ヘルニコア®椎間板注用 1.25 単位
コンドリアーゼ

2.6.6 毒性試験の概要文

生化学工業株式会社

目次

2.6.6 毒性試験の概要文 5
2.6.6.1 まとめ 5
2.6.6.2 単回投与毒性試験 10
2.6.6.2.1 椎間板内投与試験 10
2.6.6.2.1.1 カニクイザル単回椎間板内投与 13 週間病理観察試験 10
2.6.6.2.1.2 カニクイザル単回椎間板内投与 26 週間観察試験 11
2.6.6.2.1.3 ウサギ単回椎間板内投与試験 12
2.6.6.2.1.4 イヌ単回椎間板内投与 26 週間観察試験 13
2.6.6.2.1.5 イヌ単回椎間板内投与 3 年間観察試験 14
2.6.6.2.2 静脈内、筋肉内及び皮下投与試験 15
2.6.6.2.2.1 マウスにおける試験 15
2.6.6.2.2.2 ラットにおける試験 15
2.6.6.2.2.3 イヌにおける試験 16
2.6.6.3 反復投与毒性試験 16
2.6.6.3.1 ラットにおける 28 日間反復皮下投与毒性試験 17
2.6.6.3.2 イヌにおける 29 日間反復皮下投与毒性試験 18
2.6.6.4 遺伝毒性試験 19
2.6.6.4.1 細菌を用いる復帰突然変異試験 19
2.6.6.4.2 ほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験 20
2.6.6.4.3 マウスにおける小核試験 20
2.6.6.5 がん原性試験 20
2.6.6.6 生殖発生毒性試験 21
2.6.6.6.1 ラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（1） 21
2.6.6.6.2 ラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（2） 22
2.6.6.6.3 ラットにおける胚･胎児発生への影響に関する試験（1） 23
2.6.6.6.4 ラットにおける胚･胎児発生への影響に関する試験（2） 25
2.6.6.6.5 ウサギにおける胚･胎児発生の影響に関する試験（1） 25
2.6.6.6.6 ウサギにおける胚･胎児発生の影響に関する試験（2） 26
2.6.6.6.7 ラットにおける出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 27
2.6.6.7 局所刺激性試験 28
2.6.6.7.1 椎間板内投与試験 29
2.6.6.7.2 髄腔内投与試験 30
2.6.6.7.3 筋肉内投与試験 30
2.6.6.7.4 皮内投与試験 31
2.6.6.7.4.1 モルモットを用いた皮内投与刺激性試験（1） 31
2.6.6.7.4.2 モルモットを用いた皮内投与刺激性試験（2） 31
2.6.6.8 その他の毒性試験 32

2.6.6.8.1 抗原性試験 33
2.6.6.8.1.1 モルモット ASA 試験、PCA 試験及び PHA 試験 33
2.6.6.8.2 不純物（ **不純物**A* ）の毒性試験 34
2.6.6.8.2.1 ラット単回皮下投与毒性試験 34
2.6.6.8.2.2 ラット反復皮下投与毒性試験 34
2.6.6.8.2.3 遺伝毒性試験 35
2.6.6.8.3 長期保存原薬の局所刺激性試験 35
2.6.6.8.4 原薬製法変更に伴う同等性試験 36
2.6.6.9 添加物の安全性評価 36
2.6.6.9.1 マクロゴール 4000 のウサギ椎間板内投与局所刺激性試験 37
2.6.6.9.2 精製白糖のウサギ椎間板内投与局所刺激性試験 37
2.6.6.9.3 プラセボ製剤のウサギ椎間板内投与局所刺激性試験 37
2.6.6.10 考察及び結論 38
2.6.6.11 図表 46
2.6.6.12 参考文献 46

表

表 2.6.6.1-1. 毒性試験一覧 6
表 2.6.6.2-1. 単回投与毒性試験一覧 10
表 2.6.6.3-1. 反復投与毒性試験一覧 17
表 2.6.6.4-1. 遺伝毒性試験一覧 19
表 2.6.6.6-1. 生殖発生毒性試験一覧 21
表 2.6.6.7-1. 局所刺激性試験一覧 29
表 2.6.6.8-1. その他の毒性試験一覧 33
表 2.6.6.9-1. 添加物の局所刺激性試験一覧 37
表 2.6.6.10-1. 各動物における投与量及び申請用量との比率 38
表 2.6.6.10-2. 各動物の椎間板及び椎体で認められた主要な変化 39
表 2.6.6.10-3. 各動物の椎間板構造の種差 40

図

図 2.6.6.10-1. 各動物の椎間板構造 40
図 2.6.6.10-2. カニクイザルで認められたコンドリアーゼ単回椎間板内投与後の組織変化 41

***新薬承認情報提供時に置き換えた**

略号一覧

略号	省略していない表現（英語）	省略していない表現（日本語）
A/G 比	Albumin/globulin ratio	アルブミン/グロブリン比
ASA	Active systemic anaphylaxis	能動的全身性アナフィラキシー
AUC	Area under the plasma concentration - time curve	血漿中濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-last}}$	Area under the plasma concentration - time curve from zero to the last measurable time	0 から最終測定可能時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
CHL	Chinese hamster lung	新生チャイニーズハムスター肺
C_{max}	Maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
GAG	Glycosaminoglycan	グリコサミノグリカン
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に関する省令
IgE	Immunoglobulin E	免疫グロブリン E
IgG	Immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IgM	Immunoglobulin M	免疫グロブリン M
L4/L5	Intervertebral disc between the fourth and fifth lumbar vertebrae (The notation of other lumbar intervertebral discs is also similar.)	第 4 腰椎と第 5 腰椎間の椎間板（他の腰椎椎間板の表記も同様）
MCHC	Mean cell hemoglobin concentration	平均赤血球血色素濃度
PBS	Phosphate-buffered saline	リン酸緩衝生理食塩液
PCA	Passive cutaneous anaphylaxis	受動的皮膚アナフィラキシー
PHA	Passive hemagglutination	受動的赤血球凝集反応
Pkat U	Picokatal unit	ピコカタル単位
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
U	Unit	単位

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6.1 まとめ

単回投与毒性試験は、カニクイザル、ウサギ及びイヌを用いて、コンドリアーゼの臨床適応経路による椎間板内投与試験を実施した。投与後、椎間板組織に対する影響が長期間にわたり持続することが予想されたことから、カニクイザルでは投与後 26 週まで、ウサギでは投与後 2 年まで、イヌでは投与後 3 年まで観察を行った。さらに、椎間板内投与では十分な全身曝露が達成できないため、マウス、ラット及びイヌを用いて、大量投与が可能である代替投与経路による静脈内、筋肉内及び皮下投与試験を実施した。反復投与毒性試験は、ラット及びイヌを用いて、反復投与が可能な代替投与経路による皮下投与試験を実施した。遺伝毒性試験は、細菌及びほ乳類の培養細胞を用いる in vitro 試験（復帰突然変異試験、染色体異常試験）並びにマウスを用いる in vivo 小核試験を実施した。がん原性試験は、コンドリアーゼの臨床適応は椎間板内への単回投与であり、また、単回及び反復投与毒性試験並びに遺伝毒性試験で発がん性が懸念される結果は認められなかったことから、実施しなかった。生殖発生毒性試験は、ラット及びウサギを用いて三試験計画法に準じ実施した。椎間板内投与では十分な全身曝露が達成できず、さらに評価に必要な期間の反復投与ができないため、代替投与経路である皮下投与により生殖発生毒性を評価した。また、コンドリアーゼの反復皮下投与により、血清中の抗コンドリアーゼ抗体価の上昇がみられ、投与期間を通じた全身曝露の継続ができていなかった可能性が考えられたことから、一部の試験は投与期間を分割して実施した。局所刺激性試験は、ウサギ及びモルモットを用いて、単回椎間板内、髄腔内、筋肉内及び皮内投与試験を実施した。その他の毒性試験として、以下の試験を実施した。抗原性試験は、モルモットを用いて実施した。不純物の毒性試験は、コンドリアーゼ原薬中に含まれる可能性が考えられる不純物（ **不純物A*** ）について、ラットを用いた単回及び反復投与毒性試験並びに遺伝毒性試験を実施した。長期保存原薬の局所刺激性試験は、コンドリアーゼ原薬由来の **不純物C** の影響を検討する目的で、ウサギを用いた椎間板内投与による局所刺激性試験を実施した。原薬製法変更に伴う同等性試験は、コンドリアーゼ原薬の製法が本申請に至るまでに 3 回変更されているため、それぞれの原薬について、ラットを用いた単回皮下投与試験を実施した。さらに添加物の安全性評価は、コンドリアーゼ製剤中に含有する添加物（マクロゴール 4000 及び精製白糖）について、ウサギを用いた椎間板内投与による局所刺激性試験を実施した。

実施した毒性試験を表 2.6.6.1-1 に示した。

***新薬承認情報提供時に置き換えた**

表 2.6.6.1-1. 毒性試験一覧

試験の種類	投与経路	動物種/系統	被験物質
単回投与毒性試験			
	椎間板内	カニクイザル ウサギ/日本白色種 a) イヌ/ビーグル犬	コンドリアーゼ
	静脈内	マウス/Swiss ラット/Wistar イヌ/ビーグル犬	コンドリアーゼ
	筋肉内	マウス/Swiss ラット/Wistar イヌ/ビーグル犬	コンドリアーゼ
	皮下	マウス/Swiss ラット/Wistar イヌ/ビーグル犬	コンドリアーゼ
反復投与毒性試験			
28 日間	皮下	ラット/Wistar	コンドリアーゼ
29 日間	皮下	イヌ/ビーグル犬	コンドリアーゼ
遺伝毒性試験			
復帰突然変異	in vitro	ネズミチフス菌、大腸菌	コンドリアーゼ
染色体異常	in vitro	CHO 細胞	コンドリアーゼ
小核	腹腔内	マウス/Swiss	コンドリアーゼ
生殖発生毒性試験			
受胎能及び着床までの初期胚発生（1）	皮下	ラット/SD	コンドリアーゼ
受胎能及び着床までの初期胚発生（2） b)	皮下	ラット/Wistar	コンドリアーゼ
胚･胎児発生（1）	皮下	ラット/Wistar ウサギ/New Zealand White	コンドリアーゼ
胚･胎児発生（2） b)	皮下	ラット/Wistar ウサギ/New Zealand White	コンドリアーゼ
出生前及び出生後の発生並びに母動物機能 b)	皮下	ラット/Wistar	コンドリアーゼ
局所刺激性試験			
	椎間板内、髄腔内、筋肉内	ウサギ/日本白色種	コンドリアーゼ製剤
	皮内	モルモット/Hartley	コンドリアーゼ製剤
その他の毒性試験			
抗原性試験	腹腔内（感作）	モルモット/Hartley	コンドリアーゼ
不純物の毒性試験			
単回投与毒性試験	皮下	ラット/Wistar	**不純物A***
反復投与毒性試験	皮下	ラット/Wistar	**不純物A***
遺伝毒性試験	in vitro	ネズミチフス菌、大腸菌、CHL/IU 細胞	**不純物A***
長期保存原薬の局所刺激性試験	椎間板内	ウサギ/日本白色種	コンドリアーゼ
原薬製法変更に伴う同等性試験			
単回投与毒性試験	皮下	ラット/SD	コンドリアーゼ
添加物の局所刺激性試験			
	椎間板内 椎間板内	ウサギ/日本白色種 ウサギ/日本白色種	マクロゴール 4000、精製白糖 プラセボ製剤

a)：参考資料

b)：血清中の抗コンドリアーゼ抗体価の上昇がみられ、投与期間を通じた全身曝露の継続ができていなかった可能性が考えられたことから、投与期間を分割してコンドリアーゼを投与した試験。

***新薬承認情報提供時に置き換えた**

実施した各試験で得られた主な所見を以下に示した。

単回投与毒性

カニクイザルにコンドリアーゼを 0.25 又は 10 U/disc の用量で単回椎間板内投与し、投与後 1、4 及び 13 週に椎間板の病理組織学的検査を行った。すべてのコンドリアーゼ投与群で投与後 1 週から、髄核及び線維輪にコンドリアーゼの薬理作用である髄核融解作用に関連した変化（薬理作用の延長上の変化）が認められた。これらに加え、軟骨終板及び成長板に細胞の変性及び壊死、染色性低下がみられ、さらに時間の経過とともに軟骨終板では血管侵入、骨化及び菲薄化、成長板では限局性欠損がみられた。椎体においては、骨髄細胞の減少及び壊死並びに骨新生に関連した変化がみられた。ただし、これらの変化は、重度なものではなく、一部の変化は投与後 13 週では明らかな回復傾向を示した。また、コンドリアーゼを 0.25、1.6 又は 10 U/disc の用量で単回椎間板内投与し、投与後 26 週に椎間板の病理組織学的検査を行った。すべてのコンドリアーゼ投与群で髄核及び線維輪にコンドリアーゼの薬効に関連した変化（薬理作用の延長上の変化）が認められ、さらに軟骨終板の染色性低下及び菲薄化並びに成長板の限局性欠損がみられた。軟骨終板及び成長板でみられた組織学的変化は、ヒトの加齢に伴い自然発生が報告 [(1)] [(2)] されている変化と同質のものであり、椎体の変形や脆弱化を示唆するものではないと考えられた。

ウサギにコンドリアーゼを 0.2、4 又は 100 U/disc の用量で単回椎間板内投与し、投与後 1.5 及び 2 年に椎間板の病理組織学的検査を実施した（参考資料）。すべてのコンドリアーゼ投与群で投与後 2 年までに、髄核及び線維輪にコンドリアーゼの薬効に関連した変化が認められた。また、4 U/disc 以上の群で、軟骨終板を挟んで髄核に接する椎体（二次骨化中心起源）において、骨改変を伴わない骨細胞壊死がみられた。

ビーグル犬にコンドリアーゼを 0.25、1、4、16 又は 50 U/disc の用量で単回椎間板内投与し、投与後 13 及び 26 週に椎間板の病理組織学的検査を行った。投与後 13 及び 26 週ともに、0.25 及び 1 U/disc 群で髄核及び線維輪に薬効に関連した変化が認められた。4 U/disc 以上の群では髄核軟骨細胞の変性及び消失並びに基質の硝子化、髄核の消失、軟骨終板の菲薄化及び消失がみられ、軟骨終板に接する椎体においては、髄核の骨髄腔内への脱出、炎症性細胞浸潤、肉芽組織形成、骨梁の肥厚及び減少、骨新生などがみられた。また、コンドリアーゼを 50 U/disc の用量で単回椎間板内投与し、投与後 1、2 及び 3 年に椎間板の病理組織学的検査を行った。投与後 1 年では髄核及び軟骨終板が消失し、その部位に骨新生がみられた。加えて、椎体においては骨梁の肥厚及び減少、炎症性変化などがみられた。投与後 2 及び 3 年では、一旦消失した髄核や軟骨終板が回復することはなかったが、椎体における炎症性変化は沈静化した。

マウス及びラットにコンドリアーゼを 2000 U/kg の用量で単回静脈内、筋肉内及び皮下投与した試験では、死亡例はみられず、一般状態にもコンドリアーゼ投与の影響はみられなかった。概略の致死量は、マウス及びラットともに 2000 U/kg を超える用量であった。ラット皮下投与試験における C_{max} は、雄で 132 mU/mL、雌で 236 mU/mL、$AUC_{0\text{-}last}$ は雄で 300 mU·h/mL、雌で 563 mU·h/mL であった。

ビーグル犬にコンドリアーゼを 2000 U/kg の用量で単回静脈内、筋肉内及び皮下投与した試験では、死亡例はみられなかった。いずれの投与経路においても投与後 24 時間まで運動性低下がみられ、静脈内投与試験では同時に一過性の運動失調及び麻痺性歩行もみられた。概略の致死量は、2000 U/kg

を超える用量であった。皮下投与試験における C_{max} は、雄で 2560 mU/mL、雌で 2840 mU/mL、$AUC_{0\text{-}last}$ は雄で 20656 mU·h/mL、雌で 23764 mU·h/mL であった。

反復投与毒性

ラットにコンドリアーゼを 2、20 又は 200 U/kg/日の用量で 28 日間反復皮下投与した。死亡例はみられず、一般状態を含む各種検査項目にコンドリアーゼ投与による影響はみられなかった。無毒性量は、雌雄ともに 200 U/kg/日と判断した。すべてのコンドリアーゼ投与群で血清中抗コンドリアーゼ抗体が検出された。トキシコキネティクス（TK）測定において、投与 1 日の 20 及び 200 U/kg 群の血漿中コンドリアーゼ濃度は、定量可能であったが、投与 14 及び 28 日には定量下限（[redacted]mU/mL）未満であった。

ビーグル犬にコンドリアーゼを 2、20 又は 200 U/kg/日の用量で 29 日間反復皮下投与した。死亡例はみられず、一般状態を含む各種検査項目にコンドリアーゼ投与による影響はみられなかった。無毒性量は、雌雄ともに 200 U/kg/日と判断した。すべてのコンドリアーゼ投与群で血清中抗コンドリアーゼ抗体が検出された。TK 測定において、投与 1 日の血漿中コンドリアーゼ濃度は定量可能であったが、投与 15 及び 29 日にはほぼ全例で定量下限未満であった。

遺伝毒性

細菌を用いる復帰突然変異試験及びほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験では、それぞれ 100 µL（約 100 U）/plate 又は 100 U/mL までの濃度でいずれも陰性の結果であった。マウスを用いる in vivo 小核試験では、2000 U/kg の単回腹腔内投与で陰性の結果であった。

生殖発生毒性

ラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験では、コンドリアーゼを 2、20 又は 200 U/kg/日の用量で、雄には交配前 4 週から剖検前日まで、雌には交配前 2 週から妊娠 7 日まで皮下投与した。20 及び 200 U/kg 群の雌で投与期間後半に耳介の発赤、肥厚及び痂皮が、200 U/kg 群の雌で妊娠期間中に一過性の摂餌量の減少がみられたが、その他に異常は認められなかった。無毒性量は、雌雄親動物における一般毒性は雄で 200 U/kg/日、雌で 2 U/kg/日、雌雄の生殖機能及び初期胚発生に関しては 200 U/kg/日と判断した。追加試験では、コンドリアーゼを 200 U/kg/日の用量で、交配前 7 日から妊娠 7 日まで、投与期間を最大 8 日間に分割して皮下投与した。TK サテライト動物により、全投与期間において雌雄親動物がコンドリアーゼで全身曝露されたことを確認した。雌雄親動物における一般毒性、生殖機能及び初期胚発生に関する無毒性量は、200 U/kg/日と判断した。

ラットにおける胚及び胎児発生に関する試験では、コンドリアーゼを 2、20 又は 200 U/kg/日の用量で、妊娠 7 日から 16 日まで皮下投与した。追加試験では、コンドリアーゼを 200 U/kg/日の用量で妊娠 12 日から 17 日まで皮下投与した。いずれの試験においても母動物の一般毒性及び生殖機能、並びに F_1 胚、胎児発生及び F_1 出生児に関する無毒性量は、200 U/kg/日と判断した。追加試験の TK サテライト動物により、全投与期間において母動物がコンドリアーゼで全身曝露されたことを確認した。ウサギにおける胚及び胎児発生に関する試験では、コンドリアーゼを 2、20 又は 200 U/kg/日の用量で、妊娠 6 日から 18 日まで皮下投与した。追加試験では、コンドリアーゼを 200 U/kg/日の用量で妊娠 12 日から 18 日に皮下投与した。いずれの試験においても母動物の一般毒性及び生殖機能、並びに

胚及び胎児発生に関する無毒性量は、200 U/kg/日と判断した。追加試験の TK サテライト動物において、投与期間中の母動物のコンドリアーゼによる全身曝露を確認した。

ラットにおける出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験では、コンドリアーゼを200 U/kg/日の用量で妊娠 15 日から分娩後 20 日まで､投与期間を最大 8 日間に分割して皮下投与した。母動物の一般毒性及び生殖機能、並びに次世代の発生に関する無毒性量は、200 U/kg/日と判断した。TK サテライト動物において、投与期間中の母動物のコンドリアーゼによる全身曝露を確認した。

局所刺激性

ウサギにコンドリアーゼ製剤（7.5 U/mL）を椎間板内（0.075 U/disc）、髄腔内（7.5 U/site）及び筋肉内（7.5 U/site）に単回投与した。椎間板内投与では、髄核のみに刺激性が認められ、髄腔内投与では、刺激性は認められなかった。筋肉内投与では、軽微な刺激性が認められた。モルモットでは、コンドリアーゼ製剤を 8 U/site まで単回皮内投与した結果、刺激性は認められなかった。

抗原性

コンドリアーゼを 3、30 又は 300 U/kg の用量で腹腔内投与し、感作したモルモット及びそこから得られた血清を用いて、能動的全身性アナフィラキシー試験、受動的皮膚アナフィラキシー試験及び受動的赤血球凝集試験を実施した。いずれも陽性の結果であった。

不純物の毒性

ラットに､コンドリアーゼ原薬中に含まれる可能性のある **不純物A*** を 6 mg/kg で単回皮下投与した試験では、 **不純物A*** 投与の影響はみられなかった。また、28 日間反復皮下投与した試験では、 **不純物A*** の無毒性量は雄で 0.15 mg/kg/日、雌で 0.6 mg/kg/日であった。細菌及びほ乳類の培養細胞を用いる遺伝毒性試験では、いずれも陰性の結果であった。

長期保存原薬の局所刺激性

ウサギに、保存期間の異なるコンドリアーゼ原薬（ **不純物C*** 含量[redacted]、[redacted]又は[redacted]%）を 2 U/disc の用量で単回椎間板内投与した。コンドリアーゼ原薬は、保存期間の長短に関わらず、髄核、線維輪並びに椎体（二次骨化中心起源）の骨及び骨髄に対して刺激性を有したが、軟骨終板及び椎間板周囲の椎体組織には影響しなかった。また、いずれの原薬においても刺激性に差はなかった。

原薬製造変更に伴う同等性

コンドリアーゼ原薬の製法は、本申請に至るまでに 3 回変更されているため、それぞれの原薬について、ラットを用いた単回皮下投与試験により毒性を評価した。いずれの試験においても 2000 U/kg の用量で死亡例はみられなかった。一般状態、体重、及び剖検にコンドリアーゼ投与の影響はみられず、それぞれの製法変更前後の原薬で毒性に差はなかった。

添加物の安全性評価

ウサギに、コンドリアーゼ製剤の添加物であるマクロゴール 4000、精製白糖又はプラセボ製剤を椎間板内に投与した結果、いずれも刺激性は認められなかった。

***新薬承認情報提供時に置き換えた**

2.6.6.2　単回投与毒性試験

コンドリアーゼの臨床適応は、椎間板内への単回投与であるが、椎間板内投与では、全身毒性を評価するために必要となる十分に高い全身曝露が達成できない。そのため、椎間板内投与試験に加えて、静脈内、筋肉内及び皮下投与試験を実施して、全身毒性を評価した。実施した試験を表 2.6.6.2-1 に示した。

表 2.6.6.2-1. 単回投与毒性試験一覧

投与経路	動物種/系統	動物数（匹/性/群）	投与量	観察期間	GLP適用	資料番号
椎間板内	カニクイザル	雄 3/時点	0、0.25、10 U/disc	1、4、13 週	適	4.2.3.1-1
		4	0、0.25、1.6、10 U/disc	26 週	適	4.2.3.1-2 4.2.3.1-3
	ウサギ/日本白色種	雌 3/時点	0、0.2、4、100 U/disc	1.5、2 年	不適	4.2.3.1-4 （参考資料）
	イヌ/ビーグル犬	雄 3、6/時点	0、0.25、1、4、16、50 U/disc	13、26 週	適	4.2.3.1-5
		雄 6/時点	0、50 U/disc	1、2、3 年	適	4.2.3.1-6
静脈内	マウス/Swiss	5	0、2000 U/kg	14 日	適	4.2.3.1-7
	ラット/Wistar	5	0、2000 U/kg	14 日	適	4.2.3.1-10
	イヌ/ビーグル犬	2	0、2000 U/kg	14 日	適	4.2.3.1-14
筋肉内	マウス/Swiss	5	0、2000 U/kg	14 日	適	4.2.3.1-8
	ラット/Wistar	5	0、2000 U/kg	14 日	適	4.2.3.1-11
	イヌ/ビーグル犬	2	0、2000 U/kg	14 日	適	4.2.3.1-15
皮下	マウス/Swiss	5	0、2000 U/kg	14 日	適	4.2.3.1-9
	ラット/Wistar	5	0、2000 U/kg	14 日	適	4.2.3.1-12
	ラット/Wistar	3	0、2000 U/kg	—[a)]	適	4.2.3.1-13
	イヌ/ビーグル犬	2	0、2000 U/kg	14 日	適	4.2.3.1-16
	イヌ/ビーグル犬	2	0、2000 U/kg	—[a)]	適	4.2.3.1-17

a)：TK 試験

2.6.6.2.1　椎間板内投与試験

2.6.6.2.1.1　カニクイザル単回椎間板内投与 13 週間病理観察試験

（資料番号 4.2.3.1-1：試験番号 [redacted]3046G；概要表 2.6.7.5）

カニクイザル（1 群雄 3 匹/時点）の第 4 腰椎と第 5 腰椎間の椎間板（L4/L5）又は L3/L4 内に、コンドリアーゼを 0.25 又は 10 U/10 µL/disc の用量で単回投与し、投与後 1、4 及び 13 週まで観察した。対照として、リン酸緩衝生理食塩液（PBS）を 10 µL/disc の容量で投与した。投与後の一般状態観察、体重測定、腰椎の X 線検査、剖検及び病理組織学的検査を行った。

1、4 及び 13 週観察ともに、一般状態及び体重にコンドリアーゼ投与の影響はみられなかった。

腰椎の X 線検査では、すべてのコンドリアーゼ投与群で、投与後 1 週より椎間板高インデックスの投与前値からの減少がみられ、投与後 4 又は 13 週まで同程度の椎間板高インデックスの低値が持続した。

剖検では、すべてのコンドリアーゼ投与群で椎間板高の狭小化がみられ、髄核は透明度及び光沢が減少し、灰白色調を示した。その他の部位には、コンドリアーゼ投与による変化は認められなかった。

病理組織学的検査では、すべてのコンドリアーゼ投与群で投与後 1 週に髄核の縮小が髄核軟骨細胞の変性及び壊死、基質の凝縮などの変化を伴ってみられた。また、隣接する線維輪に変性や走行の不整（線維の不規則な走行）などがみられた。さらに、軟骨終板及び成長板に細胞の変性及び壊死並びに染色性低下などがみられた。椎体では成長板周囲の骨髄細胞の減少及び壊死、骨髄腔内間葉系細胞の増加、骨芽細胞の活性化を伴う骨新生がみられた。投与後 4 週では、髄核、線維輪及び軟骨終板では投与後 1 週と同様の変化が認められ、成長板では限局性欠損、骨端輪の存在する例では骨細胞及び骨髄細胞壊死、椎体では変化が進行した。一方、軟骨終板への血管侵入及び骨化、髄核、線維輪及び成長板では軟骨細胞の再生がみられた。投与後 13 週では、髄核、線維輪及び軟骨終板では投与後 1 及び 4 週と同様の変化に加え、髄核、線維輪及び成長板の軟骨細胞の再生はより明らかとなり、軟骨終板の軟骨細胞の再生もみられ、成長板の軟骨基質の好塩基性の減少並びに軟骨細胞の変性及び壊死は回復した。軟骨終板では、血管侵入及び骨化が投与後 4 週よりも明らかとなり、菲薄化もみられた。骨髄での骨芽細胞の活性化を伴う新たな骨組織形成はみられなかった。組織変化の程度は、回復性の変化を除き、0.25 U/disc 群より 10 U/disc 群の方が強かった。

以上の結果から、0.25 U/disc 以上の用量で、投与後 1 週から髄核及び線維輪に加え、軟骨終板及び成長板並びに椎体においてコンドリアーゼの影響がみられた。椎間板の髄核及び線維輪の変化はコンドリアーゼの薬効に関連した（薬理作用の延長上）変化と考えられた。軟骨終板及び成長板並びに椎体においては、投与後 4 週では成長板の限局性欠損及び椎体の骨髄への明らかな影響がみられたが、一方、回復性の変化も認められた。投与後 13 週では、一部の変化は継続しているものの、回復性の変化は進行していた。

2.6.6.2.1.2 カニクイザル単回椎間板内投与 26 週間観察試験

（資料番号4.2.3.1-2：試験番号[redacted]95-6525、資料番号4.2.3.1-3：試験番号[redacted]3940G ；概要表2.6.7.5）

カニクイザル（1 群雌雄各 4 匹）の L4/L5 内に、コンドリアーゼを 0.25、1.6 又は 10 U/10 µL/disc の用量で単回投与し、投与後 26 週まで観察した。対照として、PBS を 10 µL/disc の容量で投与した。投与後の一般状態観察、体重及び摂餌量測定、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、眼科学的検査、腰椎の X 線検査、血清中抗コンドリアーゼ抗体価測定、剖検、器官重量測定、病理組織学的検査並びに椎間板中の抗コンドリアーゼ抗体価及びコンドリアーゼ残存活性測定を行った。投与量は、試験実施当時、安定した製剤化の可能性がある最低濃度から 0.25 U/disc を低用量とし、供給可能な最高濃度から 10 U/disc を高用量とした。

一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、眼科学的検査及び器官重量に、コンドリアーゼ投与の影響はみられなかった。

腰椎の X 線検査では、すべてのコンドリアーゼ投与群で、投与後 1 週より椎間板高インデックスの投与前値からの減少がみられ、投与後 26 週まで同程度の椎間板高インデックスの低値が持続した。

剖検では、すべてのコンドリアーゼ投与群で椎間板高の狭小化がみられ、髄核は透明度及び光沢が減少し、灰白色調を示した。その他の部位には、コンドリアーゼ投与による変化は認められなかった。

病理組織学的検査では、すべてのコンドリアーゼ投与群に髄核軟骨細胞の変性、減少、集簇又は増加、線維輪の走行の不整（線維の不規則な走行）及び硝子様肥厚がみられた。さらに、軟骨終板の変性（染色性低下及び菲薄化）並びに成長板の限局性欠損がみられた。これらの変化の頻度と程度に、群間差はみられなかった。椎体には、コンドリアーゼ投与による変化は認められなかった。

血清中の抗コンドリアーゼ抗体価の測定では、1.6 U/disc 群の雌及び 10 U/disc 群の雌雄で、投与後 5 週以降に抗コンドリアーゼ IgG の増加がみられた。椎間板中の抗コンドリアーゼ抗体価の測定では、1.6 U/disc 群の雌、10 U/disc 群の雌雄で、投与後 26 週に抗コンドリアーゼ IgG が検出された。また、いずれのコンドリアーゼ投与群においても、投与後 26 週の椎間板中に、コンドリアーゼの残存活性はみられなかった。

以上の結果から、10 U/disc までの用量で、投与後 26 週に髄核及び線維輪に加え、軟骨終板及び成長板においてコンドリアーゼの影響がみられた。椎間板の髄核及び線維輪の変化はコンドリアーゼの薬効に関連した（薬理作用の延長上）変化と考えられた。また、軟骨終板の染色性低下及び菲薄化並びに成長板の限局性欠損は、ヒトの加齢に伴い自然発生が報告されている変化 (1) (2) と同質のものであり、椎体の変形や脆弱化を示唆するものではないと考えられた。しかし、これらの組織変化には、回復性が認められないことから、コンドリアーゼのカニクイザル単回椎間板内投与における投与後 26 週の無毒性量は、0.25 U/disc 未満と判断した。

2.6.6.2.1.3 ウサギ単回椎間板内投与試験

（資料番号 4.2.3.1-4（参考資料）：試験番号 [redacted]ELD1；概要表 2.6.7.5）

日本白色種ウサギ（1 群雌 3 匹/時点）の L3/L4、L4/L5、L5/L6 又は L6/L7 内に、コンドリアーゼを 0.2、4 又は 100 U/10 µL/disc の用量で単回投与し、投与後 1.5 及び 2 年まで観察し、椎間板の病理組織学的検査を実施した。対照として、PBS を 10 µL/disc の容量で投与した。さらに、比較対照としてキモパパインを、椎間板髄核体積比換算で欧米における臨床用量 (3) の約 4 倍に相当する 50 pkat U/10 µL/disc の用量で、同様に投与した。

すべてのコンドリアーゼ投与群で投与後 2 年までに、髄核の縮小が髄核細胞数の減少及び髄核基質の線維化の変化を伴って認められ、また、髄核細胞及び線維輪細胞の軟骨細胞化がみられた。さらに線維輪の波状走行及び髄核への突出（線維の不規則な走行）がみられた。これらは、コンドリアーゼの薬理作用により髄核が融解及び縮小し、本来髄核が占めていた領域を埋めるように線維輪が変形して充填され、その際、線維輪の線維の不規則な走行及び軟骨様細胞が反応性に生じたものと推察されることから、薬効に関連した変化と考えられた。いずれのコンドリアーゼ投与群においても、軟骨終板への影響はみられなかったが、4 及び 100 U/disc 群の軟骨終板を挟んで髄核に接する椎体（二次骨化中心起源）において、骨の改築像を伴わない骨細胞壊死がみられた。キモパパイン投与群では、髄核の縮小、空隙形成、髄核基質の壊死塊、髄核細胞数の減少、髄核細胞及び線維輪の軟骨細胞化、線維輪の波状走行、軟骨終板の消失、軟骨終板を挟んで髄核に接する椎体（二次骨化中心起源）の骨細

胞壊死、骨の改築像、並びに同部の骨髄の脂肪髄化及び線維化がみられ、コンドリアーゼ投与群よりも強い変化が椎体にまで達していた。髄核体積比換算で、欧米における臨床用量の約 4 倍に相当する 50 pkat U/disc のキモパパインが椎間板に及ぼす影響と比べると、100 U/disc のコンドリアーゼ（今回の申請用量の 26400 倍に相当）が椎間板へ及ぼす影響は明らかに軽度であった。

2.6.6.2.1.4　イヌ単回椎間板内投与 26 週間観察試験

（資料番号 4.2.3.1-5：試験番号 [redacted]-4433；概要表 2.6.7.5）

ビーグル犬（1 群雄 3 又は 6 匹/時点）の L4/L5 内に、コンドリアーゼを 0.25、1、4、16 又は 50 U/50 µL/disc の用量で単回投与し、投与後 13 週（1 群雄 3 匹）及び 26 週（1 群雄 6 匹）まで観察した。対照として、PBS を 50 µL/disc の容量で投与した。投与後の一般状態観察、体重及び摂餌量測定、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、眼科学的検査、腰椎の X 線検査、血清中抗コンドリアーゼ抗体価測定、剖検、器官重量測定、病理組織学的検査並びに椎間板中の抗コンドリアーゼ抗体価測定及びコンドリアーゼ残存活性測定を行った。投与量は、試験実施当時に安定した製剤化の可能性がある最低濃度から 0.25 U/disc を低用量とし、供給可能な最高濃度から 50 U/disc を高用量とした。

投与後 13 及び 26 週観察ともに、一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、眼科学的検査及び器官重量に、コンドリアーゼ投与の影響はみられなかった。

腰椎の X 線検査では、すべてのコンドリアーゼ投与群で、投与後 1 週より椎間板高インデックス（椎間板高/上位椎体高）の投与前値からの減少がみられた。無処置動物においても高頻度に自然発症することが知られている椎体骨端側方の骨増殖が、対照群を含む全群でみられ、コンドリアーゼ投与群において用量増加に伴って増強したが、この変化は、後述する剖検でみられた椎間板高の狭小化に伴う反応性変化と考えられた。椎間板腹側まで達する骨増殖は、4 U/disc 以上の群でみられ、ビーグル犬は軟骨異栄養性の犬種のため、軟骨終板及び椎体において、強い組織変化が認められたと考えられた。16 及び 50 U/disc 群では、上記所見に加えて、投与後 5 週より椎間板に接する椎体縁に骨密度減少がみられた。

