/mL あるいは81.7 mg/mL）を投与した13週間皮下投与試験（2.6.6.3.2）及び26週間皮下投与試験（2.6.6.3.3）では，投与期間終了時の病理学的検査において，回復性のある投与部位反応（剖検での皮下の暗赤色部や赤色斑，組織学的検査での皮下織の出血及び脈管周囲における単核細胞浸潤）が認められた。これらの投与部位反応は，13週間皮下投与試験の投与期間終了時に対照群を含む全群で投与部位反応

（剖検での皮下の暗赤色部と，これに伴った組織学的な変化である皮下織の出血あり）が認められていること，タンパク質製剤の皮下投与による投与部位反応が一般に報告されていることから[1)-6)]，本薬特異的な毒性ではないと判断した。

曝露量比較

カニクイザルを用いた反復投与試験のNOAELにおける曝露量と臨床試験の用法•用量における曝露量を比較した（表 2.6.6.10-1）。皮下投与による反復投与試験について，各試験のNOAEL（30 mg/kg/週）における曝露量（C_{max} 及び AUC_{0-7d}）は，臨床試験の用法•用量（最大3 mg/kg/週）における曝露量と比較して，約10倍の安全域が確保されている。また，静脈内投与による反復投与試験について，各試験の NOAEL（100 mg/kg/週）における曝露量（C_0及び AUC_{0-7d}）は，臨床試験の用法•用量（最大3 mg/kg/週）における曝露量と比較して，10倍以上の安全域が確保されている。

表 2.6.6.10-1 カニクイザル反復投与試験の無毒性量（NOAEL）における曝露量と臨床試験の用法•用量における曝露量との比較

動物種		カニクイザル	カニクイザル	カニクイザル	血友病A患者[a]
試験の種類		13週間皮下投与試験のNOAEL	26週間皮下投与試験のNOAEL	4週間静脈内投与試験のNOAEL	第III相試験の用法•用量
投与期間，投与経路		13週間，皮下	26週間，皮下	4週間，静脈内	定常状態，皮下
投与頻度		週1回	週1回	週1回	週1回
投与量（mg/kg/週）		30	30	100	3（負荷投与，週1回4週間），その後1.5（維持投与，週1回）
資料番号（試験番号）		4.2.3.2-2 (TOX[redacted]-0057)	4.2.3.2-3 (TOX[redacted]-0007)	4.2.3.2-4 (TOX[redacted]-0021)	5.3.3.5-1 (ACE001JP Part C, ACE002JP, BH29884, BH29992)
平均 C_{max} (μg/mL)	雌雄平均（雄平均/雌平均）	1135 (1200/1070)[b]	1355 (1340/1370)[c]	3555 (3550/3560)[d]	56.5[e]
	曝露量比[f]	20	23	62	
平均 AUC_{0-7d} (μg•d/mL)	雌雄平均（雄平均/雌平均）	6965 (7360/6570)[b]	8755 (8680/8830)[c]	15400 (14400/16400)[d]	386[g]
	曝露量比[f]	18	22	39	

[a] インヒビター保有•非保有及び成人•青年•小児の血友病A患者含む
[b] カッコ内の平均値（5例）は最終投与（第13回投与）時のデータを用いた
[c] カッコ内の平均値（5例）は最終投与（第26回投与）時のデータを用いた（ただし，雄の1例にADA産生が認められたため4例となる）
[d] カッコ内の平均値（5例）は最終投与（第4回投与）時のデータを用いた（ただし，静脈内投与のため C_{max} ではなく C_0で示した）
[e] 平均 $C_{max,ss}$ (μg/mL)
[f] 曝露量比はカニクイザルでの曝露量（雌雄平均）をヒトでの曝露量で除した
[g] 平均 $AUC_{1week,ss}$ (μg•d/mL)

本薬はバイオテクノロジー応用医薬品であることから，ICH S6(R1)ガイドラインで示されている考え方に従い，遺伝毒性試験及びがん原性試験は実施していない。本薬のがん原性に関する懸念は，本薬の反復投与試験及び臨床試験の結果，並びに同効の製品での安全性プロファイルから低いと判断した。

精子検査及び月経周期の確認，並びに雌雄生殖器の病理学的検査を含むカニクイザルを用いた皮下及び静脈内投与による反復投与試験において，本薬投与に起因した毒性が皮下投与の30 mg/kg/週及び静脈内投与の100 mg/kg/週までの用量で認められていないことから，本薬投与が受胎能に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。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ていないが，同効の製品における安全性プロファイル及び文献情報（IgG の胎盤通過性[27]，血液凝固亢進状態と不育症の関連性[28]等）から，正常動物への本薬過量投与時に，凝固亢進による個体発生に関連した毒性発現の懸念があると評価した。妊婦，産婦，授乳婦等への投与に関する安全性は確認されていない。

ヒト正常組織を用いた組織交差反応性試験において，本薬に対する特異的な染色が肝臓，副腎，甲状腺及び骨髄の細胞質内に認められたが，ヒト化抗体である本薬が細胞膜を通過する可能性は低いことから，これらの器官に関連する本薬の副作用が発現する可能性は低いと考えられた。健康成人の全血を用いたサイトカイン放出に関する *in vitro* 試験において，本薬によるサイトカイン誘導は，低リスク対照薬であるパニツムマブと同程度であったため，本薬の皮下投与によるサイトカイン放出症候群の発症リスクは低いと考えられた。

ICH M3(R2)ガイドラインで示されている考え方に従い，反復投与試験及び臨床試験の結果，並びに同効の製品における小児集団での安全性プロファイルから，本薬の安全性に関する小児特異的な懸念はないと評価したため，幼若動物試験は実施していない。

本剤に含まれる L-アスパラギン酸濃度[redacted] mg/mL から算出された1日最大使用量である25.9 mg は，医薬品添加物としての皮下投与による使用前例はなく，当局相談において， L-アスパラギン酸は新添加物に該当することが確認された[43]。そこで，L-アスパラギン酸の皮下投与による安全性を，L-アスパラギン酸に関する文献情報及び本薬の反復皮下投与試験の対照群（臨床用製剤に含まれる添加剤と同一組成であり L-アスパラギン酸を含む溶媒を投与した群）の結果を用いて評価した。その結果，L-アスパラギン酸の特異的な影響は認められなかったことから，本剤に含まれる L-アスパラギン酸の皮下投与による1日最大使用量25.9 mg について，安全性に関する懸念はないと判断した。

