ピリヴィジェン 10%点滴静注
5 g/50 mL、10 g/100 mL、20 g/200 mL

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.6　毒性試験の概要文

CSL ベーリング株式会社

目次

略語・略号一覧 3
非臨床試験で使用した IgG 製剤の一覧 4
2.6.6. 毒性試験の概要文 5
2.6.6.1. まとめ 5
2.6.6.1.1. 単回及び反復投与毒性試験 7
2.6.6.1.2. 遺伝毒性試験 7
2.6.6.1.3. がん原性試験 7
2.6.6.1.4. 生殖発生毒性試験 8
2.6.6.1.5. 幼若動物試験 8
2.6.6.1.6. 局所刺激性試験 8
2.6.6.1.7. L-プロリンの非臨床試験 9
2.6.6.2. 単回投与毒性試験 11
2.6.6.3. 反復投与毒性試験 11
2.6.6.4. 遺伝毒性試験 11
2.6.6.5. がん原性試験 11
2.6.6.6. 生殖発生毒性試験 12
2.6.6.7. 局所刺激性試験 12
2.6.6.7.1. ウサギを用いた IgPro10 及び生理食塩液の局所刺激性試験 12
2.6.6.7.2. ウサギを用いた調整済みのタンパク質溶液の局所刺激性試験（皮下投与後 96 時間観察） 13
2.6.6.8. その他の毒性試験 15
2.6.6.8.1. IgPro10 の不純物 15
2.6.6.8.2. L-プロリンの非臨床試験 15
2.6.6.9. 考察及び結論 50

略語・略号一覧

略語・略号	英語	日本語
AChE	Acetycholinesterase	アセチルコリンエステラーゼ
ADP	Adenosine diphosphate	アデノシン二リン酸
ATP	Adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
BuChE	Butyrylcholinesterase	ブチリルコリンエステラーゼ
CAT	Catalase	カタラーゼ
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
CIDP	Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy	慢性炎症性脱髄性多発根神経炎
CRO	Contract research organization	試験受託機関
CSLB	CSL Behring AG, Bern, called ZLB Behring AG before 2007 or ZLB Bioplasma AG before summer 2004	CSL Behring AG, Bern（2007 年以前は ZLB Behring AG、2004 年夏以前は ZLB Bioplasma AG）
DNA	Deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
GLM	General linear model	一般化線形モデル
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
GSH	Glutathione	グルタチオン
GSH-Px	Glutathione peroxidase	グルタチオンペルオキシダーゼ
ICH	International Conference on Harmonisation (of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)	医薬品規制調和国際会議
IgG	Immunoglobulin G	免疫グロブリン G
ITP	Immune thrombocytopenic purpura	免疫性血小板減少性紫斑病
IVIG	Immunoglobulin for intravenous administration	静脈注射用人免疫グロブリン
L-NAME	N-nitro-L-arginine methyl ester	N-ニトロ-L-アルギニンメチルエステル
PK	Pharmacokinetics	薬物動態
QAU	Quality Assurance Unit	信頼性保証部門
SOD	Superoxide dismutase	スーパーオキシドジスムターゼ
TRAP	Total radical-trapping antioxidant potential	総ラジカル捕捉抗酸化パラメータ

非臨床試験で使用した IgG 製剤の一覧

製剤	形態	IgG 濃度	L-プロリン	pH	臨床適用経路	販売状況	備考
IgPro10	液状製剤	10%	＋	4.8	静脈内投与	海外で販売（販売名：Privigen）	治験薬
IgPro20	液状製剤	20%	＋	4.8	皮下投与	本邦（販売名：ハイゼントラ 20%皮下注[*1]）及び海外海外（販売名：Hizentra）で販売	
サングロポール[*2]（Sandoglobulin）	凍結乾燥製剤	5%	－	6.6	静脈内投与	本邦（販売名：サングロポール）及び海外（販売名：Sandoglobulin）で販売	
Beriglobin P	液状製剤	16%	－	6.8	筋肉内投与 皮下投与	海外で販売（販売名：Beriglobin）	
[redacted]	液状製剤	[redacted]%	＋	4.8	皮下投与	[redacted]	
[redacted]	液状製剤	[redacted]%	＋	4.8	皮下投与	[redacted]	
Sandoglobulin Liquid	液状製剤	12%	＋	5.3	静脈内投与	海外で販売（販売名：Sandoglobulin Liquid）	

*1 ハイゼントラ 20%皮下注 1 g/5 mL、2 g/10 mL、4 g/20 mL（承認番号：22500AMX01830000、22500AMX01831000 及び 22500AMX01832000）
*2 サングロポール点滴静注用 2.5g（承認番号：22000AMI00003000）

2.6.6. 毒性試験の概要文

2.6.6.1.　まとめ

ヒト免疫グロブリンは生体内に存在するタンパク質であり、安全性及び忍容性は確立している。人免疫グロブリン製剤は免疫学的活性を有し、外来物反応性抗体を含むため（McMorrow et al. 1997；Tomlinson et al. 1997；Watier et al. 1996）、ヒトに外挿できない作用が動物で誘発される可能性があることから、人免疫グロブリン製剤を動物モデルで試験することには限界がある。このように非臨床試験の実施意義が限定的であることは、「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」に関するガイドライン[ICH S6 (R1)]でも認識されているため、IgPro10 の毒性評価は局所刺激性のみに限定した。局所刺激性試験では IgPro10 をウサギに静脈内、動脈内及び血管周囲投与した際、投与部位で想定される局所反応性を評価した。加えて、IgPro10 をウサギに皮下投与した際の局所刺激性試験も実施した（表 2.6.6-1）。

表 2.6.6-1　毒性試験の一覧

試験の種類及び試験番号	動物種	観察期間	投与方法	被験物質	投与量	GLP 適用の有無
局所刺激性 143.143.482 4.2.3.6.1	ウサギ	8 日	初日に単回投与、 静脈内、静脈周囲及び動脈内投与	IgPro10	ヒト IgG : 51.25 mg、 L-プロリン : 14.4 mg	適用
局所刺激性 143.143.552 4.2.3.6.2	ウサギ	4 日	単回皮下、 皮下持続投与	IgPro10 、 [redacted]*、 [redacted]*、IgPro20*、 Beriglobin P、 添加剤溶液(L-プロリン 250 mmol/L pH 4.8)	最大 2.5 mL/kg （ヒト IgG： 250 mg/kg、 L-プロリン： 72 mg/kg）	適用

* [redacted]、[redacted] 及び IgPro20 は、IgG 濃度がそれぞれ [redacted]、[redacted] 及び 20%であることを除き、IgPro10 と同等である。

その他の毒性試験は、IgPro10 製剤に安定化剤として含まれる唯一の添加剤である L-プロリンの試験である。L-プロリンはヒトでの忍容性が良好であることが知られており、小児適用の非経口栄養剤でも高用量が連日投与されている（例：プレアミン-P 注射液、扶桑薬品工業株式会社、用法・用量に基づき L-プロリンは最高 216 mg/kg まで小児に連日静脈内投与される）。また、L-プロリンは、CSL ベーリング（CSLB）社が海外で上市した静脈注射用人免疫グロブリン（IVIG）液状製剤の Sandoglobulin Liquid に含有される 3 添加物のうちの一つであり、最高 115 mg/kg まで静脈内投与される。IgPro10 については、L-プロリンを最高 288 mg/kg/day（ヒト体重 60 kg に 17.3 g/day）まで投与するが、日本ではこの用量の使用前例がない。一般毒性試験は、げっ歯類及び非げっ歯類としてよく使用されているラット及びイヌを用いて実施した。

非臨床試験は、IgPro10 の臨床適用に近い試験デザインで実施した。特に、成熟動物を用いた大部分の試験の投与レジメンは、IVIG の高用量をヒトに点滴する場合を想定し、1 日当たり 7 時間かけて静脈内持続投与した。IgPro10 の開発中に実施した非臨床試験では、L-プロリンに加えてグリシンについても検討した。グリシンは IVIG 液剤の添加物として通常使用されており、

IgPro10 の開発初期に添加物の候補にも挙がっていた。さらに、Sandoglobulin Liquid の開発中に、L-プロリンの一連の遺伝毒性試験を実施した。

最終的に、広範囲な文献検索も加味し、L-プロリンの試験データセットとした。

表 2.6.6-2　L-プロリンの毒性試験

試験の種類 及び試験番号	動物種	投与期間	投与方法	被験物質	投与量	GLP 適用の有無
反復投与毒性試験 4.2.3.7.7.1 925/034	ラット	5 日	静脈内投与 7 時間／日	L-プロリン グリシン	L-プロリン：最大 1449 mg/kg/day グリシン：最大 945 mg/kg/day	非適用
反復投与毒性試験 4.2.3.7.7.2 925/035	ラット	28 日	静脈内投与 7 時間／日	L-プロリン グリシン	L-プロリン：最大 1449 mg/kg/day グリシン：最大 945 mg/kg/day	適用
反復投与毒性試験 4.2.3.7.7.3 668316	イヌ	7 日	静脈内投与 7 時間／日	L-プロリン	最大 4350 mg/kg/day	非適用
反復投与毒性試験 4.2.3.7.7.4 668321	イヌ	28 日	静脈内投与 7 時間／日	L-プロリン	最大 4350 mg/kg/day	適用
生殖発生毒性試験 （胚・胎児毒性試験） 4.2.3.7.7.9 AA30034	ラット	妊娠 6～17 日	静脈内投与 7 時間／日	L-プロリン グリシン	L-プロリン： 1449 mg/kg/day グリシン： 945 mg/kg/day	適用
神経毒性試験 （Irwin 試験） 4.2.3.7.7.10 1657/ZLB/02	ラット	5 日	静脈内投与 7 時間／日（初日から 4 日目まで） 約 3 時間（5 日目）	L-プロリン グリシン	L-プロリン：最大 1449 mg/kg/day グリシン：最大 945 mg/kg/day	適用
神経毒性及び探索的薬物動態試験 4.2.3.7.7.11 PSR 08/06	ラット	単回投与	皮下投与 腹腔内投与	L-プロリン	皮下投与：2 g/kg 腹腔内投与：最大 4 g/kg	非適用
幼若動物における神経毒性及び薬物動態試験 4.2.3.7.7.12 PSR 03/07	ラット	単回投与	皮下投与	L-プロリン グリシン	L-プロリン： 1.9 g/kg グリシン：1.2 g/kg	非適用
幼若動物における神経毒性試験 （Irwin type 試験） 4.2.3.7.7.13 PSR 01/07	ラット	5 日（生後 9～13 日）又は 3 日（生後 9、16 及び 23 日）	皮下投与（1 日 2 回）	L-プロリン グリシン	L-プロリン：最大 2× 2.0 g/kg/day グリシン：最大 2× 1.3 g/kg/day	非適用
幼若動物における神経毒性試験（水迷路試験） 4.2.3.7.7.13、PSR 01/07 及び 4.2.3.7.7.14、ZLB 06_006	ラット	5 日（生後 9～13 日）又は 3 日（生後 9、16 及び 23 日）	皮下投与（1 日 2 回）	L-プロリン グリシン	L-プロリン：最大 2× 2.0 g/kg/day グリシン：最大 2× 1.3 g/kg/day	非適用

表 2.6.6-3　L-プロリンの遺伝毒性試験

試験の種類 及び試験番号	動物種／試験系	投与期間	投与方法	投与量	GLP 適用の有無
変異原性試験 4.2.3.7.7.5 22196	Ames	－	－	L-プロリン：最大 69 µg/plate	適用
変異原性試験 4.2.3.7.7.6 49196	Ames	－	－	L-プロリン：最大 6900 µg/plate	適用
遺伝毒性試験 4.2.3.7.7.7 CLE1554/3-D5140	チャイニーズハムスター卵巣（CHO）培養細胞における染色体異常	－	－	L-プロリン：最大 14.22 mmol/L	適用
遺伝毒性試験 4.2.3.7.7.8 CLE1554/4-D5140	マウス骨髄における小核誘導	5 日	静脈内投与	L-プロリン：最大 276 mg/kg/day	適用

L-プロリンはニコチンアミド及び L-イソロイシンとの混合物（添加物 8：L-プロリン 120 mmol/L、L-イソロイシン [redacted]mmol/L、ニコチンアミド [redacted]mmol/L、pH [redacted]）として評価した。

2.6.6.1.1.　単回及び反復投与毒性試験

単回及び反復投与毒性試験は医薬品開発の初期で、用量反応性に関する有用な情報を提供する可能性はある。しかし、人免疫グロブリン製剤は免疫学的活性を有し、外来物反応性抗体を含むため（McMorrow et al. 1997；Tomlinson et al. 1997；Watier et al. 1996）、ヒトに外挿できない作用が動物で誘発される可能性があることから、人免疫グロブリン製剤を動物モデルで試験することには限界がある。そのため、IgPro10 の単回及び反復投与毒性試験を実施しなかった。

2.6.6.1.2.　遺伝毒性試験

ヒト IgG のような免疫グロブリンは細胞内のデオキシリボ核酸（DNA）及び染色体に直接作用しないため、そのような高分子に対する遺伝毒性試験を実施することは適切ではないと考えられる。

2.6.6.1.3.　がん原性試験

IgPro10 は、慢性炎症性脱髄性多発根神経炎（CIDP）患者には高用量で投与されるが、IgPro10 に含まれる IgG 分子は内因性物質であり、高用量の IgG は抗炎症作用を示すことが知られているため、IgG の生理学的レベルを超える曝露量で細胞増殖を誘発するとは考えられない。さらに、IVIG のうち献血グロベニン-I（乾燥ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン：医薬品インタビューフォーム、Tsuchitani et al. 1984）及びガンマガード（乾燥イオン交換樹脂処理人免疫グロブリン：医薬品インタビューフォーム）の長期毒性試験において腫瘍発生を示唆するような所見は認められなかった。これらのエビデンスから、ヒトでの発がんリスクが低いことは十分に担保されるため、ICH S6 (R1)ガイドラインに基づき、新たに非臨床試験を実施する必要はないと考えられる。

2.6.6.1.4. 生殖発生毒性試験

サングロポール（IVIG 凍結乾燥製剤）を投与量 62.5、125 及び 250 mg/kg でラットの妊娠前及び妊娠初期、器官形成期並びに周産期及び授乳期に、また、サングロポールを投与量 62.5、125 及び 250 mg/kg でウサギの器官形成期に静脈内投与しても妊娠率、分娩、胎児及び新生児に対する影響はみられなかった。