剖検では、投与後 26 週までに、16 U/disc 以下のコンドリアーゼ投与群で椎間板高の狭小化がみられた。16 及び 50 U/disc 群では、髄核及び線維輪の消失、腹側縦靭帯の肥厚、椎間板及び辺縁部椎体の淡褐色化又は赤褐色化及び椎間板周囲椎体の白色化がみられ、50 U/disc 群では髄核及び線維輪が消失したため、狭小化の所見は採らなかった。その他の器官及び組織には、コンドリアーゼ投与の影響はみられなかった。

病理組織学的検査では、投与後 13 及び 26 週ともに、0.25 及び 1 U/disc 群で髄核軟骨細胞の肥大及び集簇、1 U/disc 群で線維輪の走行の不整（線維の不規則な走行）がみられた。4 U/disc 群では、上記所見に加えて、髄核基質の硝子化と軟骨細胞の変性及び消失、軟骨終板の菲薄化、軟骨終板に接する椎体の肉芽組織形成がみられた。16 及び 50 U/disc 群では、髄核の変化はより高度となり、さらに髄核及び軟骨終板の消失、椎体において髄核の骨髄腔内への脱出、炎症性細胞浸潤、骨梁の肥厚及び減少、線維性又は軟骨性骨新生などがみられた。その他の器官及び組織にはコンドリアーゼ投与の影響はみられなかった。

血清中の抗コンドリアーゼ抗体価測定では、1 U/disc 以上の群で投与後 5 週以降に抗コンドリアーゼ IgG の増加がみられた。椎間板中の抗コンドリアーゼ抗体価測定では、0.25 U/disc 以上の群で、投与後 13 及び 26 週に抗コンドリアーゼ IgG が検出された。また、いずれのコンドリアーゼ投与群においても、投与後 13 及び 26 週の椎間板中に、コンドリアーゼの残存活性はみられなかった。

以上の結果から、0.25 及び 1 U/disc で認められた変化は、薬効に関連したものと考えられた。4 U/disc では椎体に軽度な炎症性変化、16 U/disc 以上では椎間板及び椎体の顕著な破壊と再構築を生じることから、コンドリアーゼのイヌ単回椎間板内投与における投与後 26 週の無毒性量は、1 U/disc と判断した。

2.6.6.2.1.5　イヌ単回椎間板内投与 3 年間観察試験

（資料番号 4.2.3.1-6：試験番号 [redacted]-4404；概要表 2.6.7.5）

コンドリアーゼの単回椎間板内投与により誘発される変化の回復性を検討する目的で、ビーグル犬（1 群雄 6 匹/時点）の L4/L5 内に、コンドリアーゼを 50 U/50 µL/disc の用量で単回投与し、投与後 1、2 及び 3 年まで観察した。対照として、PBS を 50 µL/disc の容量で投与した。投与後の一般状態観察、体重測定、腰椎の X 線検査及び病理組織学的検査を行った。投与量は、椎間板内投与により軟骨終板に確実に損傷が認められる 50 U/disc とした。

1、2 及び 3 年観察ともに、一般状態及び体重にコンドリアーゼ投与の影響はみられなかった。

腰椎の X 線検査では、コンドリアーゼ投与群で、椎間板高の狭小化及び椎間板に接する椎体縁に骨密度減少がみられた。狭小化の程度は、投与後 1 年から 3 年まで変化はなかったが、骨密度減少は、経過年数とともに回復傾向を示した。その他、経過年数とともに進行する椎体骨端の骨増殖の発現例数及び程度ともに、対照群に比べてコンドリアーゼ投与群で高度であった。

剖検では、コンドリアーゼ投与群の投与後 1 年で、髄核の縮小又は消失、髄核の淡褐色化又は赤褐色化、辺縁部椎体の赤褐色化及び灰白褐色、腹側縦靭帯の肥厚が認められた。これらの変化のうち、投与後 2 年では、髄核の赤褐色化は消失し、辺縁部椎体の赤褐色化及び灰白褐色化は軽減し、投与後 3 年では、腹側縦靭帯の肥厚の程度及び発現例数が増加した。

病理組織学的検査では、コンドリアーゼ投与群の投与後 1 年で、髄核及び軟骨終板の消失がみられ、その消失部に線維性又は軟骨性骨新生がみられた。加えて、椎体における骨梁の肥厚及び減少、炎症性細胞浸潤、肉芽組織形成及び線維化などがみられた。投与後 2 及び 3 年では、一旦消失した髄核や軟骨終板組織が回復することはなく、骨新生が経過年数とともに顕著となったが、椎体などにおける炎症性変化は沈静化した。

線維輪、縦靭帯及び結合組織においては、軟骨細胞の消失、線維束の硝子様肥厚などの退行性変化、線維化及び腹部縦靭帯内の線維軟骨の増生、骨棘形成などの増殖性変化が投与後 1 年で散見され、投与後 2 年では両変化とも、投与後 3 年では増殖性変化がより高度となった。これらの変化は、対照群の一部の例で認められたことから自然発生及び投与針の刺入に起因するものと考えられたが、いずれもコンドリアーゼ投与群では変化の程度及び発現例数が増加していた。コンドリアーゼ投与群では、

これらの変化に加えて、投与後 1 年で軟骨細胞又は側部線維輪及び周囲結合組織の線維軟骨の増生などの増殖性変化、線維束軟骨細胞の消失、線維輪の走行の不整（線維の不規則な走行）などの退行性変化、さらに炎症性細胞浸潤がみられた。投与後 2 及び 3 年では、これらの変化のうち、増殖性変化は進行し、退行性変化には差はなく、炎症性細胞浸潤は軽減した。

以上の結果から、50 U/disc の用量で椎間板及び椎体に顕著な破壊を生じ、投与後 3 年までに一旦消失した髄核及び軟骨終板組織は回復することはなく、骨新生が経過年数とともに顕著となったが、椎体などにおける炎症性変化は回復傾向を示した。投与後 1 年から 3 年に認められた線維輪、縦靭帯及び結合組織の増殖性変化は、自然発生及び投与針の刺入に加えて、コンドリアーゼの髄核融解作用に基づく変化の二次的影響により増強したものと推察された。しかしながら、神経学的検査を含む一般状態には異常は認められなかったことから、椎間板及び椎体周囲の変化は、神経系には影響しないものと考えられた。

2.6.6.2.2 静脈内、筋肉内及び皮下投与試験

2.6.6.2.2.1 マウスにおける試験

（資料番号 4.2.3.1-7：試験番号 [redacted]593/352060、資料番号 4.2.3.1-8：試験番号 [redacted]597/352060、資料番号 4.2.3.1-9：試験番号 [redacted]595/352060；概要表 2.6.7.5）

Swiss マウス（1 群雌雄各 5 匹）にコンドリアーゼを 2000 U/kg の用量で静脈内、筋肉内及び皮下に単回投与し、投与後 14 日間観察した。対照として、PBS を 2 mL/kg の容量で投与した。試験実施当時の製剤濃度の 100 倍のコンドリアーゼを投与した（今回の申請用量である 1.25 U/disc を体重 60 kg のヒトに 1 ヵ所投与する場合の値（1.25 U/60 kg）に対しては 96000 倍の投与量）。

いずれの投与経路においても死亡例はみられず、一般状態、体重及び剖検にコンドリアーゼ投与の影響はみられなかった。

以上の結果から、コンドリアーゼのマウス静脈内、筋肉内及び皮下投与における概略の致死量は、雌雄ともに 2000 U/kg を超える用量であった。

2.6.6.2.2.2 ラットにおける試験

（資料番号 4.2.3.1-10：試験番号 [redacted]592/352060、資料番号 4.2.3.1-11：試験番号 [redacted]596/352060、資料番号 4.2.3.1-12：試験番号 [redacted]594/352060、資料番号 4.2.3.1-13：試験番号 [redacted]2916/01；概要表 2.6.7.2、2.6.7.3、2.6.7.5）

Wistar ラット（1 群雌雄各 5 匹）にコンドリアーゼを 2000 U/kg の用量で静脈内、筋肉内及び皮下に単回投与し、投与後 14 日間観察した。対照として、PBS を 2 mL/kg の容量で投与した。試験実施当時の製剤濃度の 100 倍のコンドリアーゼを投与した（今回の申請用量に対しては 96000 倍の投与量）。

いずれの投与経路においても死亡例はみられず、一般状態、体重及び剖検にコンドリアーゼ投与の影響はみられなかった。

以上の結果から、コンドリアーゼのラット静脈内、筋肉内及び皮下投与における概略の致死量は、雌雄ともに 2000 U/kg を超える用量であった。

また、単回皮下投与毒性試験におけるコンドリアーゼの全身曝露を明らかにするために、雌雄の Wistar ラットに、上述の試験と同様の条件でコンドリアーゼを投与した。投与 0.5、1、2、6、24、48 及び 96 時間に血液を採取し、血漿中コンドリアーゼ濃度を、放射能標識基質を用いた高感度コンドリアーゼ酵素活性測定法により測定した（各時点雌雄各 3 匹）。その結果、C_{max} は、雄及び雌でそれぞれ 132 mU/mL 及び 236 mU/mL であり、$AUC_{0\text{-last}}$ は 300 mU·h/mL 及び 563 mU·h/mL であった。

2.6.6.2.2.3 イヌにおける試験

（資料番号 4.2.3.1-14：試験番号 [redacted]074、資料番号 4.2.3.1-15：試験番号 [redacted]076、資料番号 4.2.3.1-16：試験番号 [redacted]075、資料番号 4.2.3.1-17：試験番号 [redacted]2916/03；概要表 2.6.7.2、2.6.7.3、2.6.7.5）

ビーグル犬（1 群雌雄各 2 匹）にコンドリアーゼを 2000 U/kg の用量で静脈内、筋肉内及び皮下に単回投与し、投与後 14 日間観察した。対照として、PBS を 2 mL/kg の容量で投与した。試験実施当時の製剤濃度の 100 倍のコンドリアーゼを投与した（今回の申請用量に対しては 96000 倍の投与量）。

いずれの投与経路においても死亡例はみられず、剖検及び器官重量にコンドリアーゼ投与の影響はみられなかった。一般状態観察において、静脈内投与では運動性低下、鼻を鳴らす行動、運動失調及び麻痺性歩行がみられた。皮下投与では運動性低下及び円背位がみられ、筋肉内投与では、これらに加え、運動失調がみられた。これらの症状は、投与後 2 日にはすべて消失した。いずれの投与経路においても、全例で一過性の体重減少がみられた。

以上の結果から、コンドリアーゼのイヌ静脈内、筋肉内及び皮下投与における概略の致死量は、雌雄ともに 2000 U/kg を超える用量であった。

また、単回皮下投与毒性試験におけるコンドリアーゼの全身曝露を明らかにするために、1 群雌雄各 2 匹のビーグル犬に上述の試験と同様の条件でコンドリアーゼを投与した。投与 0.5、1、2、6、24、48 及び 96 時間に血液を採取し、血漿中コンドリアーゼ濃度を、放射能標識基質を用いた高感度コンドリアーゼ酵素活性測定法により測定した。その結果、C_{max} は、雄で 2281 及び 2838 mU/mL、雌で 3377 及び 2303 mU/mL であり、$AUC_{0\text{-last}}$ は雄で 19339 及び 21973 mU·h/mL、雌で 27220 及び 20308 mU·h/mL であった。

2.6.6.3 反復投与毒性試験

コンドリアーゼの臨床適応は、椎間板内への単回投与であるが、椎間板内投与では十分な全身曝露が達成できず、さらに評価に必要な期間の反復投与はできないことから、代替投与経路である皮下投与により反復投与毒性試験を実施した。実施した試験を表 2.6.6.3-1 に示した。

表 2.6.6.3-1. 反復投与毒性試験一覧

動物種/系統	投与経路	投与期間	動物数 （匹/性/群）	投与量 （U/kg/日）	GLP 適用	資料番号
ラット/Wistar	皮下	28 日	10 5（回復群）	0、2、20、200 0、200	適	4.2.3.2-1
ラット/Wistar	皮下	28 日	3（TK 群）	0、2、20、200	適	4.2.3.2-2
イヌ/ビーグル	皮下	29 日	4 2（回復群）	0、2、20、200 0、200	適	4.2.3.2-3
イヌ/ビーグル	皮下	29 日	3（TK 群）	0、2、20、200	適	4.2.3.2-4

2.6.6.3.1　ラットにおける 28 日間反復皮下投与毒性試験

（資料番号 4.2.3.2-1：試験番号 [redacted]637、資料番号 4.2.3.2-2：試験番号 [redacted]2916/02；概要表 2.6.7.7A）

Wistar ラット（1 群雌雄各 10 匹）に、コンドリアーゼを 2、20 又は 200 U/kg/日の用量で、1 日 1 回 28 日間反復皮下投与した。対照として、PBS を 1 mL/kg/日の容量で投与した。また、回復群として、対照群及び 200 U/kg 群に各群雌雄各 5 匹を追加し、投与期間終了後に 28 日間の休薬期間を設けて、投与期間中に認められた所見の回復性を検討した。当該試験の高用量は、試験実施当時の製剤濃度の 10 倍のコンドリアーゼを投与した（今回の申請用量に対しては 9600 倍の投与量）。投与後の一般状態観察、体重、摂餌量及び摂水量測定、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、眼科学的検査、剖検、器官重量測定、病理組織学的検査及び血清中抗コンドリアーゼ抗体価測定を行った。また、TK 検討のため、雌雄 Wistar ラットに、当該試験と同様の条件でコンドリアーゼを投与し、投与 1、14 及び 28 日に、血漿中コンドリアーゼ濃度を、放射能標識基質を用いた高感度コンドリアーゼ酵素活性測定法により測定した（各時点雌雄各 3 匹）。

血漿中コンドリアーゼ濃度は、投与 1 日の 2 U/kg 群ではすべての時点で定量下限未満であったが、20 U/kg 以上の群では、投与後 1 又は 2 時間で最高濃度に達し、投与後 6 時間では定量下限未満となった。曝露量に性差はみられなかった。投与 14 及び 28 日の血漿中コンドリアーゼ濃度は、採血したすべての群で定量下限未満であり、反復投与期間中にコンドリアーゼに特異的な抗体が産生され、コンドリアーゼ活性を中和したものと考えられた。

観察期間中、いずれの投与群にも死亡例はみられず、一般状態、体重、摂餌量、摂水量、血液学的検査、尿検査、眼科学的検査、剖検及び器官重量に、コンドリアーゼ投与の影響はみられなかった。血液生化学的検査では、200 U/kg 群の雄で γ-グロブリンの増加がみられ、雌で A/G 比及びアルブミンの減少、β_1-グロブリンの増加がみられた。休薬期間終了時には、200 U/kg 群の雄で α_2-グロブリンの増加、雌で γ-グロブリンの増加がみられた。すべてのコンドリアーゼ投与群で抗コンドリアーゼ抗体（IgG 及び IgM）が検出されていることから、これらの変化は、抗体産生と関連した変化と考えられた。また、200 U/kg 群の雌で無機リンの高値がみられたが、そのレベルは背景データの範囲内であり、さらに他の電解質に影響はみられず、毒性作用もみられなかったことから、偶発的変化と考えられた。病理組織学的検査では、投与期間終了時に、対照群を含めすべての投与群で投与部位の皮下に限局的な単核白血球の浸潤がみられた。その発現頻度及び程度は雌雄ともに、投与量の増加に伴い増加した。休薬期間終了時にも、200 U/kg 群の雄 1 例の同部位に単核白血球の浸潤がみられた。その他

の変化は、対照群でも認められたものであり、さらに、この系統及びこの週齢のラットに通常認められる変化であることから、コンドリアーゼ投与とは関連性のない変化と考えられた。

血清中の抗コンドリアーゼ IgG が投与 15 日に検出され、投与 28 日に最も高値となり、休薬期間終了時においても検出された。抗コンドリアーゼ IgM は投与 15 日に最も高値となり、その後、投与 28 日には減少した。回復群では、抗コンドリアーゼ IgM はほとんど検出されなかった。投与部位の皮下にみられた単核細胞浸潤は、異種タンパク質に対する局所の免疫反応によるものと考えられた。

以上の結果から、2、20 及び 200 U/kg/日の投与で免疫反応が引き起こされるものの、明らかな毒性はみられなかったことから、コンドリアーゼのラット 28 日間反復皮下投与における無毒性量は雌雄ともに 200 U/kg/日と判断した。

2.6.6.3.2 イヌにおける 29 日間反復皮下投与毒性試験

（資料番号 4.2.3.2-3：試験番号 [redacted]707、資料番号 4.2.3.2-4：試験番号 [redacted]2916/04；概要表 2.6.7.7B）

ビーグル犬（1 群雌雄各 4 匹）にコンドリアーゼを 2、20 又は 200 U/kg/日の用量で 1 日 1 回 29 日間反復皮下投与した。対照として、PBS を 0.3 mL/kg/日の容量で投与した。また、回復群として、対照群及び 200 U/kg 群に各群雌雄各 2 匹を追加し、投与期間終了後に 28 日間の休薬期間を設けて、投与期間中に認められた所見の回復性を検討した。当該試験の高用量は、試験実施当時の製剤濃度の 10 倍のコンドリアーゼを投与した（今回の申請用量に対しては 9600 倍の投与量）。投与後の一般状態観察、体重及び摂餌量測定、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、眼科学的検査、剖検、器官重量測定、病理組織学的検査及び血清中抗コンドリアーゼ抗体価測定を行った。また、TK 検討のため、1 群雌雄各 3 匹のビーグル犬に、当該試験と同様の条件でコンドリアーゼを投与し、投与 1、15 及び 29 日に、血漿中コンドリアーゼ濃度を、高感度コンドリアーゼ酵素活性測定法により測定した（各時点雌雄各 3 匹）。

血漿中コンドリアーゼ濃度は、投与 1 日の投与後 0.5 時間から 6 時間に最高濃度に達し、その後減少した。C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}last}$ に性差はみられず、曝露量は投与量の増加に伴い増加した。投与 15 及び 29 日の血漿中コンドリアーゼ濃度は、採血したすべての群で定量下限未満であり、反復投与期間中にコンドリアーゼに特異的な抗体が産生され、コンドリアーゼ活性を中和したものと考えられた。

観察期間中、いずれの投与群においても死亡例はみられず、体重、摂餌量、尿検査、眼科学的検査、剖検、器官重量及び病理組織学的検査に、コンドリアーゼ投与の影響はみられなかった。一般状態観察では、投与期間終了時に 20 U/kg 群の雄 1 例及び 200 U/kg 群の雄 3 例で投与部位に腫脹がみられた。血液学的検査では、投与期間終了時に 2 及び 200 U/kg 群の雌で MCHC の有意な低値がみられたが、投与量との関連性がないことから、偶発的変化と考えられた。また、200 U/kg 群の雌雄で白血球数の高値が認められたが、コンドリアーゼに対する抗体産生と関連した変化と考えられた。休薬期間終了時に 200 U/kg 群の雄で赤血球数、ヘモグロビン量及びヘマトクリット値の有意な低値がみられた。しかしながら、これらの変化は軽度であり、すべての値は背景データの範囲内であったことから、明らかな毒性作用を示唆するものではないと考えられた。血液生化学的検査では、投与期間終了時に 200 U/kg 群の雌で血漿中尿素の低値及びカルシウムの高値がみられたが、他の検査項目に変化が認め

られず、また、カルシウム濃度の高値は雌のみにみられた軽度の変化であることから、偶発的変化と考えられた。

血清中の抗コンドリアーゼ IgG が、投与期間中のコンドリアーゼ投与群の雌雄で検出され、休薬期間終了時においても検出された。また、抗コンドリアーゼ IgM が、すべてのコンドリアーゼ投与群の雄で投与 15 日に、20 U/kg 群の雌 1 例で投与 15 及び 27 日に検出されたが、休薬期間終了時には検出されなかった。

以上の結果から、2、20 及び 200 U/kg/日の投与で免疫反応が引き起こされるものの、明らかな毒性はみられなかったことから、コンドリアーゼのイヌ 29 日間反復皮下投与における無毒性量は雌雄ともに 200 U/kg/日と判断した。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

コンドリアーゼの遺伝毒性について、以下の in vitro 及び in vivo 試験により評価した。実施した試験を表 2.6.6.4-1 に示した。

表 2.6.6.4-1. 遺伝毒性試験一覧

試験の種類	菌株/細胞/動物種	代謝活性化の有無	投与量/処理濃度	GLP 適用	資料番号
復帰突然変異	ネズミチフス菌、大腸菌	有、無	0、1.23、3.7、11.11、33.33、100.0 µL（約 100 U）/plate	適	4.2.3.3.1-1
染色体異常	CHO 細胞	有、無	0、60、80、100 U/mL	適	4.2.3.3.1-2
小核	マウス	－	0、2000 U/kg（腹腔内投与）	適	4.2.3.3.2-1

－：該当せず

2.6.6.4.1 細菌を用いる復帰突然変異試験

（資料番号 4.2.3.3.1-1：試験番号 [redacted]248；概要表 2.6.7.8A）

コンドリアーゼの遺伝子突然変異誘発性の有無をネズミチフス菌 TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び大腸菌 WP2*uvr*A 株を用いて検討した。コンドリアーゼの用量は、1.23、3.7、11.11、33.33 又は 100.0 µL（約 100 U）/plate の計 5 濃度を設定した。コンドリアーゼ原薬を用いて調製できる最高濃度を最高用量とした。

薬物代謝酵素系（S9mix）による代謝活性化の有無に関わらず、コンドリアーゼのいずれの濃度、いずれの試験菌株においても、復帰変異コロニー数の増加はみられなかった。

以上の結果から、コンドリアーゼは、遺伝子突然変異誘発性を有しないと判定した。

2.6.6.4.2 ほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験

（資料番号 4.4.3.3.1-2：試験番号 [redacted]219；概要表 2.6.7.8B）

コンドリアーゼの染色体異常誘発性の有無をチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を用いて検討した。コンドリアーゼの用量は、60、80 又は 100 U/mL の計 3 濃度を設定した。コンドリアーゼ原薬を用いて調製できる最高濃度を最高用量とした。

S9mix による代謝活性化の有無に関わらず、コンドリアーゼのいずれの濃度においても、染色体異常を有する細胞の増加はみられなかった。

以上の結果から、コンドリアーゼは、ほ乳類の培養細胞に対して染色体異常誘発性を有しないと判定した。

2.6.6.4.3 マウスにおける小核試験

（資料番号 4.2.3.3.2-1：試験番号 [redacted]547；概要表 2.6.7.9）

Swiss マウス（1 群雌雄各 15 匹）に、コンドリアーゼを 2000 U/kg の用量で単回腹腔内投与した。対照として、PBS を 20 mL/kg の容量で投与した。投与後 24、48 及び 72 時間に、雌雄各 5 匹より骨髄細胞を採取した。骨髄細胞の塗抹標本を作製し、小核を有する多染性赤血球の出現頻度を調べた。投与量は、マウス及びラットにおける単回投与毒性試験の用量である 2000 U/kg とした。

コンドリアーゼ投与群において、対照群と比較して、小核を有する多染性赤血球の発現頻度の増加はみられなかった。

以上の結果から、コンドリアーゼは、マウス骨髄細胞に対して小核誘発性を有しないと判定した。

2.6.6.5 がん原性試験

コンドリアーゼの臨床適応は、椎間板内への単回投与である。コンドリアーゼのイヌ及びカニクイザルにおける単回椎間板内投与試験において、カニクイザルでは投与後 26 週まで、イヌでは投与後 3 年まで観察した結果、椎間板内にがん原性を示唆する所見はみられなかった。また、ラット及びイヌに 28 日間又は 29 日間反復皮下投与した試験においても、がん原性を示唆する所見はみられなかった。さらに、コンドリアーゼには遺伝毒性も認められなかった。以上のことから、がん原性試験は実施しなかった。

2.6.6.6　生殖発生毒性試験

コンドリアーゼの臨床適応経路である椎間板内投与では、全身毒性の評価に必要となる十分に高い全身曝露が達成できない。さらに、評価に必要な期間の反復投与もできない。したがって、代替投与経路である皮下投与によりコンドリアーゼの生殖発生毒性を評価した。また、コンドリアーゼの反復皮下投与により、血清中の抗コンドリアーゼ抗体価の上昇がみられ（2.6.6.3.1 参照）、投与期間を通じた全身曝露の継続ができていなかった可能性が考えられたことから、投与期間を分割してコンドリアーゼを投与する試験を実施した。実施した試験を表 2.6.6.6-1 に示した。

表 2.6.6.6-1. 生殖発生毒性試験一覧

試験の種類	動物種/系統	投与経路	投与期間	動物数（匹/群）	投与量（U/kg/日）	GLP適用	資料番号
受胎能及び着床までの初期胚発生	ラット/SD	皮下	雄：交配前 4 週～剖検前日 雌：交配前 2 週～妊娠 7 日	雄：22 雌：22	0、2、20、200	適	4.2.3.5.1-1
	ラット/Wistar	皮下	雄：交配前 7 日～交尾確認日 雌：交配前 7 日～妊娠 7 日	雄：20 雌：20	0、200	適	4.2.3.5.1-2
胚･胎児発生への影響	ラット/Wistar	皮下	妊娠 7 日～16 日	雌：52	0、2、20、200	適	4.2.3.5.2-1
	ラット/Wistar	皮下	妊娠 12 日～17 日	雌：20	0、200	適	4.2.3.5.2-2
	ウサギ/NZW	皮下	妊娠 6 日～18 日	雌：16	0、2、20、200	適	4.2.3.5.2-3
	ウサギ/NZW	皮下	妊娠 12 日～18 日	雌：20	0、200	適	4.2.3.5.2-4
出生前及び出生後の発生並びに母体の機能	ラット/Wistar	皮下	妊娠 15 日～分娩後 20 日	雌：22	0、200	適	4.2.3.5.3-1

NZW：New Zealand White

2.6.6.6.1　ラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（1）

（資料番号 4.2.3.5.1-1：試験番号 [redacted]-2755；概要表 2.6.7.12A）

SD ラット（1 群雌雄各 22 匹）に、コンドリアーゼを 2、20 又は 200 U/kg/日の用量で、雄は交配前 4 週から剖検前日まで、雌は交配前 2 週から妊娠 7 日まで、反復皮下投与した。対照として、PBS を 1 mL/kg/日の容量で投与した。ラットにおける 28 日間反復皮下投与毒性試験において、試験実施当時の推定臨床用量の 10 倍である 200 U/kg/日の用量で、抗コンドリアーゼ抗体価の上昇以外に明らかな影響がみられなかったことから、当該試験の高用量は 200 U/kg/日とした。

母動物の一般状態観察、体重及び摂餌量測定を実施した。投与開始前 7 日から交配期間中までの毎日、膣垢像から性周期の判定を行い、投与開始後 14 日間の各群の雌の平均発情回数を算出した。雌動物は同群内の雄動物と 1 対 1 で同居させ、膣栓又は膣垢中に精子が確認された場合に交尾成立（妊娠 0 日）とし、交尾率、受胎率を求めた。雌は妊娠 15 日に帝王切開し、黄体数と着床数を数え、着床率を求めた。母動物ごとに生存胎児数、死亡胎児数を算定した。また、生存胎児は外表検査と体重測定を行い、死亡率、胎児生存率、生存胎児の同腹児平均体重を求めた。雄動物は最終同居終了時に

剖検し、体表、胸腔及び腹腔内器官及び組織を肉眼的に観察した。その後、精巣、精巣上体、精嚢及び前立腺の重量を測定した。雄の対照群と 200 U/kg 群全例の精巣上体、精嚢及び前立腺並びに雌の不妊動物の卵巣及び子宮の病理組織学的検査を行った。また、対照群と 200 U/kg 群全例の精巣について、生殖細胞とセルトリ細胞の数を測定した。

雌雄親動物に死亡例はみられなかった。一般状態観察では、20 U/kg 群の雌で交配開始日から妊娠 10 日まで、200 U/kg 群の雌では交配開始日から妊娠 6 日まで耳介の発赤、肥厚及び痂皮がみられた。体重には、コンドリアーゼ投与の影響はみられなかった。摂餌量は、200 U/kg 群の雌で、妊娠期間を通して低値傾向が認められ、妊娠 6 日から 7 日及び 12 日から 15 日の間の摂餌量は有意な低値を示した。ラットへの反復皮下投与により、抗コンドリアーゼ抗体価（IgG 及び IgM）の増加がみられていることから、これら一般状態の変化及び摂餌量の減少は、免疫反応により誘発された変化、あるいはそれに伴う二次的影響と考えられた。性周期、発情回数、交尾率及び雌雄の受胎率にコンドリアーゼ投与の影響はみられなかった。2 U/kg 群で着床数の有意な低値がみられたが、20 及び 200 U/kg 群ではみられず、投与量の増加に伴う変化ではないことから、コンドリアーゼ投与とは関連性のない変化と考えられた。剖検では、200 U/kg 群の雄 1 例に左側精巣の腫大がみられた以外に変化はなかった。腫大例の認められた 200 U/kg 群の精巣重量においては、コンドリアーゼ投与群と対照群の間に有意差はみられなかった。病理組織学的検査では、精巣腫大のみられた 200 U/kg 群の 1 例で腫大側の精巣に精細管内腔の拡張がみられたが、1 例のみでの片側だけの変化であったことから、自然発生的な変化と考えられた。精細管上皮細胞数の測定において、200 U/kg 群で精子形成サイクルの V ステージで精祖細胞数比が有意な高値を示したが、その差はわずかであり、その他の細胞数及び上皮細胞数には対照群の間に差はみられなかった。胎児の検査では、外表異常として、2 U/kg 群で短尾、20 U/kg 群で小眼球症、200 U/kg 群で結合体がみられたが、その発生率は対照群と差はなかった。2 U/kg 群で生存胎児数の有意な低値がみられたが、20 及び 200 U/kg 群ではみられなかった。胎児体重においては、コンドリアーゼ投与群と対照群の間に有意差はみられなかった。

以上の結果から、雌では 20 及び 200 U/kg/日の投与で耳介の変化が認められていることから、コンドリアーゼの無毒性量は、雌雄親動物における一般毒性は雄で 200 U/kg/日、雌で 2 U/kg/日、生殖能及び初期胚発生に関しては、雌雄ともに 200 U/kg/日と判断した。

2.6.6.6.2 ラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（2）

（資料番号 4.2.3.5.1-2：試験番号 [redacted]143；概要表 2.6.7.12B）

コンドリアーゼのラットへの反復皮下投与により、抗コンドリアーゼ抗体が産生され、評価すべき生殖発生過程を通しての十分量のコンドリアーゼ全身曝露を得ることが、同一動物では困難と考えられた。そこで、コンドリアーゼの投与期間を最大 8 日間に分割した群を設け、対照群と比較することにより各投与時期におけるコンドリアーゼ投与の影響を評価した。

Wistar ラット（1 群雌雄各 20 匹）に、コンドリアーゼを 200 U/kg/日の用量で反復皮下投与した。コンドリアーゼ投与群として、投与期間を雌雄ともに交配前 7 日から交配開始日とする群（交配前投与群：2 群）、雌雄ともに交配開始日から交尾確認日とする群（交配中投与群：3 群）、雄は無処置、

雌は交尾確認日から妊娠 7 日とする群（妊娠中投与群：4 群）を設定した。対照群（1 群）については投与期間を分割せず、全期間を通して PBS を 1 mL/kg/日の容量で投与した。また、TK 検討のため、サテライト群を設けて血漿中コンドリアーゼ濃度を、高感度コンドリアーゼ酵素活性測定法により測定した。投与量は、ラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（1）の高用量と同用量とした。母動物の一般状態観察、体重及び摂餌量測定を実施した。1 群及び 2 群は雌雄の投与 8 日以降、3 群は雌雄の投与日、4 群は雌の投与前から、それぞれ最長 7 日間、雌雄 1 対 1 で同居させ、交配させた。膣垢中に精子が認められた場合又は膣内に膣栓が認められた場合に交尾成立（妊娠 0 日）とした。1 群から 3 群の雄は交尾成立の翌日に剖検した。雌は妊娠 13 日に帝王切開し、剖検、着床の有無、黄体数、着床数、生存胎児数を観察した。

雌雄親動物に死亡例はみられず、一般状態、体重、体重増加量、摂餌量及び剖検にコンドリアーゼ投与の影響はみられなかった。性周期、交尾率、受胎率、交尾成立までの日数、黄体数、着床数、着床前死亡率、生存胎児数、早期及び後期吸収胚率、死亡胎児率及び着床後死亡率においては、コンドリアーゼ投与群と対照群の間に有意差はみられなかった。

コンドリアーゼを投与した TK サテライト動物において、初回投与後及び最終投与後の血漿中コンドリアーゼ濃度は、定量下限以上であったことから、投与期間中の雌雄親動物のコンドリアーゼによる全身曝露が確認された。

以上の結果から、コンドリアーゼの雌雄親動物における一般毒性、生殖機能及び初期胚発生に関する無毒性量は、いずれも 200 U/kg/日と判断した。

2.6.6.6.3 ラットにおける胚･胎児発生への影響に関する試験（1）

（資料番号 4.2.3.5.2-1：試験番号 [redacted]428；概要表 2.6.7.13A）

Wistar 妊娠雌ラット（1 群 52 匹）にコンドリアーゼを 2、20 又は 200 U/kg/日の用量で妊娠 7 日から 16 日まで反復皮下投与した。対照として、PBS を 1 mL/kg/日の容量で投与した。妊娠動物のうち 35 匹を帝王切開し、17 匹は自然分娩させた。ラットにおける 28 日間反復皮下投与毒性試験において、試験実施当時の推定臨床用量の 10 倍である 200 U/kg/日の用量で抗コンドリアーゼ抗体価の上昇以外に明らかな影響がみられなかったことから、当該試験の高用量は 200 U/kg/日とした。

母動物の一般状態観察、体重及び摂餌量測定を実施した。F_0 帝王切開群は、妊娠 21 日に帝王切開し、剖検を行うとともに、黄体数、着床数、早期及び後期吸収胚数、死亡胎児数、生存胎児数及び性別を検査し、子宮及び卵巣重量、胎盤重量、生存胎児の体重及び体長測定並びに F_1 胎児の外表、内臓及び骨格検査を実施した。自然分娩群の F_0 雌について、妊娠動物数、妊娠期間、授乳時体重及び摂餌量、剖検、着床痕数、出産児数、生存出生児数、死産児数、哺育期間中の一腹当りの死亡出生児数を検査し、受胎率、出生率、生存率及び離乳率、生存出生児性比及び着床後死亡率を算出した。F_1 出生児について、一般状態、体重、剖検、発育分化、行動発達、神経筋機能及び感覚機能について検査した。F_1 雌雄（生殖試験群）の生殖能の検査では、交尾までの期間、交尾及び受胎率を算出した。F_1 帝王切開群について、妊娠期間中の F_1 雌の体重、摂餌量、妊娠期間、黄体数、着床数、早期及び後期吸収胚数、生存及び死亡胎児数並びに着床前及び着床後死亡率、生存胎児率、胚及び胎児

死亡率、生存胎児性比並びに子宮及び卵巣重量を測定した。F_2胎児については、外表異常を検査し、半数例について内臓異常を検査した。

妊娠動物に死亡例はみられず、一般状態にコンドリアーゼ投与の影響はみられなかった。

すべての妊娠動物の妊娠期間及び自然分娩群の哺育期間における、体重及び摂餌量にコンドリアーゼ投与の影響はみられなかった。

F_0帝王切開群の剖検に異常はみられず、黄体数、着床数、早期及び後期吸収胚数、生存胎児数及び生存胎児率、死亡胎児数、着床前及び着床後死亡率並びに胎児体重、体長、子宮及び卵巣重量並びに胎盤重量において、コンドリアーゼ投与群と対照群の間に有意差はみられなかった。生存胎児性比に関して、20 U/kg 群で生存雄胎児数の有意な増加がみられたが、200 U/kg 群ではみられなかったことから、コンドリアーゼ投与とは関連性のない変化と考えられた。