2.6.6.11 図表

図表は本文中に示した。

2.6.6.12 参考文献

1) Tabrizi MA, Roskos LK. Preclinical and clinical safety of monoclonal antibodies. Drug Discov Today 2007 Jul;12(13-14):540-7.
2) Catapano AL, Papadopoulos N. The safety of therapeutic monoclonal antibodies: implications for cardiovascular disease and targeting the PCSK9 pathway. Atherosclerosis 2013 May;228(1):18-28.
3) Jolles S, Borte M, Nelson RP Jr, Rojavin M, Bexon M, Lawo JP, et al.. Long-term efficacy, safety, and tolerability of Hizentra® for treatment of primary immunodeficiency disease. Clin Immunol 2014 Feb;150(2):161-9.
4) Kanegane H, Imai K, Yamada M, Takada H, Ariga T, Bexon M, et al. Efficacy and safety of IgPro20, a subcutaneous immunoglobulin, in Japanese patients with primary immunodeficiency diseases. J Clin Immunol 2014 Feb;34(2):204-11.
5) Maeder W, Lieby P, Sebald A, Spycher M, Pedrussio R, Bolli R. Local tolerance and stability up to 24 months of a new 20% proline-stabilized polyclonal immunoglobulin for subcutaneous administration. Biologicals 2011 Jan;39(1):43-9.
6) Mocci G, Marzo M, Papa A, Armuzzi A, Guidi L. Dermatological adverse reactions during anti-TNF treatments: Focus on inflammatory bowel disease. J Crohn's Colitis 2013 Nov;7(10):769-79.

7) Obeck DK, Toft II JD, Dupuy HJ. Severe polyarthritis in a rhesus monkey: suggested mycoplasma etiology. Lab Anim Sci 1976;26:613-8.
8) Lipman NS, Schelling SH, Otto G, Murphy JC. Juvenile rheumatoid arthritis in a rhesus monkey (Macaca mulatta). J Med Primatol 1991;20:82-8.
9) Bywaters EGL. Observations on chronic polyarthritis in monkeys. J R Soc Med 1981;74:794-799.
10) [redacted] Difference of measurement reaction between the APTT reagents, Actin FSL and Actin, in the in vitro assay using cynomolgus monkey plasma treated with CH5534262 (Study No. TOX[redacted]-0055). Chugai Pharmaceutical Co., Ltd. In-house report, [redacted].
11) Lawrie AS, Kitchen S, Efthymiou M, Mackie IJ, Machin SJ. Determination of APTT factor sensitivity--the misguiding guideline. Int J Lab Hematol 2014 Dec;35(6):652-7.
12) Greaves P. Endocrine glands: Histopathology of preclinical toxicity studies – interpretation and relevance in drug safety evaluation. 4th ed. Academic Press; 2012. pp. 751-2.
13) Haruyama E, Suda M, Ayukawa Y, Kamura K, Mizutamari M, Ooshima Y, et al. Testicular development in cynomolgus monkeys. Toxicol Pathol 2012 Aug;40(6):935-42.
14) Mital P, Hinton BT, Dufour JM. The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. Biol Reprod 2011 May; 84(5): 851-8.
15) Cheng CY, Mruk DD. The blood-testis barrier and its implications for male contraception. Pharmacol Rev 2012;64:16-64.
16) 茶谷文雄. 医薬品の精巣毒性. 日薬理誌 2009;133:82-6.
17) Thomas MJ, Thomas JA. Toxic responses of the reproductive system. In: Klaassen CD editor. Casarett and Doull's Toxicology, The basic science of poisons. 6th ed. New York: McGraw-Hill;2001. p689.
18) Albassam MA, Lillie LE, Smith GS. Asymptomatic polyarteritis in a cynomolgus monkey. Lab Anim Sci 1993;43:628-9.
19) Porter BF, Frost P, Hubbard GB. Polyarteritis nodosa in a cynomolgus macaque (Macaca fascicularis). Vet Pathol 2003;40:570-3.
20) McCormack PL, Plosker GL. Octocog alfa, plasma/albumin-free method. Drugs 2005;65(18):2613-20, discussion 21-2.
21) Tarantino MD, Collins PW, Hay CRM, Shapiro AD, Gruppo RA, Berntorp E, et al. RAHF-PFM Clinical Study Group. Clinical evaluation of an advanced category antihaemophilic factor prepared using a plasma/albumin-free method: pharmacokinetics, efficacy, and safety in previously treated patients with haemophilia A. Haemophilia 2004 Sep;10(5):428-37.
22) Négrier C, Shapiro A, Berntorp E, Pabinger I, Tarantino M, Retzios A, et al.. Surgical evaluation of a recombinant factor VIII prepared using a plasma/albumin-free method: efficacy and safety of Advate in previously treated patients. Thromb Haemost 2008 Aug;100(2):217-23.
23) Blanchette VS, Shapiro AD, Liesner RJ, Hernández Navarro F, Warrier I, Schroth PC, et al. rAHF-PFM Clinical Study Group. Plasma and albumin-free recombinant factor VIII: pharmacokinetics, efficacy and safety in previously treated pediatric patients. J Thromb Haemost 2008 Aug;6(8):1319-26.
24) Valentino LA, Mamonov V, Hellmann A, Quon DV, Chybicka A, Schroth P, et al. Prophylaxis Study Group. A randomized comparison of two prophylaxis regimens and a paired comparison of on-demand and prophylaxis treatments in hemophilia A management. J Thromb Haemost 2012 Mar;10(3):359-67.
25) Iorio A, Marcucci M, Cheng J, Oldenburg J, Schoenig-Diesing C, Matovinovic E, et al. Patient data meta-analysis of Post-Authorization Safety Surveillance (PASS) studies of haemophilia A patients treated with rAHF-PFM. Haemophilia 2014 Nov;20(6):777-83.
26) CAD review by FDA-CAC (SDN[redacted], dated [redacted]).

27) Pentsuk N, van der Laan JW. An interspecies comparison of placental antibody transfer: new insights into developmental toxicity testing of monoclonal antibodies. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol 2009;86:328-44.

28) Sotiriadis A, Makrigiannakis A, Stefos T, Paraskevaidis E, Kalantaridou SN. Fibrinolytic defects and recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis. Obstet Gynecol 2007 May;109(5):1146-55.

29) Chung CH. Managing premedications and the risk for reactions to infusional monoclonal antibody therapy. The Oncologist 2008 Jun;13(6):725-32.

30) Wing MG, Moreau T, Greenwood J, Smith RM, Hale G, Isaacs J, Waldmann H, Lachmann PJ, Compston A. Mechanism of first-dose cytokine-release syndrome by CAMPATH 1-H: involvement of CD16 (FcγRIII) and CD11a/CD18 (LFA-1) on NK cells. J Clin Invest 1996;98:2819-26.