サングロポールのこれらの試験成績より、ヒト IgG は生殖発生に悪影響を及ぼさないと推察された。また、動物試験の実施に際し、IgPro10 の外来物反応性抗体及び免疫原性の影響を考慮して、IgPro10 の生殖発生毒性試験は実施しなかった。

2.6.6.1.5. 幼若動物試験

IgPro10 に含まれる IgG は、市販の IVIG 製剤として長期にわたり小児に適用されてきた。さらに、CSLB 社が実施した IgPro10 の海外臨床試験では、組み込まれた小児患者に対する安全性への懸念は認められなかった。したがって、小児に対する安全性への懸念はないと考えられたことから、幼若動物を用いた非臨床試験は実施しなかった。

2.6.6.1.6. 局所刺激性試験

IgPro10 のウサギにおける局所刺激性試験を実施し、静脈内投与、静脈周囲投与及び動脈内投与により想定される局所反応を評価した。IgPro10 及び生理食塩液投与により誘発される紅斑及び浮腫は軽度であり、それらの発現頻度及び程度は静脈内と動脈内投与の間では同等であり、被験物質を静脈周囲に投与すると、生理食塩液投与と比較して僅かに顕著な変化が認められたが、いずれの変化も許容範囲内であった。

次に実施した IgPro10 のウサギにおける局所刺激性試験は、投与容量 0.5 mL 及び 2.5 mL/kg による単回皮下投与で実施した。IgPro10 以外に海外市販の比較対照製剤として Beriglobin P（16%タンパク質溶液）、[redacted]、[redacted] 及び IgPro20 を使用し評価した。検討したすべての IgPro 製剤は、タンパク質濃度が比較的高いこと（例：[redacted]）を除き、IgPro10 と同一組成であった。また、添加物溶液（L-プロリン 250 mmol/L、pH 4.8）も評価した。IgPro10、[redacted] 及び添加物溶液による紅斑は、Beriglobin P による紅斑よりも発現頻度が低かった。IgPro20 及び [redacted] 投与後に観察された紅斑は、Beriglobin P による紅斑と同程度であった。IgPro10 の検討した 2 用量間で紅斑に顕著な差は認められなかった。浮腫の出現頻度及び程度は、被験物質の用量増加に伴い上昇した（被験物質のタンパク質濃度の違い）。被験物質間で痛みの反応に大差はなく、IgPro10 の皮下投与による組織学的異常所見は認められなかった。

2.6.6.1.7. L-プロリンの非臨床試験

IgPro10 の臨床試験に基づき、CIDP 患者に投与される IgG の 1 日当たりの臨床推奨最高用量は 1000 mg/kg であり、この投与量における L-プロリンとしての用量は 288 mg/kg になる。IgPro10 の予想される使用条件下で L-プロリンのヒトへの曝露に関する情報は多く、一連の毒性試験をすべて実施しなくても妥当であると考えられた。以上を考慮し、L-プロリンの半減期が短いことから、短期の静脈内反復投与毒性試験を実施した。また、遺伝毒性試験及び胚・胎児発生に関する静脈内投与試験を行い、さらに、神経毒性試験（静脈内投与、皮下投与又は腹腔内投与）を実施し L-プロリンの高用量投与による影響を評価した。

2.6.6.1.7.1. 単回及び反復投与毒性試験

ラットの 5 日間投与用量設定試験後に実施された反復投与毒性試験では、L-プロリンを 120 mmol/L 及び 300 mmol/L の濃度で毎日 7 時間、28 日間静脈内持続投与した。L-プロリンを静脈内持続投与した最高用量は 1449 mg/kg/day であり、高用量での投与容量は、ラットに静脈内持続投与できる最大容量の 42 mL/kg であった。試験期間中、途中死亡例はみられず、投与に関連する一般状態の変化は観察されなかった。28 日目の低及び高用量群の雄でのみ、体重増加量の軽度抑制（統計学的有意差なし）及び摂餌量の減少が観察された。血液学的検査で投与に関連する明らかな影響は認められなかった。血液生化学的検査では、投与群間の変動は本薬投与との関連はなく偶発的なものであり、すべての個別データは背景データの範囲内であった。器官重量に変化はみられず、脳を含む組織の剖検所見及び病理組織学的所見に本薬投与に関連した変化は観察されなかった。本試験における無毒性量は、高用量の 1449 mg/kg/day と推定された。

イヌの 7 日間投与用量設定試験後に実施された反復投与毒性試験では、L-プロリンを最高 4350 mg/kg までの投与量で毎日 7 時間、28 日間静脈内持続投与した。眼科学的検査、心電図検査、血液学的検査及び血液生化学的検査では、L-プロリン投与に関連すると考えられる変化はみられず、L-プロリン投与による剖検所見及び病理組織学的所見も観察されなかった。尿検査では、L-プロリン投与に直接関連すると考えられる変化はみられず、大部分の変化は高容量投与による電解質の生理学的不均衡によるものであった。4 週間投与毒性試験では、高用量群（4350 mg/kg）における数例の動物に嘔吐を含む一般状態の変化が観察された。試験期間中、体重は順調に増加した。概して、高用量群の動物に摂餌量減少が認められた。L-プロリンを投与量 2170 及び 4350 mg/kg で 7 時間静脈内持続投与（投与速度 : 9 及び 18 mL/kg/hr）した 28 日間連日投与毒性試験では、ビーグル犬に良好な忍容性が認められた。本試験における無毒性量は 4350 mg/kg/day であると考えられた。

単独の単回投与毒性試験は実施しなかった。L-プロリンの急性毒性は、ラット及びイヌにおける前述の反復投与毒性試験の中で評価した。これらの試験で L-プロリンの初回投与後、一般状態の変化は認められなかった。

L-プロリンは半減期が短く、血中から急速に消失し体内に蓄積しないことから、反復投与による新たな安全性の懸念はないと考えられる。そのため、4 週間以上の投与期間による反復投与毒性試験は実施しなかった。

2.6.6.1.7.2.　遺伝毒性試験

復帰突然変異試験、*in vitro* 染色体異常試験及びマウス骨髄を用いた小核試験では、ニコチンアミド及び L-イソロイシンとともに L-プロリンは遺伝毒性を示さなかった。

2.6.6.1.7.3.　生殖発生毒性試験

L-プロリンはヒトの生体内に存在し、臨床製剤として広範囲に使用されていることから、受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、並びに出生前・出生後の発生及び母体の機能に関する試験を実施しなかった。加えて、ラット及びイヌを用いた 4 週間投与毒性試験でも、28 日目に安楽死させた高用量群の動物の生殖器に病理組織学的変化は観察されなかった。

ラットに L-プロリンを投与量 1449 mg/kg/day で妊娠 6 日から 17 日まで 1 日 7 時間静脈内持続投与する胚・胎児発生に関する試験を実施した。この用量での投与容量は 42 mL/kg であり、動物に静脈内持続投与可能な最大投与容量である。その結果、母動物及び胚に対する毒性は認められず、この用量は無影響量と考えられた。

2.6.6.1.7.4.　神経毒性試験

新生児ラットの高プロリン血症モデルで神経毒性及び神経化学的変化を示唆する徴候がみられることを示す公表文献が数報あることから、高用量の L-プロリンを幼若ラットに投与し急性神経毒性の臨床徴候（Irwin 試験）及び Morris 水迷路課題試験に対する影響を検討した。

L-プロリンをラットに 1 日 7 時間で静脈内持続投与した 5 日間 Irwin 試験において、IgPro10 の臨床試験における最高用量の 5 倍まで投与した場合の L-プロリンの用量（1449 mg/kg/day）で、5 日目投与後に体温の軽度上昇が認められた以外には、明らかな影響は認められなかった（2.6.6.8.2.5.1）。別の薬物動態（PK）試験では、L-プロリンの 2 g/kg をラットに皮下投与した結果、最高血漿中濃度は 12 mmol/L であり、神経学的影響や発作などの徴候はみられなかった（2.6.6.8.2.5.2）。

Bavaresco ら（Bavaresco et al. 2005）の方法に従い、臨床での IVIG 製剤の適応に基づき、L-プロリンを新生児ラットに生後 9 日から 13 日まで 1 日 1 回、又は生後 9、16 及び 23 日に間歇的に皮下投与した結果、急性神経毒性徴候は観察されなかった。また、同様に L-プロリンを投与したラットに対して、生後 54 日から 71 日に Morris 水迷路課題試験により空間学習検査を実施した。その結果、L-プロリンを投与した全動物では参照記憶の獲得に成功し、参照記憶及び作業記憶の検査で良好な成績を示した。前述のいずれの L-プロリン投与スケジュールも参照記憶の獲得、参照記憶及び作業記憶に対して負の影響を及ぼさなかった。

2.6.6.2. 単回投与毒性試験

一般的に、単回投与毒性試験は医薬品開発の初期で、用量反応性に関する有用な情報を提供する可能性がある。しかし、人免疫グロブリン製剤は免疫学的活性を有し、外来物反応性抗体を含むため（McMorrow et al. 1997；Tomlinson et al. 1997；Watier et al. 1996）、ヒトに外挿できない作用が動物で誘発される可能性があることから、動物モデルを用いて人免疫グロブリン製剤を試験することには限界がある。そのため、IgPro10 の単回投与毒性試験を実施しなかった。

2.6.6.3. 反復投与毒性試験

人免疫グロブリン製剤は免疫学的活性を有し、外来物反応性抗体を含むため（McMorrow et al. 1997；Tomlinson et al. 1997；Watier et al. 1996）、ヒトに外挿できない作用が動物で誘発される可能性があることから、動物モデルを用いて人免疫グロブリン製剤を試験することには限界がある。ヒト IgG を動物に投与すると、抗ヒト IgG 抗体が産生されるため、血清中ヒト IgG 濃度を高値に上昇させることは難しく、たとえ静脈内反復投与毒性試験が実施できたとしても、動物での IgPro10 の曝露量がヒトでの曝露量を上回る可能性は低い。加えて、海外の臨床試験及び市販後の情報より、本剤の安全性について特段の懸念はないと考えられる。これらすべての理由より、IgPro10 の反復投与毒性試験を実施しなかった。

2.6.6.4. 遺伝毒性試験

ヒト IgG のような免疫グロブリンは細胞内の DNA 及び染色体に直接影響を及ぼさないため、そのような高分子の遺伝毒性試験を実施することは適切ではないと考えられた。

2.6.6.5. がん原性試験

IgG 分子は内因性物質であり、ヒト IgG の反復投与は異種動物で免疫反応を引き起こすと考えられるため、IgPro10 に含まれる IgG 分子のがん原性試験を実施することは適切ではない。IgPro10 は CIDP 患者に高用量で投与されるが、IgPro10 に含まれる IgG 分子は内因性物質であり、高用量の IgG は抗炎症作用を示すことが知られているため、IgG の生理学的レベルを超える曝露量で細胞増殖及び腫瘍発生を誘発するとは考えられない。さらに、IVIG のうち献血グロ

ベニン-I（乾燥ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン：医薬品インタビューフォーム、Tsuchitani et al. 1984）及びガンマガード（乾燥イオン交換樹脂処理人免疫グロブリン：医薬品インタビューフォーム）の長期毒性試験において腫瘍発生を示唆するような所見は認められなかった。これらのエビデンスより、ヒトでの発がんリスクが低いことは十分に担保されるため、ICH S6 (R1)ガイドラインに基づき、新たに非臨床試験を実施する必要はないと考えられる。また、動物での IgPro10 の曝露量がヒトでの曝露量を上回る可能性は低く、動物を用いてがん原性試験を実施する意義は低いと考えられる。

2.6.6.6.　生殖発生毒性試験

サングロポール（Sandoglobulin Liquid の先行製剤）を投与量 62.5、125 及び 250 mg/kg でラットの妊娠前及び妊娠初期、器官形成期並びに周産期及び授乳期に、また、サングロポールを投与量 62.5、125 及び 250 mg/kg でウサギの器官形成期に静脈内投与しても妊娠率、分娩、胎児及び新生児に対する影響はみられなかった。

サングロポールの試験結果より、ヒト IgG は生殖発生毒性に影響を及ぼさないと推察された。また、動物試験の実施に際しては、IgPro10 の外来物反応性抗体及び免疫原性の影響を考慮すべきであり、動物での IgPro10 の曝露量はヒトでの曝露量を上回らず低くなると予測される。海外での臨床試験及び市販後の情報より、本製剤の安全性について特段の懸念はないと考えられる。これらのことから、IgPro10 の生殖発生毒性試験を実施しなかった。

2.6.6.7.　局所刺激性試験

ウサギを用いる第 1 の局所刺激性試験は IgPro10 の開発中に実施し、IgPro10 の静脈内投与、静脈周囲投与及び動脈内投与による局所刺激性を評価した。

ウサギを用いる第 2 の局所刺激性試験では、海外での市販製剤 Beriglobin P を比較対照として用い、数種の IgG 製剤を皮下投与した場合の局所刺激性を評価した。Beriglobin P のタンパク濃度は 16%、pH は約 6.8 であった。加えて、他の比較対照製剤として [redacted]（[redacted]）、[redacted]（[redacted]）及び IgPro20（20%タンパク質）も用いた。また、タンパク質を含有しない添加物溶液（L-プロリン 250 mmol/L、pH 4.8）も評価に使用した。

両試験では、臨床試験 ZLB03_003CR［免疫性血小板減少性紫斑病（ITP）を対象とした海外試験、Hagan et al. 2012］で検討した IgPro10 のロットと同一ロットを使用した。

2.6.6.7.1.　ウサギを用いた IgPro10 及び生理食塩液の局所刺激性試験

表 2.6.7-5、4.2.3.6.1 における試験報告書（試験番号 143. 143. 482）

本試験では、IgPro10［ヒト IgG（総タンパク質 102.5 g/L）、L-プロリン 250 mmol/L、pH 4.8、Batch No. [redacted]］を New Zealand White ウサギに単回で静脈内、静脈周囲及び動脈内投与した。

本試験は GLP 適用試験として実施した。

各群 3 例（雄 2 例、雌 1 例）、3 群のウサギを試験に使用した。それらの動物の右側耳介に被験製剤（投与容量 0.5 mL）を静脈内、静脈周囲及び動脈内に単回投与した。この投与容量は標準であり、特に静脈周囲投与では投与可能な最大容量である。同様に左側耳介には対照として生理食塩液を投与した。投与局所の所見と体重は定期的に記録した。8 日間の観察後、すべての動物を安楽死させ剖検した。病理組織学的検査は投与部位周辺の組織を採取し実施した。