F_1胎児の外表、内臓及び骨格検査に、コンドリアーゼ投与の影響はみられなかった。骨格検査では、頭頂骨、前頭骨、指骨及び趾骨の不完全骨化並びに指骨の未骨化を有する胎児数の有意な増加又は減少がみられたが、これらの変異は項目によっては投与量の増加に伴う変化ではないこと、骨化度に関する項目では骨化の亢進と抑制の両方の変化が認められたこと、すべて一腹当りでは有意差はみられなかったことから、コンドリアーゼ投与とは関連性のない変化と考えられた。

自然分娩群のF_0雌の妊娠動物数、妊娠期間、授乳時体重及び摂餌量、剖検、着床痕数、出産児数、生存出生児数、死産児数、受胎率、出生率、生存率及び離乳率、生存出生児性比及び着床後死亡率において、コンドリアーゼ投与群と対照群の間に有意差はみられなかった。2 U/kg 群で哺育期間中の一腹当りの死亡出生児数の有意な増加がみられたが、20 及び 200 U/kg 群では有意差はみられなかったことから、コンドリアーゼ投与とは関連性のない変化と考えられた。

F_1出生児の離乳前の体重、剖検、発育分化（耳介開展、毛生、切歯萌出、眼瞼開裂、精巣下降、膣開口）、行動発達、神経筋機能、感覚機能及び哺育期間中（離乳後）の一般状態及び体重並びに摂餌量にコンドリアーゼ投与の影響はみられなかった。F_1出生児の離乳前の一般状態観察では、コンドリアーゼ投与群で冷感及び巨大児の数に有意な低値及び高値がみられたが、投与量との関連性がないことから、コンドリアーゼ投与とは関連性のない変化と考えられた。

F_1雌雄（生殖試験群）の生殖能の検査では、交尾までの期間及び交尾率において、コンドリアーゼ投与群と対照群の間に有意差はみられなかった。200 U/kg 群の受胎率に有意差がみられたが、対照群の値が低かったためであり、受胎率の変化はコンドリアーゼ投与とは関連性のない変化と考えられた。F_1帝王切開群の黄体数、着床数、早期及び後期吸収胚数、生存及び死亡胎児数並びに着床前及び着床後死亡率においては、コンドリアーゼ投与群と対照群の間に有意差はみられなかった。妊娠期間中のF_1雌の体重、摂餌量、妊娠期間、生存胎児率、胚及び胎児死亡率、生存胎児性比並びに卵巣重量においても、コンドリアーゼ投与群と対照群の間に有意差はみられなかった。200 U/kg 群の子宮重量に有意な低値がみられたが、対照群の値が高かったためであり、子宮重量の変化はコンドリアーゼ投与とは関連性のない変化と考えられた。

F_2胎児の外表検査では、胎児の体長が 20 及び 200 U/kg 群で有意に増加したが、F_1胎児の体長と同等であることから、コンドリアーゼ投与とは関連性のない変化と考えられた。胎児体重、胎盤重量及び胎児の内臓検査において、コンドリアーゼ投与群と対照群の間に有意差はみられなかった。

以上の結果から、コンドリアーゼの母動物（F_0）における一般毒性、母動物（F_0）における生殖機能及び次世代（F_1）についての無毒性量は、いずれも 200 U/kg/日と判断した。

2.6.6.6.4 ラットにおける胚･胎児発生への影響に関する試験（2）

（資料番号 4.2.3.5.2-2：試験番号 [redacted]144；概要表 2.6.7.13B）

コンドリアーゼのラットへの反復皮下投与により、抗コンドリアーゼ抗体が産生され、評価すべき生殖発生過程を通しての十分量のコンドリアーゼ全身曝露を得ることが、同一動物では困難と考えられた。そこで、先に実施したラットにおける胚及び胎児発生の影響に関する試験（1）において、十分なコンドリアーゼ曝露ができていなかった可能性がある妊娠12日から17日まで限局して投与する試験を追加実施した。

Wistar 妊娠雌ラット（1 群 20 匹）に、コンドリアーゼを 200 U/kg/日の用量で妊娠 12 日から 17 日まで反復皮下投与した。対照として、PBS を 1 mL/kg/日の容量で投与した。母動物の一般状態観察、体重及び摂餌量測定を実施した。妊娠 20 日に帝王切開し、剖検を行うとともに、黄体数、着床数、死亡胎児数、生存胎児数、生存胎児の外表及び性別を検査し、生存胎児の体重及び胎盤重量測定、内臓及び骨格検査を実施した。また、TK 検討のため、サテライト動物を用いて血漿中コンドリアーゼ濃度を、高感度コンドリアーゼ酵素活性測定法により測定した。当該試験の投与量は、ラットにおける胚及び胎児発生の影響に関する試験（1）の高用量と同用量とした。

母動物に死亡例はみられず、一般状態、体重、摂餌量、剖検、黄体数、着床数及び死亡胎児数に、コンドリアーゼ投与の影響はみられなかった。胚及び胎児の生存、発育、外表異常、内臓異常、骨格異常及び骨格変異の各発現率並びに骨化数において、コンドリアーゼ投与群と対照群の間に有意差はみられなかった。

コンドリアーゼを投与した TK サテライト動物において、初回投与後及び最終投与後の血漿中コンドリアーゼ濃度は定量下限以上であったことから、投与期間中の母動物のコンドリアーゼによる全身曝露が確認された。

以上の結果から、コンドリアーゼの母動物における一般毒性、生殖機能及び胚並びに胎児発生に関する無毒性量は、いずれも 200 U/kg/日と判断した。

2.6.6.6.5 ウサギにおける胚･胎児発生の影響に関する試験（1）

（資料番号 4.2.3.5.2-3：試験番号 [redacted]772；概要表 2.6.7.13C）

New Zealand White 妊娠雌ウサギ（1 群 16 匹）に、コンドリアーゼを 2、20 又は 200 U/kg/日の用量で、妊娠 6 日から 18 日まで反復皮下投与した。対照として、PBS を 1 mL/kg/日の容量で投与した。

母動物の一般状態観察、体重及び摂餌量測定を実施した。妊娠 29 日に帝王切開し、剖検を行うとともに、黄体数、着床数、死亡胎児数、生存胎児数、生存胎児の外表及び性別を検査し、生存胎児の体重及び胎盤重量測定、内臓及び骨格検査を実施した。ラットにおける 28 日間反復皮下投与毒性試験において、試験実施当時の推定臨床用量の 10 倍である 200 U/kg/日の用量で抗コンドリアーゼ抗体価の上昇以外に明らかな影響がみられなかったことから、当該試験の高用量は 200 U/kg/日とした。

2 U/kg 群の 1 例で著しい衰弱がみられたため、妊娠 20 日に切迫屠殺した。他のウサギには、一般状態に異常はみられなかった。200 U/kg 群で妊娠 6 日から 12 日の摂餌量の有意な減少がみられたが、その他の期間の摂餌量には有意差はみられず、体重及び体重増加量に有意差はみられなかった。母動物の剖検では、切迫屠殺した 1 例を除いて異常はみられなかった。黄体数、着床数、生存胎児数、死亡胎児数、早期及び後期吸収胚数、着床前死亡率、着床後死亡率、胎児体重、胎盤重量及び生存胎児の性比においては、コンドリアーゼ投与群と対照群の間に有意差はみられなかった。

胎児の外表及び内臓検査に、コンドリアーゼ投与の影響はみられなかった。骨格検査では、20 及び 200 U/kg 群において骨格変異である腰肋を持つ胎児数が有意に増加した。この変化がコンドリアーゼ投与の影響である可能性も否定しきれないものの、ウサギにおいて腰肋は自然発生的に高頻度に認められる変化であり、本薬投与による影響は、その背景データから大きく外れた値ではなく、自然発生的に認められる程度であったことから、その毒性学的意義は小さいと考えられた。20 U/kg 群において、胸骨分節、脛骨近位骨端及び上腕骨近位骨端の不完全骨化、並びに上腕骨近位骨端及び前肢中節骨の未骨化の一腹当りの頻度が有意に増加した。20 U/kg 群での骨化遅延は、同腹児の生存胎児数が多かったことによるものであり、コンドリアーゼ投与とは関連性のない変化と考えられた。200 U/kg 群において、前肢中節骨の未骨化、及び後肢中節骨の不完全骨化の有意な減少、並びに胸骨分節の不完全骨化の有意な増加がみられたが、一定した変化ではないため、コンドリアーゼ投与とは関連性のない変化と考えられた。

以上の結果から、コンドリアーゼの母動物における一般毒性、生殖機能及び胚並びに胎児発生に関する無毒性量は、いずれも 200 U/kg/日と判断した。

2.6.6.6.6 ウサギにおける胚･胎児発生の影響に関する試験（2）

（資料番号 4.2.3.5.2-4：試験番号 [redacted]365；概要表 2.6.7.13D）

コンドリアーゼのウサギへの反復皮下投与により、抗コンドリアーゼ抗体が産生され、評価すべき生殖発生過程を通しての十分量のコンドリアーゼ全身曝露を得ることが、同一動物では困難と考えられた。そこで、先に実施したウサギにおける胚及び胎児発生の影響に関する試験（1）において、十分なコンドリアーゼ曝露ができていなかった可能性がある妊娠12日から18日まで限局して投与する試験を追加実施した。

New Zealand White 妊娠雌ウサギ（1 群 20 匹）にコンドリアーゼを 200 U/kg/日の用量で妊娠 12 日から 18 日まで反復皮下投与した。対照として、PBS を 1 mL/kg/日の容量で投与した。TK 検討のため、サテライト動物を用いて血漿中コンドリアーゼ濃度を、高感度コンドリアーゼ酵素活性測定法により測定した。また、ウサギ胚及び胎児発生毒性試験（1）の全身曝露を推定するため、着床から妊

娠中期までの妊娠 6 日から 12 日までコンドリアーゼを投与する TK サテライト群を設け、血漿中コンドリアーゼ濃度を、高感度コンドリアーゼ酵素活性測定法により測定した。当該試験の投与量は、ウサギにおける胚及び胎児発生の影響に関する試験（1）の高用量と同用量とした。母動物の一般状態観察、体重及び摂餌量測定を実施した。妊娠 29 日に帝王切開し、剖検を行うとともに、黄体数、着床数、死亡胎児数、生存胎児数、生存胎児の外表及び性別を検査し、生存胎児の体重及び胎盤重量測定、内臓及び骨格検査を実施した。

母動物に死亡例はみられず、一般状態、体重、摂餌量及び剖検にはコンドリアーゼ投与の影響はみられなかった。胎児の観察では、黄体数、着床数、着床前死亡率、着床後死亡率、生存胎児数、胎児死亡率、生存胎児の体重及び胎盤重量において、コンドリアーゼ投与群と対照群の間に有意差はみられなかった。コンドリアーゼ投与群では対照群と比較して吸収胚の発現率が有意に低く、生存胎児の性比（雄数/総数）が有意に高かったが、偶発的変化と考えられた。コンドリアーゼ投与群では外表異常及び内臓異常は認められなかった。骨格検査において、胎児の骨格異常発現率及び胎児に骨格異常が認められた母動物の割合が有意な高値を示した。コンドリアーゼ投与群で増加した骨格異常を型別にみると、胸骨分節癒合については、当該試験施設の背景データの範囲内であることから、自然発生の範囲内にあると考えられた。また、胸椎過剰（胸椎数 13）がコンドリアーゼ投与群の 1 母動物に集中して 4 胎児にみられたが、他の母動物にはみられなかったことから、遺伝的要因によるものと推察された。その他、コンドリアーゼ投与群の 1 母動物の 1 胎児に腰椎体癒合及び腰椎半椎の複合異常、他の母動物の 1 胎児に尾椎体癒合がみられたが、いずれも発現頻度は低いことから、コンドリアーゼ投与とは関連性のない変化と考えられた。骨格変異の発現率及び骨化数においては、コンドリアーゼ投与群と対照群の間に有意差はみられなかった。

コンドリアーゼ投与群の血漿中コンドリアーゼ濃度は、初回投与日及び最終投与日で定量下限以上であったことから、妊娠 12 日から 18 日まで投与した時の投与期間中の母動物のコンドリアーゼによる全身曝露が確認された。また、TK サテライト群の結果から、妊娠 6 日から 12 日まで投与した時の投与期間中の母動物のコンドリアーゼによる全身曝露が確認された。

以上の結果から、コンドリアーゼの母動物における一般毒性、生殖機能及び胚並びに胎児発生に関する無毒性量は、いずれも 200 U/kg/日と判断した。

2.6.6.6.7 ラットにおける出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

（資料番号 4.2.3.5.3-1：試験番号 [redacted]145；概要表 2.6.7.14）

Wistar 妊娠雌ラット（1 群 22 匹）に、コンドリアーゼを 200 U/kg/日の用量で、妊娠 15 日から分娩後 20 日まで反復皮下投与した。コンドリアーゼ投与群については投与期間を分割し、分娩後 0 日から 7 日投与群、分娩後 7 日から 14 日投与群、分娩後 14 日から 20 日投与群、妊娠 15 日から分娩前日投与群とした。対照群として、投与期間を分割せず全期間を通して PBS を 1 mL/kg/日の容量で投与した。また、TK 検討のため、サテライト動物を用いて血漿中コンドリアーゼ濃度を、高感度コンドリアーゼ酵素活性測定法により測定した。当該試験の投与量は、ラットにおける各生殖発生毒性試験及び 28 日間反復投与毒性試験の高用量と同用量とした。母動物（F_0）の一般状態観察、体重及び摂

餌量測定並びに剖検を行った。母動物の生殖機能に関する評価項目として、分娩及び哺育能を観察した。次世代（F_1）に及ぼす影響評価のため、分娩時の状態、一般状態、4 日生存率、離乳率、剖検、体重、発育分化、初期行動、感覚機能、オープンフィールドテスト、条件回避学習能、生殖器の発育分化、交尾能、受胎能並びに胚（F_2）の着床及び生存を調べた。

F_0 雌には、いずれのコンドリアーゼ投与群でも死亡例はみられず、一般状態、体重、摂餌量、剖検、分娩率及び出産率に、コンドリアーゼ投与の影響はみられなかった。F_1 出生児では、一般状態、体重、4 日生存率、離乳率、初期行動（背面立ち直り反射及び負の走地性）及び離乳時の剖検にコンドリアーゼ投与の影響はみられなかった。発育分化（毛生、切歯萌出、眼瞼開裂、耳介開展）において、分娩後 14 日から 20 日投与群の生後 2 日における耳介開展の発現率が雌雄ともに有意な低値を示したが、投与期間は分娩後 14 から 20 日であるため、コンドリアーゼ投与とは関連性のない変化であった。

離乳後の観察では、一般状態、体重、行動観察（視覚性置き直し反応、瞳孔反射、耳介反射及び疼痛反応）、生殖機能検査（生殖器の発育分化、交尾率及び受胎率）及び 10 週齢時の剖検に、コンドリアーゼ投与の影響はみられなかった。オープンフィールドテストでは、分娩後 14 日から 20 日投与群の雄の 2 日目の移動区画数及び排尿回数並びに妊娠 15 日から分娩前日投与群の 2 日目の移動区画数が有意な低値を示したが、その差は軽度であることから、毒性学的に意義はないと考えられた。F_1 雌の妊娠期間中の一般状態及び体重に、コンドリアーゼ投与の影響はみられなかった。帝王切開時の剖検に異常はみられず、黄体数、着床数、着床前死亡率、着床後死亡率、早期及び後期吸収胚率、生存胚数及び死亡胚率において、コンドリアーゼ投与群と対照群の間に有意差はみられなかった。

コンドリアーゼを投与した TK サテライト動物において、初回投与後及び最終投与後の血漿中コンドリアーゼ濃度は定量下限以上であったことから、投与期間中の母動物のコンドリアーゼによる全身曝露が確認された。

以上の結果から、コンドリアーゼの母動物（F_0）における一般毒性、生殖機能及び次世代（F_1）の発生に関する無毒性量は、いずれも 200 U/kg/日と判断した。

2.6.6.7 局所刺激性試験

コンドリアーゼの臨床適応は、椎間板内への単回投与であることから、椎間板に対する局所刺激性を検討した。また、本剤の椎間板周囲組織への誤投与又は椎間板からの漏出の可能性などを考慮して、種々の投与経路（髄腔内、筋肉内、皮内）による局所刺激性も検討した。

また、臨床試験に使用したコンドリアーゼ原薬の製造方法は、今回の申請に至るまでに 3 回変更されており、コンドリアーゼ製剤の処方が 1 回変更されている。したがって、各変更時にウサギを用いた局所刺激性試験を実施して変更製剤の安全性を確認した。実施した試験を表 2.6.6.7-1 に示した。本概要文中にはコンドリアーゼ製剤を用いて最後に実施した試験（原薬製法 C による凍結乾燥製剤）の結果のみを示し、他の試験の概略は概要表 2.6.7.16 にまとめて示した。

表 2.6.6.7-1. 局所刺激性試験一覧

被験物質	動物種/系統	投与経路	投与量	観察期間	GLP適用	資料番号
溶液製剤（原薬製法 A）	ウサギ/NZW	椎間板内 髄腔内 脊髄神経根 筋肉内	0、2 U/disc 0、200 U/site 0、50 U/site 0、200 U/site	投与後 2、7 日	適	4.2.3.6-1
凍結乾燥製剤（原薬製法 A）	ウサギ/日本白色種	椎間板内 髄腔内 筋肉内	0、0.2 U/disc 0、20 U/site 0、20 U/site	投与後 2、7 日	適	4.2.3.6-2
凍結乾燥製剤（原薬製法 B）	ウサギ/日本白色種	椎間板内 髄腔内 筋肉内	0、0.1 U/disc 0、10 U/site 0、10 U/site	投与後 2、7 日	適	4.2.3.6-3 4.2.3.6-4 4.2.3.6-5
凍結乾燥製剤（原薬製法 C、概要文記載試験）	ウサギ/日本白色種	椎間板内 髄腔内 筋肉内	0、0.075 U/disc 0、7.5 U/site 0、7.5 U/site	投与後 2、7 日	適	4.2.3.6-6 4.2.3.6-7 4.2.3.6-8
凍結乾燥製剤（原薬製法 A）	モルモット/Hartley	皮内	0、0.5、4、8 U/site	投与後 0.5、24、48、72 時間	適	4.2.3.6-9
凍結乾燥製剤（原薬製法 A）	モルモット/Hartley	皮内	注射針法：0、0.05、0.1、0.5、8 U/site プリックランセット法：0、0.03、0.3、0.6、1.2、2.4 U/site	投与後 0.5、24、48、72 時間、5、7、10、14、16 日	適	4.2.3.6-10

NZW：New Zealand White

2.6.6.7.1　椎間板内投与試験

（資料番号 4.2.3.6-6：試験番号 [redacted]-3409；概要表 2.6.7.16）

日本白色種ウサギ（1 群雄 6 匹/時点）の L4/L5 内に、コンドリアーゼ製剤（7.5 U/mL）、コンドリアーゼ製剤溶解液（陰性対照）又はプラセボ製剤（比較対照）を 10 µL/disc の容量で単回投与した。投与後 2 及び 7 日まで一般状態観察及び体重測定を行い、観察期間終了後に L4/L5 を含む脊椎を肉眼的に観察したのち、病理組織学的検査を行った。

各群ともに一般状態、体重及び剖検に投与の影響はみられなかった。

病理組織学的検査では、コンドリアーゼ製剤群で投与後 2 日に椎間板の髄核細胞の増加、集簇及び空胞化、髄核基質の硝子化がみられた。投与後 7 日では、特に高度の変化が認められた例で、髄核細胞の消失がみられた。なお、投与後 2 及び 7 日ともに線維輪、軟骨終板、椎体及び椎間板周囲組織に変化は認められなかった。コンドリアーゼ製剤溶解液群及びプラセボ製剤群では、投与後 2 及び 7 日ともに椎間板に変化は認められなかった。

以上の結果から、コンドリアーゼ製剤は、椎間板の髄核に対する刺激性を有するが、認められた組織変化は薬効に関連した変化であり、また髄核以外の周囲組織には影響しないと判断した。

2.6.6.7.2 髄腔内投与試験

（資料番号 4.2.3.6-7：試験番号 [redacted]-3408；概要表 2.6.7.16）

日本白色種ウサギ（1 群雄 6 匹/時点）の髄腔内に、コンドリアーゼ製剤（7.5 U/mL）、コンドリアーゼ製剤溶解液（陰性対照）又はプラセボ製剤（比較対照）を 1 mL/site の容量で単回投与した。投与後 2 及び 7 日まで一般状態観察及び体重測定を行い、観察期間終了後に脳（大脳、小脳及び延髄）及び第 1 頸椎から尾椎間の脊柱（胸椎、腰椎及び仙椎）を肉眼的に観察したのち、病理組織学的検査を行った。

各群ともに一般状態、体重及び剖検に投与の影響はみられなかった。

病理組織学的検査では、投与部位の髄膜において、投与後 2 日にコンドリアーゼ製剤群で単核細胞浸潤、投与後 7 日に陰性対照群及びプラセボ製剤群で線維化がみられたが、それ以外に変化は認められなかった。投与部位の脊髄、胸椎の脊髄及び髄腔内並びに脳及び延髄においては、各群ともに、投与後 2 及び 7 日ともに変化は認められなかった。

以上の結果から、コンドリアーゼ製剤は、中枢神経系組織に対する刺激性を有しないと判断した。

2.6.6.7.3 筋肉内投与試験

（資料番号 4.2.3.6-8：試験番号 [redacted]-3410；概要表 2.6.7.16）

日本白色種ウサギ（1 群雄 6 匹/時点、ただし陽性対照は雄 3 匹/時点）の右後肢外側広筋内に、コンドリアーゼ製剤（7.5 U/mL）、コンドリアーゼ製剤溶解液（陰性対照）、プラセボ製剤（比較対照）又は 0.75 v/v%酢酸（陽性対照）を 1 mL/site の容量で単回投与した。投与後 2 又は 7 日まで一般状態観察及び体重測定を行い、観察期間終了後に投与部位を含む筋肉組織を肉眼的に観察したのち、病理組織学的検査を行った。

各群ともに一般状態及び体重に投与の影響はみられなかった。

投与後 2 日では、コンドリアーゼ製剤群、コンドリアーゼ製剤溶解液群及びプラセボ製剤群において、投与部位の外側広筋に赤色斑がみられた。投与後 7 日では、コンドリアーゼ製剤群及プラセボ製剤群において、投与部位の外側広筋に赤色斑がみられた。

病理組織学的検査では、投与後 2 日のコンドリアーゼ製剤溶解液群で軽度及び中等度のマクロファージ浸潤、筋肉線維の変性及び壊死、出血及び水腫がみられた。コンドリアーゼ製剤群、プラセボ製剤群及び陽性対照群ではこれらの所見に加えて、軽度の好中球浸潤がみられた。投与後 7 日では、コンドリアーゼ製剤溶解液群に変化は認められなかったが、プラセボ製剤群では軽度のマクロファージ浸潤、筋肉線維の変性及び壊死、石灰沈着、線維化及び筋肉線維の再生がみられた。コンドリアーゼ製剤群ではこれらに加えて、軽度の好酸球浸潤及び黄褐色色素貪食マクロファージがみられた。投与後 7 日の組織変化の程度は、投与後 2 日に比較して軽度であり、また、コンドリアーゼ製剤群及びプラセボ製剤群の組織変化の程度に差はみられず、両群の組織変化はコンドリアーゼ製剤溶解液群よりも強く、陽性対照群よりも弱かった。

以上の結果から、コンドリアーゼ製剤は、筋肉組織に対して軽微な刺激性を有するが、その程度はプラセボ製剤に等しかった。また、コンドリアーゼ製剤及びプラセボ製剤ともに、投与後 2 日に比べて投与後 7 日の組織変化は軽度であり、回復傾向が認められたことから、筋肉組織に対する影響は一過性と推察された。

2.6.6.7.4　皮内投与試験

2.6.6.7.4.1　モルモットを用いた皮内投与刺激性試験（1）

（資料番号 4.2.3.6-9：試験番号 [redacted]057；概要表 2.6.7.16）

Hartley モルモット（1 群雄 6 匹）の側腹部皮内に、コンドリアーゼ製剤を 0.5、4 又は 8 U/0.1 mL/site の用量で単回投与し、投与後 72 時間まで皮膚症状を観察した。対照として、生理食塩液を 0.1 mL/site の容量で投与した。観察期間終了後に投与部位を肉眼的に観察したのち、病理組織学的検査を行った。

肉眼的観察では、いずれの用量においてもコンドリアーゼ製剤投与部位に、刺入部位を中心とした白色変化が投与後 30 分以内にみられ、投与後 72 時間まで全例にみられた。白色変化の範囲は用量の増加及び時間経過とともに拡大した。しかしながら、いずれの投与部位にも、皮膚刺激性の指標となる紅斑、浮腫などはみられなかった。

病理組織学的検査では、ヘマトキシリン・エオジン染色及び特殊染色でコンドリアーゼ製剤投与部位に異常は認められなかった。一方、抗プロテオグリカン ΔDi-4S 抗体 2-B-6 を用いた免疫組織染色では、いずれのコンドリアーゼ製剤投与部位においても、白色変化部位に陽性反応が認められた。抗プロテオグリカン ΔDi-4S 抗体 2-B-6 は、基質であるコンドロイチン硫酸にコンドリアーゼが作用して生じた不飽和構造を抗原として認識する。したがって、皮膚の白色変化は、コンドリアーゼ製剤投与により、コンドロイチン硫酸が分解され、その保水能が減少したことによる、皮膚の水分含量の低下が原因であると考えられた。

以上の結果から、コンドリアーゼ製剤は、0.5 U/site 以上の用量で投与部位の皮膚に白色変化を生ずるものの、皮膚に対する刺激性を有しないと判断した。

2.6.6.7.4.2　モルモットを用いた皮内投与刺激性試験（2）

（資料番号 4.2.3.6-10：試験番号 [redacted]078；概要表 2.6.7.16）

Hartley モルモット（1 群雄 6 匹）の側腹部皮内に、コンドリアーゼ製剤を注射針又はプリックランセットを用いて単回投与した。投与量は、注射針による投与では 0.05、0.1、0.5 又は 8 U/0.1 mL/site、プリックランセットによる投与では 0.03、0.3、0.6、1.2 又は 2.4 U/0.03 mL/site とした。対照として生理食塩液を、注射針による投与では 0.1 mL/site、プリックランセットによる投与では 0.03 mL/site の容量で投与した。投与後 0.5、24、48、72 時間、5、7、10、14 及び 16 日に皮膚症状を観察し、観察期間終了後に投与部位を肉眼的に観察したのち、病理組織学的検査を行った。

肉眼的観察では、いずれの用量においても注射針による投与により、注射部位に投与後 7 日まで時間経過とともに漸次拡大する白色部がみられた。この変化は、投与後 10 日以降に漸次縮小したが、投与後 16 日まで回復しなかった。プリックランセットによる投与は、0.03 及び 0.3 U/site では、いずれの観察時点においても皮膚の変化は認められなかった。0.6 及び 1.2 U/site では、刺入部位に投与後 7 日に白色部がみられたが、投与後 10 日には消失した。また、2.4 U/site では投与後 72 時間以降に白色部がみられたが、投与後 16 日には消失した。

病理組織学的検査では、いずれの投与方法でもヘマトキシリン・エオジン染色において異常所見はみられなかった。免疫組織染色においては、いずれの投与方法及び用量においても、抗プロテオグリカン ΔDi-4S 抗体 2-B-6 の陽性反応が認められ、コンドリアーゼ製剤により皮膚中のコンドロイチン硫酸が分解され、不飽和構造が発現したことが示された。

以上の結果から、注射針による投与は 0.05 U/site 以上、プリックランセットによる投与は 0.6 U/site 以上の用量で、投与部位の皮膚に白色変化を生ずるものの、可逆性の変化であると推察されたことから、コンドリアーゼ製剤は皮膚に対する刺激性を有しないと判断した。

2.6.6.8　その他の毒性試験

コンドリアーゼの抗原性試験は、能動的全身性アナフィラキシー（ASA）試験、受動的皮膚アナフィラキシー（PCA）試験及び受動的赤血球凝集（PHA）試験を実施した。また、不純物の毒性試験は、**不純物A***の単回皮下投与毒性試験、反復皮下投与毒性試験及び遺伝毒性試験を実施した。さらに、長期保存したコンドリアーゼ原薬中に認められた原薬由来の**不純物C***の影響を検討する目的で局所刺激性試験を実施した。コンドリアーゼ製剤中には、原薬中に認められた不純物以外の不純物は見出されないことから、製剤中不純物についての試験は実施しなかった。また、コンドリアーゼ原薬の製法は、本申請に至るまでに 3 回変更されているため、製造方法変更前後での毒性を、ラットにおける単回皮下投与毒性試験により比較した。実施した試験を表 2.6.6.8-1 に示した。

***新薬承認情報提供時に置き換えた**

表 2.6.6.8-1. その他の毒性試験一覧

試験の種類	動物種/系統	投与経路	投与期間	動物数/群	投与量	GLP適用	資料番号
抗原性試験							
ASA	モルモット/Hartley	腹腔内（感作） 静脈内（惹起）	a)	10	3、30、300 U/kg	適	4.2.3.7.1-1
PCA	モルモット/Hartley	静脈内（惹起）	－	5 b)	－	適	4.2.3.7.1-2
PHA	モルモット/Hartley	in vitro	－	5 b)	－	適	4.2.3.7.1-3
不純物の毒性試験							
単回投与毒性	ラット/Wistar	皮下	単回	5	0、6 mg/kg	適	4.2.3.7.6-1
反復投与毒性	ラット/Wistar	皮下	28 日	10	0、0.04、0.15、0.6 mg/kg	適	4.2.3.7.6-2
遺伝毒性	ネズミチフス菌、大腸菌	in vitro	－	－	0、16.9、33.8、67.5、135、270、540 µg/plate	適	4.2.3.7.6-3
	CHL/IU 細胞	in vitro	－	－	0、67.5、135、270 µg/mL	適	4.2.3.7.6-4
長期保存原薬の毒性試験							
局所刺激性	ウサギ/日本白色種	椎間板内	単回	6	0、2 U/disc	適	4.2.3.7.6-5 4.2.3.7.6-6
原薬の同等性試験							
単回投与毒性	ラット/SD ラット/SD	皮下 皮下	単回 単回	5 5	0、2000 U/kg 0、2000 U/kg	適 適	4.2.3.7.7-1 4.2.3.7.7-2

－：該当せず
a)：1 日おきに 3 回
b)：ASA 試験で免疫感作した動物の 5 例から採取した血清を用いた。

2.6.6.8.1　抗原性試験

2.6.6.8.1.1　モルモット ASA 試験、PCA 試験及び PHA 試験

（資料番号 4.2.3.7.1-1：試験番号 [redacted]077、資料番号 4.2.3.7.1-2：試験番号 [redacted]144、資料番号 4.2.3.7.1-3：試験番号 [redacted]319；概要表 2.6.7.17）

ASA 試験は、Hartley モルモット（1 群雄 10 匹）にコンドリアーゼを 3、30 又は 300 U/kg の用量で試験 0、2 及び 4 日に腹腔内投与して感作し、試験 14 日にコンドリアーゼを 300 U/kg の用量で静脈内投与して惹起した。陽性対照としてウマ血清を用いた。コンドリアーゼの静脈内投与後 4 時間まで、惹起されたアナフィラキシー症状を観察した。また、試験 14 日に眼窩より採血し、PCA 試験及び PHA 試験を実施した。感作用量の高用量は、[redacted]として約 [redacted]mg/kg となるように設定した。

ASA 試験では、3 U/kg 群の 3 例にアナフィラキシー症状が発現し、そのうち 1 例が死亡した。陽性対照群、30 及び 300 U/kg 群では、惹起を行った全 4 例に重篤なアナフィラキシー症状が発現し、いずれの群においても、そのうち 2 例が投与後 10 分以内に死亡した。PCA 試験では、3 U/kg 群には皮膚反応はみられなかったが、30 及び 300 U/kg 群並びに陽性対照群では全例に皮膚反応がみられ、陽性の結果であった。PHA 試験では、3 U/kg 群には赤血球凝集反応は認められなかったが、30 及び 300 U/kg 群並びに陽性対照群では、赤血球凝集反応がみられた。

以上の結果から、コンドリアーゼは、モルモットにおいて抗原性を有すると判断した。

2.6.6.8.2　不純物（　不純物A*　）の毒性試験

不純物A*　は、コンドロイチナーゼ ABC と[redacted]を有する分子量[redacted]であり、コンドリアーゼ原薬中に含まれる可能性が考えられる（[redacted]未満）。**不純物A***　の安全性を確認するために、単回投与毒性試験、反復投与毒性試験及び遺伝毒性試験を実施した。なお、各試験の**不純物A***　の投与量は、対応するコンドリアーゼの毒性試験における被験物質と[redacted]がほぼ一致する量を設定した。

2.6.6.8.2.1　ラット単回皮下投与毒性試験

（資料番号 4.2.3.7.6-1：試験番号 [redacted]020；概要表 2.6.7.17）

Wistar ラット（1 群雌雄各 5 匹）に、**不純物A***　を 6 mg/kg の用量で単回皮下投与し、14 日間観察した。対照として PBS を 2.5 mL/kg の容量で投与した。

死亡例はみられず、一般状態及び剖検に、**不純物A***　投与の影響はみられなかった。概略の致死量は、雌雄ともに 6 mg/kg を超える用量であった。

2.6.6.8.2.2　ラット反復皮下投与毒性試験

（資料番号 4.2.3.7.6-2：試験番号 [redacted]021；概要表 2.6.7.17）

Wistar ラット（1 群雌雄各 10 匹）に、**不純物A***　を 0.04、0.15 又は 0.6 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回 28 日間反復皮下投与した。対照として、PBS を 1 mL/kg/日の容量で投与した。投与後の一般状態観察、体重及び摂餌量測定、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、眼科学的検査、剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を行った。

死亡例はみられず、一般状態、体重、尿検査、眼科学的検査、剖検、器官重量及び病理組織学的検査に、**不純物A***　投与の影響はみられなかった。

摂餌量では、0.6 mg/kg 群の雌で投与 14、25 及び 28 日に有意な高値がみられたが、体重に影響がないことから毒性学的に意義はないと考えられた。

血液学的検査では、0.6 mg/kg 群の雄で白血球数の有意な低値がみられたが、病理組織学的検査では造血臓器障害を示唆する所見はなく、また、組織での消費や破壊の亢進を示唆する所見もみられなかったことから、**不純物A***　投与との関連性について明らかにすることはできなかった。また、0.15 mg/kg 群の雌で、血小板数の有意な高値と活性化部分トロンボプラスチン時間の有意な短縮が認められたが、0.6 mg/kg 群では変化が認められず、毒性学的に意義はないと考えられた。血液生化学的検査では、0.6 mg/kg 群の雄で α_2-グロブリン分画比の高値並びにグルコース及びトリグリセリドの低値がみられた。α_2-グロブリンは炎症時に増加する傾向があるが、当該試験では炎症性変化が 1 例にみられるのみであり、**不純物A***　投与との関連性について明らかにすることはできなかった。また、グルコース及びトリグリセリドの低値は、内分泌疾患や肝疾患などに付随してみられることが知られ

ているが、病理組織学的検査では内分泌器官や肝臓に所見はみられなかったことから、**不純物A***投与との関連性について明らかにすることはできなかった。

以上の結果から、0.6 mg/kg/日の投与により、雄で α_2-グロブリン分画比の高値並びに白血球数、グルコース及びトリグリセリドの低値がみられたが、雌では同様の変化が認められなかったことから、**不純物A***　のラット 28 日間反復皮下投与における無毒性量は、雄で 0.15 mg/kg/日、雌で 0.6 mg/kg/日と判断した。