31) Bugelski PJ, Achuthanandam R, Capocasale RJ, Treacy G, Bouman-Thio E. Monoclonal antibody-induced cytokine-release syndrome. Expert Rev Clin Immunol 2009;5: 499-521.

32) Clatworthy MR, Sivaprakasam R, Butler AJ, Watson CJE. Subcutaneous administration of alemtuzumab in simultaneous pancreas-kidney transplantation. Transplantation 2007;84:1563-7.

33) Morford LL, et al. Preclinical safety evaluations supporting pediatric drug development with biopharmaceuticals: strategy, challenges, current practices. Birth Defects Research (part B) 2011;92:359-80.

34) Schwartz RS, Abildgaard CF, Aledort LM, Arkin S, Bloom AL, Brackmann HH, et al. Human recombinant DNA-derived antihemophilic factor (factor VIII) in the treatment of hemophilia A. N Engl J Med 1990 Dec 27;323(26):1800-5.

35) 福井 弘, 森 和夫, 石川 正明, 柴田 昭, 高橋 芳右, 藤巻 道男ほか. 遺伝子組換えヒト第VIII 因子製剤 BAY w 6240の多施設共同による臨床的検討（長期投与試験）. 日本輸血学会雑誌 1991;37(5):593-604.

36) Fukui H, Yoshioka A, Shima M, Tanaka I, Koshihara K, Fukutake K, et al. Clinical evaluation of recombinant human factor VIII (BAY w 6240) in the treatment of hemophilia A. Int J Hematol 1991 Oct;54(5):419-27.

37) Yoshioka A, Shima M, Fukutake K, Takamatsu J, Shirahata A. Kogenate FS Study Group. Safety and efficacy of a new recombinant FVIII formulated with sucrose (rFVIII-FS) in patients with haemophilia A: a long-term, multicentre clinical study in Japan. Haemophilia 2001 May;7(3):242-9.

38) Kreuz W, Gill JC, Rothschild C, Manco-Johnson MJ, Lusher JM, Kellermann E, Gorina E, Larson PJ. International Kogenate-FS Study Group. Full-length sucrose-formulated recombinant factor VIII for treatment of previously untreated or minimally treated young children with severe haemophilia A: results of an international clinical investigation. Thromb Haemost 2005 Mar;93(3):457-67.

39) Shirahata A, Fukutake K, Takamatsu J, Shima M, Yoshioka A. Pharmacokinetics, prophylactic effects, and safety of a new recombinant FVIII formulated with sucrose (BAY 14-2222) in Japanese patients with hemophilia A. Int J Hematol 2000 Jul;72(1):101-7.

40) Giles AR, Tinlin S, Hoogendoorn H, Fournel MA, Ng P, Pancham N. *In vivo* characterization of recombinant factor VIII in a canine model of hemophilia A (factor VIII deficiency). Blood 1988 Jul;72(1):335-9.

41) Revel-Vilk S. The conundrum of neonatal coagulopathy. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2012;2012:450-4.

42) Andrew M, Paes B, Milner R, Johnston M, Mitchell L, Tollefsen DM, et al. Development of the human coagulation system in the full-term infant. Blood 1987 Jul;70(1):165-72.

43) 簡易相談（平成[redacted]年[redacted]月[redacted]日実施）結果要旨.

44) WHO FOOD ADDITIVES SERIES: 54. Safety evaluation of certain food additives. AMINO ACID AND RELATED SUBSTANCES. pp. 435-86. Prepared by the Sixty-third meeting of the Joint

FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA).
45) 対象外物質評価書 アスパラギン，2012年10月．食品安全委員会.
46) 井村賢治，福井雄一，川原央好，八木誠，鎌田振吉，高木洋治ほか．新生児用アミノ酸輸液の検討―各アミノ酸投与量の検討並びに新組成の提唱―．日本小児外科学会雑誌 1987;23(5):826-42.
47) 岡田正，鎌田振吉，藤野俊夫，松本陽一，窪田昭男．小児用アミノ酸輸液 PF-IV の臨床報告：有効性・安全性並びに至適用量の検討．JJPEN 1992;14(4):537-60.
48) 岡田正，鎌田振吉，大井龍司，遠藤昌夫，岩淵眞，美濃眞ほか．小児用アミノ酸輸液 PF-IV の臨床報告：多施設による比較試験．JJPEN 1992;14(4):561-94.
49) 岡田正，鎌田振吉，大井龍司，遠藤昌夫，岩淵眞，美濃眞ほか．小児用アミノ酸輸液 PF-IV の臨床報告：多施設による無対照試験．JJPEN 1992;14(4):595-622.
50) 厚生労働省ホームページ，職場のあんぜんサイト，L-アスパラギン酸の変異原性試験結果.
51) 佐藤博，岩渕眞．小児用成分栄養剤（ED-P）の多施設臨床試験成績．JJPEN 1985;6(6):803-23.
52) Odajima H, Ebisawa M, Nagakura T, Fujisawa T, Akasawa A, Ito K, et al. Omalizumab in Japanese children with severe allergic asthma uncontrolled with standard therapy. Allergol Int 2015 Oct;64(4):364-70.

ヘムライブラ皮下注30 mg
ヘムライブラ皮下注60 mg
ヘムライブラ皮下注90 mg
ヘムライブラ皮下注105 mg
ヘムライブラ皮下注150 mg
（エミシズマブ（遺伝子組換え））

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
APTT	activated partial thromboplastin time	活性化部分トロンボプラスチン時間
AUC	area under the plasma concentration-time curve	血漿中濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}7d}$	area under the plasma concentration-time curve from 0 to 7 days	投与後7日までの AUC
C_0	the initial concentration at time 0 calculated by extrapolation	初期血漿中濃度
C_{max}	maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
CRP	C-reactive protein	C 反応性蛋白
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
FDP	fibrin and fibrinogen degradation product	フィブリン・フィブリノーゲン分解産物
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 Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for human use	医薬品規制調和国際会議
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IL	interleukin	インターロイキン
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
PT	prothrombin time	プロトロンビン時間
SC	subcutaneous	皮下投与
SD	standard deviation	標準偏差
$t_{1/2}$	elimination half-life	消失半減期
T_{max}	time to maximum plasma concentration	最高血漿中濃度到達時間
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 単回投与毒性試験 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 カニクイザル4週間皮下投与試験（用量設定試験） 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13週間皮下投与試験（13週間回復性試験） 10
2.6.7.7.2 カニクイザル26週間皮下投与試験（13週間回復性試験） 12
2.6.7.7.3 カニクイザル4週間静脈内投与試験（4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 16
2.6.7.11.1.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 16
2.6.7.11.1.2 胚•胎児発生に関する試験 16
2.6.7.11.1.3 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
2.6.7.12 新生児を用いた試験 16
2.6.7.13 局所刺激性試験 16
2.6.7.14 その他の毒性試験 17
2.6.7.14.1 組織交差反応性試験：重要な試験以外の試験 17
2.6.7.14.2 組織交差反応性試験：重要な試験 18
2.6.7.14.3 サイトカイン放出に関する *in vitro* 試験：重要な試験以外の試験 19