結果

計画された観察期間中、死亡例はみられず全動物が生存した。各群の動物の体重に違いはみられなかった。被験製剤と生理食塩液投与により形成された紅斑及び浮腫は軽度であり、静脈内及び動脈内投与後のこれらの発現頻度及び程度も同様であったが、被験製剤の静脈周囲投与では生理食塩液と比較して僅かに目立った。静脈内、静脈周囲及び動脈内投与後に、本剤投与に関連した組織学的所見は観察されなかった。

結論

IgPro10 の単回静脈内、動脈内及び静脈周囲投与による局所忍容性は良好であった。IgPro10 の静脈周囲投与後 24 時間以内に軽度の刺激性変化が認められたが、忍容性の許容範囲内と考えられた。以上より、IgPro10 の正常な静脈内投与、あるいは不適切な投与により局所に不慮の蓄積があった場合でも、強力な局所刺激性を誘起するとは予想されなかった。

2.6.6.7.2. ウサギを用いた調整済みのタンパク質溶液の局所刺激性試験（皮下投与後 96 時間観察）

表 2.6.7-6、4.2.3.6.2 における試験報告書（試験番号 143.143.552）

本試験では IgPro10 の 2 用量を New Zealand White ウサギに皮下投与した。比較対照製剤として Beriglobin P（16%タンパク質、pH 約 6.8）を使用し、加えて、タンパク質濃度以外は IgPro10 と同一組成の 3 製剤、すなわち [redacted]（[redacted]）、[redacted]（[redacted]）及び IgPro20（20%タンパク質）も用いた。添加物溶液（L-プロリン 250 mmol/L、pH 4.8）も検討した。

本試験は GLP 適用試験として実施した。

試験には被験製剤及び比較対照製剤として次のロットを使用した。IgPro10（[redacted]）、IgPro20（[redacted]）、[redacted]（[redacted]）、[redacted]（[redacted]）、Beriglobin P（[redacted]）及び L-プロリン（[redacted]）。

雌雄各 18 例の New Zealand White ウサギを 1 群雌雄各 3 例の 6 群に割り当てた。投与初日（day 0）に投与に伴う疼痛の程度を確認するため、被験物質の 0.5 mL を動物の片側にボーラス皮下投与した（低用量）。引き続き、同一動物の反対側に生理食塩液（陰性対照）の 0.5 mL を同様にボーラス皮下投与した。day 0 の第二段階として、ボーラス皮下投与後、直ちに被験物質の投

与容量 2.5 mL/kg を 5 mL/kg/hr の速度で皮下持続投与した（高用量）。翌日（day 1）の 2 回目投与では被験物質投与約 24 時間後に、生理食塩液を同様に皮下持続投与した。ボーラス皮下投与は動物の背部に、肩甲骨から尾側へ向けて行った。皮下持続投与は保定した動物にインフュージョンポンプを用いて実施した。

試験期間中、動物の死亡の有無を 1 日 1 回、記録した。一般状態観察は投与日（day 0）より投与後の 96 時間（day 4）まで 1 日 2 回行った。投与部位の疼痛、紅斑及び浮腫の程度は 0 から 4 まで段階的評価法で判定した。体重は投与日に 1 回測定した。剖検は day 4 に実施した。肉眼的所見及び病理組織学的検査は、皮下投与及び皮下持続投与部位、並びに特記すべき所見が認められた場合にはその周囲組織について段階的評価方法により行った。

結果

紅斑形成：IgPro10、[redacted] 及び添加物溶液の L-プロリン投与により、紅斑形成が観察されたが、生理食塩液投与と比較して特段の差はみられず、比較対照製剤の Beriglobin P 投与と比較してより良好な忍容性が認められた。[redacted] 及び IgPro20 の皮下持続投与後、これらの製剤に起因した紅斑（中等度の変化として評価）が認められ、紅斑の程度は比較対照製剤 Beriglobin P と同程度であった。ボーラス皮下投与と皮下持続投与による紅斑に特記すべき差異は認められなかった。

浮腫形成: 浮腫の出現頻度及び程度は被験製剤のタンパク質濃度増加に伴い上昇し、用量依存的な変化が示唆された。

疼痛反応: 被験製剤と生理食塩液の間に大きな差はみられなかった。

肉眼所見: 主な肉眼所見として、皮下組織に様々な程度の血腫及び変色部位が認められた。これらの出現頻度及び程度は、被験製剤投与群、生理食塩液投与群及び雌雄両性で同等であった。

病理組織学的検査では IgPro10 の皮下持続投与で異常所見は認められなかった。

結論

試験に使用したすべての IgPro 製剤は、Beriglobin P の同一容量と比較すると、同程度の局所刺激性又は良好な忍容性を示した。試験に使用した製剤投与群間で認められた違いは、主として同一容量の製剤を投与した際のタンパク質含有量の違いに起因すると考えられた。IgPro10 は、IgPro20（ハイゼントラ）を含むすべての免疫グロブリン製剤よりも忍容性が良好であった。また、結果に性差は認められなかった。

2.6.6.8. その他の毒性試験

2.6.6.8.1. IgPro10 の不純物

2.6.6.8.1.1. 不純物Q*

不純物Q* は、[redacted]である。IgPro10 の製造工程中、ウイルス不活化を改良するために 不純物Q* を添加した（[redacted]）。IgPro10 中の 不純物Q* 濃度は定量アッセイの検出限界以下であった（[redacted]；[redacted]）。この濃度では、患者は前述の市販製剤と同程度又は市販製剤よりも低い濃度の 不純物Q* に曝露されると考えられる。この情報に、IgPro10 の局所刺激性試験で得られた良好な結果（2.6.6.7）を考え合わせ、さらに、 不純物Q* が低毒性であることを示す文献情報（BIBRA, 1992）により、不純物Q* について追加すべき安全性試験はないとの結論に至った。

2.6.6.8.1.2. カプリル酸

カプリル酸は天然に存在する中鎖脂肪酸であり、IgPro10 の製造工程の初期に実施される沈殿段階で免疫グロブリンを精製するために使用される。その後の工程でカプリル酸は製剤から除去され、最終製剤では微量にしか存在しない（[redacted]）（[redacted]）。

2.6.6.8.1.3. エタノール

エタノールはヒト血漿を分画するために使用される。IgPro10 の製造工程でエタノールは IgG 溶液から除去され、最終製剤中では、残留溶媒に関する ICH Q3C(R3)ガイドラインでクラス 3 物質として規定された濃度をはるかに下回る残留溶媒濃度となっている。

2.6.6.8.2. L-プロリンの非臨床試験

L-プロリンは、第十七改正日本薬局方に収載されており、輸液成分として使用されている。L-プロリンは、高齢患者を含め、1 日当たり最大 216 mg/kg までの用量で医薬品としての使用前例（静脈内投与）はあるものの（プレアミン-P 注射液、扶桑薬品工業株式会社）、添加物としては CIDP 患者を用いる国内臨床試験の 1 日最大用量である 17.3 g（1 日最大用量 288 mg/kg の体重 60 kg 換算）の使用前例はない。そのため、L-プロリンの毒性試験成績を添付した。以下に示したいくつかの試験では、被験物質として L-プロリン以外にグリシンも使用したが、グリシンの試験成績は、IgPro10 に関連がないため記載していない。

2.6.6.8.2.1. L-プロリンの単回投与毒性試験

L-プロリンの単独の単回投与毒性試験は実施していないため、単回投与毒性は、ラット及びイヌを用いた 28 日間反復投与毒性試験（GLP 適用試験）の中で評価した。

＊新薬承認情報提供時に置換

2.6.6.8.2.1.1.　ラットにおける単回投与毒性

ラットにおける 28 日間投与毒性試験（試験番号 925/035、2.6.6.8.2.2.2）では、L-プロリンを投与量 579 又は 1449 mg/kg で 1 群当たり 20 例（雌雄各 10 例）に 1 日 1 回、7 時間静脈内持続投与した。動物の生死の確認及び一般状態観察は、投与期間中に連日で 1 日に少なくとも 2 回行い、体重及び摂餌量の測定は週 1 回実施した。

試験期間中、途中死亡はみられなかった。初回投与後、いずれの投与群にも被験物質投与に関連した一般状態の変化は観察されなかった。投与群の一部動物に体重増加抑制及び摂餌量減少が認められた。以上より、ラットにおける概略の致死量は 1449 mg/kg を超えると考えられた。

2.6.6.8.2.1.2.　イヌにおける単回投与毒性

イヌにおける 28 日間投与毒性試験（試験番号 668321、2.6.6.8.2.2.4）では、L-プロリンを投与量 2170 又は 4350 mg/kg で 1 群当たり 6 例（雌雄各 3 例）に 1 日 1 回、7 時間静脈内持続投与した。動物の生死の確認及び一般状態観察は、投与期間中に連日で 1 日に少なくとも 2 回行い、体重及び摂餌量の測定はそれぞれ週 1 回及び毎日実施した。

試験期間中、途中死亡はみられなかった。初回投与後、いずれの投与群にも被験物質投与に関連した一般状態の変化は観察されなかった。4350 mg/kg 群で摂餌量の減少が認められたが、体重増加量に変化はみられなかった。以上より、イヌにおける概略の致死量は 4350 mg/kg を超えると考えられた。

2.6.6.8.2.2.　L-プロリンの反復投与毒性試験

ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験を実施した。試験成績は IgPro10 の開発期間中に得られた。これらの試験は、IgPro10 の臨床での投与方法を基に計画され、動物における投与方法は、ヒトに高用量の IVIG を点滴静注することを想定し、1 日当たり 7 時間静脈内投与とした。L-プロリンの半減期が短いため、血中から急速に消失し、生体内に蓄積しないことから、投与期間を 28 日間に設定したことは妥当であると考えられた。

2.6.6.8.2.2.1.　L-プロリン及びグリシンのラットにおける 5 日間静脈内持続投与用量設定試験

表 2.6.7-7、4.2.3.7.7.1 における試験報告書（試験番号 925/034）

5 日間投与用量設定試験は [redacted]SD 系ラット（9 週齢）を用いて毎日 7 時間、被験物質の L-プロリン及びグリシンを静脈内持続投与して毒性を評価した。また、L-プロリン及びグリシンの血清中濃度を測定しトキシコキネティクス評価も行った。

本試験は GLP 適用試験として実施しなかった。

被験物質：L-プロリン（ロット番号: [redacted]）

1 群 5 例の雄動物を 5 群に配し、対照群（生理食塩液）、L-プロリン及びグリシンの低及び高用量群を設定した。全動物に被験物質溶液又は生理食塩液を 42 mL/kg の容量で静脈内持続投与した。低及び高用量群の静脈内投与に用いる被験物質溶液の濃度はそれぞれ 120 及び 300 mmol/L に設定した。低用量での被験物質溶液は生理食塩液と等浸透圧に調整した。一方、高用量での被験物質溶液は等浸透圧であったため、調整は行わなかった。

L-プロリン低用量：579 mg/kg/day、L-プロリン高用量：1449 mg/kg/day

被験物質を 5 日間連日で 7 時間静脈内持続投与した。毎日 7 時間の投与終了後、インフュージョンチューブの詰まりを防止するため、低容量（0.4 mL/hr）の生理食塩液で静脈内持続投与を 17 時間継続した。血液採取は剖検前の day 5 に実施し、トキシコキネティクス測定用の血液はサテライト動物（3 例/群）から頻回に採血した。

次のパラメータについて観察又は測定を実施した。少なくとも 1 日 2 回、動物の瀕死状態又は生死の確認、及び一般状態の観察を行った。体重は day 1、3 及び 5 に測定した。摂餌量は投与期間中に 1 回測定した。臨床病理検査（血液学的検査及び血液生化学的検査）は投与終了時（day 5）に実施した。全動物を day 5 に剖検した。各動物の剖検は完全に行い、全動物の組織標本を剖検時に固定して保存した。対照群及び高用量群の動物から採取した一部組織（肝臓、腎臓及び脾臓）は病理組織学的検査を行った。

<u>結果</u>

本試験では途中死亡はみられず、いずれの投与群にも被験物質投与に関連した一般状態の変化は認められなかった。対照群と比較して、いずれの投与群の体重増加量にも変化はみられなかった。L-プロリンの高用量群の平均摂餌量が僅かに低下したが、統計学的に有意な変化ではなく、個々の動物の摂餌量は対照群のデータ範囲内であった。

血液学的検査では、いずれの投与群にも明らかな被験物質投与の影響は認められなかった。L-プロリンの低用量群で好酸球数の軽度な低下が認められ、統計学的に有意であったが、この変化に用量相関性がみられず、偶発的と考えられた。

血液生化学的検査では、被験物質投与による明らかな影響はみられなかった。L-プロリンの高用量群で ALAT の統計学的に有意な軽度の上昇及び総タンパクの上昇（統計学的有意差なし）が認められた。しかし、これらの検査値は背景データの範囲内であるため、いずれも偶発的な変化と考えられた。また、これらのパラメータは、ラット 28 日間投与毒性試験（2.6.6.8.2.2.2）では変化がみられなかった。

器官重量では、L-プロリンの低及び高用量群に変化はみられなかった。

肉眼的及び病理組織学的検査で観察された変化は、げっ歯類のこの系統及び週齢における通常の背景データと一致しており、被験物質投与との関連はなく、いずれも偶発的であると考えられた。

L-プロリンを 1449 mg/kg で投与した場合、ベースラインレベルよりも約 12 倍高い血清中濃度（4.0 mmol/L）の一過性上昇が認められた。L-プロリンの投与により、他のアミノ酸濃度に影響はみられなかった。

結論

L-プロリンのいずれの用量でも毒性は認められなかったため、本試験における高用量の 1449 mg/kg が無毒性量と考えられた。引き続き実施したラット 28 日間投与 GLP 毒性試験では、両用量が使用可能であった。

2.6.6.8.2.2.2.　L-プロリン及びグリシンのラットを用いた 28 日間連日 7 時間静脈内持続投与毒性試験及び 2 週間回復性試験

表 2.6.7-8、4.2.3.7.7.2 における試験報告書（試験番号 925/035）

28 日間投与毒性試験は Crl-CD (SD)IGS BR 系ラット（9 週齢）を用いて毎日 7 時間、被験物質の L-プロリン及びグリシンを静脈内持続投与して毒性を評価し、加えて、2 週間休薬して毒性症状の回復性についても評価した。さらに、L-プロリン及びグリシンの血清中濃度を測定しトキシコキネティクス評価も行った。