2.6.6.8.2.3　遺伝毒性試験

（1）　復帰突然変異試験

（資料番号 4.2.3.7.6-3：試験番号 [redacted]018；概要表 2.6.7.17）

不純物A*　の遺伝子突然変異誘発性の有無をネズミチフス菌 TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び大腸菌 WP2*uvr*A 株を用いて検討した。**不純物A***　の用量は 16.9 から 540 µg/plate（公比 2）の計 6 濃度を設定した。

S9mix による代謝活性化の有無に関わらず、**不純物A***　のいずれの濃度、いずれの試験菌株においても復帰変異コロニー数の増加はみられなかった。

以上の結果から、**不純物A***　は、遺伝子突然変異誘発性を有しないと判定した。

（2）　染色体異常試験

（資料番号 4.2.3.7.6-4：試験番号 [redacted]019；概要表 2.6.7.17）

不純物A*　の染色体異常誘発性の有無をチャイニーズハムスター肺由来細胞（CHL/IU 細胞）を用いて検討した。**不純物A***　の用量は、67.5、135 又は 270 µg/mL の計 3 濃度を設定した。

S9mix による代謝活性化の有無に関わらず　**不純物A***　のいずれの濃度においても染色体異常を有する細胞の増加はみられなかった。

以上の結果から、**不純物A***　は、ほ乳類の培養細胞に対して染色体異常誘発性を有しないと判定した。

2.6.6.8.3　長期保存原薬の局所刺激性試験

（資料番号 4.2.3.7.6-5：試験番号 [redacted]0133G、資料番号 4.2.3.7.6-6：試験番号 [redacted]283PG；概要表 2.6.7.17）

日本白色種ウサギ（1 群雄各 6 匹/時点）の L4/L5 内に、原薬由来の　**不純物C***　を含む保存期間の異なるコンドリアーゼ原薬 3 ロット（　**不純物C***　含量 [redacted]%、[redacted]%又は [redacted]%）を 2 U/disc の用量で単回投与した。対照として、PBS を 10 µL/disc の容量で投与した。投与後 2 及び 7 日まで一般状態観察及

び体重測定を行い、観察期間終了時に L4/L5 を含む脊椎を肉眼的に観察したのち、病理組織学的検査を行った。

各群ともに一般状態及び体重に投与の影響はみられなかった。病理組織学的検査では、いずれの原薬ロット群ともに、投与後 2 日に髄核の小型化（縮小）、髄核細胞数の増加又は減少、髄核細胞の集簇、空胞化、変性及び壊死、小型髄核細胞数の増加、髄核基質の濃縮（凝縮）及び硝子化、線維輪では限局性の変性及び壊死、髄核側への突出（線維の不規則な走行）及び微小出血がみられた。投与後 7 日では、投与後 2 日とほぼ同じ変化が認められた。髄核細胞の空胞化は、やや軽減したが、髄核基質の濃縮及び硝子化、小型髄核細胞数の増加、線維輪の限局性の変性及び壊死はやや重篤化した。さらに、二次骨化中心起源の椎体（軟骨終板と成長板の間）の骨及び骨髄に骨髄細胞成分の減少、間質細胞ないし線維成分の増加、活性化骨芽細胞の増加及び骨形成がみられ、この変化は投与後 2 日では明瞭でなかったが、投与後 7 日では比較的顕著であった。

以上の結果から、いずれの原薬ロットにおいても椎間板の髄核、線維輪並びに椎体（二次骨化中心起源）の骨及び骨髄に対する刺激性が認められたが、軟骨終板及び椎間板周囲の椎体組織に刺激性は認められなかった。また、局所刺激性の所見に原薬ロット間の差はなく、コンドリアーゼ原薬の長期保存による局所刺激性に違いはなかった。

2.6.6.8.4　原薬製法変更に伴う同等性試験

（資料番号 4.2.3.7.7-1：試験番号 [redacted]-2157、資料番号 4.2.3.7.7-2：試験番号 [redacted]017；概要表 2.6.7.17）

コンドリアーゼ原薬の製法は、第 I/II 相試験開始時から本申請に至るまでに、3 回変更されている。それぞれの製法変更後の原薬について、SD ラットを用いた単回皮下投与試験により毒性を評価した。

いずれの試験においても 2000 U/kg の用量で死亡例はみられなかった。一般状態、体重及び剖検に異常は認められず、それぞれの製法変更前後の原薬で毒性に差はなかった。

2.6.6.9　添加物の安全性評価

コンドリアーゼ製剤は、添加物としてマクロゴール 4000、精製白糖、リン酸二水素ナトリウム及びリン酸水素ナトリウム水和物を含有している。これら添加物は、静脈内投与での使用実績はあるが、椎間板内投与での使用実績はないことから、新添加物に相当する。しかしながら、一般的に椎間板内投与による全身曝露は、静脈内投与と比較して極めて低いと考えられることから、全身毒性を調べる試験（単回及び反復投与毒性試験）、遺伝毒性試験、生殖発生毒性試験などは実施せず、これら添加物を含むプラセボ製剤を用いて投与局所における刺激性試験のみを実施した。プラセボ製剤は、椎間板及び周囲組織に刺激性を有しないと判断した（2.6.6.7.1 参照）。また、製剤中の添加物の相互作用の影響を検討するため、マクロゴール 4000 及び精製白糖の刺激性試験を実施した。さらに、プラセボ製剤を用いて間欠投与の刺激性試験を実施した。実施した試験を表 2.6.6.9-1 に示した。

表 2.6.6.9-1. 添加物の局所刺激性試験一覧

被験物質	動物種/系統	投与経路	投与期間	投与量	観察期間	GLP適用	資料番号
マクロゴール4000	ウサギ/日本白色種	椎間板内	単回	0、0.1 mg/disc	単回投与後2、7日	適	4.2.3.7.7-3
精製白糖	ウサギ/日本白色種	椎間板内	単回	0、0.05 mg/disc	単回投与後2、7日	適	4.2.3.7.7-4
プラセボ製剤	ウサギ/日本白色種	椎間板内	2回（投与間隔7日）	10 µL/disc	2回目投与後2、7日	適	4.2.3.7.7-5

2.6.6.9.1　マクロゴール 4000 のウサギ椎間板内投与局所刺激性試験

（資料番号 4.2.3.7.7-3：試験番号 [redacted]-3320（1）；概要表 2.6.7.17）

日本白色種ウサギ（1 群雄 3 匹/時点）の L4/L5 内に、マクロゴール 4000 を 0.1 mg/10 µL/disc の用量で単回投与した。対照として、生理食塩液を 10 µL/disc の容量で投与した。投与後 2 及び 7 日まで一般状態観察及び体重測定を行い、観察期間終了後に L4/L5 を含む脊椎を肉眼的に観察したのち、病理組織学的検査を行った。

一般状態、体重、剖検及び病理組織学的検査にマクロゴール 4000 投与の影響はみられなかった。

以上の結果から、マクロゴール 4000 は、椎間板及び周囲組織に対する刺激性を有しないと判断した。

2.6.6.9.2　精製白糖のウサギ椎間板内投与局所刺激性試験

（資料番号 4.2.3.7.7-4：試験番号 [redacted]-3320（2）；概要表 2.6.7.17）

日本白色種ウサギ（1 群雄 3 匹/時点）の L4/L5 内に、精製白糖を 0.05 mg/10 µL/disc の用量で単回投与した。対照として、生理食塩液を 10 µL/disc の容量で投与した。投与後 2 及び 7 日まで一般状態観察及び体重測定を行い、観察期間終了後に L4/L5 を含む脊椎を肉眼的に観察したのち、病理組織学的検査を行った。

一般状態、体重、剖検及び病理組織学的検査に精製白糖投与の影響はみられなかった。

以上の結果から、精製白糖は、椎間板及び周囲組織に対する刺激性を有しないと判断した。

2.6.6.9.3　プラセボ製剤のウサギ椎間板内投与局所刺激性試験

（資料番号 4.2.3.7.7-5：試験番号 [redacted]0403G；概要表 2.6.7.17）

コンドリアーゼ製剤に使用されている添加物の反復投与時の安全性を検討した。日本白色種ウサギ（1 群雄 6 匹/時点）の L4/L5 内に、プラセボ製剤を 10 µL/disc の容量で 7 日間隔にて 2 回投与した。陰性対照として、生理食塩液を 10 µL/disc の容量で投与した。2 回目投与後 2 及び 7 日まで一般状態

観察及び体重測定を行い、観察期間終了後に L4/L5 を含む脊椎を肉眼的に観察したのち、病理組織学的検査を実施した。

一般状態、体重及び剖検にプラセボ製剤投与の影響はみられなかった。病理組織学的検査では、プラセボ製剤群及び陰性対照群ともに、投与後 2 及び 7 日に髄核の小型化（縮小）、小型髄核細胞、髄核細胞の変性（核消失）、髄核基質の濃縮（凝縮）及び硝子化並びに髄核の周囲骨組織への侵入がみられた。線維輪では髄核側への突出（線維の不規則な走行）、線維輪細胞の肥大及び針刺入痕周囲での変性及び壊死がみられた。これらの変化に群間差はみられず、プラセボ製剤群と陰性対照群の椎間板に対する刺激性に差はないと判断した。

以上の結果から、プラセボ製剤と陰性対照の椎間板に対する刺激性に差はなく、認められた変化は同一椎間板内に 2 回針を刺入した事によるものと考えられ、プラセボ製剤は椎間板及び周囲組織に対する刺激性を有しないと判断した。

2.6.6.10　考察及び結論

コンドリアーゼの安全性評価は、臨床適応経路を考慮し、通常の全身毒性に加えて、椎間板及び椎体に対する組織障害性を検討した。

単回投与毒性試験

カニクイザル、ウサギ及びビーグル犬を用いた単回椎間板内投与試験では、椎間板及び椎間板に隣接する椎体に種々の病理組織学的変化が認められた。椎間板内に単回投与した各種試験におけるコンドリアーゼの投与量及び髄核体積比より算出した申請用量との比率を表 2.6.6.10-1 に示した。また、各動物において認められた主要な病理組織学的変化を表 2.6.6.10-2 に示した。

表 2.6.6.10-1. 各動物における投与量及び申請用量との比率

申請用量との比率[a)]	12	14	20	26	53	56	79	225	494	528	899	1056	2808	26400
動物における投与量(U/disc)														
カニクイザル	0.25						1.6		10					
ウサギ			0.075	0.1	0.2					2		4		100
ビーグル犬		0.25				1		4			16		50	

a) : 髄核体積比（ヒト : 1、カニクイザル : 1/61.7、ウサギ : 1/330、ビーグル犬 : 1/70.2）を用い、以下の式より算出した。

$$\text{申請用量との比率} = \frac{\text{動物における投与量（U/disc）}}{\text{申請用量（1.25 U/disc）} \times \text{髄核体積比}}$$

コンドリアーゼの単回椎間板内投与により、髄核の縮小が細胞の変性及び壊死、基質の凝縮などの変化を伴って認められた。また、隣接する線維輪に変性や線維の不規則な走行などがみられた。これらの変化は、コンドリアーゼの薬理作用である髄核融解作用に関連した変化（薬理作用の延長上の変化）と考えられ、すべての動物種で認められた。これらに加え、カニクイザルでは投与後 1 及び 4 週に軟骨終板及び成長板において細胞の変性及び壊死、染色性低下、軟骨終板において血管侵入及び

骨化並びに成長板の限局性欠損がみられ、椎体においては骨髄細胞の減少及び壊死並びに骨新生に関連した変化が認められた。投与後 13 週では細胞の再生性の変化が明らかとなり、投与後 26 週では軟骨終板の染色性低下及び菲薄化並びに成長板の限局性欠損がみられるものの、椎体に変化は認められなかった。ウサギでは投与後 1 週に線維輪に隣接する椎体（二次骨化中心起源）において、カニクイザルと同様に骨髄細胞の減少及び骨新生に関連した変化が認められた。投与後 1.5 年以降では同部位における骨細胞壊死がみられた。ビーグル犬では投与後 13 週から軟骨終板の消失、椎体への髄核の脱出及び骨梁の改変などの強い組織変化が認められ、これらの組織変化は投与後 3 年まで認められた。

表 2.6.6.10-2. 各動物の椎間板及び椎体で認められた主要な変化

動物種	カニクイザル	ウサギ	ビーグル犬
投与量（U/disc）	0、0.25、1.6、10	0、0.075、0.1、0.2、2、4、100	0、0.25、1、4、16、50
観察期間	1、4、13、26 週 a)	2、7 日、1.5、2 年 b)	13、26 週、1、2、3 年 c)
毒性量	0.25 U/disc 以上 （申請用量 12 倍以上 d)）	2 U/disc 以上 （申請用量 528 倍以上 d)）	4 U/disc 以上 （申請用量 225 倍以上 d)）
髄核	薬効関連：髄核縮小、細胞変性・壊死・集簇、基質凝縮（1-26 週） 回復変化：細胞再生（4-13 週）	薬効関連：細胞変性・壊死、基質凝縮（2-7 日）、髄核縮小（2-7 日、1.5-2 年）、軟骨細胞化、線維組織での置換（1.5-2 年）	薬効関連：髄核消失、細胞肥大・集簇・変性（13-26 週、1-3 年）
線維輪	薬効関連：細胞変性・壊死、限局性変性、線維の不規則走行（1-26 週）、硝子様肥厚（26 週） 回復変化：細胞再生（4-13 週）	薬効関連：細胞変性・壊死、限局性変性（2-7 日）、線維の不規則走行（2-7 日、1.5-2 年）、軟骨細胞化（1.5-2 年）	薬効関連：細胞消失、線維の不規則走行、硝子様肥厚（13-26 週、1-3 年）
軟骨終板	毒性：細胞変性・壊死（1-13 週）、染色性低下（1-26 週）、血管侵入、骨化（4-13 週）、菲薄化（13-26 週）、骨細胞・骨髄細胞壊死（骨端輪）（4-13 週） 回復変化：細胞再生（13 週）	変化なし	毒性：細胞変性・消失、菲薄化、消失（髄核と椎体の境界が部分的に消失）（13-26 週、1-3 年）
成長板	毒性：細胞変性・壊死（1-4 週）、染色性低下（1-13 週）、限局性欠損（4-26 週） 回復変化：細胞再生（4-13 週）	変化なし	変化なし
椎体（骨髄含む）	毒性：骨髄細胞減少・骨髄腔内間葉系細胞増加（成長板周囲）、骨髄細胞壊死（1-13 週）、骨新生（活性化骨芽細胞を伴う（1-4 週）、伴わず（13 週）））	毒性（二次骨化中心起源）：骨髄細胞減少、活性化骨芽細胞増加、骨新生（2-7 日）、骨髄腔内間葉系細胞増加（7 日）、骨細胞壊死（軟骨終板隣接の骨梁、骨改変なし）（1.5-2 年）	毒性：軟骨終板消失部から椎体への髄核脱出、肉芽組織形成、炎症、骨梁改変（13-26 週、1-3 年）

a)：1.6 U/disc は 26 週観察のみ実施した。
b)：2 及び 7 日観察（ウサギ椎間板内局所刺激性試験）は 0、0.075、0.1、0.2 又は 2 U/disc で実施し、0.075、0.1 及び 0.2 U/disc は製剤、2 U/disc は長期保存原薬を用いた。1.5 及び 2 年観察は 0、0.2、4 又は 100 U/disc で実施した。
c)：1、2 及び 3 年観察は 0、50 U/disc のみ実施した。
d)：動物における投与量の申請用量（1.25 U/disc）との比率。

コンドリアーゼの椎間板内投与による組織変化の違いには、椎間板構造の種差が大きく関与していると考えられる [(4)]。したがって、非臨床試験の結果を用いてヒトの椎間板局所における安全性を評価する場合、各動物の椎間板構造を十分理解した上で考察する必要がある。各動物の椎間板構造の種差を表 2.6.6.10-3 及び図 2.6.6.10-1 に示した。

表 2.6.6.10-3. 各動物の椎間板構造の種差

	ヒト	カニクイザル	ウサギ	ビーグル犬
髄核の脊索細胞	無し		有り	無し
軟骨終板の厚さ	厚い		薄い	
二次骨化中心の形成	一部のみ		有り	
骨端輪の有無	有り		無し	
成長板	軟骨終板の一部で成長帯として存在		骨端軟骨として存在	
ヒトとの類似性	-	高い	低い	低い

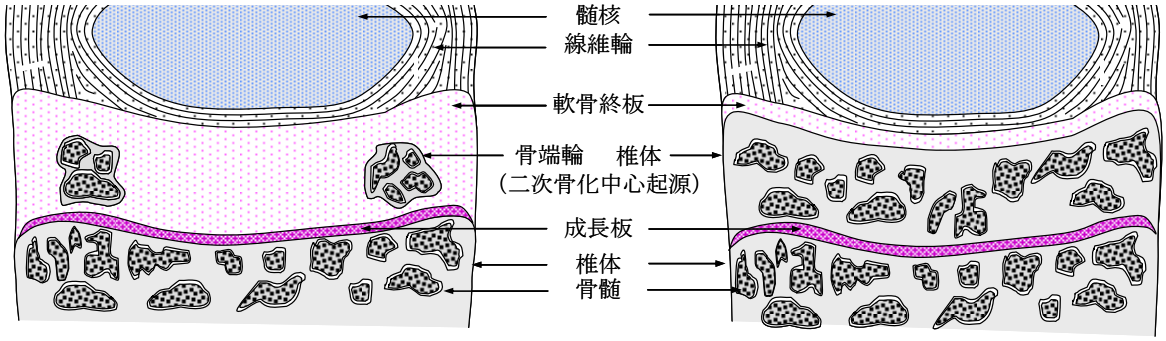


図 2.6.6.10-1. 各動物の椎間板構造

さらに、ヒトにおける安全性評価では、椎間板構造の種差に加え、ヒトの椎間板における加齢に伴う変化も考慮する必要がある。ヒトでは新生児において、成長板は軟骨終板の一部で成長帯として存在する。10～15 歳頃には成長板の幅が増殖軟骨細胞の減少を伴って減少して不整となり、20 歳頃までに成長板は骨組織で覆われる（閉鎖）。また、発達期には軟骨終板の中に二次骨化中心が形成され、輪状（ドーナツ状）に骨端輪を形成するが、遅くとも 25 歳までには椎体と融合（閉鎖）する。加齢に伴い成長板は閉鎖し、軟骨終板は軟骨層のみとなり、その軟骨層は 40 歳頃には骨組織と直接接するようになる。さらに、高齢になると骨組織が軟骨終板に侵入し、65 歳頃までには軟骨終板は非常に薄くなる [(1)]。なお、ヒトでは加齢に伴い軟骨終板に血管が侵入し骨化を誘発することは稀なことではない。

カニクイザルは軟骨終板が厚く、ヒトと同様に骨端輪を有するなど、試験動物のうち椎間板構造が最もヒトと類似していることから [(5)] [(6)]、コンドリアーゼの影響を考察する上で最も重要と考えられる。

カニクイザルの椎間板内にコンドリアーゼを 0.25～10 U/disc（申請用量の 12～494 倍）の用量で単回投与した結果、図 2.6.6.10-2 に示すとおり、種々の組織変化が認められた。各観察時点における組織変化は、いずれの用量においても同質の組織変化が認められたが、変化の程度は投与後 13 週までは用量が高いほど強く、投与後 26 週では用量に関係なく同様であった。

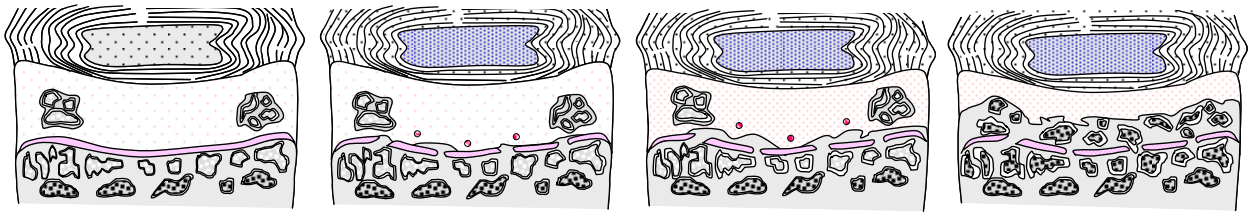


図 2.6.6.10-2. カニクイザルで認められたコンドリアーゼ単回椎間板内投与後の組織変化

髄核及び線維輪では、観察期間を通して変性及び細胞数の減少など、コンドリアーゼの髄核融解作用に基づく変化が認められた。投与後 4 週までに軟骨終板から椎体の一部で染色性低下、細胞数の減少及び壊死などの所見がみられたことから、椎間板内に投与したコンドリアーゼは髄核及び線維輪を超えて、椎間板に隣接する椎体の一部にまで影響すると考えられた。一方、髄核、線維輪、軟骨終板及び成長板においては、回復性の変化として細胞の再生がみられた。また、軟骨終板における血管侵入及び骨化は、染色性低下に対する修復性の変化と考えられた。投与後 13 週では一部の組織変化は、明らかな回復傾向を示し、投与後 26 週では軟骨終板から椎体に壊死性の変化はみられず、組織変化は慢性期には沈静化していると考えられた。投与後 26 週以降は、再び壊死などの急性期の変化が誘発される可能性は低いと考えられ、組織像に著変は生じないと推察された。

軟骨終板から椎体の一部に認められた変化は、椎体の基本構造に影響を及ぼすような重度な変化ではなかった。また、ヒトの軟骨終板及び成長板は、加齢に伴い菲薄化あるいは骨化又は消失するが [(1)] [(2)] 、投与後 26 週の軟骨終板及び成長板における組織像はそれらと同質のものであった。さらに、X 線検査においても椎体に異常は認められていない。以上を包括的に判断すると椎体の変形や脆弱化を示唆するものではないと考えられる。In vitro 試験においては、コンドリアーゼによる髄核及び線維輪の細胞に対する細胞毒性は認められておらず[(7)]、骨細胞に対する細胞毒性も認められていない[(8)]。よって、細胞外基質にグリコサミノグリカン（GAG）を豊富に含む髄核、線維輪、軟骨終板及び成長板の細胞でみられた細胞数の減少及び壊死は、コンドリアーゼにより細胞外基質の GAG を分解したことにより、細胞周囲の環境が変化したために生じた二次的影響である可能性が示唆された。

以上、ヒトと椎間板構造の類似したカニクイザルにコンドリアーゼを単回椎間板内投与すると、急性期から亜急性期において軟骨終板、成長板及び椎間板に隣接する椎体の一部に毒性所見がみられた。これらの所見は、重度なものではなく、亜急性期では回復性の変化も認められた。また、申請用量の 500 倍弱の用量においても、慢性期には組織変化は沈静化し、修復を示唆する組織像を示したことから、臨床においてコンドリアーゼは重篤な組織変化を誘発する可能性は低いと考えられた。

ウサギは、使用した試験動物のうち軟骨終板が最も薄く、軟骨終板に隣接して骨組織がみられる。軟骨終板に隣接した骨組織には、ヒトの長管骨と同様に二次骨化中心が形成されるため、骨髄腔を伴い、成長期には成長板が骨端軟骨として存在する。また、ウサギ髄核にはヒト成人では退化して存在しない髄核脊索細胞が少なくとも 12 箇月齢まで存在している。このように、ウサギの椎間板構造や構成細胞にはヒトと異なる部分も多いが、軟骨終板が非常に薄くなった患者へコンドリアーゼを投与した場合の、骨及びその周辺組織に対する影響は、ウサギの結果からの考察が有用と考えられる。

ウサギの椎間板内にコンドリアーゼを 0.075～100 U/disc（申請用量の 20～26400 倍）の用量で単回投与した結果、髄核及び線維輪でカニクイザルと同様の髄核融解作用に基づく変化が認められた。また、椎体（二次骨化中心起源）では急性期に 2 U/disc（申請用量の 528 倍）、慢性期に 4 U/disc（申請用量の 1056 倍）以上の用量において、細胞数の減少、壊死などの所見がみられた。これらの所見は、カニクイザルの椎体における所見と基本的に類似しており、また組織構造は維持されていた。以上の結果を踏まえると、軟骨終板の薄くなった患者においては、椎体に影響が及ぶ可能性は否定できないものの、今回の申請用量で重篤な組織変化は生じないと推察された。

ビーグル犬は、ウサギと同様に軟骨終板が薄く、さらに軟骨異栄養性（軟骨発育不全）の犬種であることから、他の動物と比較してヒトの椎間板における安全性評価上の位置付けは低い。ビーグル犬にコンドリアーゼを 0.25～50 U/disc（申請用量の 14～2808 倍）の用量で単回椎間板内投与した結果、4 U/disc（申請用量の 225 倍）以上の用量において軟骨終板の消失及び椎体への髄核の脱出並びに骨梁の改変など、椎体の破壊と再構築を伴う強い変化が認められた。椎体における変化は、X 線検査においても椎間板腹側の骨増殖や椎体縁の骨密度減少として認められたが、神経学的検査を含む一般状態及び各種検査項目に異常は認められず、これら椎間板及び椎間板に隣接する椎体周囲の組織変化は、全身機能に影響を及ぼすものではないと考えられた。

椎間板構造の観点から考察した結果、コンドリアーゼによる組織変化の動物種による違いは、椎間板周囲組織の構造が動物により異なるためと考えられた。すなわち、カニクイザルは、軟骨終板が厚いことから、髄核及び線維輪を超えたコンドリアーゼの影響は主に軟骨終板（骨端輪を含む）及び成長板でみられ、椎体への影響は細胞の減少とそれに伴う骨新生に留まると考えられた。一方、ウサギは軟骨終板が薄く、軟骨終板に隣接して椎体（二次骨化中心起源）が存在することから、コンドリアーゼの影響は主に骨組織にみられ、骨新生のみならず骨細胞壊死がみられたと考えられた。さらに軟骨発育不全であるビーグル犬では、軟骨終板及び椎体においてより強い組織変化が認められたと考えられた。

コンドリアーゼの類薬は、過去に上市されたキモパパインが挙げられる。キモパパインは、タンパク質分解酵素であるため、周辺神経組織以外にも椎間板及び椎体に対して明らかな影響を及ぼすことが報告されている [(9)] [(10)]。Malinin 等の報告では、臨床用量のキモパパインをヒヒの椎間板内に単回投与した時の椎間板周囲の椎体への影響は、50 及び 10 U/mL のコンドリアーゼを 200 µL 投与したものに比べ、明らかに重度であることが示されている [(9)]。また、ウサギにおいては、臨床用量の約 4 倍に相当するキモパパインは、臨床用量の 26400 倍に相当するコンドリアーゼに比べ、組織変化は明らかに重度であった（2.6.6.2.1.3 参照）。

これまでの臨床試験においてコンドリアーゼを投与した被験者に、椎体の脆弱化を示唆する有害事象や椎体骨折を含む重篤な症状は認められていない。確認されている有害事象として、軟骨終板と隣接する椎体の変化が高頻度に認められた。ただし、コンドリアーゼ投与群における軟骨終板と隣接する椎体の変化については、有害事象の重症度はすべて軽度であり、変化がみられた症例においても、それを特徴付けるような臨床症状は認められなかった。さらに、この変化は加齢でも認められるものであり、生理学的変化の範疇であることを考慮すると、臨床上重大な問題にはならないと考えられた。

なお、臨床においてキモパパインは、副作用として神経学的合併症を発現することが報告されているものの、椎体への影響に関与する副作用は報告されていない。したがって、上述のとおり、動物においてコンドリアーゼによる椎体への影響はキモパパインに比べ明らかに軽度であるが、仮に、臨床においてコンドリアーゼの投与によりキモパパインでみられた程の重度な組織障害が椎体に生じたとしても、臨床上問題となる可能性は低いと考えられた。

以上、コンドリアーゼの椎間板内投与による組織障害性は、標的部位である椎間板に加え、椎間板に隣接する椎体の一部にまで及ぶ可能性が示された。しかしながら、ヒトと椎間板構造が類似しているカニクイザルにおいて、その障害の程度は、椎体の基本構造や全身機能に影響を及ぼすものではなく、回復性も確認された。また、これまでの臨床試験において、非臨床で得られた知見との関連性が示唆される重篤な症状は認められておらず、さらに、臨床で使用経験のあるキモパパインよりも障害の程度は明らかに軽度であることから、コンドリアーゼによる組織障害性は臨床において重大な懸念にはならないと考えられる。

単回投与毒性試験は、椎間板内投与では十分な全身曝露が達成できないため、代替投与経路による静脈内、筋肉内及び皮下投与による試験を実施した。マウス、ラット及びイヌに 2000 U/kg を静脈内、筋肉内及び皮下投与し、その後 2 週間観察したが、マウス及びラットには特記すべき変化はみられなかった。イヌではいずれの投与経路においても運動性低下がみられ、加えて静脈内投与では運動失調及び麻痺性歩行もみられたが、いずれも投与後 2 日までに回復する一過性の変化であった。いずれの動物種、投与経路においても死亡例はみられず、概略の致死量は、2000 U/kg を超える用量であった。

反復投与毒性試験

反復投与毒性試験は、全身曝露が期待できる代替投与経路である皮下投与を選択し、ラット及びイヌに 200 U/kg/日までの用量を 4 週間投与した。ラットの血液生化学的検査において、200 U/kg 群の雌雄でいくつかの検査項目に変動がみられたが、コンドリアーゼに対する抗体産生と関連した変化、又は偶発的変化であり毒性学的に意義はなかった。イヌでは、20 U/kg 以上の群に投与期間終了時、投与部位の腫張が少数例にみられたが、ラット及びイヌともその他の検査項目にコンドリアーゼ投与と関連した変化は認められなかった。TK 測定の結果、ラット及びイヌとも投与 1 日の血漿中コンドリアーゼ濃度は定量可能であったが、投与 14 又は 15 日及び投与終了後はいずれの採血時点でも定量下限未満であった。抗コンドリアーゼ抗体が検出されたことから、コンドリアーゼを反復皮下投与した場合、抗コンドリアーゼ抗体が産生され、それに伴い、血漿中コンドリアーゼの酵素活性が検出されなくなると考えられた。ラット及びイヌの無毒性量は、雌雄ともに 200 U/kg/日と判断した。

遺伝毒性試験

遺伝毒性試験は、細菌を用いる復帰突然変異試験、ほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験及びマウスを用いる in vivo 小核試験を実施したが、いずれの試験においても陰性の結果であった。したがってコンドリアーゼは遺伝毒性を有しないと考えられた。

生殖発生毒性試験

生殖発生毒性試験は、全身曝露が期待できる皮下投与により実施した。しかし、その後実施された前述の反復皮下投与毒性試験の TK 測定において、一定期間の反復投与後に認められる抗コンドリア

ーゼ抗体による酵素活性の中和が原因と推察される、血漿中コンドリアーゼ濃度の消失がみられた。そこで、同一動物への反復投与期間をラットで 8 日以内、ウサギで 7 日以内とし、評価すべき生殖発生過程を通しての全身曝露が達成されるように、投与期間を分割した試験を実施した。

投与期間分割による試験では、TK 測定の結果、各コンドリアーゼ投与群ともに初回投与後及び最終投与後の血漿中コンドリアーゼ濃度が、定量下限以上であることが確認されたため、評価すべき生殖発生過程を通しての全身曝露が達成されていると判断した。

ラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、ラット及びウサギにおける胚及び胎児発生に関する試験、ラットにおける出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験のいずれにおいても、親動物の生殖機能及び胚、胎児及び出生児への影響はみられず、生殖発生毒性に関する無毒性量は、200 U/kg/日と判断した。

局所刺激性試験

ウサギの椎間板内、髄腔内及び筋肉内に原薬製法 A、B 及び C によるコンドリアーゼ製剤を投与し、投与部位及びその周囲組織に対する刺激性を病理組織学的検査により評価した。また、皮膚に対する刺激性について、モルモットの皮内に原薬製法 A によるコンドリアーゼ製剤を投与し、肉眼的及び病理組織学的検査により評価した。椎間板内投与では、0.075 U/disc（原薬製法 C）、0.1 U/disc（原薬製法 B）、0.2 及び 2 U/disc（原薬製法 A）の投与において、髄核細胞の萎縮と変性、増加、集簇、消失及び空胞化並びに髄核基質の硝子化などがみられた。2 U/disc では線維輪の変性及び壊死がみられたが、0.2 U/disc 以下では線維輪に変化はみられなかった。軟骨終板、椎体及び椎間板周囲組織では、いずれのコンドリアーゼ製剤投与においても変化は認められなかった。また、髄腔内投与では、7.5 U/site（原薬製法 C）、10 U/site（原薬製法 B）、20 及び 200 U/site（原薬製法 A）投与において、髄膜の単核細胞浸潤及び出血がみられたが、対照群でも認められたものであり、中枢神経系組織に対する刺激性を有しないと判断した。筋肉内投与では、7.5 U/site（原薬製法 C）、10 U/site（原薬製法 B）、20 及び 200 U/site（原薬製法 A）のいずれの投与においても、マクロファージ浸潤、筋肉線維の変性及び壊死、出血及び水腫等の筋肉組織に対して軽微な刺激性が認められた。しかし、それらの変化は、プラセボ製剤でも認められたものであり、回復傾向が認められたことから、筋肉組織に対する影響は一過性と推察された。

以上のことから、コンドリアーゼ製剤で認められた椎間板、中枢神経系及び筋肉組織における刺激性は、原薬製法 A、B 及び C による明らかな違いはなく、原薬製法 A の 2 U/disc 椎間板内投与でみられた線維輪の変性及び壊死は、用量に起因した変化と考えられた。さらに皮内投与においては、8 U/site（原薬製法 A）まで、皮膚刺激性は認められなかった。

その他の毒性試験

その他の毒性試験は、抗原性試験、不純物の毒性試験、長期保存原薬の局所刺激性試験及び原薬製法変更に伴う同等性試験を実施した。

抗原性試験は、モルモットに 300 U/kg までの用量を腹腔内投与して感作し、感作動物について ASA 試験を実施した。また、感作した動物より得た血清を用い PCA 試験及び PHA 試験を実施した。いずれの試験においても陽性の結果であり、コンドリアーゼはモルモットにおいて抗原性を有すると判断

した。コンドリアーゼは、*Proteus vulgaris* が産生するタンパク質であり、ビーグル犬及びカニクイザルにおける単回椎間板内投与試験では、投与動物で血清中抗コンドリアーゼ IgG 抗体価の上昇が投与後 5 週以降に認められていることから、ヒトに単回椎間板内投与した場合にも、コンドリアーゼによる感作が成立し、抗コンドリアーゼ抗体が産生される可能性が考えられる。実際に、これまでの臨床試験では、コンドリアーゼを投与した被験者の一部で血清中抗コンドリアーゼ IgG 抗体価の上昇が認められている。しかし、アナフィラキシー反応誘発の原因となる抗コンドリアーゼ IgE 抗体価の上昇は、これまで 1 例も認められていない。また一般に、モルモットやウサギを用いた抗原性試験において、薬物による感作性が認められる場合でも、微量の惹起ではアナフィラキシー反応の誘発に至らない場合もある。本剤の場合、ヒト椎間板内に投与されるコンドリアーゼは微量（約 [redacted]μg）で、血漿中コンドリアーゼ濃度は定量下限未満であり、薬物動態試験の結果から、椎間板内投与されたコンドリアーゼのうち極めて微量のみが緩慢に全身へ移行するものと考えられる。したがって、仮に、コンドリアーゼによる椎間板ヘルニア治療の既往歴のある、また、別の何らかの原因により抗コンドリアーゼ抗体を有する患者に対して、コンドリアーゼが投与されたとしてもアナフィラキシー反応の発現に至る可能性は低いと考えられる。ヒトにおいて抗コンドリアーゼ IgG 抗体価の上昇が認められていることから、II 型及び III 型アレルギー反応を発現する可能性は否定できない。しかし、ラット及びイヌの反復投与毒性試験では、血清中抗コンドリアーゼ IgG の増加が認められているが、血液学・血液生化学的検査及び病理組織学的検査において、グロブリンの増加を除き、コンドリアーゼ投与に起因した変化は、200 U/kg/日の用量まで認められなかった。さらに、サル及びイヌ単回椎間板内投与 26 週間試験ともに、血清中の抗コンドリアーゼ IgG の増加が認められたが、血液学・血液生化学的検査及び投与部位以外の病理組織学的検査において、コンドリアーゼ投与に起因した変化は認められなかった。したがって、血清中の抗コンドリアーゼ IgG の増加がみられた場合においても、抗原への IgG 抗体の結合による細胞障害（II 型）あるいは免疫複合体の組織沈着による臓器障害（III 型）を示唆するような変化は認められなかったことから、ヒトにおいて II 型及び III 型アレルギー反応を発現する可能性は低いと考えられた。

不純物の毒性試験は、コンドリアーゼ原薬中に含まれる可能性が考えられた **不純物A*** について、単回投与毒性試験及び反復投与毒性試験並びに遺伝毒性試験を実施した。ラットに **不純物A*** を単回皮下投与した試験では、一般状態及びその他の観察項目に異常はみられず、概略の致死量は雌雄ともに 6 mg/kg を超える用量であった。ラットに **不純物A*** を 0.6 mg/kg/日までの用量で 28 日間反復皮下投与した試験では、雄は 0.6 mg/kg/日投与により、血液学的検査及び血液生化学的検査のいくつかの検査項目に変動がみられたことから、**不純物A*** の無毒性量は、雄で 0.15 mg/kg/日、雌で 0.6 mg/kg/日であった。**不純物A*** の遺伝毒性試験は、細菌を用いる復帰突然変異試験及びほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験を実施したが、いずれも陰性の結果であり、**不純物A*** は遺伝毒性を有しないと考えられた。

長期保存原薬の局所刺激性試験は、コンドリアーゼ原薬中に認められている原薬由来の **不純物C*** の毒性を検討する目的で **不純物C*** を含む複数の保存期間の異なるコンドリアーゼ原薬ロットを用いて局所刺激性試験を実施した。保存期間の異なる複数のコンドリアーゼ原薬ロット（**不純物C*** 含量 [redacted]、[redacted] 又は [redacted]%）を用い、ウサギに 2 U/disc の用量で単回椎間板内投与した試験では、各原薬ロット間の局所刺激性の所見に差はみられず、[redacted]%までの **不純物C*** はコンドリアーゼの局所刺

激性に影響を及ぼさないと考えられた。なお、コンドリアーゼ由来の　**不純物C***　は、原薬の製造後の期間に応じてその含量が微増し、これまでの各種毒性試験に用いた原薬にも含有されていたことが示唆されている。したがって、コンドリアーゼについて実施された全身性及び椎間板局所での影響を評価した毒性試験の結果から、臨床製剤への含有の可能性がある濃度範囲の　**不純物C***　について、安全性は担保されているものと考えられる。

原薬製法変更に伴う同等性試験は、コンドリアーゼ原薬の製法変更後の毒性について、ラットを用いた単回皮下投与試験により評価した。いずれの試験においても 2000 U/kg の用量で死亡例はみられなかった。一般状態及びその他の観察項目に異常は認められず、それぞれの製法変更前後の原薬で毒性に差はなかった。

添加物の安全性評価

コンドリアーゼ製剤に添加されているマクロゴール 4000、精製白糖又はプラセボ製剤を、ウサギの椎間板内に投与し、投与部位及びその周囲組織に対する刺激性を病理組織学的検査により評価した。マクロゴール 4000、精製白糖及びプラセボ製剤には、椎間板に対する刺激性は認められなかった。

以上、コンドリアーゼは、単回椎間板内投与により、標的部位である椎間板に加え、椎間板に隣接する椎体の一部にまで組織障害性が及ぶ可能性が示されたが、その障害の程度は椎体の基本構造や全身機能に影響を及ぼすものではなく、回復性も確認されたことから、ヒトにおいて重篤な組織変化は誘発されないものと考えられる。さらに、コンドリアーゼの静脈内、筋肉内及び皮下投与において全身毒性、生殖発生毒性及び遺伝毒性は認められなかった。コンドリアーゼの抗原性については、ヒトにおいて感作性を示す可能性は否定できないが、臨床用法・用量が椎間板内への微量の単回投与であることや薬物動態試験の成績を踏まえ、アレルギー症状発現の可能性は低いと考えられた。

以上のことから、コンドリアーゼのヒトにおける安全性について、懸念すべき問題はないと考えられる。

2.6.6.11　図表

表は、本文中の該当箇所又は 2.6.7 の毒性試験の概要表に記載し、概要表を参照する場合は、参照箇所を本文中に示した。

2.6.6.12　参考文献

（1）　Bernick S, Cailliet R. Vertebral end-plate changes with aging of human vertebrae. Spine. 1982;7:97-102.