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: emicizumab

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/week [a])	GLP Compliance	Testing Facility	Study No. (CTD Location)
Repeat-Dose Toxicity	Cynomolgus monkey	SC	4 weeks	0, 1, 6, 30	No	Chugai	TOX[redacted]-5089 (4.2.3.2-1)
Repeat-Dose Toxicity	Cynomolgus monkey	SC	13 weeks with 13 weeks recovery	0, 1, 6, 30	Yes	Chugai	TOX[redacted]-0057 (4.2.3.2-2)
Repeat-Dose Toxicity	Cynomolgus monkey	SC	26 weeks with 13 weeks recovery	0, 1, 6, 30	Yes	[redacted]	TOX[redacted]-0007 (4.2.3.2-3)
Repeat-Dose Toxicity	Cynomolgus monkey	IV	4 weeks with 4 weeks recovery	0, 10, 30, 100	Yes	[redacted]	TOX[redacted]-0021 (4.2.3.2-4)
Other Toxicity Studies Tissue cross-reactivity	Cynomolgus monkey and human tissues	*In vitro*	NA	10, 20, 50, 100, 200 µg/mL	No	[redacted]	[redacted] (4.2.3.7.7-1)
Other Toxicity Studies Tissue cross-reactivity	Human tissues	*In vitro*	NA	10, 50 µg/mL	Yes	[redacted]	TOX[redacted]-0072 (4.2.3.7.7-2)
Other Toxicity Studies Cytokine release	Human whole blood cells	*In vitro*	NA	0.1, 1, 10, 100 µg/mL	No	Chugai	TOX[redacted]-0083 (4.2.3.7.7-3)

GLP = Good Laboratory Practice; SC = subcutaneous; IV = intravenous; NA = not applicable.
[a] Doses expressed as emicizumab, and doses in mg/kg/week unless otherwise specified.
Notes: Chugai = Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.; [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: emicizumab

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (mg/kg/week [a])	GLP Compliance	Study No. (CTD Location)
Repeat-Dose Toxicity (4 weeks)	Cynomolgus monkey	SC	0, 1, 6, 30	No	TOX[redacted]-5089 (4.2.3.2-1)
Repeat-Dose Toxicity (13 weeks with 13 weeks recovery)	Cynomolgus monkey	SC	0, 1, 6, 30	Yes	TOX[redacted]-0057 (4.2.3.2-2)
Repeat-Dose Toxicity (26 weeks with 13 weeks recovery)	Cynomolgus monkey	SC	0, 1, 6, 30	Yes	TOX[redacted]-0007 (4.2.3.2-3)
Repeat-Dose Toxicity (4 weeks with 4 weeks recovery)	Cynomolgus monkey	IV	0, 10, 30, 100	Yes	TOX[redacted]-0021 (4.2.3.2-4)

GLP = Good Laboratory Practice; SC = subcutaneous; IV = intravenous.

[a] Doses expressed as emicizumab, and doses in mg/kg/week unless otherwise specified.

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: emicizumab

Doses (mg/kg/week [a])	Method of Administration	Cynomolgus Monkey							
		Mean C_{max} (μg/mL)				Mean $AUC_{0\text{-}7d}$ (μg•d/mL)			
		Male		Female		Male		Female	
1	SC	ND	(TOX[redacted]-5089)	ND	(TOX[redacted]-5089)	863	(TOX[redacted]-5089)	818	(TOX[redacted]-5089)
		40.7 [c]	(TOX[redacted]-0057)	41.6 [b]	(TOX[redacted]-0057)	267 [c]	(TOX[redacted]-0057)	242 [b]	(TOX[redacted]-0057)
		52.0 [b]	(TOX[redacted]-0007)	48.2 [c]	(TOX[redacted]-0007)	339 [b]	(TOX[redacted]-0007)	284 [c]	(TOX[redacted]-0007)
6	SC	ND	(TOX[redacted]-5089)	ND	(TOX[redacted]-5089)	4896	(TOX[redacted]-5089)	7177	(TOX[redacted]-5089)
		211 [c]	(TOX[redacted]-0057)	264 [b]	(TOX[redacted]-0057)	1310 [c]	(TOX[redacted]-0057)	1690 [b]	(TOX[redacted]-0057)
		358 [b]	(TOX[redacted]-0007)	262 [b]	(TOX[redacted]-0007)	2360 [b]	(TOX[redacted]-0007)	1670 [b]	(TOX[redacted]-0007)
30	SC	ND	(TOX[redacted]-5089)	ND	(TOX[redacted]-5089)	26623	(TOX[redacted]-5089)	21322	(TOX[redacted]-5089)
		1200	(TOX[redacted]-0057)	1070	(TOX[redacted]-0057)	7360	(TOX[redacted]-0057)	6570	(TOX[redacted]-0057)
		1340 [b]	(TOX[redacted]-0007)	1370	(TOX[redacted]-0007)	8680 [b]	(TOX[redacted]-0007)	8830	(TOX[redacted]-0007)
10	IV	406 [d]	(TOX[redacted]-0021)	453 [d]	(TOX[redacted]-0021)	1810	(TOX[redacted]-0021)	1980	(TOX[redacted]-0021)
30	IV	1430 [d]	(TOX[redacted]-0021)	1270 [d]	(TOX[redacted]-0021)	5140	(TOX[redacted]-0021)	5520	(TOX[redacted]-0021)
100	IV	3550 [d]	(TOX[redacted]-0021)	3560 [d]	(TOX[redacted]-0021)	14400	(TOX[redacted]-0021)	16400	(TOX[redacted]-0021)
Studies (CTD Location)		TOX[redacted]-5089 (4.2.3.2-1) : at 1st dose (4-week SC, dose range-finding, non-GLP) TOX[redacted]-0057 (4.2.3.2-2): at 13th dose (13-week SC, GLP) TOX[redacted]-0007 (4.2.3.2-3): at 26th dose (26-week SC, GLP) TOX[redacted]-0021 (4.2.3.2-4): at 4th dose (4-week IV, GLP)							

SC = subcutaneous; IV = intravenous; ND = not determined.