本試験は GLP 適用試験として実施され、試験施設の信頼性保証部門（QAU）が実地調査を行った。

被験物質：L-プロリン（ロット番号: [redacted]）

1 群 20 例（雌雄各 10 例）を 5 群に配し、対照群（生理食塩液）、L-プロリン及びグリシンの低及び高用量群を設定した。対照群及び高用量群に 1 群 10 例（雌雄各 5 例）を追加し、毒性症状の回復性を評価するために 28 日間静脈内持続投与後、2 週間の休薬を行った。全動物に被験物質溶液又は生理食塩液を 42 mL/kg の容量で静脈内持続投与した。低及び高用量群の静脈内投与に用いる被験物質溶液の濃度はそれぞれ 120 及び 300 mmol/L に設定した。低用量での被験物質溶液は生理食塩液と等浸透圧に調整した。一方、高用量での被験物質溶液は調整しなくとも等浸透圧であった。

被験物質の用量は以下のとおり設定した。

L-プロリン低用量：579 mg/kg、L-プロリン高用量：1449 mg/kg

被験物質を 28 日間連日で 7 時間静脈内持続投与した。毎日 7 時間の投与終了後、インフュージョンチューブの詰まりを防止するため、動物には残りの 1 日 17 時間に低容量（0.4 mL/hr）の生理食塩液で静脈内持続投与を継続した。血液採取は剖検前の day 29 及び day 43（回復性試験動物）に実施し、トキシコキネティクス測定用の血液はサテライト動物（3 例/性/群）から頻回に採血した。採尿は投与終了時の剖検動物から行い、静脈内持続最終投与日の day 28 から剖検日の day 29 までの 24 時間にわたり採取した。

次のパラメータについて観察又は測定を実施した。少なくとも 1 日 2 回、動物の瀕死状態又は生死の確認、及び一般状態の観察を行った。休薬期間中の一般状態観察は 1 日 1 回行った。詳細な一般状態観察は投与期間中に毎日、休薬期間中は週 1 回実施した。眼付属器、中間透光体及び眼底の眼科学的検査は間接検眼法により、投与前及び投与 4 週に実施した。体重は全動物について、投与開始前、並びに投与期間中及び休薬期間中に週 1 回測定した。摂餌量は投与期間中及び休薬期間中に個体別に週 1 回測定した。臨床病理検査は試験終了時（day 29）に実施した。血液学的検査は休薬期間終了時（day 43）にも対照群及び高用量群の全動物（1 群当たり雌雄各 5 例）について実施した。全動物は投与終了時（day 29）又は 2 週間休薬期間終了時（day 43）に剖検した。各動物の外観、すべての開口部、頭蓋腔、カーカス（内臓を取り除いた死体）、脳の外観、頸髄、胸腔及び腹腔の各器官、頸部組織及び器官並びに投与部位の剖検を実施した。組織標本は剖検時に固定し保存した。対照群及び高用量群の全例の組織（脳を含む 40 以上の組織）について病理組織学的検査を実施した。さらに、4 週目に剖検した全例の動物について、腎臓の病理組織学的検査を行った。各群の病理組織学的検査は、肉眼的異常がみられた全器官について必要に応じ実施した。

<u>結果</u>

本試験では途中死亡はみられず、試験期間中、いずれの投与群にも被験物質投与に関連した一般状態の変化は認められなかった。

最初の投与 2 週間に、L-プロリンの低及び高用量群の雄で、対照群と比較して平均体重増加量の軽度な抑制が認められた。この体重増加抑制は投与後半の 2 週間でも回復しなかった。L-プロリンの両用量投与群の雌にみられた体重増加量は投与終了時に対照群にみられたものと同程度であった。被験物質投与群の平均体重は対照群の平均体重と比較して、静脈内持続投与終了時では両者の間に統計学的な有意差は認められなかった。体重の差異は投与終了時の群平均値で 10%以上の差がなかったため、この僅かな差異は毒性学的意義のある変化とは考えられなかった。体重増加量と同様、摂餌量は L-プロリン低及び高用量群の雄で減少を示したが、雌では影響が小さかった。被験物質投与群と対照群間では、投与期間中の摂餌量に統計学的に有意な差は認められなかった。

血液学的検査では、被験物質投与に起因する明らかな変化は認められなかった。L-プロリンの低及び高用量群の雄で day 29 に実施した検査では、活性化部分トロンボプラスチン時間の軽

度な延長が認められ、高用量群にみられた差は有意であった。しかし、L-プロリンの高用量群の雄で全個別データは背景データの範囲内に含まれており、この変化は偶発的と考えられた。好酸球数の相対値については､L-プロリンの低用量群の雄で対照群と比較して増加がみられた。しかし、この変化に用量相関性がみられず、偶発的な変化と考えられた。

血液生化学的検査では、被験物質投与に起因する明らかな変化は認められなかった。L-プロリンの高用量群の雄で同時に設定した対照群と比較して、血中コレステロール濃度の僅かな減少がみられたが、いずれの個別データも背景データの範囲内であり、この変化は偶発的と考えられた。

尿検査パラメータには被験物質投与に関連した変化はみられなかった。L-プロリンの低用量群の雄で対照群に比べて統計学的に有意な尿量減少がみられたが、この変化に用量依存性がみられず、偶発的と考えられた。また、L-プロリンの高用量群の雌で対照群と比較して、尿中クレアチニン排泄が軽度に減少したが、僅かな変化であったため被験物質投与との関連はないと考えられた。被験物質投与群と対照群との比較では、クレアチニンクリアランス及び尿中クレアチニン排泄に変化は認められなかった。

眼科学的検査でも被験物質投与による影響はみられなかった。

病理学的検査でも被験物質投与に関連した明らかな変化はなかった。投与部位及び肺でみられた病理組織学的変化は、その出現頻度と症状の程度が対照群と被験物質投与群で差がなかったため、投与操作の影響のみによるものと考えられた。対照群と比較して器官重量に、被験物質投与に関連する明らかな変化は認められなかった。

すべての肉眼病理所見の出現頻度は散発的であり、被験物質投与との関連はみられず、偶発性と考えられた。観察された肉眼的所見には胃の暗色部位、皮膚又は皮下組織に誘発されたびらんや痂皮若しくは限局性又は多発性の脱毛、肝臓の蒼白部位又は乳頭突起変化、子宮肥大、脾臓の嚢胞性領域又は異常形、投与部位の硬結又は塊状物があった。これらの変化は病理組織学的所見と関連がみられたが、このような試験で通常認められる所見であり、被験物質との関連はないと考えられた。

病理組織学的所見には被験物質投与と関連すると考えられる明らかな変化はなかった。対照群を含めたすべての投与群で、投与部位及びカテーテルを挿入していない血管に軽微から軽度の内皮肥厚が認められた。数例の動物では、この所見は対照群及び被験物質投与群にみられた軽微から軽度の炎症性細胞、カテーテル周辺の軽微から中等度の血栓形成あるいは低頻度の壁在血栓に伴って誘発されていた。これらの所見は投与操作に関連したものと考えられた。軽微から軽度の血管周囲のリンパ球浸潤、軽微から中等度の肺胞組織球増加あるいは出血、並びに軽微から重度の限局性又は多発性の肉芽腫が肺にみられたが、それらの重篤度及び出現頻度は対照群と被験物質投与群で同様であった。L-プロリン高用量群の雌で 2 例に軽度から中等度の単一血栓が肺に認められた。この肺でみられた所見は投与操作（静脈内持続投与方法）に関連したものと考えられた。脳組織には変化は認められなかった。その他の病理組織学的変化のう

ち、自然発生又は偶発性の変化は被験物質投与との関連性を示唆しておらず、通常の背景データで一般にみられる変化と考えられた。それらの所見には、限局性又は多発性の小肉芽腫、肝臓の単細胞壊死及び空胞化、尿細管の好塩基球増多、リンパ球浸潤、慢性間質性腎炎、腎臓の皮質嚢胞及び限局性の線維化、皮膚のカテーテル周辺の痂皮又は潰瘍、表皮肥厚、肉芽腫及び慢性限局性炎症、並びに脾臓の髄外造血亢進、限局性リンパ球過形成及び異形症がみられた。

L-プロリンの血清中最高濃度は各測定日の投与最終時に認められ、最高用量を投与した雄で3.1～4.1 mmol/L 及び雌で 2.2～2.8 mmol/L であった。L-プロリンの両投与用量でみられた血清中濃度は連日投与開始前のベースライン値と同程度であり、L-プロリンの蓄積性は認められなかった。予想どおり、毎日の L-プロリンの尿中総排泄量は低いものであった。

結論

ラットに L-プロリン（579 及び 1449 mg/kg/day）を 4 週間連日静脈内投与（7 時間の静脈内持続投与）した結果、良好な忍容性が認められ、毒性を示唆する著しい変化は認められなかった。被験物質投与に関連した唯一の変化は雄の体重増加の軽度な抑制及び摂餌量の軽度な減少であった（統計学的有意差はなし）。

以上より、本試験条件下における L-プロリンの無毒性量は 1449 mg/kg と考えられた。

2.6.6.8.2.2.3.　L-プロリンのビーグル犬を用いた 7 日間静脈内持続投与用量設定試験

表 2.6.7-9、4.2.3.7.7.3 における試験報告書（試験番号 668316）

本試験は、引き続き実施するビーグル犬における 28 日間反復投与毒性試験で適切な用量及び血清中濃度を設定するために実施した。この目的のため、雌雄各 3 例の動物を試験に割り付けた。全動物は手術により埋植したカテーテルを介して反復投与可能な状態とした。1 群当たり雌雄各 1 例の動物を 3 群に割り付け、L-プロリン 0、2170 及び 4350 mg/kg の用量（投与群はそれぞれ第 1 群、第 2 群及び第 3 群、投与速度はそれぞれ 18、9 及び 18 mL/kg/hr）を 7 日間連日で 7 時間静脈内持続投与した。本試験は GLP 適用試験として実施しなかった。

個々の動物については、毎日、投与期間中は少なくとも 1 日 2 回、一般状態の変化及び被験物質投与に関連する反応を観察した。体重は投与前 1 回、投与開始後には day 1、day 4 及び day 8 に測定した。摂餌量は、試験期間中に毎日測定を行った。血液学的検査及び血液生化学的検査の血液サンプルを、全動物について投与前 2 回及び剖検前に採取した。尿検査の尿サンプルを、全動物について投与前 1 回、投与終了時の day 7 に採取した。尿サンプル中の L-プロリン濃度も測定した。トキシコキネティクス用の血液サンプルは、day 1 及び day 7 における数回の採血ポイントに全動物から採取した。投与終了時の day 7 に動物を剖検し、器官重量を測定した。

結果

L-プロリン投与に関連した一般状態の変化はみられなかった。試験期間を通じて、体重及び摂餌量の変化に異常はみられなかった。全動物の血清クレアチニン値に軽度な上昇が認められた。この変化は尿中ナトリウム、カリウム及び塩素の電解質、並びにタンパク質及びクレアチニンの変化と関連していた。全動物に尿量増加も認められた。器官重量に被験物質投与に関連すると考えられた変化はみられなかった。

L-プロリンの血清中最高濃度は day 6 の高用量投与終了時に認められ、16.5 mmol/L（雄）及び 14.5 mmol/L（雌）であった。

結論

L-プロリンを 2170 及び 4350 mg/kg の用量でビーグル犬に 7 日間連日､7 時間静脈内持続投与した結果（投与速度：9 及び 18 mL/kg/hr）、良好な忍容性が認められた。引き続き実施したイヌ 28 日間投与 GLP 毒性試験における投与方法は容認できるものと考えられた。

2.6.6.8.2.2.4.　ビーグル犬を用いた 7 時間静脈内持続投与による 28 日間投与毒性試験及び 14 日間回復性試験

表 2.6.7-10、4.2.3.7.7.4 における試験報告書（試験番号 668321）

本試験では、L-プロリンをビーグル犬（投与開始時に約 5～7 箇月齢）に 28 日間毎日 7 時間静脈内持続投与し毒性を評価し、加えて、14 日間休薬して毒性の回復性についても評価した。本試験では血清中 L-プロリン濃度の測定も併せて実施した。

本試験は GLP 適用試験として実施した。

動物数 26 例（雄: 13 例、雌: 13 例）を、1 群当たり雌雄各 3 例で 3 群に割り付けた。

第 1 群:　対照群（生理食塩液）; 投与速度 18 mL/kg/hr
第 2 群:　L-プロリン 2170 mg/kg/day; 投与速度 9 mL/kg/hr
第 3 群:　L-プロリン 4350 mg/kg/day; 投与速度 18 mL/kg/hr

第 1 群及び第 3 群の雌雄各 2 例のイヌを追加し、2 週間の休薬による回復性について評価した。

全動物は手術により埋植したカテーテルを介して 28 日間連日､歩行可能な状態で 7 時間静脈内持続投与した。

個々の動物については、毎日、投与期間中は少なくとも 1 日 2 回、一般状態の変化及び被験物質投与に関連する反応を観察した｡体重は投与開始 2 週間前より週 1 回測定した｡摂餌量は、投与開始 2 週間前より毎日測定を行った。眼科学的検査は投与前、投与終了時及び回復期間終了時に、心電図検査は投与前に 1 回、day 2 及び day 28 の静脈内持続投与終了前並びに回復期間終了時に検査した。血液学的検査及び血液生化学的検査の血液サンプルを、全動物について

投与前 2 回、day 15、day 29 及び day 43 に採取した。尿サンプルは全動物について、投与前 1 回、剖検前（day 29 又は day 43）に 24 時間尿を採取した。また、尿サンプルを用いて L-プロリン含量を測定した。トキシコキネティクス用の血液サンプルは試験期間中、数回の採血ポイントに全動物から採取した。

28 日間の投与期間終了時又は 14 日間の回復期間終了時に、剖検する予定としていた動物について剖検し、詳細な肉眼観察、器官重量の測定及び病理組織学的検査を行った。剖検は体の開口部（耳介、鼻孔、口、肛門、陰門）及び頭部、胸部及び腹部の組織を含む外観及び内観について詳細に検査した。全動物を剖検し、組織標本を固定後に保存し、病理組織学的検査（脳を含め 40 以上の組織）に供した。