（2）　Grignon B, Grignon Y, Mainard D, Braun M. Netter P, Roland J. The structure of the cartilaginous end-plates in elder people. Surg Radiol Anat. 2000;22:13-19.

（3）　Boots Company. Chymodiactin product information, package insert. 1987.

*新薬承認情報提供時に置き換えた

（4） [redacted]. SI-6603（C-ABC）を単回椎間板内投与した際の安全性についての考察 改訂版1．生化学工業（株）社内資料. [redacted].

（5） Longo G, Ripalda P, Denaro V, Forriol F. Morphologic comparison of cervical, thoracic, lumbar intervertebral discs of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). Eur Spine J. 2006;15:1845-1851.

（6） Eurell JAC, Kazarian LE. The vertebral cartilaginous endplate of the preadult rhesus monkey (*Macaca mulatta*). A correlative scanning electron-and light-microscopic study. Spine. 1986;11:483-486.

（7） Takegami K, An HS, Kumano F, Chiba K, Thonar EJ, Singh K, et al. Osteogenic protein-1 is most effective in stimulating nucleus pulposus and annulus fibrosus cells to repair their matrix after chondroitinase ABC-induced in vitro chemonucleolysis. Spine J. 2005;5:231-238.

（8） [redacted]. 骨器官培養を用いた SI-6603 の骨毒性の検討. 生化学工業（株）社内資料. [redacted].

（9） Malinin T, Brown MD. Changes in vertebral bodies adjacent to acutely narrowed intervertebral discs: observations in baboons. Spine. 2007;32:603-607.

（10） Kato F, Mimatsu K, Iwata H, Miura T. Comparison of tissue reaction with chondroitinase ABC and chymopapain in rabbits as the basis of clinical application in chemonucleolysis. Clin Orthop Relat Res. 1993;288:294-302.

ヘルニコア®椎間板注用 1.25 単位
コンドリアーゼ

2.6.7 毒性試験概要表

生化学工業株式会社

目次

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一覧表 8
2.6.7.3 トキシコキネティクス試験成績一覧表 9
2.6.7.4 毒性試験：被験物質一覧 11
2.6.7.5 単回投与毒性試験 15
2.6.7.6 反復投与毒性試験 - 重要な試験以外の試験 22
2.6.7.7 反復投与毒性試験 - 重要な試験 23
2.6.7.7A 反復投与毒性試験 23
2.6.7.7B 反復投与毒性試験 26
2.6.7.8 In vitro 遺伝毒性試験 29
2.6.7.8A In vitro 遺伝毒性試験 29
2.6.7.8B In vitro 遺伝毒性試験 32
2.6.7.9 In vivo 遺伝毒性試験 34
2.6.7.10 がん原性試験 35
2.6.7.11 生殖発生毒性試験 - 重要な試験以外の試験 36
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 37
2.6.7.12A ラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（1） 37
2.6.7.12B ラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（2） 39
2.6.7.13 生殖発生毒性試験 - 胚・胎児発生への影響に関する試験 43
2.6.7.13A ラットにおける胚・胎児発生への影響に関する試験（1） 43
2.6.7.13B ラットにおける胚・胎児発生への影響に関する試験（2） 51
2.6.7.13C ウサギにおける胚・胎児発生への影響に関する試験（1） 54
2.6.7.13D ウサギにおける胚・胎児発生への影響に関する試験（2） 58
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 61
2.6.7.15 新生児を用いた試験 66
2.6.7.16 局所刺激性試験 67
2.6.7.17 その他の毒性試験 78

略号一覧

略号	省略していない表現（英語）	省略していない表現（日本語）
ASA	Active systemic anaphylaxis	能動的全身性アナフィラキシー
AUC	Area under the plasma concentration-time curve	血漿中濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-last}}$	Area under the plasma concentration - time curve from zero to the last measurable time	0 から最終測定可能時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
CHL	Chinese hamster lung	新生チャイニーズハムスター肺
C_{max}	Maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
IgG	Immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IgM	Immunoglobulin M	免疫グロブリン M
L4/L5	Intervertebral disc between the fourth and fifth lumbar vertebrae (The notation of other lumbar intervertebral discs is also similar.)	第 4 腰椎と第 5 腰椎間の椎間板 （他の腰椎椎間板の表記も同様）
MCHC	Mean cell hemoglobin concentration	平均赤血球色素濃度
PBS	Phosphate-buffered saline	リン酸緩衝生理食塩液
PCA	Passive cutaneous anaphylaxis	受動的皮膚アナフィラキシー
PHA	Passive hemagglutination	受動的赤血球凝集反応
Pkat U	Picokatal unit	ピコカタル単位
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
U	Unit	単位

2.6.7　毒性試験概要表

2.6.7.1　毒性試験一覧表

被験物質：コンドリアーゼ

試験の種類	動物種/系統	投与方法	投与期間	投与量	GLP適用	実施施設	試験番号	資料番号
単回投与毒性試験	カニクイザル	椎間板内	単回	0.25, 10 U/disc	適	[redacted]	[redacted]3046G	4.2.3.1-1
		椎間板内	単回	0.25, 1.6, 10 U/disc	適	[redacted]	[redacted]-6525	4.2.3.1-2
		椎間板内	単回	0.25, 1.6, 10 U/disc	適	[redacted]	[redacted]3940G	4.2.3.1-3
	ウサギ/日本白色種	椎間板内	単回	0.2, 4, 100 U/disc	不適	生化学工業（株）	[redacted]ELD1	4.2.3.1-4（参考）
	イヌ/ビーグル犬	椎間板内	単回	0.25, 1, 4, 16, 50 U/disc	適	[redacted]	[redacted]-4433	4.2.3.1-5
		椎間板内	単回	50 U/disc	適	[redacted]	[redacted]-4404	4.2.3.1-6
	マウス/Swiss	静脈内	単回	2000 U/kg	適	[redacted]	[redacted].593/352060	4.2.3.1-7
		筋肉内	単回	2000 U/kg	適	[redacted]	[redacted].597/352060	4.2.3.1-8
		皮下	単回	2000 U/kg	適	[redacted]	[redacted].595/352060	4.2.3.1-9
	ラット/Wistar	静脈内	単回	2000 U/kg	適	[redacted]	[redacted].592/352060	4.2.3.1-10
		筋肉内	単回	2000 U/kg	適	[redacted]	[redacted].596/352060	4.2.3.1-11
		皮下	単回	2000 U/kg	適	[redacted]	[redacted].594/352060	4.2.3.1-12
		皮下	単回	2000 U/kg [a)]	適	[redacted]	[redacted]2916/01	4.2.3.1-13
	イヌ/ビーグル犬	静脈内	単回	2000 U/kg	適	[redacted]	[redacted].074	4.2.3.1-14
		筋肉内	単回	2000 U/kg	適	[redacted]	[redacted].076	4.2.3.1-15
		皮下	単回	2000 U/kg	適	[redacted]	[redacted].075	4.2.3.1-16
		皮下	単回	2000 U/kg [a)]	適	[redacted]	[redacted]2916/03	4.2.3.1-17
反復投与毒性試験	ラット/Wistar	皮下	28 日間	2, 20, 200 U/kg [b)]	適	[redacted]	[redacted].637	4.2.3.2-1
		皮下	28 日間	2, 20, 200 U/kg [a)]	適	[redacted]	[redacted]2916/02	4.2.3.2-2
	イヌ/ビーグル犬	皮下	29 日間	2, 20, 200 U/kg [b)]	適	[redacted]	[redacted].707	4.2.3.2-3
		皮下	29 日間	2, 20, 200 U/kg [a)]	適	[redacted]	[redacted]2916/04	4.2.3.2-4

[redacted]

a)：TK 試験として実施　b)：下線は無毒性量

（続く）

2.6.7.1 毒性試験一覧表 （続き）

被験物質：コンドリアーゼ、コンドリアーゼ製剤

試験の種類	動物種/系統	投与方法	投与期間	投与量	GLP適用	実施施設	試験番号	資料番号
遺伝毒性試験	*S.typhimurium* *E.coli*	in vitro	-	1.23, 3.70, 11.11, 33.33, 100.0 µL（約 100 U）/plate	適	[redacted]	[redacted].248	4.2.3.3.1-1
	CHO 細胞	in vitro	-	60, 80, 100 U/mL	適	[redacted]	[redacted].219	4.2.3.3.1-2
	マウス/Swiss	腹腔内	単回	2000 U/kg	適	[redacted]	[redacted].547	4.2.3.3.2-1
生殖発生毒性試験	ラット/SD	皮下	a)	2, 20, 200 U/kg	適	[redacted]	[redacted]-2755	4.2.3.5.1-1
	ラット/Wistar	皮下	b)	200 U/kg	適	[redacted]	[redacted]143	4.2.3.5.1-2
	ラット/Wistar	皮下	G7 - G16[c)]	2, 20, 200 U/kg	適	[redacted]	[redacted].428	4.2.3.5.2-1
	ラット/Wistar	皮下	G12 - G17[c)]	200 U/kg	適	[redacted]	[redacted]144	4.2.3.5.2-2
	ウサギ/New Zealand White	皮下	G6 - G18[c)]	2, 20, 200 U/kg	適	[redacted]	[redacted].772	4.2.3.5.2-3
	ウサギ/New Zealand White	皮下	G12 - G18[c)]	200 U/kg	適	[redacted]	[redacted]365	4.2.3.5.2-4
	ラット/Wistar	皮下	G15 - L20[c)]	200 U/kg	適	[redacted]	[redacted]145	4.2.3.5.3-1
局所刺激性試験	ウサギ/日本白色種	椎間板内	単回	0.075 U/disc	適	[redacted]	[redacted]-3409	4.2.3.6-6
			単回	0.1 U/disc	適	[redacted]	[redacted]-3130	4.2.3.6-3
			単回	0.2 U/disc	適	[redacted]	[redacted]-3794	4.2.3.6-2

-：該当なし

[redacted]

a)：雄：交配前 4 週～剖検前日、雌：交配前 2 週～妊娠 7 日

b)：雄：交配前 7 日～交尾確認日、雌：交配前 7 日～妊娠 7 日

c)：G：妊娠日数、L：分娩後日数

（続く）

2.6.7.1 毒性試験一覧表 （続き）

被験物質：コンドリアーゼ、コンドリアーゼ製剤

試験の種類	動物種/系統	投与方法	投与期間	投与量	GLP適用	実施施設	試験番号	資料番号
局所刺激性試験	ウサギ/日本白色種	髄腔内	単回	7.5 U/site	適	[redacted]	[redacted]-3408	4.2.3.6-7
			単回	10 U/site	適	[redacted]	[redacted]-3131	4.2.3.6-4
			単回	20 U/site	適	[redacted]	[redacted]-3794	4.2.3.6-2
		筋肉内	単回	7.5 U/site	適	[redacted]	[redacted]-3410	4.2.3.6-8
			単回	10 U/site	適	[redacted]	[redacted]-3132	4.2.3.6-5
			単回	20 U/site	適	[redacted]	[redacted]-3794	4.2.3.6-2
	ウサギ/New Zealand White	椎間板内	単回	2 U/disc	適	[redacted]	[redacted].263	4.2.3.6-1
		髄腔内	単回	200 U/site	適	[redacted]	[redacted].263	4.2.3.6-1
		脊髄神経根	単回	50 U/site	適	[redacted]	[redacted].263	4.2.3.6-1
		筋肉内	単回	200 U/site	適	[redacted]	[redacted].263	4.2.3.6-1
	モルモット/Hartley	皮内	単回	0.5, 4, 8 U/site	適	[redacted]	[redacted]057	4.2.3.6-9
		皮内	単回	注射針法： 0.05, 0.1, 0.5, 8 U/site プリックランセット法： 0.03, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4 U/site	適	[redacted]	[redacted]078	4.2.3.6-10
その他の毒性試験 抗原性試験								
ASA 試験	モルモット/Hartley	腹腔内	1 日おきに 3 回（感作）	3, 30, 300 U/kg	適	[redacted]	[redacted].077	4.2.3.7.1-1
PCA 試験	モルモット/Hartley	腹腔内	1 日おきに 3 回（感作）	3, 30, 300 U/kg	適	[redacted]	[redacted].144	4.2.3.7.1-2
PHA 試験	モルモット/Hartley	in vitro	-	-	適	[redacted]	[redacted].319	4.2.3.7.1-3

-：該当なし

[redacted]

（続く）

2.6.7.1 毒性試験一覧表 （続き）

試験の種類	動物種/系統	投与方法	投与期間	投与量	GLP適用	実施施設	試験番号	資料番号
不純物の毒性試験								
						被験物質：	**不純物A***	
単回投与毒性試験	ラット/Wistar	皮下	単回	6 mg/kg	適	[redacted]	[redacted]020	4.2.3.7.6-1
反復投与毒性試験	ラット/Wistar	皮下	28 日間	0.04, 0.15, 0.6 mg/kg	適	[redacted]	[redacted]021	4.2.3.7.6-2
遺伝毒性試験	*S.typhimurium* *E.coli*	in vitro	-	16.9, 33.8, 67.5, 135, 270, 540 µg/plate	適	[redacted]	[redacted]018	4.2.3.7.6-3
	CHL/IU 細胞	in vitro	-	67.5, 135, 270 µg/mL	適	[redacted]	[redacted]019	4.2.3.7.6-4
長期保存原薬の局所刺激性試験								
							被験物質：コンドリアーゼ	
局所刺激性試験	ウサギ/日本白色種	椎間板内	単回	2 U/disc	適	[redacted]	[redacted]0133G	4.2.3.7.6-5
		椎間板内	単回	2 U/disc	適		[redacted]283PG	4.2.3.7.6-6
原薬製法変更に伴う同等性試験								
							被験物質：コンドリアーゼ	
単回投与毒性試験	ラット/SD	皮下	単回	2000 U/kg	適	[redacted]	[redacted]-2157	4.2.3.7.7-1
	ラット/SD	皮下	単回	2000 U/kg	適	[redacted]	[redacted]017	4.2.3.7.7-2
添加物の毒性試験								
							被験物質：マクロゴール 4000	
局所刺激性試験	ウサギ/日本白色種	椎間板内	単回	0.1 mg/disc	適	[redacted]	[redacted]-3320 (1)	4.2.3.7.7-3
							被験物質：精製白糖	
局所刺激性試験	ウサギ/日本白色種	椎間板内	単回	0.05 mg/disc	適	[redacted]	[redacted]-3320 (2)	4.2.3.7.7-4
							被験物質：プラセボ製剤	
局所刺激性試験	ウサギ/日本白色種	椎間板内	2 回	10 µL/disc	適	[redacted]	[redacted]0403G	4.2.3.7.7-5

-：該当なし

[redacted]

***新薬承認情報提供時に置き換えた**

2.6.7.2 トキシコキネティクス試験一覧表

被験物質：コンドリアーゼ

試験の種類	動物種/系統	投与方法	投与期間	投与量	GLP 適用	試験番号	資料番号
単回投与毒性試験	ラット/Wistar	皮下	単回	2000 U/kg	適	[redacted]2916/01	4.2.3.1-13
	イヌ/ビーグル犬	皮下	単回	2000 U/kg	適	[redacted]2916/03	4.2.3.1-17
反復投与毒性試験	ラット/Wistar	皮下	28 日間	2, 20, 200 U/kg	適	[redacted]2916/02	4.2.3.2-2
	イヌ/ビーグル犬	皮下	29 日間	2, 20, 200 U/kg	適	[redacted]2916/04	4.2.3.2-4
生殖発生毒性試験	ラット/Wistar	皮下	雄：交配前 7 日～交尾確認日 雌：交配前 7 日～妊娠 7 日	200 U/kg	適	[redacted]143	4.2.3.5.1-2
	ラット/Wistar	皮下	妊娠 12 日～17 日	200 U/kg	適	[redacted]144	4.2.3.5.2-2
	ウサギ/New Zealand White	皮下	妊娠 12 日～18 日	200 U/kg	適	[redacted]365	4.2.3.5.2-4
	ラット/Wistar	皮下	妊娠 15 日～分娩後 20 日	200 U/kg	適	[redacted]145	4.2.3.5.3-1

2.6.7.3　　トキシコキネティクス試験成績一覧表

被験物質：コンドリアーゼ

単回投与後の C_{max}（mU/mL）

投与量（U/kg）	ラット				イヌ a)			
	M	F	M	F	M	F	M	F
2	-	-	BLQ	BLQ	-	-	0.381 0.240 0.778	0.498 0.442 0.735
20	-	-	0.409	0.236	-	-	6.39 4.55 4.83	5.97 7.23 4.59
200	-	-	5.77	5.47	-	-	69.6 38.9 234	52.8 44.8 63.2
2000	132	236	-	-	2281 2838	3377 2303	-	-
試験番号	[redacted]2916/01		[redacted]2916/02		[redacted]2916/03		[redacted]2916/04	
資料番号	4.2.3.1-13		4.2.3.2-2		4.2.3.1-17		4.2.3.2-4	

-：測定なし

M：雄　F：雌　　BLQ：血漿中濃度が定量下限（[redacted]mU/mL）未満

a)：個体別の値

（続く）

2.6.7.3 トキシコキネティクス試験成績一覧表（続き）

被験物質：コンドリアーゼ

単回投与後の $AUC_{0\text{-last}}$（mU· h/mL）

投与量（U/kg）	ラット				イヌ [a)]			
	M	F	M	F	M	F	M	F
2	-	-	BLQ	BLQ	-	-	0.580 0.262 1.05	0.559 1.46 2.27
20	-	-	0.299	0.158	-	-	15.0 24.0 22.0	17.1 28.0 39.4
200	-	-	5.62	7.85	-	-	738 507 1011	288 461 640
2000	300	563	-	-	19339 21973	27220 20308	-	-
試験番号	[redacted]2916/01		[redacted]2916/02		[redacted]2916/03		[redacted]2916/04	
資料番号	4.2.3.1-13		4.2.3.2-2		4.2.3.1-17		4.2.3.2-4	

-：測定なし

M：雄　F：雌　　BLQ：血漿中濃度が定量下限（[redacted]mU/mL）未満

a)：個体別の値

2.6.7.4　毒性試験：被験物質一覧

被験物質：コンドリアーゼ

ロット番号	純度（%）	規格設定された不純物（%） 不純物B*	試験番号	試験の種類
申請規格 a)	（測定方法 IV）：%以上 （測定方法 II）：%以上	検出限界（0.05 μg/mL）未満		
BC005P01	（測定方法 I）：% （測定方法 I）：%	μg/mL	.593/352060	マウス単回静脈内投与試験
			.597/352060	マウス単回筋肉内投与試験
			.595/352060	マウス単回皮下投与試験
			.592/352060	ラット単回静脈内投与試験
			.596/352060	ラット単回筋肉内投与試験
			.594/352060	ラット単回皮下投与試験
			.074	イヌ単回静脈内投与試験
			.076	イヌ単回筋肉内投与試験
			.075	イヌ単回皮下投与試験
			.248	細菌を用いる復帰突然変異試験
			.219	ほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験
			.547	マウスにおける小核試験
			.077	モルモット ASA 試験
			.144	モルモット PCA 試験
			.319	モルモット PHA 試験
BC008P01	（測定方法 I）：% （測定方法 I）：%	ND	.637	ラット 28 日間反復皮下投与試験
			.707	イヌ 29 日間反復皮下投与試験
			.428	ラットにおける胚･胎児発生への影響に関する試験（1）
BC011P01	（測定方法 I）：% （測定方法 I）：%	ND	ELD1	ウサギ単回椎間板内投与試験（参考資料）

ND：　**不純物B***　測定時、ブランクより吸光度が低く、計算不可能（試験規格 μg/mL 以下）。

a)：申請規格には、 は測定方法 IV、 は測定方法 II（それぞれの測定方法を改善し、より分離度を向上させた方法）を用いた。

（続く）

***新薬承認情報提供時に置き換えた**

2.6.7.4 毒性試験：被験物質一覧 （続き）

被験物質：コンドリアーゼ、コンドリアーゼ製剤

ロット番号	純度（%）	規格設定された不純物（%） 不純物B*	試験番号	試験の種類
BC017P01	（測定方法 I）：% （測定方法 II）：%a)	ND	0133G	長期保存原薬のウサギ椎間板内投与局所刺激性試験
BC030	（測定方法 I）：% （測定方法 I）：%	ND	ELD1	ウサギ単回椎間板内投与試験（参考資料）
BC039P01	（測定方法 I）：% （測定方法 I）：%	検出限界（μg/mL）以下	-6525 -2755	カニクイザル単回椎間板内投与 26 週間観察試験 ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（1）
BC041P01	（測定方法 I）：% （測定方法 I）：%	検出限界（μg/mL）以下	-4433 772	イヌ単回椎間板内投与 26 週間観察試験 ウサギ胚･胎児発生への影響に関する試験（1）
BC044P01	（測定方法 II）：% （測定方法 I）：%	検出限界（μg/mL）以下	-4404	イヌ単回椎間板内投与 3 年間観察試験
BC059P01	（測定方法 II）：% （測定方法 I）：%	検出限界（μg/mL）以下	2916/01 2916/03 2916/02 2916/04	ラット単回皮下投与トキシコキネティクス試験 イヌ単回皮下投与トキシコキネティクス試験 ラット反復皮下投与トキシコキネティクス試験 イヌ反復皮下投与トキシコキネティクス試験
BC065S01	（測定方法 II）：% （測定方法 I）：%	検出限界（μg/mL）以下	-2157	ラット単回皮下投与試験
BC066S01	（測定方法 II）：% （測定方法 I）：%	検出限界（μg/mL）以下	-2157	ラット単回皮下投与試験
BC069P01	（測定方法 II）：% （測定方法 II）：%a)	検出限界（μg/mL）以下	0133G	長期保存原薬のウサギ椎間板内投与局所刺激性試験

ND： **不純物B*** 測定時、ブランクより吸光度が低く、計算不可能（試験規格 μg/mL 以下）。
a)：特性試験として実施。

（続く）

***新薬承認情報提供時に置き換えた**

2.6.7.4 毒性試験：被験物質一覧 （続き）

被験物質：コンドリアーゼ、コンドリアーゼ製剤

ロット番号	純度（%）	規格設定された不純物（%） 不純物B*	試験番号	試験の種類
BC070P01	（測定方法 II）：% （測定方法 I）：%	検出限界（0.08 µg/mL）以下	143 144 145	ラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（2） ラットにおける胚･胎児発生への影響に関する試験（2） ラットにおける出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験
BC072	（測定方法 III）：% （測定方法 I）：%	検出限界（ µg/mL）未満	017	ラット単回皮下投与試験
BC-Test02	（測定方法 III）：% （測定方法 I）：%	検出限界（ µg/mL）未満	365	ウサギにおける胚･胎児発生への影響に関する試験（2）
BC-Test03P01	（測定方法 III）：% （測定方法 I）：%[a)]	検出限界（ µg/mL）未満	133G	長期保存原薬のウサギ椎間板内投与局所刺激性試験
KBC-004P01	（測定方法 IV）：% （測定方法 II）：%	検出限界（ µg/mL）未満	3046G	カニクイザル単回椎間板内投与 13 週間病理観察試験
DC1Q04	b)	c)	-3409 -3408 -3410	ウサギ椎間板内投与局所刺激性試験 ウサギ髄腔内投与局所刺激性試験 ウサギ筋肉内投与局所刺激性試験
DC1N02	b)	c)	-3130 -3131 -3132	ウサギ椎間板内投与局所刺激性試験 ウサギ髄腔内投与局所刺激性試験 ウサギ筋肉内投与局所刺激性試験
8910601	b)	c)	-3794	ウサギ椎間板内、髄腔内、筋肉内投与局所刺激性試験
DC1C07	b)	c)	263	ウサギ椎間板内、髄腔内、脊髄神経根、筋肉内投与局所刺激性試験

ND： **不純物B*** 測定時、ブランクより吸光度が低く、計算不可能（試験規格 µg/mL 以下）。

a)：特性試験として実施。

b)：コンドリアーゼ製剤では、純度規格は設定されていない。

c)：コンドリアーゼ製剤では、規格設定された不純物はない。

（続く）

***新薬承認情報提供時に置き換えた**

2.6.7.4 毒性試験：被験物質一覧 （続き）

被験物質：コンドリアーゼ製剤

ロット番号	純度（%）	規格設定された不純物（%） 不純物B*	試験番号	試験の種類
DC1J01	a)	b)	[redacted]057 078	モルモット皮内投与局所刺激性試験（1） モルモット皮内投与局所刺激性試験（2）
DC1J03	a)	b)	[redacted]057 078	モルモット皮内投与局所刺激性試験（1） モルモット皮内投与局所刺激性試験（2）

[redacted]

ND： **不純物B*** 測定時、ブランクより吸光度が低く、計算不可能（試験規格 [redacted]μg/mL 以下）。

a)：コンドリアーゼ製剤では、純度規格は設定されていない。

b)：コンドリアーゼ製剤では、規格設定された不純物はない。

***新薬承認情報提供時に置き換えた**

2.6.7.5　単回投与毒性試験

被験物質：コンドリアーゼ

動物種/系統	投与方法（溶媒/投与形態）	投与量	性別及び動物数/群	最大非致死量	概略の致死量	特記すべき所見	試験番号（資料番号）
カニクイザル	椎間板内（PBS/溶液）	0.25, 10 U/disc	M：9[a)]	10 U/disc	>10 U/disc	コンドリアーゼ投与後 1 週で、髄核、線維輪、軟骨終板及び成長板に変性が認められ、椎体では成長板周囲の骨髄細胞の減少及び壊死、骨髄腔内間葉系細胞の増加、骨芽細胞の活性化を伴う骨新生が認められた。投与後 4 週では、髄核、線維輪及び軟骨終板では投与後 1 週と同様の変化が認められ、成長板では限局性欠損、骨端輪の存在する例では骨細胞及び骨髄細胞壊死、椎体では変化が進行した。一方、軟骨終板への血管侵入及び骨化、髄核、線維輪及び成長板では軟骨細胞の再生がみられた。投与後 13 週では、髄核、線維輪及び軟骨終板では投与後 1 及び 4 週と同様の変化に加え、髄核、線維輪及び成長板の軟骨細胞の再生はより明らかとなり、軟骨終板の軟骨細胞の再生もみられ、成長板の軟骨基質の好塩基性の減少並びに軟骨細胞の変性及び壊死は回復した。軟骨終板では、血管侵入及び骨化が投与後 4 週よりも明らかとなり、菲薄化もみられた。骨髄での骨芽細胞の活性化を伴う新たな骨組織形成はみられなかった。組織変化の程度は、回復性の変化を除き、0.25 U/disc 群より 10 U/disc 群の方が強かった。 腰椎の X 線検査では、0.25 U/disc 以上の群で、投与後 1 週より椎間板高インデックスの投与前値からの減少がみられ、投与後 13 週まで同程度の椎間板高インデックスの低値が持続した。 一般状態、体重にコンドリアーゼ投与の影響はみられなかった。	[redacted]3046G（4.2.3.1-1）

M：雄　　PBS：リン酸緩衝生理食塩液

a)：3 例ずつ 3 時点（投与後 1、4 及び 13 週）

（続く）

2.6.7.5 単回投与毒性試験 （続き）

被験物質：コンドリアーゼ

動物種/系統	投与方法（溶媒/投与形態）	投与量	性別及び動物数/群	最大非致死量	概略の致死量	特記すべき所見	試験番号（資料番号）
カニクイザル	椎間板内（PBS/溶液）	0.25, 1.6, 10 U/disc	M：4 F：4	10 U/disc	>10 U/disc	コンドリアーゼ投与群に髄核軟骨細胞の変性、減少、集簇又は増加、線維輪の走行の不整及び硝子様肥厚がみられた。さらに、軟骨終板の変性（染色性低下及び菲薄化）並びに成長板の限局性欠損がみられた。これらの変化の頻度と程度に、群間差は認められなかった。椎体には、コンドリアーゼ投与による変化は認められなかった。 腰椎のX線検査では、0.25 U/disc以上の群の雌雄で、投与後1週より椎間板高インデックスの投与前値からの減少がみられ、投与後26週まで同程度の椎間板高インデックスの低値が持続した。 一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、眼科学的検査及び器官重量にコンドリアーゼ投与の影響はみられなかった。	[redacted]-6525（4.2.3.1-2） [redacted]3940G（4.2.3.1-3）

M：雄　F：雌　　PBS：リン酸緩衝生理食塩液

（続く）

2.6.7.5 単回投与毒性試験 （続き）

被験物質：コンドリアーゼ

動物種/系統	投与方法（溶媒/投与形態）	投与量	性別及び動物数/群	最大非致死量	概略の致死量	特記すべき所見	試験番号（資料番号）
ウサギ/日本白色種	椎間板内（PBS/溶液）	0.2, 4, 100 U/disc	F：6	100 U/disc	>100 U/disc	コンドリアーゼ投与群で髄核の縮小、髄核基質の線維化、髄核細胞数の減少、髄核及び線維輪細胞の軟骨細胞化、線維輪の波状走行並びに線維輪の髄核への突出がみられた。コンドリアーゼ投与群のいずれの投与量においても、軟骨終板への影響はみられなかったが、4及び 100 U/disc 群の軟骨終板を挟んで髄核に接する椎体（二次骨化中心起源）において、骨の改築像を伴わない骨細胞壊死がみられた。髄核体積比換算で、今回の申請用量の 26400 倍高い投与量に相当する、100 U/disc のコンドリアーゼが椎間板に及ぼす影響は、欧米における臨床用量の約 4 倍に相当する 50 pkat U/disc のキモパパインと比べても、明らかに軽度であった。	[redacted]ELD1（4.2.3.1-4）（参考）

F：雌　　PBS：リン酸緩衝生理食塩液

（続く）

2.6.7.5 単回投与毒性試験 （続き）

被験物質：コンドリアーゼ

動物種/系統	投与方法（溶媒/投与形態）	投与量	性別及び動物数/群	最大非致死量	概略の致死量	特記すべき所見	試験番号（資料番号）
イヌ/ビーグル犬	椎間板内（PBS/溶液）	0.25, 1, 4, 16, 50 U/disc	M：9	50 U/disc	>50 U/disc	0.25 及び 1 U/disc 群で髄核軟骨細胞の肥大及び集簇、1 U/disc 群で線維輪の走行の不整がみられた。4 U/disc 群では、上記所見に加えて、髄核基質の硝子化と軟骨細胞の変性及び消失、軟骨終板の菲薄化、軟骨終板に接する椎体の肉芽組織形成がみられた。16 及び 50 U/disc 群では、髄核の変化はより高度となり、さらに髄核及び軟骨終板の消失、椎体における骨梁の肥厚及び減少、炎症性細胞浸潤、線維性又は軟骨性骨新生等がみられた。その他の器官及び組織にはコンドリアーゼ投与の影響はみられなかった。 腰椎の X 線検査では、0.25 U/disc 以上の群において、投与後 1 週より、椎間板高インデックス（椎間板高/上位椎体高）の投与前値からの減少がみられた。無処置動物においても高頻度に自然発症することが知られている椎体骨端側方の骨増殖が、対照群を含む全群でみられ、コンドリアーゼ投与群において用量増加に伴って増強したが、この変化は、剖検でみられた椎間板高の狭小化に伴う反応性変化と考えられた。椎間板腹側まで達する骨増殖は、4 U/disc 以上の群でみられ、ビーグル犬は軟骨異栄養性のため、軟骨終板及び椎体において、強い組織変化が認められたと考えられた。16 及び 50 U/disc 群では、上記所見に加えて、投与後 5 週より椎間板に接する椎体縁に骨密度減少がみられた。 一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査及び器官重量に、コンドリアーゼ投与の影響はみられなかった。	[redacted]-4433（4.2.3.1-5）