[a] Doses expressed as emicizumab; [b] one animal with anti-drug antibody production was observed; [c] two animals with anti-drug antibody production were observed; [d] values expressed as C_0.

Note: The animals with confirmed anti-drug antibody production were excluded.

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: emicizumab

Batch No./Lot No.	Purity (%)	Specified Impurities	Unspecified Impurities	Total Impurities	Study No. (CTD Location)	Type of Study
[redacted]	[redacted] [a]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted] (4.2.3.7.7-1)	Other Toxicity Studies (Tissue cross-reactivity, non-GLP)
[redacted]	[redacted] [b]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	TOX[redacted]-5089 (4.2.3.2-1)	Repeat-Dose Toxicity (4-week SC, dose range-finding, non-GLP)
[redacted]	[redacted]	[redacted]	SE-HPLC (area%) [redacted] AE-HPLC (area%) [redacted] CE-HPLC (area%) [redacted]	Nonreduced CE-SDS (%CPA) [redacted]	TOX[redacted]-0083 (4.2.3.7.7-3)	Other Toxicity Studies (Cytokine release, non-GLP)
					TOX[redacted]-0057 (4.2.3.2-2)	Repeat-Dose Toxicity (13-week SC, GLP)
					TOX[redacted]-0072 (4.2.3.7.7-2)	Other Toxicity Studies (Tissue cross-reactivity, GLP)
[redacted]	[redacted]	[redacted]	SE-HPLC (area%) [redacted] AE-HPLC (area%) [redacted] CE-HPLC (area%) [redacted]	Nonreduced CE-SDS (%CPA) [redacted]	TOX[redacted]-0007 (4.2.3.2-3)	Repeat-Dose Toxicity (26-week SC, GLP)
					TOX[redacted]-0021 (4.2.3.2-4)	Repeat-Dose Toxicity (4-week IV, GLP)

AE-HPLC = anion exchange high performance liquid chromatography; CE-HPLC = cation exchange high performance liquid chromatography; CE-SDS = capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate; %CPA = percent corrected peak area; [redacted]; IV = intravenous; [redacted]; NA = not applicable; NE = not examined; ND = not detected; SC = subcutaneous; SE-HPLC = size exclusion high performance liquid chromatography.

[a] Purity was mentioned based on the data of Lot No. [redacted]. The Lot No. [redacted] was prepared from the Lot No. [redacted]; [b] Purity was mentioned based on the data of Lot No. [redacted]. The Lot No. [redacted] was prepared from the Lot No. [redacted].

2.6.7.5 単回投与毒性試験

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　カニクイザル4週間皮下投与試験（用量設定試験）

表 2.6.7.6-1　カニクイザル4週間皮下投与試験（用量設定試験）

Test Article: emicizumab
Study No.: TOX[redacted]-5089
CTD Location: 4.2.3.2-1

Species/ Strain	Method of adminis-tration	Duration of Dosing	Gender and No. per Group	Doses (mg/kg/week)	Mean C_{max} (µg/mL) M/F	Mean AUC_{0-7d} (µg•d/mL) M/F	Noteworthy Findings
Cynomolgus monkey [a]	SC	4 weeks (dose range-finding)	1M and 1F	0 (control, vehicle [b])	BLQ	ND	Shortening of APTT in all groups receiving emicizumab, which was attributed to the pharmacological action of emicizumab.
				1	ND	1st dose: 863/818	
				6	ND	1st dose: 4896/7177	
				30	ND	1st dose: 26623/21322	
							Reversibility: Not determined in this study NOAEL: 30 mg/kg/week

SC = subcutaneous; M = male; F = female; NOAEL = no observed adverse effect level; BLQ = below the limit of quantification (< 0.01 µg/mL); ND = not determined.
[a] Vietnamese, monkeys were 3 to 4 years of age at the start of dosing; [b] Vehicle/Formulation,150 mmol/L arginine-aspartate buffer containing 20 mmol/L histidine and 0.5 mg/mL poloxamer 188, pH 6.0.

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13週間皮下投与試験（13週間回復性試験）

表 2.6.7.7.1-1　カニクイザル13週間皮下投与試験（13週間回復性試験）

Report Title: A 13-week subcutaneous intermittent dose (once weekly, 14 doses) toxicity study of CH5534262 in cynomolgus monkeys followed by a 13-week recovery period

Test Article: emicizumab
Species/Strain: Cynomolgus monkey (Vietnamese)
Duration of Dosing: 13 weeks
Study No.: TOX[redacted]-0057
Initial Age: 3 years of age at the start of dosing
Duration of Postdose: 13 weeks
CTD Location: 4.2.3.2-2
Date of First Dose: [redacted]
Method of Administration: Subcutaneous injection, once weekly
Vehicle/Formulation: 20 mmol/L histidine-aspartate buffer containing 150 mmol/L arginine-aspartate and 0.5 mg/mL poloxamer 188, pH 6.0
GLP Compliance: Yes
NOAEL: 30 mg/kg/week
Special Features: Neurobehavioral function (functional observational battery) in clinical observations

Dose (mg/kg/week)	**0 (Control, vehicle)**		**1**		**6**		**30**	
Number of Animals (Recovery)	**M: 5 (2)**	**F : 5 (2)**	**M : 5 (2)**	**F : 4 [a] (2)**	**M : 5 (2)**	**F : 5 (2)**	**M : 5 (2)**	**F : 5 (2)**
Toxicokinetics: emicizumab								
Number of Animals	5	5	5	4 [a]	5	5	5	5
Mean C_{max} [b] (μg/mL) 13th dose	BLQ	BLQ	40.7 ± 2.2	41.6 ± 5.9	211 ± 42	264 ± 13	1200 ± 290	1070 ± 210
Mean $AUC_{0\text{-}7d}$ [b] (μg•d/mL) 13th dose	Not determined	Not determined	267 ± 7	242 ± 36	1310 ± 310	1690 ± 80	7360 ± 1600	6570 ± 1090
Anti-Emicizumab Antibody:								
Confirmed Production	0	0	2	1	2	1	0	0
Confirmed Neutralizing activity	0	0	0	0	1	1	0	0
Noteworthy Findings								
Hematology:								
APTT (sec) : Dosing Period								
Day -11 (Before)	23.74 ± 2.18	23.64 ± 2.10	23.52 ± 1.34	24.35 ± 0.78	24.20 ± 1.19	24.28 ± 0.77	23.92 ± 0.99	23.48 ± 1.43
Day 4	24.10 ± 2.35	23.56 ± 1.56	22.50 ± 1.23	22.70 ± 0.88	21.94 ± 1.28*	21.50 ± 0.67**	21.16 ± 0.78**	20.64 ± 1.02**
Day 8	23.70 ± 1.88	23.34 ± 1.59	22.60 ± 1.12	23.15 ± 0.66	22.10 ± 1.33*	21.60 ± 0.47**	21.12 ± 0.70**	20.62 ± 0.74**
Day 43	23.44 ± 2.04	22.96 ± 1.86	21.58 ± 1.04	21.83 ± 1.11	22.30 ± 2.34	20.72 ± 0.74**	20.96 ± 0.64*	20.30 ± 1.10**
Day 92	23.58 ± 2.00	23.14 ± 1.86	21.18 ± 1.21*	21.58 ± 0.85*	21.98 ± 2.22*	20.82 ± 0.95**	21.00 ± 0.79*	20.50 ± 1.19**
Day 95	22.98 ± 1.90	23.32 ± 1.87	20.96 ± 0.83	21.80 ± 0.68*	21.46 ± 2.08	20.88 ± 0.83**	20.88 ± 0.73	20.80 ± 1.01**