すべての肉眼的病変（病変の種類、位置、大きさ、形、色、性状及び数）を記録した。

結果

途中死亡例は認められなかった。嘔吐を含む一般状態の変化が高用量群（3 群）の数例の動物で認められた。液状便のようなまれな事例は高用量群で、day 36（雄）及び day 37（雌）にみられた。しかし、本事例は回復期間中に認められたものであり、この変化は被験物質投与によるとは考えられなかった。

試験期間を通じて、体重変動に異常はみられなかった。投与期間中、高用量群（第 3 群）全般で摂餌量の減少が認められ、その減少の程度は雄で軽度、雌で軽度から中等度であった。回復期間中の摂餌量には変化が認められなかった。

眼科学的検査及び心電図検査で、被験物質投与との関連が考えられるような変化はみられなかった。

血液学的検査及び血液生化学的検査で被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

尿検査からは、L-プロリン投与に直接関連すると考えられるような尿中パラメータの変化は認められなかった。尿検査で認められた変化のほとんどは、動物に大量の溶液を投与したことによる電解質の生理的不均衡に起因するものと考えられた。この変化は投与前値との比較で、低用量群の 2 群では軽度であったが、全群で尿量の増加が認められた。尿中電解質（UNa、UCl）は 1 群に比べ、2 群及び 3 群で減少した。尿カリウム値は 1 群に比べ、2 群で増加し、3 群で減少した。しかし、投与前値との比較では、全群の電解質の値は著しく減少した。2 群の尿中クレアチニン値は 1 及び 3 群の値の約 2 倍であったが、投与前値と比較するとかなり低値であった。

尿中クレアチニンの排泄は大量の溶液投与による影響を受けなかった。

L-プロリン投与によると考えられる器官重量の変化はみられなかった。しかし、雄の高用量群（第 3 群）で精巣の小型化が 3 例に認められた。小型の精巣の 3 例中 2 例が未成熟と記録されたが、これらには被験物質投与との関連性がないと考えられた。

L-プロリン投与に起因すると考えられる剖検所見及び病理組織学的所見は観察されなかった。

L-プロリンの血清中最高濃度は各測定日の投与終了時に認められ、高用量群の雄で 12.3～14.5 mmol/L 及び雌で 11.1～12.8 mmol/L であった。血清中 L-プロリンのトラフ値は毎日の投与前値と同様であり、L-プロリンの蓄積性は認められなかった。L-プロリンの静脈内投与量の 5%未満が尿中に排泄された。

結論

ビーグル犬を用いて L-プロリン 2170 及び 4350 mg/kg を、それぞれ 9 及び 18 mL/kg/hr の投与速度で 28 日間毎日、7 時間の静脈内持続投与を行った結果、良好な忍容性が認められた。病理組織学的検査では被験物質の投与に起因した変化は認められなかった。以上より、本試験における無毒性量は 4350 mg/kg と考えられた。

2.6.6.8.2.3.　L-プロリンの遺伝毒性試験

L-プロリンにニコチンアミド及び L-イソロイシンを加えた混合添加物の構成成分として、L-プロリンの変異原性に関し、包括的に試験結果を集積してきた。これらの試験は、ICH S2B ガイドラインに従い実施した。加えて、L-プロリンの復帰突然変異試験（0.5 mol）及びマウス宿主経由試験（800 mg/kg）では、代謝活性化系の有無に関わらず陰性結果が得られた（Green and Savage, 1978）。

L-プロリンの遺伝毒性及び染色体異常誘発性を以下の試験で検討した。

- 復帰突然変異試験はプレート法及びプレインキュベーション法を用いた［試験番号 22196（[redacted]）及び 49196（[redacted]）］。
- *In vitro* 染色体異常試験（CHO 細胞：試験番号 CLE 1554/3-D5140）
- マウス骨髄を用いる小核試験（試験番号 CLE 1554/4-D5140）

これらの試験成績を要約すると、検討した混合添加物中の L-プロリンが遺伝毒性を示すようなエビデンスはみられなかった。これら 3 種類の添加物の代謝は既知であり、化合物間の相互作用が低いことを考慮すると、これらの試験成績は L-プロリン単一の添加物として試験したものと同様と考えられる。このことは、血清及び構造タンパク質中に豊富に存在する非必須アミノ酸としての L-プロリンの役割と合致している。

2.6.6.8.2.3.1.　ネズミチフス菌を用いる哺乳類ミクロソームのプレート法による復帰突然変異試験

表 2.6.7-11、4.2.3.7.7.5 における試験報告書（試験番号 22196）

プレート法による復帰突然変異試験では、肝代謝活性化系（Aroclor 1254 誘導でラット肝臓より得られた S9 ミクロソーム分画）の存在下及び非存在下で、添加物 8（ロット番号 [redacted]）の変異原性の有無について *S.typhimurium* 菌（5 種類のヒスチジン要求株）を用いて評価した。

本試験は GLP 適用試験として実施した。

初回試験は、被験物質の添加物 8（L-プロリン 120 mmol/L、ニコチンアミド [redacted]mmol/L、L-イソロイシン [redacted]mmol/L、pH [redacted]）を 52～5000 µg/plate の 5 段階の用量で実施した。これらの用量は L-プロリンとして 0.7～69 µg/plate に相当した。2 回目の試験では、用量段階をより狭く 5 段階に設定して実施した（L-プロリンとして 6.8～69 µg/plate に相当する添加物 8 の用量 492～5000 µg/plate に設定）。

TA100 の菌株を用いた予備試験は、代謝活性化系の存在下及び非存在下で、被験物質の毒性評価及び最適用量を設定するために実施した。予備試験に引き続き、5 種菌株（TA98、TA100、TA102、TA1535 及び TA1537）を用いて、代謝活性化系の存在下及び非存在下で本試験を実施した。

結果

添加物 8 は最高 5000 µg/plate（L-プロリンとして 69 µg/plate）までの用量で、代謝活性化系の有無に関わらず細胞毒性を示さず、再現性の良好な状態で統計学的に有意な復帰変異体の増加は認められなかった。全菌株で全濃度について 3 プレートで試験を行った。この結果は、添加物 8 を 5000 µg/plate（L-プロリンとして 69 µg/plate）まで処理した別の 2 回目の試験でも確認された。陰性対照（溶媒：生理食塩液）及び陽性対照物質は両試験で適切な反応を示した。

結論

本試験条件下では添加物 8 に含まれる L-プロリンはプレート法による復帰突然変異試験で変異原性を示さなかった。

2.6.6.8.2.3.2.　細菌を用いたプレインキュベーション法による復帰突然変異試験

表 2.6.7-12、4.2.3.7.7.6 における試験報告書（試験番号 49196）

本試験では、前述の試験（22196）と異なり、復帰突然変異試験のプレインキュベーション法が採用され、培養した細菌及び S9 代謝活性化系の存在下及び非存在下で被験物質を 37℃で約 25 分間、前培養した。本試験法では被験物質のより高用量での試験が可能であった（試験番号 22196 で用いた L-プロリンの最高用量が 69 µg/plate であったのに対して、本試験では L-プロリンの最高用量は 6900 µg/plate）。

復帰突然変異試験では添加物 8（ロット番号 [redacted]：L-プロリン 120 mmol/L、ニコチンアミド [redacted] mmol/L、L-イソロイシン [redacted]mmol/L、pH [redacted]）の変異原性を評価した。5 種類のネズミチフス菌ヒスチジン要求株を用いて、肝代謝活性化系（フェノバルビタール／メチルコラン

トレン混合物を投与したラット肝臓からの S9 ミクロソーム分画）存在下及び非存在下で、2 回の独立した試験で添加物 8 の影響を検討した。試験菌株は TA98、TA100、TA102、TA1535 及び TA1537 を用いた。溶媒は生理食塩液を用いた。

本試験は GLP 適用試験として実施した。

結果

初回試験では、添加物 8 は L-プロリンとして 73～6900 µg/plate の用量で処理した。2 回目の試験では、添加物 8 は L-プロリンとして 679～6900 µg/plate の用量で処理した。各試験では S9 代謝活性化系の存在下及び非存在下にそれぞれ 5 用量を設定し、3 プレートで試験を行った。用量段階は、代謝活性化系の存在下及び非存在下でネズミチフス菌 TA100 を用いて検討した予備試験に基づき設定した。各試験の最高用量は、L-プロリンとして 6900 µg/plate に相当する処理可能な最高用量（添加物 8 として 500 µL/plate）を設定した。

添加物 8 は､両試験で検討した用量範囲でいずれの菌株に対しても細胞毒性を示さなかった。代謝活性化系非存在下では、全菌株に復帰変異体の増加は認められなかった。代謝活性化系存在下では、実施した 2 試験のうちの最初の試験で、L-プロリンの 2208 µg/plate 処理により試験菌株 TA1537 の復帰変異体が統計学的に有意に増加した。この増加（陰性対照群の 2.5 倍）に用量依存性は認められず、再現性もみられなかった。そのため、この変化は変異原性を示すものではないと判断された。両試験では陰性対照群及び陽性対照群ともに適切な反応が認められた。

結論

本試験条件下では、被験物質である添加物 8 はプレインキュベーション法による復帰突然変異試験で変異原性を示さなかった。

2.6.6.8.2.3.3.　培養チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を用いた染色体異常試験

表 2.6.7-13、4.2.3.7.7.7 における試験報告書（試験番号 CLE 1554/3-D5140）

添加物 8（ロット番号 [redacted] : L-プロリン 120 mmol/L、ニコチンアミド [redacted]mmol/L、L-イソロイシン [redacted]mmol/L）について、2 枚の CHO 細胞培養プレートを用いて *in vitro* 細胞遺伝学試験を 2 回の独立した試験として実施した。被験物質は培地で希釈し、検討した L-プロリンの最高濃度は 14.22 mmol/L であった。

本試験は GLP 適用試験として実施し、試験施設の QAU が実施調査を行った。

結果

初回試験では、ラット肝ミクロソーム分画（S9）の存在下及び非存在下で L-プロリンを最大 15 mmol/L まで 3 時間処理し、その後回復として 17 時間培養したが細胞数に明らかな影響を及

ぼさなかった。試験ではL-プロリンの3濃度（8.002、10.67及び14.22 mmol/L）を用いた。L-プロリンは最高濃度14.22 mmol/Lでも、S9の有無に関わらず細胞数に明確な影響を及ぼさなかった。

2回目の試験では、S9非存在下で被験物質を20時間処理し、S9存在下では被験物質を3時間処理し、その後、回復期間として17時間培養した。添加物8の3濃度（L-プロリンの8.002、10.67及び14.22 mmol/L相当）で処理したところ、S9存在下及び非存在下に関わらず、染色体異常を有する細胞の出現頻度は陰性対照群と同程度であった。L-プロリンの14.22 mmol/L処理で細胞毒性がみられ、S9存在下及び非存在下で細胞数はそれぞれ17及び31%減少した。

陰性対照物質で構造異常を有する細胞の出現頻度を調べたところ、背景データの範囲内であり、陽性対照物質（4-nitroquinolone-1-oxide及びシクロフォスファミド）では構造異常を有する細胞数の統計学的有意な増加が認められた。

結論

S9存在下及び非存在下で､L-プロリンとして最大14.22 mmol/Lまでの添加物8を処理した結果、添加物8はCHO細胞で染色体異常を誘発しなかった。

2.6.6.8.2.3.4.　マウス骨髄を用いた小核試験

表2.6.7-14、4.2.3.7.7.8における試験報告書（試験番号CLE 1554/4-D5140）

添加物8（ロット番号[redacted]：L-プロリン120 mmol/L、ニコチンアミド[redacted]mmol/L、L-イソロイシン[redacted]mmol/L）の3用量をマウスに投与し、*in vivo*骨髄小核試験を実施した。添加物8はボーラス静脈内投与用の等張液を用いた。最初に用量設定試験として1群当たり雌雄各3例のマウスに15～20 mL/kgで投与容量を変えて投与し、その結果に基づき本試験の用量を設定した。この初回試験では毒性を示唆する一般状態の変化は観察されず、本試験でも認められなかった。

本試験では、5、10及び20 mL/kg/dayの添加物8を1群8例のCD-1系雄マウスに5日間連続投与した。動物は最終投与24時間後に安楽死させた。陰性対照群には生理食塩液を1日1回、5日間連続で静脈内投与した。陽性対照物質のシクロフォスファミドは生理食塩液に溶解し、40 mg/kgを1群8例の雄マウスに単回静脈内投与し、24時間後に安楽死させた。各動物について、2000個の多染性赤血球の計数を行った。

結果

陽性対照群では、小核を有する多染性赤血球数の平均値は、陰性対照群と比較して統計学的に有意に増加した。陰性対照群では、多染性赤血球/正染性赤血球の比は正常な群平均を示し、小核を有する多染性赤血球の出現頻度は背景データの範囲内であった。添加物8を投与した全

投与群のマウスでも、多染性赤血球/正染性赤血球の比は正常な値を示し、小核を有する多染性赤血球の出現頻度は背景データの範囲内であり、対照群の範囲内であった。

結論

添加物 8 を最高 20 mL/kg（添加物 8 に含まれる L-プロリンの最高投与量：276 mg/kg）でマウスに 5 日間連続投与した結果､骨髄に多染性赤血球の小核は誘発されないと結論づけられた。最高用量は動物愛護上の観点から投与可能な最大量であり､倫理上容認できる用量を設定した。投与経路が静脈内投与であったこと、添加物の性質及び骨髄血液循環流の特性が既知であることから、本試験系では骨髄赤血球が添加物に十分に曝露されたことが示された。

2.6.6.8.2.4.　L-プロリンの生殖発生毒性試験

L-プロリンのラットを用いる胚・胎児発生に関する試験を実施した。受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、出生前・出生後の発生及び母体の機能に関する試験、並びに非げっ歯類を用いる胚・胎児発生に関する試験は以下の観点から実施していない。