M：雄　　PBS：リン酸緩衝生理食塩液

（続く）

2.6.7.5 単回投与毒性試験 （続き）

被験物質：コンドリアーゼ

動物種/系統	投与方法（溶媒/投与形態）	投与量	性別及び動物数/群	最大非致死量	概略の致死量	特記すべき所見	試験番号（資料番号）
イヌ/ビーグル犬	椎間板内（PBS/溶液）	50 U/disc	M：18	50 U/disc	>50 U/disc	コンドリアーゼ投与群の投与後 1 年で、髄核及び軟骨終板の消失がみられ、その消失部に線維性又は軟骨性骨新生がみられた。 投与後 2 及び 3 年では、骨新生が経過年数とともに顕著となった。椎体においては、骨梁の肥厚及び減少、炎症性細胞浸潤、肉芽組織形成及び線維化がみられたが、投与後 1 年と比較して、投与後 2 及び 3 年ではいずれも軽減傾向を示した。線維輪、縦靭帯及び結合組織においては、軟骨細胞の消失、線維束の硝子様肥厚等の退行性変化、線維化及び腹部縦靭帯内の線維軟骨の増生、骨棘形成等の増殖性変化が投与後 1 年で散見され、投与後 2 年では両変化とも、投与後 3 年では増殖性変化がより高度となった。これらの変化は対照群の一部の例で認められたことから自然発生及び投与針の刺入に起因するものと考えられたが、いずれもコンドリアーゼ投与群では変化の程度及び発現例数が増加していた。コンドリアーゼ投与群では、これらの変化に加えて、投与後 1 年で軟骨細胞又は側部線維輪及び周囲結合組織の線維軟骨の増生等の増殖性変化、線維束軟骨細胞の消失、線維輪の走行の不整等の退行性変化、さらに炎症性細胞浸潤がみられた。 投与後 2 及び 3 年では、これらの変化のうち、増殖性変化は進行し、退行性変化には差はなく、炎症性細胞浸潤は軽減した。 （続く）	[redacted]-4404（4.2.3.1-6）

M：雄　　PBS：リン酸緩衝生理食塩液

（続く）

2.6.7.5 単回投与毒性試験 （続き）

被験物質：コンドリアーゼ

動物種/系統	投与方法（溶媒/投与形態）	投与量	性別及び動物数/群	最大非致死量	概略の致死量	特記すべき所見	試験番号（資料番号）
イヌ/ビーグル犬	椎間板内（PBS/溶液）	50 U/disc	M：18	50 U/disc	>50 U/disc	（続き） X 線検査では、コンドリアーゼ投与群で、椎間板高の狭小化及び椎間板に接する椎体縁に骨密度減少がみられた。狭小化の程度は、投与後 1 年から 3 年まで変化なかったが、骨密度減少は、経過年数とともに回復傾向を示した。その他、経過年数とともに進行する椎体の骨端の骨増殖の発現例数及び程度ともに、対照群に比べてコンドリアーゼ投与群で高度であった。 一般状態及び体重にコンドリアーゼ投与の影響はみられなかった。	[redacted]-4404（4.2.3.1-6）

M：雄　　PBS：リン酸緩衝生理食塩液

（続く）

2.6.7.5 単回投与毒性試験 （続き）

被験物質：コンドリアーゼ

動物種/系統	投与方法 （溶媒/投与形態）	投与量	性別及び 動物数/群	最大 非致死量	概略の 致死量	特記すべき所見	試験番号 （資料番号）
マウス/Swiss	静脈内 （PBS/溶液）	2000 U/kg	M：5 F：5	2000 U/kg	>2000 U/kg	特記すべき所見なし	[redacted].593/352060 （4.2.3.1-7）
	筋肉内 （PBS/溶液）	2000 U/kg	M：5 F：5	2000 U/kg	>2000 U/kg	特記すべき所見なし	[redacted].597 （4.2.3.1-8）
	皮下 （PBS/溶液）	2000 U/kg	M：5 F：5	2000 U/kg	>2000 U/kg	特記すべき所見なし	[redacted].595/352060 （4.2.3.1-9）
ラット/Wistar	静脈内 （PBS/溶液）	2000 U/kg	M：5 F：5	2000 U/kg	>2000 U/kg	特記すべき所見なし	[redacted].592/352060 （4.2.3.1-10）
	筋肉内 （PBS/溶液）	2000 U/kg	M：5 F：5	2000 U/kg	>2000 U/kg	特記すべき所見なし	[redacted].596/352060 （4.2.3.1-11）
	皮下 （PBS/溶液）	2000 U/kg	M：5 F：5	2000 U/kg	>2000 U/kg	特記すべき所見なし	[redacted].594/352060 （4.2.3.1-12）
イヌ/ビーグル犬	静脈内 （PBS/溶液）	2000 U/kg	M：2 F：2	2000 U/kg	>2000 U/kg	一過性の体重減少、運動性低下、鼻を鳴らす行動、運動失調及び麻痺性歩行	[redacted].074 （4.2.3.1-14）
	筋肉内 （PBS/溶液）	2000 U/kg	M：2 F：2	2000 U/kg	>2000 U/kg	一過性の体重減少、運動性低下、鼻を鳴らす行動、運動失調及び円背位	[redacted].076 （4.2.3.1-15）
	皮下 （PBS/溶液）	2000 U/kg	M：2 F：2	2000 U/kg	>2000 U/kg	一過性の体重減少、運動性低下及び円背位	[redacted].075 （4.2.3.1-16）

M：雄　F：雌　　PBS：リン酸緩衝生理食塩液

2.6.7.6 反復投与毒性試験 - 重要な試験以外の試験

該当なし。

2.6.7.7　反復投与毒性試験 - 重要な試験

2.6.7.7A　反復投与毒性試験

報告書の題名：Repeated dose (28-day) subcutaneous toxicity study, including a recovery study, with C-ABC in rats

被験物質：コンドリアーゼ

動物種/系統：ラット/Wistar（Crl:WI(WU)BR）
試験開始週齢：5 週齢
初回投与年月：[redacted]

投与期間：28 日間
休薬期間：28 日間
投与方法：皮下投与 a)
溶媒/投与形態：リン酸緩衝生理食塩液/溶液

試験番号：[redacted].637、[redacted]2916/02
CTD における資料番号：4.2.3.2-1、4.2.3.2-2
GLP 適用：適

特記事項：なし
無毒性量：200 U/kg/日

試験番号：[redacted]2916/02

投与量（U/kg/日）	0（対照）		2		20		200	
動物数	M：10（5）	F：10（5）	M：10	F：10	M：10	F：10	M：10（5）	F：10（5）
トキシコキネティクス b)								
動物数	0	0	3	3	3	3	3	3
投与 1 日								
C_{max}（mU/mL）	/	/	BLQ	BLQ	0.409	0.236	5.77	5.47
T_{max} (h)	/	/	BLQ	BLQ	1	1	2	1
$AUC_{0\text{-}last}$（mU･h/mL）	/	/	BLQ	BLQ	0.299	0.158	5.62	7.85
投与 14 日 c)	/	/	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
投与 28 日 c)	/	/	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
特記すべき所見								
死亡例及び切迫屠殺動物数	0	0	0	0	0	0	0	0
体重	-	-	-	-	-	-	-	-
摂餌量	-	-	-	-	-	-	-	-
摂水量	-	-	-	-	-	-	-	-

-：特記すべき所見なし　　/：該当なし　　（　）は回復試験用の動物数
M：雄　F：雌　　PBS：リン酸緩衝生理食塩液　　BLQ：定量下限（[redacted]mU/mL）未満
a)：臨床投与経路は椎間板内であるが、大量の反復投与ができないため、代替投与経路である皮下投与を選択した。
b)：試験番号 [redacted]2916/02
c)：いずれの測定時点においても定量下限未満であった。

（続く）

2.6.7.7A 反復投与毒性試験 （続き）

試験番号：[redacted].637

投与量（U/kg/日）	0（対照）		2		20		200	
動物数	M：10（5）	F：10（5）	M：10	F：10	M：10	F：10	M：10（5）	F：10（5）
特記すべき所見								
一般状態	-	-	-	-	-	-	-	-
眼科学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-
血液学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-
血液生化学的検査								
投与期間終了時								
γ-グロブリン（%）	5.8	-	6.2	-	6.4	-	6.6**	-
β_1-グロブリン（%）	-	11.9	-	12.9	-	13.4	-	14.7**
アルブミン（%）	-	55.3	-	55.0	-	54.3	-	52.4**
アルブミン/グロブリン比	-	1.29	-	1.25	-	1.26	-	1.18$$
無機リン（mmol/L）	-	1.85	-	1.92	-	1.98	-	2.12$
休薬期間終了時								
γ-グロブリン（%）	-	7.3	/	/	/	/	-	8.4*
α_2-グロブリン（%）	7.6	-	/	/	/	/	9.5*	-
尿検査	-	-	-	-	-	-	-	-

-：特記すべき所見なし　/：該当なし　（ ）は回復試験用の動物数

M：雄　F：雌

* $p<0.05$、** $p<0.02$（Mann-Whitney U-test）　$ $p<0.05$、$$ $p<0.01$（Dunnett's test）

（続く）

2.6.7.7A 反復投与毒性試験 （続き）

試験番号：[redacted].637

投与量（U/kg/日）	0（対照）		2		20		200	
動物数	M：10（5）	F：10（5）	M：10	F：10	M：10	F：10	M：10（5）	F：10（5）
抗コンドリアーゼ IgM（抗体価 a)）								
投与前	NE	NE	<10	<10	<10	<10	<10	<10
投与 15 日	NE	NE	640-5120	80-640	5120->10240	320-2560	2560->10240	640-2560
投与 28 日	NE	NE	640-1280	160-640	640-1280	160-640	320-1280	80-640
休薬期間終了時	NE	NE	/	/	/	/	<10-1280	80-320
抗コンドリアーゼ IgG（抗体価 a)）								
投与前	NE	NE	<10	<10	<10	<10	<10	<10
投与 15 日	NE	NE	10240-20480	10240-81920	20480-40960	20480-81920	20480-81920	40960-327680
投与 28 日	NE	NE	>327680	163840->655360	>327680	327680->655360	163840->327680	327680->655360
休薬期間終了時	NE	NE	/	/	/	/	81920-163840	655360
器官重量	-	-	-	-	-	-	-	-
剖検所見	-	-	-	-	-	-	-	-
病理組織学的検査								
投与期間終了時								
投与部位：								
皮下の単核白血球浸潤								
ごく軽度	1	3	1	3	2	1	1	1
軽度	1	0	4	3	5	4	4	5
中等度	0	0	0	0	0	0	4	0
休薬期間終了時								
投与部位：								
皮下の単核白血球浸潤								
ごく軽度	0	0	/	/	/	/	1	0

-：特記すべき所見なし　　/：該当なし　　（ ）は回復試験用の動物数

M：雄　F：雌　　NE：実施せず

a)：各群 5 匹について測定。個別値の最小値-最大値を示した。

2.6.7.7B　反復投与毒性試験

報告書の題名：Repeated dose (29-day) subcutaneous toxicity study, including a recovery study, with C-ABC in dogs

被験物質：コンドリアーゼ

動物種/系統：イヌ/ビーグル犬
試験開始月齢：5～6 月齢
初回投与年月：[redacted]

投与期間：29 日間
休薬期間：28 日間
投与方法：皮下投与 a)
溶媒/投与形態：リン酸緩衝生理食塩液/溶液

試験番号：[redacted].707、[redacted]2916/04
CTD における資料番号：4.2.3.2-3、4.2.3.2-4
GLP 適用：適

特記事項：なし
無毒性量：200 U/kg/日

試験番号：[redacted]2916/04

投与量（U/kg/日）	0（対照）		2		20		200	
動物数	M：4（2）	F：4（2）	M：4	F：4	M：4	F：4	M：4（2）	F：4（2）
トキシコキネティクス b)								
動物数	0	0	3	3	3	3	3	3
投与 1 日 c)								
C_{max}（mU/mL）	/	/	0.381	0.498	6.39	5.97	69.6	52.8
			0.240	0.442	4.55	7.23	38.9	44.8
			0.778	0.735	4.83	4.59	234	63.2
T_{max}（h）	/	/	2	1	0.5	1	2	1
			1	2	1	1	2	0.5
			2	1	0.5	0.5	2	6
$t_{1/2}$（h）	/	/	NC	NC	1.6	2.4	5.2	4.7
			NC	NC	5.6	2.7	10.3	6.0
			NC	1.8	5.4	6.1	3.7	NC
$AUC_{0\text{-last}}$（mU･h/mL）	/	/	0.580	0.559	15.0	17.1	738	288
			0.262	1.46	24.0	28.0	507	461
			1.05	2.27	22.0	39.4	1011	640
投与 15 日 d)	/	/	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
投与 29 日 d)	/	/	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ

/：該当なし　（ ）は回復試験用の動物数　M：雄　F：雌　BLQ：定量下限（[redacted]mU/mL）未満　NC：計算できず

a)：臨床投与経路は椎間板内であるが、大量の反復投与が不可能であるため、代替投与経路である皮下投与を選択した。b)：試験番号[redacted]2916/04　c)：個別値
d)：投与 15 日の 200 U/kg/日の雄 1 例で投与 0.5 及び 1 時間、雌 2 例で投与 0.5 時間にコンドリアーゼが検出されたが、それ以外の測定時点では定量下限未満であった。

（続く）

2.6.7.7B 反復投与毒性試験 （続き）

試験番号：[redacted].707

投与量（U/kg/日）	0（対照）		2		20		200	
動物数	M：4（2）	F：4（2）	M：4	F：4	M：4	F：4	M：4（2）	F：4（2）
特記すべき所見								
死亡例及び切迫屠殺動物数	0	0	0	0	0	0	0	0
体重	-	-	-	-	-	-	-	-
摂餌量	-	-	-	-	-	-	-	-
一般状態								
腫脹（投与部位）	0	0	0	0	1	0	3	0
眼科学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-
血液学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-
投与期間終了時								
赤血球数（$\times 10^{12}$/L）	6.60	6.10	6.53	5.83	6.76	6.19	5.99	5.81
ヘモグロビン量（mmol/L）	9.7	9.1	9.5	9.0	9.8	9.3	9.0	8.5
ヘマトクリット値（L/L）	0.437	0.412	0.435	0.417	0.449	0.427	0.405	0.396
白血球数（$\times 10^{9}$/L）	9.7	9.2	9.8	8.2	9.2	8.9	11.2	11.1
MCHC（mmol/L）	22.2	22.2	21.9	21.5*	21.8	21.8	22.1	21.5*
休薬期間終了時								
赤血球数（$\times 10^{12}$/L）	7.40	7.29	/	/	/	/	6.27***	6.95
ヘモグロビン量（mmol/L）	10.7	10.7	/	/	/	/	9.5*	10.1
ヘマトクリット値（L/L）	0.485	0.490	/	/	/	/	0.432*	0.458
血液生化学的検査								
投与期間終了時								
尿素（mmol/L）	-	5.0	-	4.5	-	4.6	-	3.5$$
カルシウム（mmol/L）	-	2.81	-	2.76	-	2.80	-	2.88$
休薬期間終了時	-	-	-	-	-	-	-	-
尿検査	-	-	-	-	-	-	-	-

-：特記すべき所見なし　/：該当なし　（ ）は回復試験用の動物数

M：雄　F：雌

* p<0.05、*** p <0.001（Student’s t-test）　$ p<0.05、$$ p<0.01（Dunnett’s test）

（続く）

2.6.7.7B 反復投与毒性試験 （続き）

試験番号：[redacted].707

投与量（U/kg/日）	0（対照）		2		20		200	
動物数	M：4（2）	F：4（2）	M：4	F：4	M：4	F：4	M：4（2）	F：4（2）
抗コンドリアーゼ IgM（抗体価 a)）								
投与前	NE	NE	<40	<40	<40	<40	<40	<40-320
投与 15 日	NE	NE	<80-80	<40	80-640	<40-640	160-640	<40
投与 27 日	NE	NE	<40	<40	<40	<40-160	<40	<40
休薬期間終了時	NE	NE	/	/	/	/	<40	<40
抗コンドリアーゼ IgG（抗体価 a)）								
投与前	NE	NE	<80	<80	<80	<80	<80	<80
投与 15 日	NE	NE	20480->163840	81920->163840	81920->163840	>163840	>163840	>163840
投与 27 日	NE	NE	>163840	>163840	>163840	>163840	>163840	>163840
休薬期間終了時	NE	NE	/	/	/	/	>163840	>163840
器官重量	-	-	-	-	-	-	-	-
剖検所見	-	-	-	-	-	-	-	-
病理組織学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-

-：特記すべき所見なし　　/：該当なし　　（　）は回復試験用の動物数

M：雄　F：雌　　NE：実施せず

a)：全例について測定（200 U/kg 群の投与 27 日は 4 例について実施）。個別値の最小値-最大値を示した。

2.6.7.8 In vitro 遺伝毒性試験

2.6.7.8A In vitro 遺伝毒性試験

報告書の題名：Examination of C-ABC for mutagenic activity in four strains of *Salmonella typhimurium* (Ames test) and *Escherichia coli* WP2*uvr*A

被験物質：コンドリアーゼ

試験の種類：細菌を用いる復帰突然変異試験
菌株：*S. typhimurium* TA98、TA100、TA1535、TA1537、*E. coli* WP2*uvr*A
代謝活性化系：Aroclor で誘導したラット肝 S9mix
溶媒：リン酸緩衝生理食塩液（被験物質）
処理：プレート法
細胞毒性：なし
遺伝毒性：なし

独立して実施した試験数：2
プレート数：3
分析細胞数/培養：-

試験番号：[redacted].248
CTD における資料番号：4.2.3.3.1-1
GLP 適用：適
処理年月：[redacted]

代謝活性化	被験物質	用量段階 a)（µL/plate）	Assay #1 復帰変異コロニー数（平均値）				
			TA100	TA1535	WP2*uvr*A	TA98	TA1537
代謝活性化なし	PBS	100.0	153	29	37	44	23
	コンドリアーゼ	1.23	156	34	41	42	18
		3.70	170	28	44	48	20
		11.11	161	30	37	40	16
		33.33	176	34	40	43	23
		100.0	158	30	38	42	18
	ENNG	2.0 µg/plate	/	/	763	/	/
		3.0 µg/plate	346	/	/	/	/
		5.0 µg/plate	/	296	/	/	/
	2-NF	2.0 µg/plate	/	/	/	585	/
	9-AA	80.0 µg/plate	/	/	/	/	1663

/：該当なし
PBS：リン酸緩衝生理食塩液　ENNG：N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine　2-NF：2-nitrofluorene　9-AA：9-amino-acridine
a)：コンドリアーゼ原薬を用いて調製できる最高濃度を最高用量とした。最高用量の 100.0 µL/plate は約 100 U/plate に相当。

（続く）

2.6.7.8A In vitro 遺伝毒性試験 （続き）

試験番号：[redacted].248

代謝活性化	被験物質	用量段階 a)（μL/plate）	Assay #1 復帰変異コロニー数（平均値）				
			TA100	TA1535	WP2*uvr*A	TA98	TA1537
代謝活性化あり	PBS	100.0	191	31	39	61	23
	コンドリアーゼ	1.23	183	33	40	60	25
		3.70	170	25	48	66	34*
		11.11	175	29	44	61	35*
		33.33	180	28	40	62	31*
		100.0	184	56*	46	65	23
	2-AA	2.0 μg/plate	2149	1047	/	1588	/
		5.0 μg/plate	/	/	/	/	144
		80.0 μg/plate	/	/	1097	/	/

/：該当なし

PBS：リン酸緩衝生理食塩液　2-AA：2-aminoanthracene

* $p<0.05$（Mann-Whitney U test）

a)：コンドリアーゼ原薬を用いて調製できる最高濃度を最高用量とした。最高用量の 100.0 μL/plate は約 100 U/plate に相当。

（続く）

2.6.7.8A In vitro 遺伝毒性試験 （続き）

試験番号：[redacted].248

代謝活性化	被験物質	用量段階 a)（μL/plate）	Assay #2 復帰変異コロニー数（平均値）				
			TA100	TA1535	WP2*uvr*A	TA98	TA1537
代謝活性化なし	PBS	100.0	156	26	38	46	15
	コンドリアーゼ	1.23	140	30	39	39	20
		3.70	148	29	36	36	15
		11.11	160	25	31	42	17
		33.33	159	25	38	41	16
		100.0	163	30	34	39	18
	ENNG	2.0 μg/plate	/	/	663	/	/
		3.0 μg/plate	375	/	/	/	/
		5.0 μg/plate	/	273	/	/	/
	2-NF	2.0 μg/plate	/	/	/	688	/
	9-AA	80.0 μg/plate	/	/	/	/	1074
代謝活性化あり	PBS	100	187	21	43	64	25
	コンドリアーゼ	1.23	164	21	36	66	29
		3.7	167	27	33	54	22
		11.11	172	36	39	59	32
		33.33	168	23	41	58	22
		100.0	166	38	37	62	25
	2-AA	2.0 μg/plate	2070	1032	/	1489	/
		5.0 μg/plate	/	/	/	/	152
		80.0 μg/plate	/	/	1193	/	/

/：該当なし

PBS：リン酸緩衝生理食塩液　ENNG：N-ethyl-N’-nitro-N-nitrosoguanidine　2-NF：2-nitrofluorene　9-AA：9-amino-acridine　2-AA：2-aminoanthracene

a)：コンドリアーゼ原薬を用いて調製できる最高濃度を最高用量とした。最高用量の 100.0 μL/plate は約 100 U/plate に相当。

2.6.7.8B　In vitro 遺伝毒性試験

報告書の題名：Chromosome analysis of Chinese hamster ovary cells treated *in vitro* with C-ABC

被験物質：コンドリアーゼ

試験の種類：ほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験　　独立して実施した試験数：2　　試験番号：[redacted].219
系統：チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞　　プレート数：2　　CTD における資料番号：4.2.3.3.1-2
代謝活性化系：Aroclor1254 で誘導したラット肝 S9mix　　分析細胞数/培養：1000　　GLP 適用：適
溶媒：リン酸緩衝生理食塩液（被験物質）　　処理年月：[redacted]
処理：18 時間処理（3 時間処理+15 時間回復）、32 時間処理（3 時間処理+29 時間回復）
細胞毒性：なし
遺伝毒性：なし

代謝活性化	被験物質	用量段階（U/mL）	Assay #1						
			処理	相対増殖率 a)（%）		変異体出現頻度（%）	処理	相対増殖率 a)（%）		変異体出現頻度（%）
代謝活性化なし	PBS	0	18 時間処理	100		1.0	32 時間処理	100		0.5
	コンドリアーゼ	40		94	92	NE		103	100	NE
		60		108	121	1.0		99	96	0.0
		80		118	100	0.5		108	80	1.5
		100		97	118	0.0		137	101	0.0
	Mitomycin C	0.05 µg/mL		68	71	64.0***		41	34	81.0***
代謝活性化あり	PBS	0	3 時間処理 +15 時間回復	100		1.0	3 時間処理 +29 時間回復	100		0.0
	コンドリアーゼ	40		131	110	NE		106	93	NE
		60		99	101	1.0		111	105	0.5
		80		132	114	0.0		113	100	1.5
		100		117	124	0.5		108	90	0.5
	CP	15.0 µg/mL		33	31	77.5***		91	81	63.0***

NE：実施せず
PBS：リン酸緩衝生理食塩液　CP：Cyclophosphamide
*** $p<0.001$（Fisher's exact probability test）
a)：対照群は平均値を示し、コンドリアーゼ、Cyclophosphamide 及び Mitomycin C 処理群は個別値を示す。

（続く）

2.6.7.8B In vitro 遺伝毒性試験 （続き）

試験番号：[redacted].219

代謝活性化	被験物質	用量段階（U/mL）	Assay #2						
			処理	相対増殖率 a)（%）		変異体出現頻度（%）	処理	相対増殖率 a)（%）		変異体出現頻度（%）
代謝活性化なし	PBS	0	18 時間処理	100		0.5	32 時間処理	100		1.0
	コンドリアーゼ	60		105	113	0.5		108	109	1.0
		80		110	90	0.5		114	114	0.5
		100		110	109	1.5		128	100	0.5
	Mitomycin C	0.05 µg/mL		51	54	68.5***		55	52	84.0***
代謝活性化あり	PBS	0	3 時間処理 +15 時間回復	100		0.0	3 時間処理 +29 時間回復	100		1.0
	コンドリアーゼ	60		91	90	0.0		102	114	1.5
		80		115	104	0.5		114	112	0.5
		100		107	107	1.5		95	101	0.5
	CP	15.0 µg/mL		29	23	72.0***		82	76	83.0***

PBS：リン酸緩衝生理食塩液　CP：Cyclophosphamide

*** $p<0.001$（Fisher's exact probability test）

a)：対照群は平均値を示し、コンドリアーゼ、Cyclophosphamide 及び Mitomycin C 処理群は個別値を示す。

2.6.7.9 In vivo 遺伝毒性試験

報告書の題名：Micronucleus test with C-ABC in mice

被験物質：コンドリアーゼ

試験の種類：マウスにおける小核試験
動物種/系統：マウス/Swiss
週齢：記載なし
評価した細胞：赤血球、正染性赤血球、多染性赤血球
分析細胞数/動物：2000（最大 3000）
特記事項：なし
毒性/細胞毒性：なし
遺伝毒性：なし
曝露証明：なし

処理計画：単回投与
計測時間：投与後 24、48、72 時間
投与方法：腹腔内投与
溶媒/投与形態：リン酸緩衝生理食塩液/溶液

試験番号：[redacted].547
CTD における資料番号：4.2.3.3.2-1
GLP 適用：適
投与年月：[redacted]

被験物質	投与量（U/kg）	標本作製時期（時間）	動物数	小核を有する PE 数 a)	小核を有する NE 数 a)	小核を有する E 数 a)	多染性赤血球数 a)
PBS	0	24	M：5	0.29	0.00	0.17	574
			F：5	0.65	0.12	0.43	466
		48	M：5	0.60	0.54	0.57	535
			F：5	0.33	0.00	0.13	448
		72	M：5	0.49	0.00	0.23	500
			F：5	0.69	0.22	0.43	533
コンドリアーゼ	2000	24	M：5	0.99	0.20	0.70	554
			F：5	0.90	0.00	0.47	507
		48	M：5	0.74	0.00	0.37	483
			F：5	0.81	0.00	0.37	444
		72	M：5	0.53	0.27	0.40	574
			F：5	0.36	0.00	0.20	563
Mitomycin C	1.5 mg/kg	24	M：5	35.70***	0.76	16.03***	491
		48	M：5	8.49**	7.26***	7.93***	344***

M：雄　F：雌　　PBS：リン酸緩衝生理食塩液　　PE：多染性赤血球　NE：正染性赤血球　E：赤血球
** p<0.01、*** p<0.001（T-test）
a)：分析細胞 1000 個あたりの平均値

2.6.7.10 がん原性試験

該当なし。

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

2.6.7.12A　ラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（1）

報告書の題名：C-ABC のラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

被験物質：コンドリアーゼ

試験計画：ICH 4.1.1 準拠せず
動物種/系統：ラット/Crj:CD（SD）
試験開始週齢：8 週齢（雄）
10 週齢（雌）
初回投与年月：[redacted]（雄）
（雌）
特記事項：なし

投与期間：雄：交配前 4 週～剖検前日まで
雌：交配前 2 週～妊娠 7 日まで
交尾成立日：妊娠 0 日
帝王切開日：妊娠 15 日
投与方法：皮下投与 a)
溶媒/投与形態：リン酸緩衝生理食塩液/溶液

試験番号：[redacted]-2755
CTD における資料番号：4.2.3.5.1-1
GLP 適用：適

無毒性量：F_0 雄：一般毒性；200 U/kg/日、生殖能及び初期胚発生に対する無毒性量；200 U/kg/日
F_0 雌：一般毒性；2 U/kg/日、生殖能及び初期胚発生に対する無毒性量；200 U/kg/日
F_1 胎児：200 U/kg/日

投与量（U/kg/日）		0（対照）	2	20	200
F_0 雄	動物数	22	22	22	22
	トキシコキネティクス	NE	NE	NE	NE
	死亡例及び切迫屠殺動物数	0	0	0	0
	体重	-	-	-	-
	摂餌量	-	-	-	-
	一般状態	-	-	-	-
	剖検　　左精巣の腫大	0	0	0	1
	器官重量	-	-	-	-
	病理組織学的検査				
	左精巣　精細管内腔の拡張	0	0	0	1
	精細管上皮細胞数 b)				
	V ステージ　精祖細胞数比	1.41	/	/	1.73*
	交尾動物数（交尾率%）	22 (100)	22 (100)	22 (100)	22 (100)
	受胎動物数（受胎率%）	22 (100)	22 (100)	22 (100)	21 (95.5)

-：特記すべき所見なし　　/：検査なし　　NE：実施せず　　* $p<0.05$（Student's t-test 又は Aspin-Welch's t-test）

a)：臨床投与経路は椎間板内であるが、大量の反復投与ができないため、代替投与経路である皮下投与を選択した。

b)：精子形成サイクル 14 ステージの内、II ～III、V、VII、X、XII の 5 ステージについて生殖細胞とセルトリ細胞数を測定し、ステージごとに細胞数比を求めた。（続く）

2.6.7.12A ラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（1）　（続き）

試験番号：[redacted]-2755

投与量（U/kg/日）			0（対照）	2	20	200
F_0 雌	妊娠動物数		22	22	22	22
	トキシコキネティクス		NE	NE	NE	NE
	死亡及び切迫屠殺動物数		0	0	0	0
	流産あるいは全胚吸収母体数		0	0	0	0
	交配前体重		-	-	-	-
	妊娠時体重		-	-	-	-
	交配前摂餌量		-	-	-	-
	妊娠時摂餌量（%）[a]	妊娠 6 日-7 日	25.5 g/日	-2	0	-6*
		妊娠 12 日-15 日	26.4 g/日	+3	-3	-6*
	一般状態　耳介の発赤、肥厚、痂皮		-	-	+	+
	剖検		-	-	-	-
	性周期日（日）		3.4	3.4	3.1	3.3
	精子が確認された動物数（交尾率%）		22 (100)	22 (100)	22 (100)	22 (100)
	妊娠動物数（受胎率%）		22 (100)	22 (100)	22 (100)	20 (90.9)
	平均黄体数		19.1	17.6	17.9	18.3
	平均着床数		16.7	14.9*	16.5	16.4
	平均着床率（%）		89.0	87.1	93.1	90.3
F_1 胎児	平均生存胎児数		15.7	13.6**	15.0	15.0
	平均生存率（%）		94.0	91.4	91.5	91.4
	総死亡数		22	29	31	28
	平均死亡率（%）		6.1	8.7	8.5	8.6
	平均胎児体重（mg）		270	272	277	271
	外表異常[b]　発現例数（%）		0	1 (0.3)	1 (0.3)	1 (0.3)

-：特記すべき所見なし　　+：所見あり　　NE：実施せず

* $p<0.05$（Student's t-test 又は Aspin-Welch's t-test）

a)：対照群は平均値を示す。投与群は対照群との差を%で示す。

b)：2 U/kg 群で短尾、20 U/kg 群で小眼球症、200 U/kg 群で結合体がみられた。

2.6.7.12B　ラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（2）

報告書の題名：SI-6603 のラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に関する皮下投与試験－投与期間分割による追加試験－

被験物質：コンドリアーゼ

試験計画：ICH 4.1.1 準拠せず
動物種/系統：ラット/Wistar（Crlj:WI）
試験開始週齢：11 週齢（雄）
9～10 週齢（雌）
初回投与年月：[redacted]

投与期間：　雄：交配前 7 日～交尾確認日まで
雌：交配前 7 日～妊娠 7 日まで
交尾成立日：妊娠 0 日
帝王切開日：妊娠 13 日
投与方法：皮下投与 a)
溶媒/投与形態：リン酸緩衝生理食塩液/溶液

試験番号：[redacted]143
CTD における資料番号：4.2.3.5.1-2
GLP 適用：適

特記事項：
コンドリアーゼのラットへの反復皮下投与により抗コンドリアーゼ抗体が産生されることから、評価すべき生殖発生過程を通して十分量のコンドリアーゼ全身曝露を得ることが同一動物では困難と考えられる。本試験では、上記の被験物質投与期間を最大 8 日間に分割した群を設け、対照群と比較することにより各投与時期におけるコンドリアーゼ投与の影響を評価した。各群の投与期間及び投与量を以下に示す。

群	投与量	性別	投与期間
1 群	0（媒体）	雄	交配前 7 日～剖検前日
	0（媒体）	雌	交配前 7 日～妊娠 7 日
2 群	200 U/kg/日	雌雄	交配前 7 日～交配開始日
3 群	200 U/kg/日	雌雄	交配開始日～交尾確認日
4 群	-	雄	無処置（交配用）
	200 U/kg/日	雌	交尾確認日～妊娠 7 日

無毒性量：F_0 雄：一般毒性、生殖機能及び初期胚発生に関する無毒性量；200 U/kg/日
F_0 雌：一般毒性、生殖機能及び初期胚発生に関する無毒性量；200 U/kg/日
F_1 胎児：200 U/kg/日

a)：臨床投与経路は椎間板内であるが、大量の反復投与ができないため、代替投与経路である皮下投与を選択した。

（続く）

2.6.7.12B ラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（2）　（続き）

試験番号：[redacted]143

投与量（U/kg/日）	0（対照）	200	200	無処置
投与期間	交配前 7 日～剖検前日	交配前 7 日～ 交配開始日	交配開始日～ 交尾確認日	-
F_0 雄　動物数	20	20	20	20
トキシコキネティクス				
動物数（サテライト動物数）	3	3	/	/
濃度（mU/mL）				
初回投与後 0.5 時間	BLQ	3.74	/	/
初回投与後 1 時間	/	5.01	/	/
最終投与後 0.5 時間	BLQ	2.46	/	/
最終投与後 1 時間	/	1.71	/	/
死亡例及び切迫屠殺動物数	0	0	0	0
体重	-	-	-	/
体重増加量	-	-	-	/
摂餌量	-	-	/	/
一般状態	-	-	-	-
剖検	-	-	-	/

-：特記すべき所見なし　　/：検査なし　　BLQ：定量下限（[redacted]mU/mL）未満

（続く）

2.6.7.12B ラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（2）　（続き）

試験番号：[redacted]143

投与量（U/kg/日）	0（対照）	200	200	200
投与期間	交配前 7 日～妊娠 7 日	交配前 7 日～ 交配開始日	交配開始日～ 交尾確認日	交尾確認日～妊娠 7 日
F_0 雌　妊娠動物数	20	20	20	20
トキシコキネティクス				
動物数（サテライト動物数）	3	3	/	5
濃度（mU/mL）				
初回投与後 0.5 時間	BLQ	3.59	/	2.16
初回投与後 1 時間	/	5.14	/	2.12
最終投与後 0.5 時間	BLQ	4.68	/	0.640
最終投与後 1 時間	/	2.33	/	0.452
死亡例及び切迫屠殺動物数	0	0	0	0
流産あるいは全胚吸収母体数	0	0	0	0
交配前体重	-	-	-	-
妊娠時体重	-	-	-	-
交配前体重増加量	-	-	-	-
妊娠時体重増加量	-	-	-	-
交配前摂餌量	-	-	/	/
妊娠時摂餌量	-	-	-	-
一般状態	-	-	-	-
剖検	-	-	-	-
性周期（日）/周期数	4.1 / 1.5	4.0 / 1.5	/	/
交配に要した日数（日）	2.6	2.5	2.8	2.9
精子が確認された動物数（交尾率%）	19 (95.0)	19 (95.0)	20 (100)	20 (100)
妊娠動物数（受胎率%）	19 (100)	19 (100)	19 (95.0)	19 (95.0)
平均黄体数	16.2	16.1	16.6	16.8
平均着床数	15.4	15.6	15.6	15.8
平均着床前死亡率（%）	4.7	2.8	5.1	7.5

-：特記すべき所見なし　　/：検査なし　　BLQ：定量下限（[redacted]mU/mL）未満

（続く）

2.6.7.12B ラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（2） （続き）

試験番号：[redacted]143

投与量（U/kg/日）		0（対照）	200	200	200
投与期間		交配前７日～妊娠７日	交配前７日～ 交配開始日	交配開始日～ 交尾確認日	交尾確認日～妊娠７日
F_1胎児	平均生存胎児数	14.8	14.8	14.8	15.1
	平均早期吸収胚率（%）	0.0	0.0	0.0	0.0
	平均後期吸収胚率（%）	4.0	5.4	4.9	6.1
	平均死亡胎児率 （%）	0.0	0.0	0.0	0. 0
	平均着床後死亡率（%）	4.0	5.4	4.9	6.1

2.6.7.13　生殖発生毒性試験 - 胚・胎児発生への影響に関する試験

2.6.7.13A　ラットにおける胚・胎児発生への影響に関する試験（1）

報告書の題名：A reproductive and developmental toxicity study in rats. Study on subcutaneous administration of C-ABC during the period of organogenesis (Japanese MHW Registration Requirements: Segment II).