BLQ = below the limit of quantification (< 0.01 μg/mL); M = male; F = female; - = no noteworthy findings. Data were shown in Mean ± SD. *P < 0.05, **P < 0.01: Statistical analysis was performed using the decision tree in toxicological software.

[a] One female (animal number 5201) in the 1 mg/kg group was excluded due to the incidental polyarthritis. This animal was subjected to unscheduled necropsy on the day after the seventh dose due to worsening of general condition; [b] The animals with confirmed anti-drug antibody production were excluded.

表 2.6.7.7.1-1 カニクイザル13週間皮下投与試験（13週間回復性試験）（続）

Dose (mg/kg/week)	**0 (Control, vehicle)**		**1**		**6**		**30**	
Number of Animals (Recovery)	**M: 5 (2)**	**F : 5 (2)**	**M : 5 (2)**	**F : 4[a] (2)**	**M : 5 (2)**	**F : 5 (2)**	**M : 5 (2)**	**F : 5 (2)**
Gross Pathology: Day 95 (No. of Animals)								
Dark-red area (Injection site, subcutis):	0	1	1	1	0	2	0	1
Histopathology [e]: Day 95								
Perivascular infiltration of mononuclear cell in subcutis								
1st Injection site	0	0	0	0	0	0	0	0
5th Injection site	0	0	0	0	0	1 (+++)	0	0
9th Injection site	0	0	0	0	2 (++, +)	1 (+)	1 (+)	2 (+,+)
13th Injection site	0	0	0	0	1 (+)	1 (++)	0	1 (+)
14th Injection site	0	0	0	0	3 (+,+,+)	2 (+++,+)	2 (++,++)	2 (+,++)
Postdose Evaluation: Number Evaluated	**M: 2**	**F : 2**	**M : 2**	**F : 2**	**M : 2**	**F : 2**	**M : 2**	**F : 2**
Hematology:								
APTT (sec) : Recovery Period								
Day 127	22.15	23.10	21.80	22.70	23.15	20.60	21.15	20.25
Day 155	22.30	23.30	21.90	23.40	23.25	21.75	21.35	19.95
Day 183	22.30	23.30	22.85	23.45	24.70	22.30	22.70	20.50
Gross Pathology: Day 183	–	–	–	–	–	–	–	–
Histopathology [e]: Day 183								
Perivascular infiltration of mononuclear cell in subcutis								
5th Injection site	0	0	0	0	1(+)	0	0	0

M = male; F = female; – = no noteworthy findings. Data were shown in Mean.

[a] One female (animal number 5201) in the 1 mg/kg group was excluded due to the incidental polyarthritis. This animal was subjected to unscheduled necropsy on the day after the seventh dose due to worsening of general condition; [e] Number of animals (severity). Severity of lesion: + = minimal, ++ = slight, +++ = moderate.

2.6.7.7.2　カニクイザル26週間皮下投与試験（13週間回復性試験）

表 2.6.7.7.2-1　カニクイザル26週間皮下投与試験（13週間回復性試験）

Report Title: A 26-week intermittent dose (once weekly, 27 doses) subcutaneous administration toxicity study of CH5534262 in mature cynomolgus monkeys followed by a 13-week recovery period

Test Article: emicizumab

Species/Strain: Cynomolgus monkey (Vietnamese)　**Duration of Dosing:** 26 weeks　**Study No.:** TOX[redacted]-0007

Initial Age: 4 to 6 years of age at the start of dosing　**Duration of Postdose:** 13 weeks　**CTD Location:** 4.2.3.2-3

Date of First Dose: [redacted]　**Method of Administration:** Subcutaneous injection, once weekly

Vehicle/Formulation: 20 mmol/L histidine-aspartate buffer containing 150 mmol/L arginine-aspartate and 0.5 mg/mL poloxamer 188, pH 6.0　**GLP Compliance:** Yes　**NOAEL:** 30 mg/kg/week

Special Features: Assessments for effects on fertility (sperm analysis including measurement of testis size, checking menstrual cycles) in mature animals

Dose (mg/kg/week)	**0 (Control, vehicle)**		**1**		**6**		**30**	
Number of Animals (Recovery)	**M: 5 (2)**	**F : 5 (2)**	**M : 5 (2)**	**F : 5 (2)**	**M : 4 [a] (2)**	**F : 5 (2)**	**M : 5 (2)**	**F : 5 (2)**
Toxicokinetics: emicizumab								
Number of Animals	5	5	5	5	4 [a]	5	5	5
Mean C_{max} [b] (μg/mL) 26th dose	BLQ	BLQ	52.0 ± 5.6	48.2 ± 16.4	358 ± 89	262 ± 31	1340 ± 240	1370 ± 310
Mean $AUC_{0\text{-}7d}$ [b] (μg•d/mL) 26th dose	Not determined	Not determined	339 ± 34	284 ± 78	2360 ± 650	1670 ± 220	8680 ± 1540	8830 ± 1910
Anti-Emicizumab Antibody:								
Confirmed Production [c]	0	0	1	2	1	1	1	0
Confirmed Neutralizing activity	0	0	1	2	1	0	0	0

BLQ = below the limit of quantification (< 0.01 μg/mL); M = male; F = female. Data were shown in Mean ± SD.