- 胚・胎児発生に関する試験において、L-プロリンを 1449 mg/kg の用量で雌ラットに妊娠 6 日から 17 日まで連日静脈内投与した結果、母動物への毒性、胎児毒性及び催奇形性は認められなかった。
- 28 日間投与毒性試験において、投与終了時に剖検したラット及びイヌで、最高用量群でも生殖組織（前立腺、精嚢、精巣、精巣上体、乳腺、腟、子宮、卵巣）に L-プロリン投与に関連した病理組織学的変化が認められなかった。
- L-プロリンはヒトにおいては非必須アミノ酸として体内で内因性に利用されており、生体内で合成され､血清中濃度はフィードバック阻害機構によりコントロールされている。加えて、L-プロリンは IgPro10 と同程度の最高用量で、新生児も含めヒトへの非経口栄養剤として広く使用されている。

2.6.6.8.2.4.1.　L-プロリン及びグリシンのラットにおける連日 7 時間静脈内持続投与による胚・胎児発生毒性試験

表 2.6.7-15、4.2.3.7.7.9 における試験報告書（試験番号 AA30034）

この胚・胎児発生毒性試験では、L-プロリン及びグリシンをラットの器官形成期に静脈内持続投与した際の胚・胎児発生に及ぼす影響を評価した。

本試験は GLP 適用試験として実施した。

被験物質：L-プロリン（ロット番号: [redacted]）

試験には 1 群 25 例、3 群の交配した SD 系雌ラットを使用した。1 群には生理食塩液（妊娠 6 日から 17 日まで連日静脈内持続投与）、2 群にはグリシン（300 mmol/L 水溶液）、3 群には L-

プロリン（300 mmol/L 水溶液）を投与した。投与容量 42 mL/kg（グリシン: 945 mg/kg、L-プロリン: 1449 mg/kg）を妊娠 6 日から 17 日まで 1 日 7 時間、静脈内持続投与した。投与容量は、生理食塩液を投与した場合に影響が発現しないと考えられる投与可能な最大容量を設定した。被験物質投与後、残りの 1 日 17 時間、生理食塩液を静脈内持続投与した（0.4 mL/hr）。

トキシコキネティクス測定のためのサテライト動物にも投与を実施した（対照群 2 例、被験物質投与群各 4 例）。

主な評価パラメータとして、罹患率/死亡率、一般状態、体重（妊娠 0、6、11、15、18 及び 20 日）及び摂餌量（妊娠 0～6、6～11、11～15、15～18 及び 18～20 日）を設定した。妊娠 20 日に動物を安楽死させた。剖検時に、妊娠の有無、黄体数、子宮内着床の数と分布、胎児体重及び性別を記録した。個々の胎児について外表欠損を確認した。各母動物の胎児で約半数について内臓異常を確認した後､内臓を摘出した｡内臓を摘出した検体を用いて骨格検査を行った。残りの約半数の胎児は内臓検査のために保存した。

以降、グリシンに関する試験結果及び考察については省略した。

結果

L-プロリンを投与した動物には死亡例はみられず、投与に関連した一般状態の変化も認められなかった。いずれの群に対しても、体重及び摂餌量に投与の影響はみられなかった。各群ともに 25 例中 24 例の雌動物が帝王切開時に妊娠していた（表 2.6.6-4）

表 2.6.6-4　妊娠 SD ラットに連日で 7 時間静脈内持続投与後の L-プロリンの影響

群			対照群		L-プロリン投与群	
投与量			0		1449 mg/kg/day	
母動物	妊娠動物数		24		24	
	評価した妊娠動物数		24		24	
同腹児	母獣当たりの算術平均	黄体数	13.5		14.7	
		着床数	12.0		13.0	
		生存児数	10.2		11.5	
		死亡児数	0		0	
		吸収胚数	1.7		1.5	
		胎児体重（g）	雄 3.9	雌 3.7	雄 4.0	雌 3.7
	胎児性別（%）		雄 51	雌 49	雄 51	雌 49

これらすべての雌動物には、対照群の雌 2 例で胎児がいなかったことを除き、生存児が認められた。着床前データは対照群と L-プロリン投与群の間で差は認められなかった。着床後データのうち平均胎児重量及び雌雄比には、被験物質投与による影響は認められなかった。母動物の剖検では特記すべき肉眼的変化は認められなかった。いずれの群でも胎児死亡は認められな

かった。L-プロリン投与群では外表、内臓及び骨格検査で投与の影響と考えられる異常は認められなかった。

L-プロリンを投与した雌動物の妊娠 6 日及び 17 日の平均最高血清中濃度は、それぞれ 3.53 及び 2.57 mmol/L であった。妊娠 6 日における平均最高血清中濃度は妊娠 17 日よりも高く、ベースラインの最大約 9 倍に増加した。血清中の L-プロリンに蓄積は認められなかった。

結論

L-プロリン（300 mmol/L）を 42 mL/kg/day の投与容量で 1 日 7 時間の静脈内持続投与を行ったところ、母動物への毒性、胎児毒性及び催奇形性は認められなかった。したがって、母動物への毒性、胎児毒性及び催奇形性に関する無影響量は、L-プロリンの連日投与の場合で 1449 mg/kg/day と推定された。

2.6.6.8.2.5.　L-プロリンの神経毒性試験

2.6.6.8.2.5.1.　L-プロリン及びグリシンの行動及び生理状態への影響

表 2.6.7-16、4.2.3.7.7.10 における試験報告書（試験番号 1657/ZLB/02）

L-プロリン及びグリシンの行動及び生理状態への影響を検討するため、SD 系雄ラット（試験開始時体重：195～340 g）における 5 日間投与神経毒性試験（Irwin 試験）を実施し、最初の 4 日間は L-プロリン又はグリシンを連日で 7 時間持続静脈内投与し、5 日目には約 3 時間静脈内持続投与し、行動、生理状態及び体温への影響を調べた。

以降、グリシンに関する試験結果及び考察については省略した。

Irwin 試験は、げっ歯類における症状観察、自律神経系機能及び感覚運動機能、痙攣状態及び興奮性の測定などの神経生理状態を評価する標準化された観察法及び検査法であり、静脈内持続投与中に実施される検査として用いた。本試験は GLP 適用試験として実施した。

被験物質：L-プロリン低用量群における濃度 120 mmol/L（ロット番号: [redacted]）
（生理食塩液で 300 mOsm/L に調整）
L-プロリン高用量群における濃度 300 mmol/L（ロット番号: [redacted]）

1 群 10 例の雄ラットを 4 群［無処置群、溶媒対照群（生理食塩液）、被験物質投与 2 群（低用量群及び高用量群）］に配し試験に使用した。被験物質は 5 日間連日投与された。無処置群を除く投与群の投与容量は、最初の 4 日間には 42 mL/kg/day、5 日目には 18 mL/kg/day とした。L-プロリンの低及び高用量は、最初の 4 日間でそれぞれ 579 及び 1449 mg/kg/day とした。無処置群には実験に使われていない動物を使用し、溶媒対照群には生理食塩液を投与容量 42 mL/kg/day 又は 18 mL/kg/day で投与した。

結果

L-プロリン投与群の動物の典型的な行動に僅かな変化が認められたが、これらの変化は溶媒対照群で観察された行動と比較して統計学的に有意ではなかった。また、L-プロリンの反復投与により、投与 5 日後に体温上昇が認められ、その変化は溶媒対照及び無処置対照群と比較して統計学的に有意であった。

結論

本試験において、臨床試験における 1 日最高用量の 5 倍に相当する用量で L-プロリンを投与したところ、投与に関連する行動の変化はみられなかった。したがって、L-プロリンは、IgPro10 製剤に 250 mmol/L の濃度で含有する添加物として適切であると考えられた。

2.6.6.8.2.5.2.　L-プロリンをラットに単回で皮下及び腹腔内投与した場合の薬物動態試験

表 2.6.7-17、4.2.3.7.7.11 における試験報告書（試験番号 PSR 08/06）

L-プロリンを CD 系雌ラット（体重：195～223 g）に皮下及び腹腔内投与した単回投与薬物動態試験を実施し、急性神経毒性の臨床徴候をスコア化して評価した。本試験では L-プロリンが血漿中に高濃度存在する場合の急性神経毒性を評価した。本試験は盲検及び非無作為下でコントロールされた試験とした。

試験は GLP 適用試験として実施しなかった。

被験物質:

L-プロリン（低用量）: 2.0 mol/L（ロット番号 [redacted]、2100 mOsm/L）

L-プロリン（高用量）: 4.0 mol/L（ロット番号 [redacted]、4240 mOsm/L）

塩化ナトリウム溶液（対照）: 2.2 mol/L 塩化ナトリウム（ロット番号 [redacted]、[redacted] mOsm/L）

1 群 6 例の雌動物を 5 群に配し使用した。L-プロリン低用量の皮下投与群、L-プロリン低及び高用量の腹腔内投与群、対照群として塩化ナトリウム溶液の皮下投与群及び腹腔内投与群とした。

投与容量は全群で 8.7 mL/kg とした。低用量群及び高用量群に対する L-プロリンの投与量はそれぞれ 2 及び 4 g/kg とした。

神経毒性評価及び採血のため、各群を 3 例ずつの 2 サブグループに分けた。神経毒性を含む一般状態の評価及び血液サンプル採取は交互に実施され、一方のサブグループでは投与前（ベースライン）、投与後 15 分、1 時間、4 時間及び 24 時間に、他方のグループでは投与前（ベー

スライン）、投与後 30 分、2 時間及び 8 時間に行った。一般状態は発作及び痙攣のような急性神経毒性の徴候に関して特記した。

結果

試験期間中に途中死亡はみられなかった。

L-プロリンの皮下投与：

急性神経毒性の徴候を含め、L-プロリン投与に起因する一般状態の変化は認められなかった。

対照群（塩化ナトリウム溶液）の動物に認められた主な一般状態の変化は、ほとんどの動物で投与時に観察された発声と左後肢の一過性の筋緊張及び投与後 4～8 時間にみられた投与部位の脱毛であった。

L-プロリンの腹腔内投与：

L-プロリンの低・高用量及び塩化ナトリウム溶液を投与した動物に認められた主な一般状態の変化は、投与時及び投与後に観察された発声と後肢の一過性の強い筋緊張であった。L-プロリン投与群では、ある程度用量相関性のある脱糞が観察されたが、その他の一般状態の変化はほとんどみられなかった。溶媒対照群では主にその他の一般状態の変化が観察された。

L-プロリンの皮下投与後のトキシコキネティクス：

L-プロリン溶液投与後の平均血漿中濃度は、170 µmol/L から投与後 15 分の平均血漿中最高濃度である 11990 µmol/L まで 70 倍に増加した。血漿中 L-プロリンの消失速度は速く（半減期：1.5 時間）、L-プロリン投与後 8 時間で投与前の濃度に戻った。対照群の塩化ナトリウム溶液の投与では、L-プロリンの血漿中濃度に特に変化は認められなかった。

結論

発作のような急性神経毒性を示唆する臨床徴候は認められなかった。本試験で L-プロリンを 2 g/kg で皮下投与した場合に一般状態の変化がみられなかったことは、L-プロリンを 1 日に 7 時間以上かけて静脈内投与した Irwin 試験の成績を裏付けている。本試験で L-プロリンの投与により得られた血漿中濃度は、以前実施した静脈内持続投与での試験結果よりもかなり高かった。対照群を含む全群の動物で投与後短時間に同等な一般状態の変化が認められた。これらの変化は、対照群の動物にも観察されたため、L-プロリン投与による影響とは考えられない。L-プロリンの腹腔内投与群に認められた脱糞は皮下投与群では観察されなかったが、この症状は L-プロリンの最高血漿中濃度と関連がみられなかったため、投与経路あるいは投与液の浸透圧による影響と考えられた。

2.6.6.8.2.5.3.　幼若動物における水迷路試験

最近実施された試験において、高用量の L-プロリンを新生児ラットに数週間連日投与したところ、Morris 水迷路課題試験（Bavaresco et al. 2005；Delwing et al. 2006a）及びその他の行動薬

理試験（Shanti et al. 2004）の成績に悪影響を及ぼすと報告されたことから、L-プロリンの幼若ラットにおける急性神経毒性の臨床徴候について、CIDP の IVIG 投与スケジュールを組み込んだ Morris 水迷路課題試験で追加検討した。当該試験では、比較対照物質としてグリシン（以降、詳述しない）及び溶媒対照として生理食塩液を用いた。新生児ラットには非常に強いシナプス形成が認められることから、新生児ラットを使用動物として選択した。当該試験は 2 パートに分けて実施され、一つは急性神経毒性の評価（試験番号 PSR 01/07）及び PK 評価（試験番号 PSR 03/07）を含む児の飼育と被験物質投与、もう一つは学習及び記憶検査（試験番号 ZLB 06_006）である。

2.6.6.8.2.5.3.1.　幼若ラットに L-プロリン及びグリシンを単回皮下投与した場合の薬物動態試験

表 2.6.7-18、4.2.3.7.7.12 における試験報告書（試験番号 PSR 03/07）

PSR 01/07（2.6.6.8.2.5.3.2）では投与期間中での水迷路課題への影響を検討し、急性神経毒性について評価したが、その試験計画に従い、L-プロリンを単回皮下投与した時の薬物動態に関する情報を得るため、幼若ラットを用いた薬物動態試験を実施した。

本試験は GLP 適用試験として実施しなかった。

被験物質: L-プロリン溶液 2 mol/L（ロット番号 [redacted]）

本試験では PSR 01/07 試験の代替動物を使用し、26 日齢の雄ラット 24 例を 1 群当たり 8 例の 3 群に割り当てた。体重当たり等モル用量（16.4 mmol/kg）の L-プロリン（1.9 g/kg）、グリシン（1.2 g/kg）、又は対照群として生理食塩液を単回皮下投与した。成熟ラットより得られたデータと直接比較する目的で、投与前（ベースライン値、2 例/群）、投与後 15 分（3 例/群）及び 4 時間（3 例/群）に、L-プロリン及びグリシンの血漿中濃度を測定するために眼窩叢より採血した（動物 1 例当たり 1 サンプル）。動物は採血後直ちに安楽死させた。血液サンプルは血漿分離後、測定まで-20℃で保存した。

L-プロリン投与群の血漿中濃度は、投与前では対照群と同一レベルであったが皮下投与後に急速に上昇し、15 分で L-プロリンは約 15 mmol/L のレベルに到達した（表 2.6.6-5）。投与後 4 時間では、血漿中濃度は L-プロリン投与群で約 16%に低下した。

表 2.6.6-5　L-プロリン皮下投与後の血漿中濃度推移（平均値±標準偏差、n=2～3／時点）

時間（分）	L-プロリン濃度（mmol/L）	
	生理食塩液	L-プロリン
ベースライン	0.25 ± 0.004	0.27 ± 0.04
15	0.28 ± 0.04	14.6 ± 1.4
240	0.24 ± 0.006	2.6 ± 0.16