被験物質：コンドリアーゼ

試験計画：ICH4.1.3 準拠せず
動物種/系統：ラット/Wistar（Crl:WI(WU)BR）
試験開始週齢：雄 13 週齢、雌 12 週齢
初回投与年月：[redacted]
投与期間：妊娠 7 日～16 日
交尾成立日：妊娠 0 日
帝王切開日：妊娠 21 日
投与方法：皮下投与 a)
溶媒/投与形態：リン酸緩衝生理食塩液/溶液
試験番号：[redacted].428
CTD における資料番号：4.2.3.5.2-1
GLP 適用：適

特記事項：
予備試験として、1 群 10 例の妊娠ラットに、コンドリアーゼの 0、2、20 又は 200 U/kg/日を妊娠 7 日から 16 日まで皮下投与し、妊娠 21 日に剖検した。その結果、死亡はみられず、母動物の一般状態、体重、体重増加量、摂餌量及び剖検に異常はみられなかった。生殖能、子宮及び卵巣重量、胎児の外観にコンドリアーゼ投与の影響は認められなかった。1 群の動物数は、本試験 40 例及び追加試験 12 例の合計 52 例を供した。追加試験の動物は全例、帝王切開群に充てた。

無毒性量：F_0 雌：一般毒性及び生殖機能に関する無毒性量；200 U/kg/日
F_1 胎児：200 U/kg/日
F_1 出生児：200 U/kg/日

投与量（U/kg/日）		0（対照）	2	20	200
母体/雌動物	妊娠動物数	27＋8 b)	32＋7 b)	27＋7 b)	30＋8 b)
	トキシコキネティクス	NE	NE	NE	NE
	死亡例及び切迫屠殺動物数	0	0	0	0
	流産あるいは全胚吸収母体数	0	0	0	0
	一般状態　（本試験 / 追加試験）	- / -	- / -	- / -	- / -
	体重　（本試験 / 追加試験）	- / -	- / -	- / -	- / -
	摂餌量　（本試験 / 追加試験）	- / -	- / -	- / -	- / -

-：特記すべき所見なし　NE：実施せず
a)：臨床投与経路は椎間板内であるが、大量の反復投与ができないため、代替投与経路である皮下投与を選択した。
b)：動物数は本試験の妊娠動物数＋追加試験の妊娠動物を示す。

（続く）

2.6.7.13A ラットにおける胚・胎児発生への影響に関する試験（1）　（続き）

試験番号：[redacted].428

投与量（U/kg/日）		0（対照）	2	20	200
F_0帝王切開群	評価母体数	22	26	23	27
	剖検	-	-	-	-
	器官重量（子宮、卵巣）	-	-	-	-
	平均黄体数	14.45	14.35	14.13	13.07
	平均着床数	10.55	10.46	10.96	10.30
	平均着床前死亡率（%）	27.51	27.20	23.23	22.68
F_1胎児	評価母体数	21	26	22	25
	平均生存胎児数	10.52	9.54	10.50	9.85
	生存胎児率（%）	95	91	92	92
	平均死亡胎児数	0.00	0.00	0.09	0.04
	早期吸収胚数	10	22	16	15
	後期吸収胚数	1	2	3	6
	平均着床後死亡率（%）	8.81	7.39	11.38	14.25
	平均胎盤重量（g）				
	雄	0.421	0.425	0.427	0.434
	雌	0.405	0.432	0.407	0.429
	平均胎児体長（cm）				
	雄	3.96	4.02	3.97	4.02
	雌	3.87	3.93	3.85	3.87
	平均胎児体重（g）				
	雄	4.703	4.831	4.730	4.757
	雌	4.425	4.641	4.449	4.438
	生存雄胎児数	100	117	133*	126
	胎児の性比（%雄）	45	47	58	49

-：特記すべき所見なし

* $p<0.05$（Fisher's exact test）

（続く）

2.6.7.13A ラットにおける胚・胎児発生への影響に関する試験（1）　（続き）

試験番号：[redacted].428

投与量（U/kg/日）			0（対照）	2	20	200
F_1胎児検査	外表異常：	胎児頻度（%）	3/221 (1.4)	3/248 (1.2)	4/233 (1.7)	2/257 (0.8)
		母動物頻度（%）	3/21 (14)	3/26 (12)	4/22 (18)	2/26 (7.7)
	内臓検査：					
	奇形	胎児頻度（%）	0	0	0	0
		母動物頻度（%）	0	0	0	0
	異常	胎児頻度（%）	0	0	1/109 (0.9)	0
		母動物頻度（%）	0	0	1/22 (4.5)	0
	変異	胎児頻度（%）	4/105 (3.8)	5/119 (4.2)	5/109 (4.6)	4/121 (3.3)
		母動物頻度（%）	4/21 (19)	4/26 (15)	4/22 (18)	4/25 (16)
	骨格検査：					
	奇形	胎児頻度（%）	0	0	0	1/135 (0.7)
		母動物頻度（%）	0	0	0	1/25 (4.0)
	脊柱　側弯症	胎児頻度（%）	0	0	0	1/135 (0.7)
		母動物頻度（%）	0	0	0	1/25 (4.0)
	異常	胎児頻度（%）	0	2/129 (1.6)	1/122 (0.8)	2/135 (1.5)
		母動物頻度（%）	0	2/26 (7.7)	1/22(4.5)	2/25 (8.0)
	変異	胎児頻度（%）	7/116 (6.0)	10/129 (7.8)	8/122 (6.6)	8/135 (5.9)
		母動物頻度（%）	6/21 (29)	9/26 (35)	8/22 (36)	7/25 (28)
	骨化遅延	胎児頻度（%）	116/116 (100)	129/129 (100)	122/122 (100)	135/135 (100)
		母動物頻度（%）	21/21 (100)	26/26 (100)	22/22 (100)	25/25 (100)
	前頭骨　不完全骨化					
		胎児頻度（%）	78/116 (67)	106/129* (82)	99/122* (81)	99/135 (73)
		母動物頻度（%）	17/21 (81)	22/26 (85)	20/22 (91)	22/25 (88)
	頭頂骨　不完全骨化					
		胎児頻度（%）	77/116 (66)	106/129** (82)	99/122* (81)	97/135 (72)
		母動物頻度（%）	16/21 (76)	23/26 (88)	20/22 (91)	22/25 (88)

* $p<0.05$、** $p<0.01$（Fisher's exact test）

（続く）

2.6.7.13A ラットにおける胚・胎児発生への影響に関する試験（1）　（続き）

試験番号：[redacted].428

投与量（U/kg/日）		0（対照）	2	20	200
F_1 胎児検査	骨格検査：				
	骨化遅延				
	指骨　末節骨不完全骨化（1-5 指）				
	胎児頻度（%）	17/116 (15)	12/129(9.3)	6/122* (4.9)	15/135 (11)
	母動物頻度（%）	6/21 (29)	6/26 (23)	3/22 (14)	7/25 (28)
	指骨　基節骨未骨化（3-6 指）				
	胎児頻度（%）	16/116 (14)	24/129 (19)	27/122 (22)	36/135 *(27)
	母動物頻度（%）	11/21 (52)	14/26 (54)	15/22 (68)	19/25 (76)
	趾骨　基節骨不完全骨化（1-4 指）				
	胎児頻度（%）	67/116 (58)	68/129(53)	72/122 (59)	52/135** (39)
	母動物頻度（%）	20/21 (95)	22/26 (85)	21/22 (95)	22/25 (88)
F_0 自然分娩群	妊娠動物数	13	13	11	11
	平均妊娠期間（日）	21.77	21.77	21.91	21.82
	授乳時体重	-	-	-	-
	授乳時摂餌量	-	-	-	-
	受胎率（%）	76	76	65	65
	平均着床痕数	10.85	10.00	11.73	10.73
	剖検	-	-	-	-
F_1 出生児（離乳前）	平均出産児数	10.00	8.77	10.27	8.91
	平均生存出生児数	10.00	8.77	9.91	8.82
	総死産児数	0	0	4	1
	着床後死亡率（%）	7.47	12.69	14.62	15.70
	出生率（%）	92	88	84	82
	平均死亡出生児数	1	12**	1	0
	生後 4 日生存率（%）	99	89	99	100
	離乳率（%）	99	100	100	100

-：特記すべき所見なし

* $p<0.05$、** $p<0.01$（Fisher's exact test）

（続く）

2.6.7.13A ラットにおける胚・胎児発生への影響に関する試験（1）　（続き）

試験番号：[redacted].428

投与量（U/kg/日）			0（対照）	2	20	200
F_1 出生児（離乳前）	体重（g）	出生後 1 日	6.46	6.28	6.28	6.49
		出生後 4 日	10.13	9.83	9.96	10.52
		離乳時	48.18	45.34#	48.34	48.28
	体重増加量		-	-	-	-
	出生児性比（%雄）		53	53	50	60
	一般状態					
	生後 1 日	冷感（発現例数）	12	10	0***	0**
	生後 4 日	巨大児（発現例数）	0	0	2	12***
	発育分化 a)		-	-	-	-
	行動観察 b)		-	-	-	-
F_1 出生児（離乳後）	生殖器の発育分化 c)		-	-	-	-
	行動観察 d)		-	-	-	-
	驚愕順応性試験		-	-	-	-
	活動性試験 e)		-	-	-	-
	能動的回避試験		-	-	-	-
	一般状態		-	-	-	-
	体重		-	-	-	-
	摂餌量		-	-	-	-

-：特記すべき所見なし

** $p<0.01$、*** $p<0.001$（Fisher's exact test）　# $p<0.05$（ANOVA 及び Dunnett's test）

a)：耳介開展、毛生、切歯萌出、眼瞼開裂

b)：聴覚反応、空中立ち直り反応、疼痛反応

c)：精巣下降、膣開口

d)：瞳孔反射、回転棒試験、握力測定

e)：移動、排尿、排糞

（続く）

2.6.7.13A ラットにおける胚・胎児発生への影響に関する試験（1）　（続き）

試験番号：[redacted].428

投与量（U/kg/日）		0（対照）	2	20	200
F_1雄（生殖試験群）	動物数	12	11	11	11
	一般状態	-	-	-	-
	体重	-	-	-	-
	摂餌量	-	-	-	-
	交尾動物数（交尾率%）	8 (67)	8 (73)	9 (82)	10 (91)
	受胎動物数（受胎率%）	2 (25)	6 (75)	5 (56)	8* (80)
	剖検	-	-	-	-
	病理組織学的検査（未交尾動物、妊娠非成立動物）	-	-	-	-
F_1雌（生殖試験群）	動物数	12	11	11	11
	一般状態	-	-	-	-
	体重	-	-	-	-
	摂餌量	-	-	-	-
	平均交配所要日数（日）	1.88	3.88	2.11	1.10
	交尾動物数（交尾率%）	8 (67)	8 (73)	9 (82)	10 (91)
	受胎動物数（受胎率%）	2 (25)	6 (75)	5 (56)	8* (80)
	剖検	-	-	-	-
	病理組織学的検査（未交尾動物、不妊動物）	-	-	-	-

-：特記すべき所見なし

* $p<0.05$（Fisher's exact test）

（続く）

2.6.7.13A ラットにおける胚・胎児発生への影響に関する試験（1） （続き）

試験番号：[redacted].428

投与量（U/kg/日）		0（対照）	2	20	200
F_1 帝王切開群	動物数	2	6	5	8
	妊娠期間中の一般状態	-	-	-	-
	妊娠期間中の体重	-	-	-	-
	器官重量　子宮（g）	5.025	3.726	4.344	3.487#
	卵巣（g）	0.1260	0.1202	0.1014	0.1168
	平均黄体数	15.00	14.17	14.40	13.88
	平均着床数	13.50	11.00	13.40	11.13
	平均着床前死亡率（%）	10.00	22.46	7.17	20.12
F_2 胎児	評価母動物数	2	6	5	8
	平均生存胚数	12.50	9.83	12.60	9.25
	平均着床後死亡率（%）	6.67	9.64	6.76	17.75
	早期吸収胚数	2	7	4	13
	後期吸収胚数	0	0	0	2
	胎児生存率（%）	93	89	94	83
	平均胎盤重量（g）				
	雄	0.392	0.424	0.397	0.408
	雌	0.391	0.413	0.390	0.402
	平均胎児体長（cm）				
	雄	3.67	3.89	3.99#	3.97#
	雌	3.63	3.82	3.87	3.89
	平均胎児体重（g）				
	雄	4.189	4.348	4.494	4.566
	雌	4.121	4.216	4.356	4.324
	胎児の性比（%雄）	44	66	54	43

-：特記すべき所見なし

# $p<0.05$（ANOVA 及び Dunnett's test）

（続く）

2.6.7.13A ラットにおける胚・胎児発生への影響に関する試験（1）　（続き）

試験番号：[redacted].428

投与量（U/kg/日）			0（対照）	2	20	200
F_2胎児検査	外表異常：	胎児頻度（%）	1/25 (4.0)	3/59 (5.1)	5/63 (7.9)	2/74 (2.7)
		母動物頻度（%）	1/2 (50)	3/6 (50)	2/5 (40)	2/8 (25)
	内臓検査：					
	奇形	胎児頻度（%）	0	0	0	0
		母動物頻度（%）	0	0	0	0
	異常	胎児頻度（%）	0	1/27 (3.7)	0	1/36 (2.8)
		母動物頻度（%）	0	1/6 (17)	0	1/8 (13)
	変異	胎児頻度（%）	0	1/27 (3.7)	1/30 (3.3)	2/36 (5.6)
		母動物頻度（%）	0	1/6 (17)	1/5 (20)	1/8 (13)

2.6.7.13B　ラットにおける胚・胎児発生への影響に関する試験（2）

報告書の題名：SI-6603 のラットにおける胚･胎児発生に関する皮下投与試験－投与期間分割による追加試験

被験物質：コンドリアーゼ

試験計画：ICH 4.1.3 準拠
動物種/系統：ラット/Wistar（Crlj:WI）
試験開始週齢：9～10 週（雌）
初回投与年月：[redacted]

投与期間：妊娠 12 日～17 日
交尾成立日：妊娠 0 日
帝王切開日：妊娠 20 日
投与方法：皮下投与 a)
溶媒/投与形態：リン酸緩衝生理食塩液/溶液

試験番号：[redacted]144
CTD における資料番号：4.2.3.5.2-2
GLP 適用：適

特記事項：
コンドリアーゼのラットへの反復皮下投与により抗コンドリアーゼ抗体が産生されることから、評価すべき生殖発生過程を通して十分量のコンドリアーゼ全身曝露を得ることが同一動物では困難と考えられる。本試験では、試験 [redacted].428 において十分なコンドリアーゼ曝露ができていなかった可能性があると考えられる妊娠 12 日から 17 日まで限局して投与し、コンドリアーゼ投与の影響を評価した。

無毒性量：F_0 雌：一般毒性及び生殖機能に関する無毒性量；200 U/kg/日
F_1 胎児：200 U/kg/日

投与量（U/kg/日）		0（対照）	200
母体/雌動物	妊娠動物数	20	18
	トキシコキネティクス		
	動物数（サテライト動物数）	3	5
	濃度（mU/mL）		
	初回投与後 0.5 時間	BLQ	1.55
	初回投与後 1 時間	/	2.78
	最終投与後 0.5 時間	BLQ	0.335
	最終投与後 1 時間	/	0.583

/：該当なし　　BLQ：定量下限（[redacted]mU/mL）未満
a)：臨床投与経路は椎間板内であるが、大量の反復投与ができないため、代替投与経路である皮下投与を選択した。

（続く）

2.6.7.13B ラットにおける胚・胎児発生への影響に関する試験（2）　（続き）

試験番号：[redacted]144

投与量（U/kg/日）		0（対照）	200
母体/雌動物	妊娠動物数	20	18
	死亡例及び切迫屠殺動物数	0	0
	流産あるいは全胚吸収母体数	0	0
	一般状態	-	-
	体重	-	-
	体重増加量	-	-
	摂餌量	-	-
	剖検	-	-
	平均黄体数	16.4	16.4
	平均着床数	15.9	15.4
	平均着床前死亡率（%）	2.7	5.9
胎児	評価母体数	20	18
	平均生存胎児数	14.9	15.0
	平均早期吸収胚率（%）	0.0	0.0
	平均後期吸収胚率（%）	6.3	2.4*
	平均死亡胎児率　（%）	0.0	0.0
	平均着床後死亡率（%）	6.3	2.4*
	平均胎盤重量（g）		
	雄	0.542	0.540
	雌	0.511	0.512
	平均胎児体重（g）		
	雄	4.31	4.32
	雌	4.09	4.07
	胎児の性比（雄/雄+雌）	0.56	0.51

-：特記すべき所見なし

* $p<0.05$（Wilcoxon's rank-test）

（続く）

2.6.7.13B ラットにおける胚・胎児発生への影響に関する試験（2） （続き）

試験番号：[redacted]144

投与量（U/kg/日）			0（対照）	200
胎児検査	外表異常		-	-
	内臓異常	胎児頻度（%）	12/144 (8.3)	8/131 (6.2)
		母動物頻度（%）	7/20 (35.0)	6/18 (33.3)
	骨格観察			
	骨格異常	胎児頻度（%）	0	1[a)]/139 (0.8)
		母動物頻度（%）	0	1/18 (5.6)
	骨格変異	胎児頻度（%）	45/153 (30.3)	45/139 (33.5)
		母動物頻度（%）	18/20 (90.0)	15/18 (83.3)
	骨化数		-	-

-：特記すべき所見なし

a)：肋骨短小

2.6.7.13C　ウサギにおける胚・胎児発生への影響に関する試験（1）

報告書の題名：A reproductive and developmental toxicity study in rabbits. Study on subcutaneous administration of C-ABC during the period of organogenesis (Japanese MHW Registration Requirements : Segment II)

被験物質：コンドリアーゼ

試験計画：ICH 4.1.3 準拠せず
動物種/系統：ウサギ/New Zealand White
試験開始月齢：6 ヵ月齢
初回投与年月：[redacted]

投与期間：妊娠 6 日～18 日
交尾成立日：妊娠 0 日
帝王切開日：妊娠 29 日
投与方法：皮下投与 a)
溶媒/投与形態：リン酸緩衝生理食塩液/溶液

試験番号：[redacted].772
CTD における資料番号：4.2.3.5.2-3
GLP 適用：適

特記事項：
予備試験として、1 群 4 例の妊娠ウサギに、コンドリアーゼの 0、2、20 又は 200 U/kg/日を妊娠 6 日から 18 日まで皮下投与し、妊娠 29 日に剖検した。その結果、死亡はみられず、母動物の一般状態、体重、体重増加量、摂餌量及び剖検に異常はみられなかった。生殖能、子宮及び卵巣重量、胎児の外観にコンドリアーゼ投与の影響は認められなかった。

無毒性量：F_0 雌：一般毒性及び生殖機能に関する無毒性量；200 U/kg/日
F_1 胎児：200 U/kg/日

投与量（U/kg/日）		0（対照）	2	20	200
母体/雌動物	妊娠動物数	15	14	16	15
	トキシコキネティクス	NE	NE	NE	NE
	死亡例及び切迫屠殺動物数	0	1 b)	0	0
	流産あるいは全胚吸収母体数	0	0	0	0
	一般状態	-	-	-	-
	体重	-	-	-	-
	体重増加量（g）　妊娠 6 日-12 日	73.3	46.4	50.4	17.4
	摂餌量（%）c)　妊娠 6 日-12 日	36.2 g/kg/日	+3	+7	-16**
	剖検	-	-	-	-
	器官重量	-	-	-	-

-：特記すべき所見なし　　NE：実施せず　　** $p<0.01$（ANOVA 及び Dunnett's test）

a)：臨床投与経路は椎間板内であるが、大量の反復投与ができないため、代替投与経路である皮下投与を選択した。

b)：妊娠 20 日に切迫屠殺した。一般状態では、妊娠 17 日から全身状態の悪化、冷感、尿道周囲汚れ、トレイ上に血痕がみられた。剖検では弁膜心内膜炎、腹膜炎、盲腸と子宮の癒着、肝臓に点状壊死が認められた。

c)：対照群は平均値を示す。投与群は対照群との差を%で示す。

（続く）

2.6.7.13C ウサギにおける胚・胎児発生への影響に関する試験（1）　（続き）

試験番号：[redacted].772

投与量（U/kg/日）		0（対照）	2	20	200
母体/雌動物	平均黄体数	11.47	10.77	11.31	10.57
	平均着床数	9.27	9.46	9.75	8.43
	平均着床前死亡率（%）	19.19	11.61	12.99	19.04
胎児	評価母体数	15	13	16	14
	平均生存胎児数	7.60	8.08	9.13	7.36
	平均死亡胎児数	0.13	0.69	0.13	0.07
	早期吸収胚数	13	3	5	6
	後期吸収胚数	10	6	3	8
	平均着床後死亡率（%）	17.60	16.25	6.57	12.50
	平均胎盤重量（g）				
	雄	3.7346	3.8272	3.7355	3.9448
	雌	3.6473	3.6427	3.5426	3.9392
	平均胎児体重（g）				
	雄	43.778	43.598	40.889	44.048
	雌	43.046	43.687	40.525	44.738
	胎児の性比（%雄）	46	37	53	49
胎児検査	外表検査：　胎児頻度（%）	13/116 (11)	12/114 (11)	22/148 (15)	5/104 (4.8)
	母動物頻度（%）	6/15 (40)	6/13 (46)	7/16 (44)	4/14 (29)
	小型児　胎児頻度（%）	9 (7.8)	9 (7.9)	20 (14)	2 (1.9)
	母動物頻度（%）	4 (27)	4 (31)	5 (31)	1 (7.1)

（続く）

2.6.7.13C ウサギにおける胚・胎児発生への影響に関する試験（1）　（続き）

試験番号：[redacted].772

投与量（U/kg/日）			0（対照）	2	20	200
胎児検査	内臓検査：					
	奇形	胎児頻度（%）	1/114 (0.9)	0	3/146 (2.1)	0
		母動物頻度（%）	1/15 (6.7)	0	2/16 (13)	0
	異常	胎児頻度（%）	15/114 (13)	16/105 (15)	26/146 (18)	20/103 (19)
		母動物頻度（%）	10/15 (67)	8/12 (67)	13/16 (81)	11/14 (79)
	変異	胎児頻度（%）	31/114 (27)	31/105 (30)	16/146 ** (11)	20/103 (19)
		母動物頻度（%）	11/15 (73)	9/12 (75)	8/16 (50)	10/14 (71)
	骨格検査：					
	奇形	胎児頻度（%）	1/114 (0.9)	0	2/146 (1.4)	0
		母動物頻度（%）	1/15 (6.7)	0	2/16 (13)	0
	肋骨　奇形	胎児頻度（%）	1/114 (0.9)	0	0	0
		母動物頻度（%）	1/15 (6.7)	0	0	0
	合指症	胎児頻度（%）	1/114 (0.9)	0	0	0
		母動物頻度（%）	1/15 (6.7)	0	0	0
	肋骨癒合	胎児頻度（%）	0	0	2/146 (1.4)	0
		母動物頻度（%）	0	0	2/16 (13)	0
	異常	胎児頻度（%）	5/114 (4.4)	2/105 (1.9)	2/146 (1.4)	3/103 (2.9)
		母動物頻度（%）	4/15 (27)	2/12 (17)	2/16 (13)	3/14 (21)
	変異	胎児頻度（%）	56/114 (49)	58/105 (55)	96/146 * (66)	74/103 *** (72)
		母動物頻度（%）	12/15 (80)	12/12 (100)	16/16 (100)	14/14 (100)
	肋骨　腰肋	胎児頻度（%）	55/114 (48)	56/105 (53)	93/146 * (64)	74/103 *** (72)
		母動物頻度（%）	12/15 (80)	12/12 (100)	16/16 (100)	14/14 (100)

* $p<0.05$、** $p<0.01$、*** $p<0.001$（Fisher's exact test）

（続く）

2.6.7.13C ウサギにおける胚・胎児発生への影響に関する試験（1）　（続き）

試験番号：[redacted].772

投与量（U/kg/日）		0（対照）	2	20	200
胎児検査　骨格検査：					
骨化遅延	胎児頻度（%）	91/114 (80)	79/105 (75)	128/146 (88)	77/103 (75)
	母動物頻度（%）	14/15 (93)	11/12 (92)	16/16 (100)	14/14 (100)
胸骨分節 不完全骨化（1 ヵ所）					
	胎児頻度（%）	23/114 (20)	32/105 (30)	47/146* (32)	37/103* (36)
	母動物頻度（%）	10/15 (67)	11/12 (92)	15/16 (94)	14/14 (100)
指骨 中節骨不完全骨化（1-4 指）					
	胎児頻度（%）	21/114 (18)	20/105 (19)	37/146 (25)	24/103 (23)
	母動物頻度（%）	7/15 (47)	7/12 (58)	14/16* (88)	12/14 (86)
指骨 中節骨未骨化（3-6 指）					
	胎児頻度（%）	21/114 (18)	9/105 (8.6)	21/146 (14)	6/103** (5.8)
	母動物頻度（%）	5/15 (33)	5/12 (42)	10/16 (63)	4/14 (29)
趾骨 中節骨不完全骨化（1-4 趾）					
	胎児頻度（%）	11/114 (9.6)	7/105 (6.7)	18/146 (12)	2/103* (1.9)
	母動物頻度（%）	4/15 (27)	5/12 (42)	9/16 (56)	1/14 (7.1)
脛骨 近位骨端不完全骨化					
	胎児頻度（%）	9/114 (7.9)	8/105 (7.6)	25/146* (17)	7/103 (6.8)
	母動物頻度（%）	6/15 (40)	4/12 (33)	11/16 (69)	4/14 (29)
上腕骨 近位骨端不完全骨化					
	胎児頻度（%）	6/114 (5.3)	11/105 (10)	21/146* (14)	6/103 (5.8)
	母動物頻度（%）	5/15 (33)	6/12 (50)	9/16 (56)	6/14 (43)
上腕骨 近位骨端未骨化					
	胎児頻度（%）	16/114 (14)	19/105 (18)	40/146* (27)	15/103 (15)
	母動物頻度（%）	7/15 (47)	5/12 (42)	10/16 (63)	6/14 (43)

* $p<0.05$、** $p<0.01$（Fisher's exact test）

2.6.7.13D　ウサギにおける胚・胎児発生への影響に関する試験（2）

報告書の題名：SI-6603 のウサギにおける胚･胎児発生に関する皮下投与試験－投与期間分割による追加試験－

被験物質：コンドリアーゼ

試験計画：ICH 4.1.3 準拠
動物種/系統：ウサギ/New Zealand White
試験開始週齢：18 週齢
初回投与年月：[redacted]

投与期間：毒性試験群：妊娠 12 日～18 日
TK サテライト群：妊娠 6 日～12 日
交尾成立日：妊娠 0 日
帝王切開日：妊娠 29 日
投与方法：皮下投与 a)
溶媒/投与形態：リン酸緩衝生理食塩液/溶液

試験番号：[redacted]365
CTD における資料番号：4.2.3.5.2-4
GLP 適用：適

特記事項：
コンドリアーゼのウサギへの反復皮下投与により抗コンドリアーゼ抗体が産生されることから、評価すべき生殖発生過程を通して十分量のコンドリアーゼ全身曝露を得ることが同一動物では困難と考えられる。本試験では、試験[redacted].772 において十分なコンドリアーゼ曝露ができていなかった可能性があると考えられる妊娠 12 日から 18 日まで限局して投与し、コンドリアーゼ投与の影響を評価した。TK サテライト群では試験[redacted].772 におけるコンドリアーゼ曝露を推定するために着床から妊娠中期までの投与期間を設定し、妊娠 6 日（投与初日）にプロファイリング、妊娠 12 日（最終投与日）にモニタリングした。

無毒性量：F_0 雌：一般毒性及び生殖機能に関する無毒性量；200 U/kg/日
F_1 胎児：200 U/kg/日

投与量（U/kg/日）	0（対照）	200	200（TK サテライト群）
母体/雌動物　妊娠動物数	16	17	5
トキシコキネティクス			
動物数	3	4	4
濃度（mU/mL）			
初回投与後 0.5 時間	BLQ	5.36	1.48
初回投与後 1 時間	/	12.2	4.09
最終投与後 0.5 時間	BLQ	0.0534	0.0253
最終投与後 1 時間	/	0.102	0.0316
プロファイリング　初回投与時	/	/	C_{max} (mU/mL)：34.7 t_{max} (h)：5.0 $AUC_{0\text{-}last}$ (mU･h/mL)：105

/：該当なし　　BLQ：定量下限（[redacted]mU/mL）未満
a)：臨床投与経路は椎間板内であるが、大量の反復投与ができないため、代替投与経路である皮下投与を選択した。

（続く）

2.6.7.13D ウサギにおける胚・胎児発生への影響に関する試験（2）　（続き）

試験番号：[redacted]365

投与量（U/kg/日）		0（対照）	200
母体/雌動物	死亡例及び切迫屠殺動物数	0	0
	流産あるいは全胚吸収母体数	2	2
	一般状態	-	-
	体重	-	-
	体重増加量	-	-
	摂餌量（%）[a)] 妊娠 13 日	153 g/日	-18**
	妊娠 19 日	161 g/日	+21*
	剖検	-	-
	平均黄体数	11.2	10.9
	平均着床数	8.7	8.8
	平均着床前死亡率（%）	21.6	19.0
胎児	評価母体数	16	17
	平均生存胎児数	8.0	8.5
	平均早期吸収胚率（%）	0.0	0.0
	平均後期吸収胚率（%）	5.1	0.6#
	平均死亡胎児率　（%）	2.8	2.3
	平均着床後死亡率（%）	7.9	2.8
	平均胎盤重量（g）		
	雄	3.57	3.58
	雌	3.56	3.56
	平均胎児体重（g）		
	雄	40.2	42.0
	雌	40.1	39.6
	胎児の性比（雄/雄+雌）	0.41	0.59#

-：特記すべき所見なし

* p<0.05、** p<0.01（Student's t-test）　# p<0.05（Wilcoxon's rank-test）

a)：対照群は平均値を示す。投与群は対照群との差を%で示す。

（続く）

2.6.7.13D ウサギにおける胚・胎児発生への影響に関する試験（2）　（続き）

試験番号：[redacted]365

投与量（U/kg/日）			0（対照）	200
胎児検査	外表異常		-	-
	内臓異常	胎児頻度（%）	1/128 (1.3)	0
		母動物頻度（%）	1/16 (6.3)	0
	骨格検査			
	骨格異常	胎児頻度（%）	1/128 (0.6)	11/145* (8.3)
		母動物頻度（%）	1/16 (6.3)	6/17# (35.3)
	胸骨分節癒合 a)	胎児頻度（%）	1/128（0.6）	5/145 (3.4)
		母動物頻度（%）	1/16	4/17
	胸椎過剰	胎児頻度（%）	0	4/145　(3.4)
		母動物頻度（%）	0	1/17
	腰椎体癒合	胎児頻度（%）	0	1/145 (0.8)
		母動物頻度（%）	0	1/17
	腰椎半椎	胎児頻度（%）	0	1/145 (0.8)
		母動物頻度（%）	0	1/17
	尾椎体癒合	胎児頻度（%）	0	1/145 (0.7)
		母動物頻度（%）	0	1/17
	骨格変異	胎児頻度（%）	88/128 (65.1)	107/145 (72.9)
		母動物頻度（%）	15/16 (93.8)	17/17 (100)
	骨化数		-	-

-：特記すべき所見なし

* $p<0.05$（Wilcoxon's rank-test）　# $p<0.05$（χ-square-test, intentional）

a)：試験施設における発現率の背景値は、最高 5.0%、平均 2.1%であった。

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

報告書の題名：SI-6603 のラットにおける出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する皮下投与試験

被験物質：コンドリアーゼ

試験計画：ICH 4.1.2 準拠

動物種/系統：ラット/Wistar（Crlj:WI）
試験開始週齢：9～12 週齢
初回投与年月日：[redacted]

投与期間：妊娠 15 日～分娩後 20 日
（群毎に分割、特記事項参照）
交尾成立日：妊娠 0 日
投与方法：皮下投与 a)
溶媒/投与形態：リン酸緩衝生理食塩液/溶液
同腹児数の調整/非調整：4 匹/性/腹

試験番号：[redacted]145
CTD における資料番号：4.2.3.5.3-1
GLP 適用：適

特記事項：
コンドリアーゼのラットへの反復皮下投与により抗コンドリアーゼ抗体が産生されることから、評価すべき生殖発生過程を通して十分量のコンドリアーゼ全身曝露が同一動物では困難と考えられる。本試験では、上記の被験物質投与期間を最大 8 日間に分割した群を設け、対照群と比較することにより各投与時期におけるコンドリアーゼ投与の影響を評価した。各群の投与期間及び投与量を以下に示す。

群	投与量	投与期間
1 群	0（媒体）	妊娠 15 日～分娩後 20 日
2 群	200 U/kg/日	分娩後 0 日～7 日
3 群	200 U/kg/日	分娩後 7 日～14 日
4 群	200 U/kg/日	分娩後 14 日～20 日
5 群	200 U/kg/日	妊娠 15 日～分娩前日

無毒性量：F_0 雌：一般毒性；200 U/kg/日、生殖機能及び次世代発生に対する無毒性量；200 U/kg/日
F_1 雄：200 U/kg/日
F_1 雌：200 U/kg/日

a)：臨床投与経路は椎間板内であるが、大量の反復投与ができないため、代替投与経路である皮下投与を選択した。

（続く）

2.6.7.14 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 （続き）

試験番号：[redacted]145

投与量（U/kg/日）		0（対照）	200	200	200	200
投与期間		妊娠 15 日～分娩後 20 日	分娩後 0 日～7 日	分娩後 7 日～14 日	分娩後 14 日～20 日	妊娠 15 日～分娩前日
F_0 雌	妊娠動物数	22	22	22	22	22
	トキシコキネティクス					
	動物数（サテライト動物数）	3	5	5	5	5
	濃度（mU/mL）					
	初回投与後 0.5 時間	BLQ	3.41	1.49	0.666	1.67
	初回投与後 1 時間	/	2.17	1.92	0.976	2.79
	最終投与後 0.5 時間	BLQ	0.343	0.800	0.626	1.15
	最終投与後 1 時間	/	0.242	0.738	0.539	1.49
	死亡例及び切迫屠殺動物数	0	0	0	0	0
	流産あるいは全胚吸収母体数	0	0	0	0	0
	妊娠時体重	-	-	-	-	-
	哺育時体重	-	-	-	-	-
	妊娠時体重増加量	-	-	-	-	-
	哺育時体重増加量	-	-	-	-	-
	妊娠時摂餌量	-	-	-	-	-
	哺育時摂餌量	-	-	-	-	-
	一般状態	-	-	-	-	-
	剖検	-	-	-	-	-
	平均妊娠期間（日）	22.2	22.0	22.0	22.0*	22.0
	分娩動物数（分娩率%） a)	22 (100.0)	22 (100.0)	22 (100.0)	22 (100.0)	22 (100.0)