[a] One male (Animal No. 10303) in the 6 mg/kg group was excluded due to the administration site swelling (an arthus reaction triggered by administration of a heteroprotein; type III hypersensitivity). This animal was prematurely necropsied on the day after the 22nd dose due to the very high levels of anti-drug antibodies production and the below the level of detection plasma emicizumab concentration; [b] The animals with confirmed anti-drug antibody production were excluded; [c] Among these six animals with confirmed anti-drug antibody production during the dosing period, anti-drug antibodies continued to be detected in two of the three animals for which a recovery period was established. In addition, anti-drug antibodies were newly detected in one of two males from the 1 mg/kg group, and in one of two females in both the 6 and 30 mg/kg groups.

Note: The APTT shortening that was attributed to the pharmacological action of emicizumab in the 13-week SC GLP was not seen in the 26-week SC GLP study. However, it has been confirmed from the findings of an *in vitro* study (Study No. TOX[redacted]-0055) that this event occurred as a result of different APTT values arising from the use of different APTT measurement reagents.

表 2.6.7.7.2-1 カニクイザル26週間皮下投与試験（13週間回復性試験）（続）

Dose (mg/kg/week)	**0 (Control, vehicle)**		**1**		**6**		**30**	
Number of Animals (Recovery)	**M: 5 (2)**	**F : 5 (2)**	**M : 5 (2)**	**F : 5 (2)**	**M : 4 [a] (2)**	**F : 5 (2)**	**M : 5 (2)**	**F : 5 (2)**
Noteworthy Findings								
Gross Pathology: Day 186 (No. of Animals)								
Dark-red area (Injection site, subcutis):	0	0	2	1	0	0	0	0
Histopathology [e]: Day 186								
Hemorrhage								
1st Injection site	0	0	2 (+, +++)	0	0	0	0	0
5th Injection site	0	0	2 (+, +)	0	1 (+)	0	0	0
9th Injection site	0	0	1 (+)	0	0	0	0	0
13th Injection site	0	0	0	0	0	0	0	1 (+)
14th Injection site	0	0	2 (++,++)	1 (++)	0	0	1 (+)	0
Perivascular infiltration of mononuclear cell in subcutis								
1st Injection site	0	0	0	0	0	0	0	0
5th Injection site	0	0	0	2 (++,++)	0	0	0	1 (++)
9th Injection site	0	0	0	1 (++)	0	2 (++,++)	0	2 (++,++)
13th Injection site	0	0	0	2 (++,+)	0	1 (++)	1 (++)	1 (++)
14th Injection site	0	1 (+)	0	2 (++,++)	0	2 (++,++)	2 (++,++)	1 (+)
Postdose Evaluation: Number Evaluated	**M: 2**	**F : 2**	**M : 2**	**F : 2**	**M : 2**	**F : 2**	**M : 2**	**F : 2**
Gross Pathology: Day 274	–	–	–	–	–	–	–	–
Histopathology [e]: Day 274								
Hemorrhage								
5th Injection site	0	0	1 (+)	0	0	0	0	0
9th Injection site	0	0	0	0	0	0	0	0
Perivascular infiltration of mononuclear cell in subcutis								
5th Injection site	0	0	0	0	0	0	0	2 (+, +)
9th Injection site	0	0	0	0	0	0	0	1 (+)

M = male; F = female; – = no noteworthy findings. Data were shown in Mean.

[a] One male (Animal No. 10303) in the 6 mg/kg group was excluded due to the administration site swelling (an arthus reaction triggered by administration of a heteroprotein; type III hypersensitivity). This animal was prematurely necropsied on the day after the 22nd dose due to the very high levels of anti-drug antibodies production and the below the level of detection plasma emicizumab concentration; [e] Number of animals (severity). Severity of lesion: + = minimal, ++ = slight, +++ = moderate. In addition, the first to the 13th dosing was conducted on injection site 1 to 13, and the 14th to the 27th dosing was conducted on injection site 1 to 14.

2.6.7.7.3　カニクイザル4週間静脈内投与試験（4週間回復性試験）

表 2.6.7.7.3-1　カニクイザル4週間静脈内投与試験（4週間回復性試験）

Report Title: A 4-week intermittent dose (once weekly, 5 doses) intravenous administration toxicity study of CH5534262 in cynomolgus monkeys followed by a 4-week recovery period

Test Article: emicizumab
Species/Strain: Cynomolgus monkey (Vietnamese)　**Duration of Dosing:** 4 weeks　**Study No.:** TOX[redacted]-0021
Initial Age: 3 to 4 years at the start of dosing　**Duration of Postdose:** 4 weeks　**CTD Location:** 4.2.3.2-4
Date of First Dose: [redacted]　**Method of Administration:** intravenous injection, once weekly
Vehicle/Formulation: 20 mmol/L histidine-aspartate buffer containing 150 mmol/L arginine-aspartate and 0.5 mg/mL poloxamer 188, pH 6.0　**GLP Compliance:** Yes　**NOAEL:** 100 mg/kg/week
Special Features: None

Dose (mg/kg/week)	**0 (Control, vehicle)**		**10**		**30**		**100**	
Number of Animals (Recovery)	**M: 5 (2)**	**F : 5 (2)**	**M : 3**	**F : 3**	**M : 3**	**F : 3**	**M : 5 (2)**	**F : 5 (2)**
Toxicokinetics: emicizumab								
Number of Animals	5	5	3	3	3	3	5	5
Mean C_0 (μg/mL)　4th dose	BLQ	BLQ	406 ± 56	453 ± 37	1430 ± 230	1270 ± 100	3550 ± 460	3560 ± 510
Mean $AUC_{0\text{-}7d}$ (μg•d/mL)　4th dose	Not determined	Not determined	1810 ± 250	1980 ± 210	5140 ± 420	5520 ± 640	14400 ± 2900	16400± 3000
Anti-Emicizumab Antibody:								
Confirmed Production	0	0	0	0	0	0	0	0
Confirmed Neutralizing activity	0	0	0	0	0	0	0	0
Noteworthy Findings								
Hematology:								
APTT (sec) : Dosing Period								
Day -7 (Before)	23.06 ± 1.24	24.64 ± 1.94	23.40 ± 0.44	24.80 ±1.65	23.53 ± 1.56	24.90 ± 0.95	23.84 ± 0.68	26.02 ± 1.53
Day 2	24.38 ± 1.22	25.24 ± 2.84	18.80 ± 0.36**	18.43 ± 1.16**	18.23 ± 0.85**	17.17 ± 0.80**	19.74 ±1.62**	18.74 ± 2.34**
Day 8	23.40 ± 0.98	23.78 ± 1.37	19.03 ± 0.85**	18.57 ± 1.04**	17.73 ± 0.64**	17.67 ± 0.72**	18.38 ± 1.40**	18.74 ± 1.63**
Day 22	23.78 ± 1.10	25.78 ± 1.61	18.40 ± 0.78**	18.43 ± 0.50**	18.80 ± 1.15**	18.27 ± 1.16**	18.34 ± 1.25**	20.88 ± 0.70**
Day 23	22.94 ± 1.02	24.12 ± 1.45	17.73 ± 0.98**	16.97 ± 1.20**	18.73 ± 0.42**	17.60 ± 1.81**	19.26 ± 0.93**	19.68 ± 1.72**
Day 29	24.44 ± 0.88	25.50 ± 2.06	17.60 ± 0.95**	17.60 ± 0.62**	18.90 ± 0.79**	18.07 ± 1.92**	19.68 ± 1.20**	20.00 ± 2.54**

BLQ = below the limit of quantification (< 0.01 μg/mL); M = male; F = female. Data were shown in Mean ± SD. *P < 0.05, **P < 0.01: Statistical analysis was performed using the decision tree in toxicological software.