L-プロリンの最高血漿中濃度は、本試験では幼若雄ラットで 15 mmol/L であり、成熟雌ラットで 12 mmol/L であったことから（試験番号 PSR 08/06、4.2.3.7.7.11）、両者に差は認められなかった。L-プロリンの血漿からの消失は幼若ラットで僅かに遅かった。成熟ラット及び幼若ラットでの血漿中濃度は、投与後 15 分にほぼ同程度の最高に達し、投与後 4 時間に、それぞれ 9%及び 16%に低下した。本試験結果は、成熟に伴い L-プロリンの代謝及び排泄が増加するという Moreira らの報告を裏付けるものである（Moreira et al. 1989）。

L-プロリンのクリアランスは速やかと考えられたため、反復投与での実質的な蓄積性は、PSR 01/07 試験で実施した少なくとも 8 時間間隔では認められない可能性が高かった。

2.6.6.8.2.5.3.2.　幼若ラットを用いた L-プロリン及びグリシン投与による Morris 水迷路行動に及ぼす影響－投与期間中－

表 2.6.7-19、4.2.3.7.7.13 における試験報告書（試験番号 PSR 01/07）

本試験の目的は、1) Moreria らが以前実施した研究に基づき L-プロリン及びグリシン投与によるラットへの影響を調べること、及び 2) 急性神経毒性に関する一般状態の変化をスコア化することであった。

本試験は GLP 適用試験として実施しなかった。

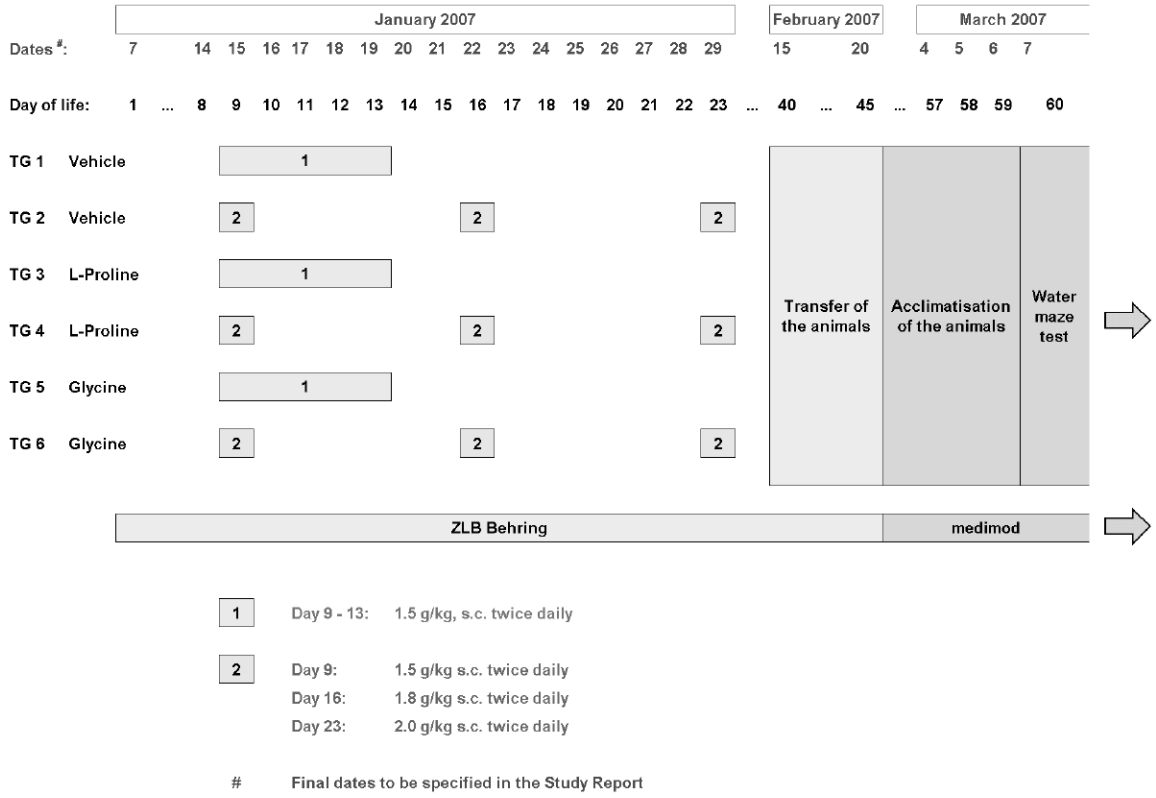
合計 144 例の Wistar 系雄ラットを用い、対照群を含む 6 群とした。

L-プロリン、グリシン及び生理食塩液を出生後早期に当たる生後 9 日から 23 日の間に皮下投与した。次の 2 種類の投与スケジュールが選択された。スケジュール“1”では、L-プロリン 1.5 g/kg（皮下投与）及びグリシン 1.0 g/kg（皮下投与、13.0 mmol/kg）を 1 日 2 回、生後 9 日から 13 日まで 5 日間連続投与した。5 日間連日投与は CIDP 患者に IVIG を静脈内投与した場合の導入期間を想定して実施した。スケジュール“2”では、CIDP 患者への IVIG 適用（維持療法）を想定し、生後 9 日に L-プロリン 1.5 g/kg 及びグリシン 1.0 g/kg（13.0 mmol/kg）を 1 日 2 回、生後 16 日に L-プロリン 1.8 g/kg 及びグリシン 1.2 g/kg（15.6 mmol/kg）を 2 回、生後 23 日に L-プロリン 2.0 g/kg 及びグリシン 1.3 g/kg（17.4 mmol/kg）を 2 回、非連続的にそれぞれ皮下投与した。このような漸増投与方法は、動物の加齢に伴い血漿中 L-プロリンのクリアランス増加により生じる投与量の不足分を補うために選択した。各投与日の 2 回の投与は 8 時間間隔で行った。2 種類の投与スケジュールの詳細を図 2.6.6-1 及び表 2.6.6-6 に示した。以降、グリシンに関する試験成績は省略した。

表 2.6.6-6　投与群構成

No.	投与群	スケジュール	投与量 (g/kg)	投与容量 (mL/kg)	例数 (雄)
1	生理食塩液	1	－	6.5	24
2	生理食塩液	2	－	6.5、7.8 及び 8.7 （生後 9、16 及び 23 日）	24
3	L-プロリン（2 mol/L）	1	1.5	6.5	24
4	L-プロリン（2 mol/L）	2	1.5、1.8 及び 2.0 （生後 9、16 及び 23 日）	6.5、7.8 及び 8.7	24
5	グリシン（2 mol/L）	1	1.0	6.5	24
6	グリシン（2 mol/L）	2	1.0、1.2 及び 1.3 （生後 9、16 及び 23 日）	6.5、7.8 及び 8.7	24

図 2.6.6-1　試験スケジュール



被験物質：L-プロリン溶液 2 mol/L、ロット番号：[redacted]

各群に割り当てた 24 例の新生児ラットを各々12 例ずつ､2 例の乳母動物とともに 2 群に分けた。

Morris の水迷路試験を行うため、1 群 16 例のラットを外部の試験受託機関（CRO）に送付した。試験計画書に従い、十分な動物数を確保するため、追加動物にも投与した。生後 37 日の学習検査に供するため、無作為に選抜した動物を CRO に送付した（試験番号 ZLB06_006、2.6.6.8.2.5.3.3）。

生後 19 日に 2、4 及び 6 群から無作為に選抜した合計 24 例の動物を、薬物動態評価（試験番号 PSR 03/07）を実施するために送付した。これらのデータは 2.6.6.8.2.5.3.1 に示した。

結果

スケジュール“1”に従い、生理食塩液、L-プロリンを 5 日間連続投与した動物では、投与期間を通じて急性神経毒性の徴候を含め、一般状態の変化は認められなかった（表 2.6.6-7）。

スケジュール“2”に従い、生理食塩液、L-プロリンを生後 9、16 及び 23 日に投与した動物では、投与期間を通じて急性神経毒性の徴候を含め、一般状態の変化は認められなかった（表 2.6.6-7）。

表 2.6.6-7　急性神経毒性に関する徴候（投与直後のスコア）

時間（生後日数）		生理食塩液	L-プロリン
スケジュール 1	スケジュール 2		
9（初回投与）		異常なし	異常なし
9（2 回目投与）		異常なし	異常なし
	9（初回投与）	異常なし	異常なし
	9（2 回目投与）	異常なし	異常なし
10（初回投与）		異常なし	異常なし
10（2 回目投与）		異常なし	異常なし
11（初回投与）		異常なし	異常なし
11（2 回目投与）		異常なし	異常なし
12（初回投与）		異常なし	異常なし
12（2 回目投与）		異常なし	異常なし
13（初回投与）		異常なし	異常なし
13（2 回目投与）		異常なし	異常なし
	16（初回投与）	異常なし	異常なし
	16（2 回目投与）	異常なし	異常なし
	23（初回投与）	異常なし	異常なし
	23（2 回目投与）	異常なし	異常なし

スケジュール“2”の初回投与日（生後 9 日目）及び 2 回目投与日（16 日目）の初回投与時に、投与直後の局所刺激性に関する所見はいずれの群でも認められなかった。スケジュール“2”の 2 回目投与日（16 日目）には、生理食塩液投与による一般状態の変化は観察されず、忍容性が認められた。2 回目投与後、L-プロリン投与群の数例の動物に局所刺激性の症状が認められた。投与に関連して、16 例中 10 例の動物で投与部位の脱毛がみられた（片側性 : 8 例、両側性 :

2 例、それぞれ直径約 2～4 mm)。さらに、皮膚の赤色化（16 例中 4 例）及び局所の腫脹（16 例中 2 例）が認められた。すべての動物は動物搬送日までには症状が回復した。

3 回目投与日には、局所刺激性の症状は全投与群で認められなかった。この予期しない症状が観察されたことを受け、スケジュール“1”で使用した動物を再検討した。これらの動物に対する投与は、再検討の 3 日前に終了していた。生理食塩液を投与した動物では一般状態の変化はみられなかった。L-プロリンを投与した 16 例中 6 例の動物にはこの時点で、直径約 2～3 mm の局所の脱毛が片側性で 16 例中 4 例、両側性で 16 例中 2 例に認められた。両側性の脱毛が認められた 1 例の投与部位に局所的に小さな腫脹が認められた。これらの動物は完全に回復した。

結論

幼若ラットに L-プロリンを 5 日間連続投与又は間歇投与を行ったが、急性神経毒性の徴候は認められなかった。

この投与スケジュールに関わらず 2 mol/L の L-プロリン溶液を頻回皮下投与すると、数例の動物に局所刺激性の症状が観察された。最も頻繁にみられた所見は片側性又は両側性に発現した投与部位の脱毛であり、皮膚の赤色化と局所の腫脹も認められた。臨床徴候について詳細な検査に必要な集中的な干渉を行ったものの、ラットの防御反応は誘発されなかったため、これらの徴候は疼痛を伴わないことが示唆された。生理食塩液を投与した動物では、そのような徴候は発現しなかったため、これらの変化は被験物質投与と関連したと考えられた。しかし、総合的に判断すると、これらの徴候は軽微から中等度であり、一過性の変化であった。

2.6.6.8.2.5.3.3.　幼若ラットを用いた L-プロリン及びグリシン投与による Morris 水迷路行動に及ぼす影響

表 2.6.7-20、4.2.3.7.7.14 における試験報告書（試験番号 ZLB 06_006）

Morris の水迷路課題は参照記憶と作業記憶の両方の空間記憶評価に用いられる典型的な試験である。

本試験の目的は、Bavaresco らにより作成された実験方法に基づき、幼若動物の参照記憶及び作業記憶の早期ステージ（投与スケジュール 1: 生後 9 から 13 日）又は後期ステージ（投与スケジュール 2: 生後 9、16 及び 23 日）における L-プロリンの影響について Morris の水迷路を用いて検討することであった（Bavaresco et al. 2005)。グリシンは比較対照薬とし、溶媒は陰性対照として設定した。

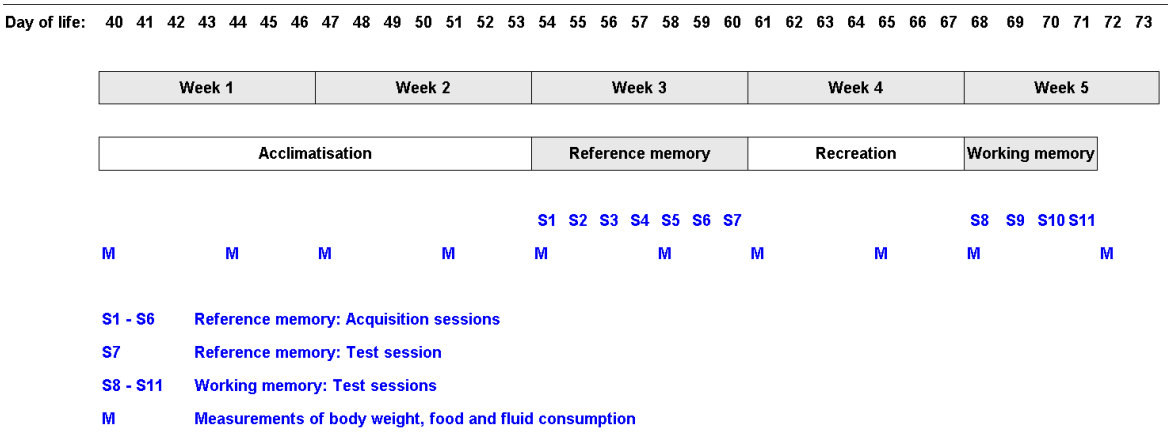
本試験は GLP 適用試験として実施しなかったものの、GLP 基準に近い、CRO の品質管理システムに基づいて実施した。試験は CRO の QAU により実地調査された。

L-プロリン、グリシン及び溶媒は、2.6.6.8.2.5.3.2 及び図 2.6.6-1 に示したように、生後 9 日から 23 日の間に 2 種類の投与スケジュールで、ラットに投与した。生後 27 日にすべてのラット