-：特記すべき所見なし　/：該当なし　BLQ：定量下限（[redacted]mU/mL）未満

* $p<0.05$（Wilcoxon's rank-test）

a)：分娩率＝（生存出生児を持つ母動物数/出産動物数）×100

（続く）

2.6.7.14 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 （続き）

試験番号：[redacted]145

投与量（U/kg/日）		0（対照）	200	200	200	200
投与期間		妊娠 15 日～分娩後 20 日	分娩後 0 日～7 日	分娩後 7 日～14 日	分娩後 14 日～20 日	妊娠 15 日～分娩前日
F_1 出生時	評価母動物数	22	22	22	22	22
	平均着床痕数	14.9	15.5	16.0	15.8	15.1
	平均出産児数	14.0	14.0	15.4*	15.0	14.0
	出産率（%）a)	94.2	90.1	96.3	93.7	92.8
	平均生存出生児数	13.7	13.0	15.0*	14.8	13.6
	出生率（%）b)	92.4	84.1	94.4	92.5	90.8
	総死亡出生児数	7	22	7	4	7
	出生時体重（g）					
	雄	6.48	6.43	6.27	6.30	6.44
	雌	6.19	6.06	5.98	5.95	6.07
	出生児の性比（雄%）	50.4	46.6	52.1	52.3	50.4
	外表異常数（%）	0	0	0	3 c) (0.9)	0
F_1 哺育時	一般状態	-	-	-	-	-
	体重（g） 生後 18 日					
	雄	42.9	43.4	43.1	44.7*	44.1
	雌	41.5	41.1	41.7	42.5	42.0
	生後 4 日生存率（%）	99.3	89.9	98.0	94.6	93.2
	離乳率（%）	98.9	100.0	100.0	100.0	100.0

-：特記すべき所見なし

* $p<0.05$（Student's t-test 又は Aspin-Welch's t-test）

a)：出産率＝（出産児数/着床数）×100、母動物平均

b)：出生率＝（出生児数/着床率）×100、母動物平均

c)：局所性浮腫及び異常回転足がみられた。

（続く）

2.6.7.14 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 （続き）

試験番号：[redacted]145

投与量（U/kg/日）		0（対照）	200	200	200	200
投与期間		妊娠 15 日～分娩後 20 日	分娩後 0 日～7 日	分娩後 7 日～14 日	分娩後 14 日～20 日	妊娠 15 日～分娩前日
F_1 哺育時	発育分化					
	毛生，切歯萌出，眼瞼開裂	-	-	-	-	-
	耳介開展　生後 2 日　雄	75.9	69.1	56.8	52.7#	55.5
	（発現率）　雌	79.7	73.5	67.5	54.4#	61.9
	初期行動 a)	-	-	-	-	-
	剖検	-	-	-	-	-
F_1 哺育後	一般状態	-	-	-	-	
	体重	-	-	-	-	-
	行動観察					
	感覚機能 b)	-	-	-	-	-
	オープンフィールドテスト					
	移動区画数　雄　1 日目 / 2 日目	50.1 / 52.9	44.3 / 48.5	51.6 / 42.8	47.8 / 38.0*	50.7 / 36.7*
	雌　1 日目 / 2 日目	63.3 / 71.0	62.3 / 73.5	59.1 / 62.3	62.6 / 58.0	60.3 / 65.8
	排尿回数　雄　1 日目 / 2 日目	0.1 / 0.2	0.3 / 0.2	0.1 / 0.4	0.2 / 0.0*	0.3 / 0.2
	雌　1 日目 / 2 日目	0.2 / 0.2	0.3 / 0.1	0.2 / 0.3	0.6 / 0.4	0.1 / 0.2
	条件回避学習能（シャトルボックス）					
	回避率 0-10 分　雄　1 日目 / 2 日目	2 / 34	7 / 35	7 / 36	7* / 27	6 / 30
	雌　1 日目 / 2 日目	8 / 30	13 / 35	11 / 43	15 / 49*	16* / 33
	剖検（10 週齢）	-	-	-	-	-

-：特記すべき所見なし

* $p<0.05$（Student's t-test 又は Aspin-Welch's t-test）　# $p<0.05$（Wilcoxon's rank-test）

a)：背面立ち直り、負の走地性

b)：視覚性置き直し反応、瞳孔反射、耳介反射、疼痛反射

（続く）

2.6.7.14 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 （続き）

試験番号：[redacted]145

投与量（U/kg/日）		0（対照）	200	200	200	200
投与期間		妊娠 15 日 ～分娩後 20 日	分娩後 0 日～7 日	分娩後 7 日～14 日	分娩後 14 日 ～20 日	妊娠 15 日 ～分娩前日
F_1 哺育後	生殖機能					
	生殖器の発育分化 [a)]	-	-	-	-	-
	交尾能及び受胎能					
	交尾動物数（交尾率%）	22 (100)	20 (100)	22 (100)	20 (95.2)	21 (100)
	受胎動物数（受胎率%）	22 (100)	20 (100)	22 (100)	20 (100)	21 (100)
	剖検（交尾確認後の雄）	-	-	-	-	-
F_1 雌	動物数	22	20	22	20	21
	妊娠期間中の一般状態	-	-	-	-	-
	妊娠期間中の体重	-	-	-	-	-
	剖検	-	-	-	-	-
	平均黄体数	15.7	16.0	16.0	15.8	15.7
	平均着床数	14.8	15.6	14.8	14.6	15.0
	平均着床前死亡率（%）	5.4	2.2	7.4	7.7	4.4
F_2 胚	評価母動物数	22	20	22	20	21
	平均生存胚数	14.0	14.9	13.9	13.9	14.2
	平均着床後死亡率（%）	5.5	4.6	5.5	4.8	5.2
	平均早期吸収胚率（%）	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	平均後期吸収胚率（%）	5.3	4.3	4.3	4.8	5.2
	平均死亡胚率 （%）	0.3	0.3	1.3	0.0	0.0

-：特記すべき所見なし

a)：雄の包皮分離、雌の膣開口

2.6.7.15 新生児を用いた試験

該当なし。

2.6.7.16　局所刺激性試験

被験物質：コンドリアーゼ製剤

動物種/系統	投与方法（溶媒/投与形態）	投与期間	投与物質	投与容量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	試験番号（資料番号）
ウサギ/日本白色種	椎間板内（コンドリアーゼ製剤溶解液[a]/溶液）	単回	コンドリアーゼ製剤（力価：7.5 U/mL）[b] プラセボ製剤[c] コンドリアーゼ製剤溶解液[a]	10 µL/disc	M：12[d]	コンドリアーゼ製剤群の投与後2及び7日に椎間板内の髄核細胞の増加、集簇及び空胞化、髄核基質の硝子化がみられた。投与後7日では、特に高度の変化が認められた例で、髄核細胞の消失がみられた。 髄核以外の周辺組織（線維輪、軟骨終板、椎体及び椎間板周囲組織）に変化はみられなかった。 プラセボ製剤群及びコンドリアーゼ製剤溶解液群では変化は認められなかった。	[redacted]-3409（4.2.3.6-6）
ウサギ/日本白色種	椎間板内（生理食塩液/溶液）	単回	コンドリアーゼ製剤（力価：10 U/mL）[e] プラセボ製剤[c] 生理食塩液	10 µL/disc	M：12[d]	コンドリアーゼ製剤群の投与後2及び7日に椎間板内の髄核細胞の増加、集簇及び空胞化、髄核基質の硝子化がみられた。投与後7日ではさらに髄核細胞の萎縮と変性がみられた。 髄核以外の周辺組織（線維輪、軟骨終板、椎体及び椎間板周囲組織）には変化は認められなかった。 プラセボ製剤群及び生理食塩液群では変化は認められなかった。	[redacted]-3130（4.2.3.6-3）

M：雄
a)：コンドリアーゼ製剤 30 U/vial の溶解液
b)：被験物質はコンドリアーゼ製剤 30 U/vial を用いて調製した。
c)：有効成分であるコンドリアーゼを含まないこと以外、被験物質と同一処方。
d)：投与後 2 及び 7 日に 6 例ずつ剖検した。
e)：被験物質はコンドリアーゼ製剤 10 U/vial を用いて調製した。

（続く）

2.6.7.16 局所刺激性試験 （続き）

被験物質：コンドリアーゼ製剤

動物種/系統	投与方法（溶媒/投与形態）	投与期間	投与物質	投与容量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	試験番号（資料番号）
ウサギ/日本白色種	椎間板内（生理食塩液/溶液）	単回	コンドリアーゼ製剤（力価：20 U/mL）[a)] プラセボ製剤[b)] PBS	10 µL/disc	M：12[c)]	コンドリアーゼ製剤群の投与後 2 及び 7 日に髄核細胞の肥大、集簇及び空胞化がみられ、投与後 7 日では 1 例に軟骨細胞の萎縮と変性、細胞間基質の硝子化がみられた。 プラセボ製剤群及び PBS 群では変化は認められなかった。	[redacted]-3794（4.2.3.6-2）
ウサギ/日本白色種	髄腔内（コンドリアーゼ製剤溶解液[d)]/溶液）	単回	コンドリアーゼ製剤（力価：7.5 U/mL）[e)] コンドリアーゼ製剤溶解液[d)] プラセボ製剤[b)]	1 mL/site	M：12[c)]	投与部位の髄膜において、投与後 2 日にコンドリアーゼ製剤群で単核細胞浸潤、投与後 7 日にコンドリアーゼ製剤溶解液群及びプラセボ製剤群で線維化が軽度にみられたが、それ以外に変化は認められなかった。投与部位の脊髄、胸椎の脊髄及び髄腔内並びに脳及び延髄においては、各群ともに、投与後 2 及び 7 日ともに変化は認められなかった。	[redacted]-3408（4.2.3.6-7）

M：雄　　PBS：リン酸緩衝生理食塩液
a)：被験物質はコンドリアーゼ製剤 40 U/vial を用いて調製した。
b)：有効成分であるコンドリアーゼを含まないこと以外、被験物質と同一処方。
c)：投与後 2 及び 7 日に 6 例ずつ剖検した。
d)：コンドリアーゼ製剤 30 U/vial の溶解液
e)：被験物質はコンドリアーゼ製剤 30 U/vial を用いて調製した。

（続く）

2.6.7.16 局所刺激性試験 （続き）

被験物質：コンドリアーゼ製剤

動物種/系統	投与方法（溶媒/投与形態）	投与期間	投与物質	投与容量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	試験番号（資料番号）
ウサギ/日本白色種	髄腔内（生理食塩液/溶液）	単回	コンドリアーゼ製剤（力価：10 U/mL）[a] プラセボ製剤[b] 生理食塩液	1 mL/site	M：12[c]	投与部位の髄膜において、投与後2日にコンドリアーゼ製剤群及び生理食塩液群で単核細胞浸潤、全群で出血が軽度にみられた。投与後7日にコンドリアーゼ製剤群及びプラセボ製剤群で線維化、生理食塩液群で局所性の軟骨増殖が軽度にみられたが、それ以外に変化は認められなかった。投与部位の脊髄、胸椎の脊髄及び髄腔内並びに脳及び延髄においては、各群ともに、投与後2及び7日ともに変化は認められなかった。	[redacted]-3131（4.2.3.6-4）
ウサギ/日本白色種	髄腔内（生理食塩液/溶液）	単回	コンドリアーゼ製剤（力価：20 U/mL）[d] プラセボ製剤[b] PBS	1 mL/site	M：12[c]	コンドリアーゼ製剤群の投与後2及び7日ともに、脊髄及び髄膜に変化は認められなかった。 プラセボ製剤群及びPBS群も変化は認められなかった。	[redacted]-3794（4.2.3.6-2）

M：雄　　PBS：リン酸緩衝生理食塩液

a)：被験物質はコンドリアーゼ製剤10 U/vialを用いて調製した。

b)：有効成分であるコンドリアーゼを含まないこと以外、被験物質と同一処方。

c)：投与後2及び7日に6例ずつ剖検した。

d)：被験物質はコンドリアーゼ製剤40 U/vialを用いて調製した。

（続く）

2.6.7.16 局所刺激性試験 （続き）

被験物質：コンドリアーゼ製剤

動物種/系統	投与方法（溶媒/投与形態）	投与期間	投与物質	投与容量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	試験番号（資料番号）
ウサギ/日本白色種	筋肉内（コンドリアーゼ製剤溶解液 a) /溶液）	単回	コンドリアーゼ製剤（力価：7.5 U/mL） b) プラセボ製剤 c) コンドリアーゼ製剤溶解液 a) 0.75 v/v%酢酸 d)	1 mL/site	M：12 e) M：6 f)	投与後 2 日では、全群でマクロファージ浸潤、筋肉線維の変性及び壊死、出血及び水腫がみられ、コンドリアーゼ製剤溶解液群を除く全群で好中球浸潤がみられた。投与後 7 日では、コンドリアーゼ製剤群及びプラセボ製剤群において、投与後 2 日にみられた変化は軽度となり、これらの変化に加えて、石灰沈着、線維化及び筋肉線維の再生がみられた。コンドリアーゼ製剤溶解液群では変化は認められなかった。 コンドリアーゼ製剤、プラセボ製剤で刺激性に差はなく、両群の刺激性はコンドリアーゼ製剤溶解液より強く、0.75 v/v%酢酸より弱かった。	[redacted]-3410（4.2.3.6-8）

M：雄　　PBS：リン酸緩衝生理食塩液
a)：コンドリアーゼ製剤 30 U/vial の溶解液
b)：被験物質はコンドリアーゼ製剤 30 U/vial を用いて調製した。
c)：有効成分であるコンドリアーゼを含まないこと以外、被験物質と同一処方。
d)：陽性対照物質
e)：投与後 2 及び 7 日に 6 例ずつ剖検した。
f)：0.75 v/v%酢酸群のみ 1 群 6 例とし、投与後 2 及び 7 日に 3 例ずつ剖検した。

（続く）

2.6.7.16 局所刺激性試験 （続き）

被験物質：コンドリアーゼ製剤

動物種/系統	投与方法（溶媒/投与形態）	投与期間	投与物質	投与容量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	試験番号（資料番号）
ウサギ/日本白色種	筋肉内（生理食塩液/溶液）	単回	コンドリアーゼ製剤（力価：10 U/mL）[a)] プラセボ製剤[b)] 生理食塩液 0.75 v/v%酢酸[c)]	1 mL/site	M：12[d)] M：6[e)]	投与後 2 日の生理食塩液群ではマクロファージ浸潤及び筋肉線維の壊死がみられた。コンドリアーゼ製剤群、プラセボ製剤群及び 0.75 v/v%酢酸群ではマクロファージ浸潤、筋肉線維の壊死、出血及び水腫がみられた。 投与後 7 日の生理食塩液群では筋肉線維の再生、コンドリアーゼ製剤群及びプラセボ製剤群では線維化あるいは筋肉線維の再生がみられた。0.75 v/v%酢酸群ではマクロファージ及びリンパ球浸潤、線維化、出血及び石灰沈着及び筋肉線維の再生がみられた。コンドリアーゼ製剤とプラセボ製剤の刺激性に明確な差はなかった。両群の刺激性は生理食塩液より強く、0.75 v/v%酢酸より弱かった。	[redacted]-3132（4.2.3.6-5）

M：雄
a)：被験物質はコンドリアーゼ製剤 10 U/vial を用いて調製した。
b)：有効成分であるコンドリアーゼを含まないこと以外、被験物質と同一処方。
c)：陽性対照物質
d)：投与後 2 及び 7 日に 6 例ずつ剖検した。
e)：0.75 v/v%酢酸群のみ 1 群 6 例とし、投与後 2 及び 7 日に 3 例ずつ剖検した。

（続く）

2.6.7.16 局所刺激性試験 （続き）

被験物質：コンドリアーゼ製剤

動物種/系統	投与方法（溶媒/投与形態）	投与期間	投与物質	投与容量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	試験番号（資料番号）
ウサギ/日本白色種	筋肉内（生理食塩液/溶液）	単回	コンドリアーゼ製剤（力価：20 U/mL）[a)] プラセボ製剤[b)] PBS 0.75 v/v%酢酸[c)]	1 mL/site	M：12[d)] M：2[e)]	投与後 2 日の PBS 群で軽度の出血、0.75 v/v%酢酸群では高度の出血及び軽微から中等度の淡白褐色化がみられた。プラセボ製剤群では軽微な出血、コンドリアーゼ製剤群では軽微な出血及び中等度の退色化がみられた。 投与後 7 日の PBS 群、プラセボ製剤群及びコンドリアーゼ製剤群では全例に変化はなく、0.75 v/v%酢酸群では全例に軽微あるいは軽度の出血と軽度から中等度の淡黄褐色化がみられた。	[redacted]-3794（4.2.3.6-2）

M：雄　　PBS：リン酸緩衝生理食塩液

a)：被験物質はコンドリアーゼ製剤 40 U/vial を用いて調製した。

b)：有効成分であるコンドリアーゼを含まないこと以外、被験物質と同一処方。

c)：陽性対照物質

d)：投与後 2 及び 7 日に 6 例ずつ剖検した。

e)：0.75 v/v%酢酸群のみ 1 群 2 例とした。

（続く）

2.6.7.16 局所刺激性試験 （続き）

被験物質：コンドリアーゼ製剤

動物種/系統	投与方法（溶媒/投与形態）	投与期間	投与物質	投与容量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	試験番号（資料番号）
ウサギ/NZW	椎間板内（PBS/溶液）	単回	コンドリアーゼ製剤（200 U/mL）[a)] PBS 生理食塩液 キモパパイン（800 pkatU/mL）[b)]	10 µL/disc	F：4 [c)]	コンドリアーゼ製剤群では投与後 2 日に髄核細胞の変性（核消失）、好酸性の消失及び空胞化がみられた。投与後 7 日では髄核細胞の好酸性の消失はみられなかったが、髄核細胞の増加及び髄核細胞の点在がみられ、線維輪では変性及び壊死がみられた。 キモパパイン群では投与後 2 及び 7 日に髄核細胞のサイズ減少、好酸性の消失及び髄核細胞の点在、線維輪では重度の変性及び壊死がみられた。 PBS 群では投与後 2 及び 7 日に髄核細胞の変性（核消失）がみられた。生理食塩液群では投与後 2 日に髄核細胞の変性（核消失）がみられた。	[redacted].263（4.2.3.6-1）

NZW：New Zealand White　　F：雌　　PBS：リン酸緩衝生理食塩液

a)：被験物質は 200 U/mL の溶液製剤を使用。

b)：比較対照物質

c)：投与後 2 及び 7 日に 2 例ずつ剖検した。

（続く）

2.6.7.16 局所刺激性試験 （続き）

被験物質：コンドリアーゼ製剤

動物種/系統	投与方法（溶媒/投与形態）	投与期間	投与物質	投与容量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	試験番号（資料番号）
ウサギ/NZW	髄腔内 a)（PBS/溶液）	単回	コンドリアーゼ製剤（200 U/mL） b) PBS 生理食塩液 キモパパイン（800 pkatU/mL） c)	1 mL/site	F：12 d) F：6 d)	コンドリアーゼ製剤群では投与後 2 及び 7 日に髄膜の出血が軽度にみられた。キモパパイン群では 2 例が死亡した。死亡例では髄膜の出血が中等度から重度にみられ、1 例で髄膜炎がみられた。生存例 4 例は投与後 2 日に剖検した。生存例では変化は認められなかった。 PBS 群では投与後 2 及び 7 日に髄膜の出血が軽微から軽度にみられた。 生理食塩液群では投与後 7 日に髄膜の出血が軽微にみられた。 脊髄にはいずれの群にも変化は認められなかった。	[redacted].263（4.2.3.6-1）

NZW：New Zealand White　　F：雌　　PBS：リン酸緩衝生理食塩液

a)：第 7 腰椎と仙骨の付近の脊髄くも膜下腔に投与した。

b)：被験物質は 200 U/mL の溶液製剤を使用。

c)：比較対照物質

d)：投与後 2 及び 7 日に 6 例ずつ剖検した。キモパパイン群は投与後 2 日に 6 例を剖検した。

（続く）

2.6.7.16 局所刺激性試験 （続き）

被験物質：コンドリアーゼ製剤

動物種/系統	投与方法（溶媒/投与形態）	投与期間	投与物質	投与容量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	試験番号（資料番号）
ウサギ/NZW	脊髄神経根 a)（PBS/溶液）	単回	コンドリアーゼ製剤（200 U/mL） b) PBS c) 生理食塩液 キモパパイン（800 pkatU/mL） d)	0.25 mL/site	F：6 e) F：3 e)	投与後 2 及び 7 日で、いずれの投与群でも特記すべき変化は認められなかった。	[redacted].263（4.2.3.6-1）
	筋肉内（PBS/溶液）	単回	コンドリアーゼ製剤（200 U/mL） b) PBS c) 生理食塩液 0.75 v/v%酢酸 f)	1 mL/site	F：6 g)	生理食塩液群及びコンドリアーゼ製剤群では投与後 2 日に軽微な出血、変性、壊死及び炎症性細胞の浸潤がみられた。投与後 7 日では変性、炎症性細胞の浸潤、鉱質化及び筋線維の好塩基性化がみられた。 PBS 群では投与後 2 日に軽微な出血、壊死及び炎症性細胞の浸潤がみられ、投与後 7 日では変性のみがみられた。 0.75 v/v%酢酸群では投与後 2 日に軽度から中等度な出血、軽微な変性、重度な壊死及び軽度な炎症性細胞の浸潤がみられ、投与後 7 日にはこれらの変化がより強くみられ、さらに鉱質化がみられた。	

NZW：New Zealand White　　F：雌　　PBS：リン酸緩衝生理食塩液
a)：左の L5/L6、右の L3/L4 の計 2 箇所の椎間孔付近の神経根へ投与した。
b)：被験物質は 200 U/mL の溶液製剤を使用。
c)：コンドリアーゼの溶媒
d)：比較対照物質
e)：投与後 2 及び 7 日に 3 例ずつ剖検した。キモパパイン群では投与後 2 日に 3 例を剖検した。
f)：陽性対照物質
g)：投与後 2 及び 7 日に 3 例ずつ剖検した。

（続く）

2.6.7.16 局所刺激性試験 （続き）

被験物質：コンドリアーゼ製剤

動物種 /系統	投与方法 （溶媒/投与形態）	投与期間	投与量	性別及び 動物数/群	特記すべき所見	試験番号 （資料番号）
モルモット /Hartley	皮内投与 （生理食塩液/溶液）	単回	0.5, 4, 8 U/site [a)]	M：6	肉眼的観察では、いずれの投与部位にも、皮膚刺激性の指標となる紅斑、浮腫等はみられなかった。いずれの用量においてもコンドリアーゼ製剤投与部位に、刺入部位を中心とした白色変化が投与後 30 分以内にみられ、投与後 72 時間まで全例にみられた。白色変化の範囲は用量の増加及び時間経過とともに拡大した。 皮膚の白色変化部位は、ヘマトキシリン・エオジン染色及び特殊染色では異常所見はみられなかったが、抗プロテオグリカン ΔDi-4S 抗体 2-B-6 を用いた免疫組織染色では、陽性反応が認められた。	[redacted]057 （4.2.3.6-9）

M：雄

a)：製剤であるコンドリアーゼ 5 U 注又はコンドリアーゼ 40 U 注を用いて調製した。

（続く）

2.6.7.16 局所刺激性試験 （続き）

被験物質：コンドリアーゼ製剤

動物種/系統	投与方法（溶媒/投与形態）	投与期間	投与量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	試験番号（資料番号）
モルモット/Hartley	皮内投与 a) ①注射針法 ②プリックランセット法 （生理食塩液/溶液）	単回	①注射針法 0.05, 0.1, 0.5,8 U/site b) ②プリックランセット法 0.03, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4 U/site b)	M：6 c)	① 注射針法 いずれの用量においてもコンドリアーゼ製剤の注射部位に白色変化がみられ、投与後 7 日まで拡大した。投与後 10 日以降は縮小したが、観察終了時（投与後 16 日）まで消失しなかった。ヘマトキシリン･エオジン染色ではいずれの投与でも異常所見はみらなかった。免疫組織染色では、いずれの用量においても抗プロテオグリカン ΔDi-4S 抗体 2-B-6 の陽性反応が認められた。 ② プリックランセット法 コンドリアーゼ製剤の 0.03 及び 0.3 U/site では皮膚に変化は認められなかった。0.6、1.2 及び 2.4 U/site では投与後 7 日又は 72 時間以降に投与部位に白色変化が認められたが、投与後 10 又は 16 日には消失した。ヘマトキシリン･エオジン染色では、いずれの用量においても異常所見は認めらなかった。免疫組織染色では、いずれの用量においても、抗プロテオグリカン ΔDi-4S 抗体 2-B-6 の陽性反応が認められた。	[redacted]078 (4.2.3.6-10)

M：雄

a)：動物の左側腹部皮内に注射針法（0.1 mL/site）で投与、右側腹部皮内にプリックランセット法（皮膚上に検査溶液 0.03 mL/site に滴下し、プリックランセットを用いて皮膚を 1 回穿刺）で投与。

b)：製剤であるコンドリアーゼ 5 U 注又はコンドリアーゼ 40 U 注を用いて調製した。

c)：投与後 7 日までは 6 例、投与後 10、14 及び 16 日は 3 例ずつ剖検した。

2.6.7.17　その他の毒性試験

抗原性試験

被験物質：コンドリアーゼ

動物種/系統	投与方法（溶媒/投与形態）	投与期間	投与量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	試験番号（資料番号）
モルモット/Hartley	感作：腹腔内（PBS/溶液） 惹起：静脈内（PBS/溶液）	感作：1日おきに3回	感作：3, 30, 300 U/kg, 0.1 mL/animal（陽性対照：ウマ血清） 惹起抗原：300 U/kg, 0.2 mL/animal（陽性対照：ウマ血清）	M：10	ASA 試験 3 U/kg 群では 3 例にアナフィラキシー症状が発現し、その内 1 例が死亡した。 30 及び 300 U/kg 群、ウマ血清群では惹起を行った全 4 例に重篤なアナフィラキシー症状が発現し、いずれの群においても、その内 2 例が投与後 10 分以内に死亡した [a]。	[redacted].077（4.2.3.7.1-1）
	惹起投与：静脈内（-/溶液）	-	惹起抗原：2500 U/kg, 0.2 mL/animal（陽性対照：ウマ血清）	M：5 [b]	PCA 試験 3 U/kg 群では皮膚反応は認められず、陰性であった。 30 及び 300 U/kg 群、ウマ血清群では皮膚反応が 5 例中 5 例に認められた。	[redacted].144（4.2.3.7.1-2）
	赤血球感作：（PBS）	-	感作赤血球：濃度：1 mg/mL	M：5 [b]	PHA 試験 3 U/kg 群では赤血球凝集反応は認められず、陰性であった。 30 及び 300 U/kg 群、ウマ血清群では強い赤血球凝集反応が認められた。	[redacted].319（4.2.3.7.1-3）

-：該当なし　M：雄　PBS：リン酸緩衝生理食塩液
ASA 試験：能動的全身性アナフィラキシー試験　PCA 試験：受身皮膚アナフィラキシー試験　PHA 試験：受身赤血球凝集試験
a)：4 例中 4 例にアナフィラキシー反応が認められ、各群 2 例が死亡したため、動物倫理上の観点から残りの動物の惹起は中止した。
b)：試験番号 [redacted]077 で免疫感作した動物の 5 例から採取した血清を用いた。

（続く）

2.6.7.17 その他の毒性試験 （続き）

不純物の毒性試験

被験物質： **不純物A***

試験の種類	動物種/系統	投与方法（溶媒/投与形態）	投与期間	投与量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	試験番号（資料番号）
単回投与毒性試験	ラット/Wistar	皮下（PBS/溶液）	単回	6 mg/kg	M：5 F：5	一般状態及び剖検に **不純物A*** 投与の影響はみられなかった。 概略の致死量は雌雄ともに 6 mg/kg を超える用量であった。	[redacted]020（4.2.3.7.6-1）
反復投与毒性試験	ラット/Wistar	皮下（PBS/溶液）	28 日間	0.04, 0.15, 0.6 mg/kg	M：10 F：10	摂餌量では、0.6 mg/kg 群の雌で対照群と比較して投与 14、25 及び 28 日に有意な高値がみられた。尿検査では、0.15 mg/kg 群の雌で比重の有意な低値がみられた。血液学的検査では、0.6 mg/kg 群の雄で白血球数の有意な低値、0.15 mg/kg 群の雌で血小板数の有意な高値と活性化部分トロンボプラスチン時間の有意な短縮が認められた。血液生化学検査では、0.6 mg/kg 群の雄で α_2-グロブリン分画比の高値並びにグルコース及びトリグリセリドの低値がみられた。 **不純物A*** の 0.6 mg/kg/日の投与により、雄で α_2-グロブリン分画比の高値並びに白血球数、グルコース及びトリグリセリドの低値がみられたが、雌では同様の変化が認められなかったことから **不純物A*** の無毒性量は雄で 0.15 mg/kg/日、雌で 0.6 mg/kg/日と判断した。	[redacted]021（4.2.3.7.6-2）

M：雄　F：雌　　PBS：リン酸緩衝生理食塩液

（続く）

2.6.7.17 その他の毒性試験 （続き）

不純物の毒性試験

被験物質： **不純物**A*

試験の種類	動物種/系統	投与方法	投与期間	投与量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	試験番号（資料番号）
遺伝毒性試験	*S. typhimurium* *E.coli*	in vitro	-	16.9, 33.8, 67.5, 135, 270, 540 µg/plate	-	S9mix による代謝活性化の有無に関わらず **不純物**A* のいずれの濃度、いずれの試験菌株においても復帰変異コロニー数の増加はみられず、遺伝子突然変異誘発性は認められなかった。	[redacted]018（4.2.3.7.6-3）
	CHL/IU 細胞	in vitro	-	67.5, 135, 270 µg/mL	-	S9mix による代謝活性化の有無に関わらず **不純物**A* のいずれの濃度においても染色体異常を有する細胞の増加はみられず、染色体異常誘発性は認められなかった。	[redacted]019（4.2.3.7.6-4）

-：該当なし

（続く）

***新薬承認情報提供時に置き換えた**

2.6.7.17 その他の毒性試験 （続き）

長期保存原薬の局所刺激性試験

被験物質：コンドリアーゼ

動物種/系統	投与方法（溶媒/投与形態）	投与期間	投与物質	投与容量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	試験番号（資料番号）
ウサギ/日本白色種	椎間板内（PBS/溶液）	単回	コンドリアーゼ [a)] （Lot BC017P01, 200 U/mL） （Lot BC069P01, 200 U/mL） （Lot BC-Test03P01, 200 U/mL） PBS	10 µL/disc	M：12 [b)]	コンドリアーゼ投与群では投与後 2 日に髄核細胞数の増加及び減少、髄核細胞の集簇、空胞化、変性及び壊死、小型髄核細胞数の増加、髄核基質の濃縮及び硝子化、髄核の小型化、線維輪では限局性の変性及び壊死、髄核側への突出及び微小出血がみられた。投与後 7 日では、投与後 2 日とほぼ同じ変化が認められた。髄核細胞の空胞化はやや軽減したが、髄核基質の濃縮及び硝子化、小型髄核細胞数の増加、線維輪の限局性の変性及び壊死についてはやや重篤化した。さらに、二次骨化中心起源の椎体（軟骨終板と成長板の間）の骨及び骨髄に骨髄細胞成分の減少、間質細胞ないし線維成分の増加、活性化骨芽細胞の増加及び骨形成がみられ、この変化は投与後 2 日では明瞭でなかったが、投与後 7 日では比較的顕著であった。 いずれの原薬ロットにおいても椎間板の髄核及び線維輪に対する刺激性が認められたが、椎間板及び椎間板周囲の椎体組織に刺激性は認められなかった。また、局所刺激性の質と程度に原薬ロット間の差はなく、コンドリアーゼ原薬の長期保存による局所刺激性に違いはなかった。	[redacted]0133G（4.2.3.7.6-5） [redacted]283PG（4.2.3.7.6-6）

M：雄　　PBS：リン酸緩衝生理食塩液

a)：コンドリアーゼ原薬 3 ロット（Lot BC017P01：保存期間 16 年, 不純物C* 含量 [redacted]%、Lot BC069P01：同 3 年, 同 [redacted]%、Lot BC-Test03P01：同 2 箇月, 同 [redacted]%）を用いた。　b)：投与後 2 及び 7 日に 6 例ずつ剖検した。

（続く）

*新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.7.17 その他の毒性試験 （続き）

原薬製法変更に伴う同等性試験

被験物質：コンドリアーゼ

動物種 /系統	投与方法 （溶媒/投与形態）	投与量	性別及び 動物数/群	最大 非致死量	概略の 致死量	特記すべき所見	試験番号 （資料番号）
ラット/SD	皮下（PBS/溶液）	2000 U/kg	M：5 F：5	2000 U/kg	>2000 U/kg	特記すべき所見なし	[redacted]-2157 （4.2.3.7.7-1）
	皮下（PBS/溶液）	2000 U/kg	M：5 F：5	2000 U/kg	>2000 U/kg	特記すべき所見なし	[redacted]017 （4.2.3.7.7-2）

M：雄　F：雌　　PBS：リン酸緩衝生理食塩液

（続く）

2.6.7.17 その他の毒性試験 （続き）

添加物の局所刺激性試験

被験物質：マクロゴール 4000

動物種/系統	投与方法（溶媒/投与形態）	投与期間	投与量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	試験番号（資料番号）
ウサギ/日本白色種	椎間板内（生理食塩液/溶液）	単回	10 mg/mL、10 µL/disc	M：6 a)	椎間板及び周囲組織に対する刺激性は認められなかった。	[redacted]-3320(1)（4.2.3.7.7-3）

M：雄
a)：投与後 2 及び 7 日に 3 例ずつ剖検した。

被験物質：精製白糖

動物種/系統	投与方法（溶媒/投与形態）	投与期間	投与量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	試験番号（資料番号）
ウサギ/日本白色種	椎間板内（生理食塩液/溶液）	単回	5 mg/mL、10 µL/disc	M：6 a)	椎間板及び周囲組織に対する刺激性は認められなかった。	[redacted]-3320(2)（4.2.3.7.7-4）

M：雄
a)：投与後 2 及び 7 日に 3 例ずつ剖検した。

被験物質：プラセボ製剤

動物種/系統	投与方法（溶媒/投与形態）	投与期間	投与量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	試験番号（資料番号）
ウサギ/日本白色種	椎間板内（生理食塩液/溶液）	2 回（投与間隔 7 日）	10 µL/disc	M：12 a)	プラセボ製剤群及び生理食塩液群ともに、投与後 2 及び 7 日に髄核では小型髄核細胞、髄核細胞の変性（核消失）、髄核基質の硝子化及び濃縮、髄核の周囲骨組織への侵入及び髄核の小型化がみられた。線維輪では髄核側への突出、線維輪細胞の肥大及び針刺入痕周囲での変性及び壊死がみられた。これらの変化に群間差はみられず、プラセボ製剤と生理食塩液の椎間板に対する刺激性に差はないと判断した。	[redacted]0403G（4.2.3.7.7-5）

M：雄
a)：2 回目投与後 2 及び 7 日に 6 例ずつ剖検した。