表 2.6.7.7.3-1 カニクイザル4週間静脈内投与試験（4週間回復性試験）（続）

Dose (mg/kg/week)	0 (Control, vehicle)		10		30		100	
Number of Animals (Recovery)	M: 5 (2)	F : 5 (2)	M : 3	F : 3	M : 3	F : 3	M : 5 (2)	F : 5 (2)
Postdose Evaluation: Number Evaluated	M: 2	F : 2	M : 0	F : 0	M : 0	F : 0	M : 2	F : 2
Hematology:								
APTT (sec) : Recovery Period								
Day 43	24.15 ± 2.05	26.25 ± 3.18	Not applicable	Not applicable	Not applicable	Not applicable	20.35 ± 1.77	21.85 ± 1.48
Day 56	23.95 ± 1.20	25.90 ± 3.54	Not applicable	Not applicable	Not applicable	Not applicable	20.40 ± 0.71	19.05 ± 0.35

M = male; F = female. Data were shown in Mean ± SD.

Note: In 1 female (Animal No. 50403) in the 100 mg/kg group, abnormal blood test results (low white blood cell and platelet counts, low neutrophil count/ratio, and high fibrinogen, FDP, and D-dimer levels, etc.) and abnormal blood chemistry test results (high CRP level, etc.) were observed from the time of the tests performed prior to the fourth dose (Day 22). On the day after the fourth dose (Day 23), red blood cell count and hemoglobin level, etc. were low. At the tests conducted prior to the fifth dose (Day 29), the low platelet and neutrophil count/ratio and the high CRP level had almost returned to normal range. Pathological examination of this animal revealed polyarteritis (diagnosed based on histopathological findings of periarteritis in the liver, pancreas, stomach, and spleen) so the abnormal values seen from the time of the tests prior to the fourth dose on Day 22 were attributed to inflammatory changes. Although the mechanism of onset of polyarteritis was unclear, this event was deemed to be a spontaneous (i.e., due to genetic and environmental factors) case of polyarteritis (i.e., vasculitis). This conclusion was based on reports of spontaneous onset of polyarteritis in literature and the manner in which it occurred.

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

2.6.7.11.1.1 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。

2.6.7.11.1.2 胚•胎児発生に関する試験

該当試験なし。

2.6.7.11.1.3 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。

2.6.7.12 新生児を用いた試験

該当試験なし。

2.6.7.13 局所刺激性試験

該当試験なし。

2.6.7.14　その他の毒性試験

2.6.7.14.1　組織交差反応性試験：重要な試験以外の試験

表 2.6.7.14.1-1　組織交差反応性試験

Test Article: emicizumab
Study No.: [redacted]
CTD Location: 4.2.3.7.7-1

Species/ Strain	Method of administration	Duration of Dosing	Gender and No. per Group	Doses (μg/mL)	Noteworthy Findings
Cynomolgus monkey and human tissues (Tissue cross-reactivity, non-GLP)	*In vitro*	Not applicable	Appropriate conditions for the immunohistochemical staining of cryosections using emicizumab, FIX antibody, and FX antibody in a GLP study were investigated. Human and cynomolgus monkey liver and cerebellum, and human glioblastoma tissues were used (one to three donors per tissue type).	10, 20, 50, 100, 200	For the antibody concentrations used in the GLP human tissue cross-reactivity study, 50 μg/mL was deemed appropriate for emicizumab, 20 μg/mL for FIX antibody, and 100 μg/mL for FX antibody. No specific staining for emicizumab or FX antibodies for cynomolgus monkey liver was identified, so it was concluded that it would not be technically possible to detect binding sites of emicizumab in cynomolgus monkeys by immunohistochemical staining.

2.6.7.14.2　組織交差反応性試験：重要な試験

表 2.6.7.14.2-1　組織交差反応性試験

Test Article: emicizumab
Study No.: TOX[redacted]-0072
CTD Location: 4.2.3.7.7-2

Species/ Strain	Method of administration	Duration of Dosing	Gender and No. per Group	Doses (μg/mL)	Noteworthy Findings
Human tissue (Tissue cross-reactivity, GLP)	*In vitro*	Not applicable	Cryosections were immunohistochemically stained for emicizumab. Thirty-five types of normal human tissue (three donors per tissue type) were used.	10, 50	Specific staining was seen within the cytoplasm of liver, adrenal, thyroid, and bone marrow cells[a].

[a] Because these specific stains were seen in cytoplasm, and given the following pharmacological characteristics of emicizumab, it is unlikely that serious adverse drug reactions will develop in humans: (i) It is unlikely that emicizumab, a humanized antibody, will cross the cell membrane and interact directly within the cytoplasm of tissues which showed specific staining, (ii) emicizumab has no antigen-neutralizing effect, (iii) emicizumab does not have cytotoxic effects.

2.6.7.14.3　サイトカイン放出に関する *in vitro* 試験：重要な試験以外の試験

表 2.6.7.14.3-1　サイトカイン放出に関する *in vitro* 試験

Test Article: emicizumab
Study No.: TOX[redacted]-0083
CTD Location: 4.2.3.7.7-3

Species/ Strain	Method of administration	Duration of Dosing	Gender and No. per Group	Doses (μg/mL)	Noteworthy Findings
Human whole blood cells (Cytokine release, non-GLP)	*In vitro*	Not applicable	Emicizumab, low-risk reference antibody (panitumumab), or high-risk reference antibody (alemtuzumab) was added to blood (fresh whole blood from 10 healthy adult donors per group). Cytokine (IL-8, IL-6 and TNF-α) levels were determined after incubation for 24 hours.	0.1, 1, 10, 100	No significant differences were seen between the emicizumab group and the low-risk reference antibody (panitumumab) group.