は乳母動物から隔離された。動物を無作為に 1 ケージ当たり 4 例ずつに分け、1～2 群には 1 群 4 ケージ、3～6 群には 1 群 6 ケージを配した。3～6 群の各群 2 ケージをバックアップの目的で無作為に選択した。本試験（2.6.6.8.2.5.3.3）の最後のステップを実施するために各群 16 例の動物を生後 40～45 日の間に CRO に輸送し、そこで水迷路課題の学習試験を実施した。

参照記憶（Reference memory）の最終試験時期は生後 60 日であった（記憶獲得時期；生後 54～59 日）。作業記憶（Working memory）の試験は生後 68～71 日に実施した（図 2.6.6-2）。

図 2.6.6-2　試験スケジュール



試験群：

すべての群には、初めに 16 例を設定した。各群 16 例中 12 例を行動試験のために選抜した。動物の選択は健康状態を判断した上で実施した（特に、不規則に間隔が開いた歯又は不正咬合）。不規則に間隔が開いた歯又は不正咬合歯を有する動物は以下のとおりであった。

早期投与の対照群: 1 例
後期投与の対照群: 1 例
早期投与の L-プロリン群: 4 例
後期投与の L-プロリン群: なし
早期投与のグリシン群: 3 例
後期投与のグリシン群: 3 例

動物の健康状態と投与前の状態に関連する所見は認められなかった。動物の健康状態に影響がみられないことを確認の上、動物は無作為に選抜された。

動物は次の 6 群に割り当てられた（表 2.6.6-8）。

表 2.6.6-8　試験群

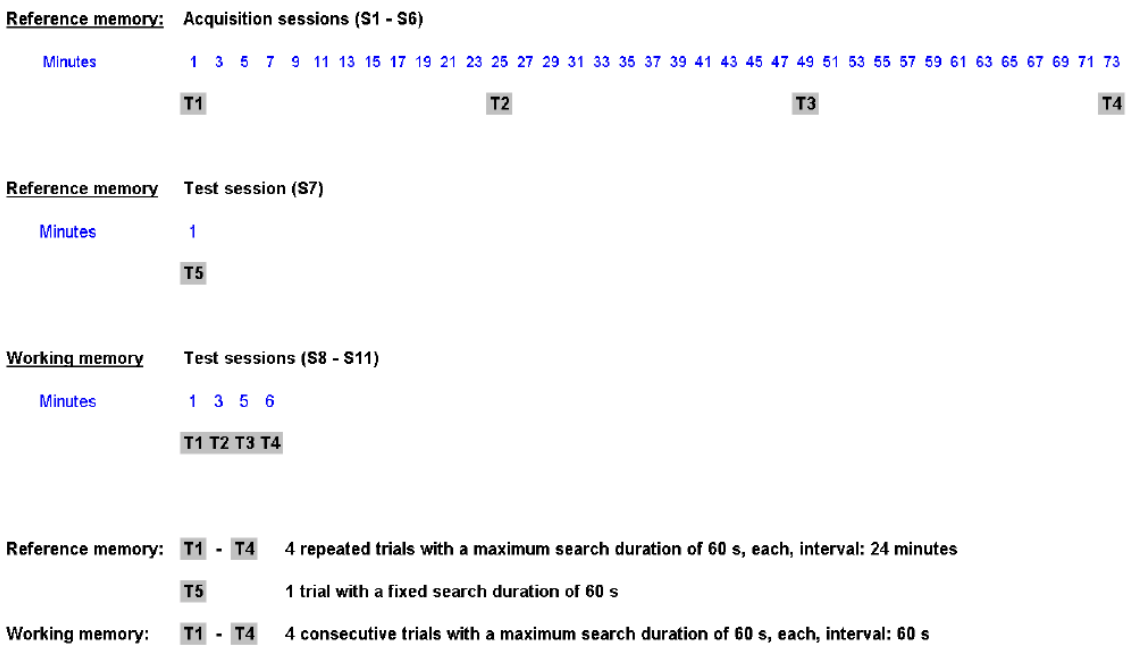
試験群	前処置			解析に使用した動物数		
	被験物質	スケジュール	投与群	参照記憶の獲得（S1-S6）	参照記憶（S7）	作業記憶（S8-S11）
TG1	溶媒	生後 9～13 日	早期投与の対照群	11	12	12
TG2	溶媒	生後 9、16 及び 23 日	後期投与の対照群	11	12	12
TG3	L-プロリン	生後 9～13 日	早期投与の L-プロリン群	11	12	12
TG4	L-プロリン	生後 9、16 及び 23 日	後期投与の L-プロリン群	10	12	11
TG5	グリシン	生後 9～13 日	早期投与のグリシン群	11	12	10
TG6	グリシン	生後 9、16 及び 23 日	後期投与のグリシン群	10	12	12
総動物数				64	72	69

試験手順：

水迷路は Bavaresco らの方法と同様に実施した（Bavaresco et al. 2005）。水迷路は黒い円形の水槽からなる（直径 180 cm、高さ 80 cm）。水槽は 21 から 23℃の水で満たし、水深は 35 cm に設定した。水槽は視覚的にほぼ等しく 4 分割した（NE 北東、SE 南東、SW 南西、NW 北西）。黒いプレキシグラス製の踏み台（直径 15 cm）は 1/4 区画の 1 ヵ所の中央に配し、水面下 2 cm になるように設置した（S1−S6 及び S8−S11）。2 つの同じ水迷路を用いて、一日で、全動物を並行して測定し試験した。

行動試験は図 2.6.6-2 及び図 2.6.6-3 に示したとおり実施した。

図 2.6.6-3　行動試験



参照記憶（Reference memory）試験：

記憶獲得の評価方法は 1 日 4 試行（T1−T4）で 6 セッション（S1−S6、6 日間）、さらに、1 試行（T5）として 1 セッション（S7）で構成されている。記憶獲得期における試行間隔は 24 分であった。

記憶獲得期では、ラットは 4 分割された 1 ヵ所の中央に水面下 2 cm に沈められた踏み台を見つけなければならない。全動物に関して、踏み台は常に同じ場所に設置した。個々の試行の間、ラットは 4 ヵ所のスタート場所（N、E、S、W）のうちの 1 ヵ所に、水槽の壁面を向かせて水中に置いた。スタート場所は変更し、獲得日に繰り返し同じ場所からスタートさせなかった。ラットには 1 試行当たり 60 秒間の踏み台を捜す時間を与えた。ラットが 60 秒以内に踏み台を捜し当てた場合、さらに、10 秒間の踏み台で休む時間が与えられた。ラットが 60 秒以内に踏み台を捜し当てることができなかった場合、踏み台に誘導され、10 秒間の踏み台で休む時間が与えられた。セッション（S7）では踏み台が外され、ラットは 60 秒間、踏み台を捜すことになる。

作業記憶（Working memory）試験：

1 日 4 試行（T1–T4）で 4 セッション（S8−S11）を行い、各試行の間隔は 60 秒であった。ラットは 4 分割した水槽の 1 区画に、壁面に向けて静置された。そのラットは 4 分割した中の 1 区画の中央に設置された踏み台を捜さなければならなかった。試行間隔が短いことを除けば、試験の条件は参照記憶試験の試験試行と同一であった。特に、1 日 4 試行の間、踏み台は 4 分

割の常に同じ場所に設置されていた。参照記憶試験とは異なり、踏み台の位置は日ごとに変更した。

動物の行動は水迷路の上部中央に設置したビデオカメラにより記録した。ビデオテープでラットの軌跡を追跡し、座標及び時刻を連続的にデータファイルに記録した。このデータファイルをコンピュータプログラムにより解析した。

以下の主なパラメータを算出した。

- 踏み台（セッション S1−S6、S8−S11）又は除去した踏み台の位置（セッション S7）を発見するまでの潜時
- 踏み台（セッション S1−S6、S8−S11）又は除去した踏み台の位置（セッション S7）に到達するまでの距離
- スタート点と踏み台間の最も短い距離と比較した実際の移動距離の割合（%）（実際の距離/最短距離）

さらに、追加パラメータとして、踏み台への移動距離、踏み台からの離脱後の移動距離、壁に近づいた移動距離、平均速度及び急速に泳いだ距離が算出された。

3 種類の「早期」試験群（TG1、TG3、TG5）及び 3 種類の「後期」試験群（TG2、TG4、TG6）の成績比較は分離一般化線形モデル（GLM）解析で実施された。参照記憶獲得セッション（S1−S6）及び作業記憶試験セッション（S8−S11）の際に、セッションごとの 4 試行の平均値を算出し、統計解析（セッションごとの個別平均値）を実施した。作業記憶試験セッション（S8−S11）の際には、4 試験セッションで行われた個々の試行の平均値を算出し、統計解析（試行ごとの個別平均値）を実施した。両方のケースについて、GLM は 2 種類の要素を含む。第一に独立因子としての投与、第二に従属因子としての時間（繰り返し）が該当する。

参照記憶（S7）試験で測定されたパラメータは、単一因子としての投与を伴う 1 因子 GLM を用いて解析した。

いずれの場合でも、統計学的な有意水準を $p<0.05$（両側検定）とした。

<u>結果</u>

参照記憶／獲得セッション：

参照記憶獲得セッション（S1−S6）で測定されたパラメータで、両方の投与スケジュールの 3 群間に統計学的に有意な変化が認められたものはなかった。

全群の動物が水迷路課題をうまく習得したことを示すすべてのパラメータの中で、時間という要素の意義は予測どおり高かった。Morris の水迷路でみられた参照記憶に関連したパラメータは、最初のセッションから最後のセッションに至るまでには改善した。S1−S6 のセッションでは、踏み台に到達するまでの潜時、移動距離、実際の距離/最短距離がいずれも減少した。踏み台に到達するまでの距離を示すパラメータは増加し、踏み台から離脱後の移動距離は減少した。最初の 3 セッションで、すべての動物は最適水準に到達した。

空間分布のパラメータは僅かに異なった経時変化を示した。最初の 2 つのセッションを実施中、動物は水迷路の中央から相対的に長い距離を移動し、さらに、S3 から S6 までの間に中央で泳ぐ距離は連続的に減少した。水迷路の壁付近での移動距離は逆に増加した。

S1 から S6 までの平均速度は減少し、同時に、急速な泳ぎでの移動距離は同様に S1 から S6 まで減少した。

参照記憶／試験セッション：

参照記憶試験の試験セッション（S7）では、踏み台を取り除いた。パラメータはすべての試験時間、又は踏み台があった位置まで到達した時間が計算された。

2 種類の投与スケジュールとも､3 群間には全試験時間から算出されたパラメータに違いはなかった。すべての動物は 1/4 円の踏み台があった区画で約 60%の時間を費やし、そのほとんどを踏み台があった位置で費やした｡また､全動物が踏み台のあった位置を横切る回数は同じで、踏み台があった位置への平均距離も同様であった。

2 種類の投与スケジュールとも、踏み台があった位置に到達するまでの測定値から算出された主要なパラメータに関して 3 群間に差異は認められなかった。取り除かれた踏み台があった場所を探索する潜時､踏み台があった位置に到達するまでの移動距離及び実際の距離/最短距離は、各投与スケジュールで投与群間に差はなかった。得られた値は先行して実施した習得セッションの値と同様であった。空間選好（例えば、壁付近での移動距離、水迷路の中央での移動距離）について、L-プロリン及び溶媒投与群の間に明らかな差異は認められなかった。

生後 9 から 13 日の L-プロリン投与では動物の遊泳速度は増進した（平均速度及び急速に泳ぐ移動距離)。しかし、その効果は非常に弱く、溶媒投与群の平均速度と比較して差は認められなかった。

作業記憶：

セッション S8−S11 では、踏み台の位置を毎日変更した。そのため、動物はその目標位置を毎日変更しなければならなかった。これは概して 1 試行目では成績不良であったが、続く 2-4 試行目では急速に達成率が上昇した。動物は初回試行で踏み台の位置が変更されていることに気が付いた後、新しい踏み台の位置を捜すことに集中した。

S8−S11 の初回試行では、動物は、踏み台に到着するまでに長時間を要し、実際の距離/最短距離が長く、踏み台まで長距離（実際に踏み台がある位置に到達する距離）を移動して探索精度も低下した。直前の踏み台の位置を確認したことを反映したパラメータ（例えば、直前のセッションで踏み台があった位置を横切る回数等）は初回試行では高値を示していた。試験が進む中で、動物の行動は新しい踏み台の位置を捜すことに向けられた。いずれのパラメータに関しても時間への大幅な影響はこの学習による影響を反映していた。

2 種類の投与スケジュールとも、L-プロリン及び溶媒投与群の間には、動物の探索成功に関するパラメータについて差は認められなかった。

2 種類の投与スケジュールとも、L-プロリン及び溶媒投与群の間には、平均速度及び速く泳いでいた移動距離に関するパラメータについて差は認められなかった。

結論

Bavaresco らの方法に従った今回の Morris 水迷路課題（Bavaresco et al. 2005）の実験方法では、3 回の記憶獲得セッションを行った後、記憶獲得の成功が最適なレベルであることを確認した上で、6 回の記憶獲得セッションを行うもので、参照記憶の評価を行うにあたって良好な学習成果を示してきた。L-プロリン投与群では（投与スケジュールに係らず）、参照記憶の獲得に影響を及ぼさなかった。

セッション S7 では、すべての動物は踏み台があった 1/4 円の区画で積極的な探索行動を行って長時間を費やした。L-プロリンの投与は、探索強度（踏み台が取り除かれた 1/4 円の区画にいた時間又は踏み台があった位置の通過）に対して著明な影響を及ぼさなかった。取り除かれた踏み台があった場所を探索する潜時、その場所に到達するまでの距離及びその場所まで最短ルートで移動した場合の距離といった、水迷路課題で評価される主な成功関連のパラメータに対して、投与の影響に差はみられなかった。

踏み台の場所を毎日変更して行った作業記憶を調べる試験では、L-プロリン前投与の影響を受けなかった。踏み台の新しい場所を探索する潜時、踏み台に到達するまでの距離、すなわち、踏み台までの最短距離に対して実際に移動した距離といった成功関連のいずれのパラメータにも、試験群間で差は認められなかった。

したがって、Bavaresco ら（Bavaresco et al. 2005）の方法に従い、本試験で参照記憶及び作業記憶について検査した結果、L-プロリン投与群を含む全群の動物は参照記憶の獲得に成功し、良好な成績を示した。L-プロリンの異なる投与スケジュールでも参照記憶の獲得、参照記憶及び作業記憶に対して負の影響を及ぼさなかった。

本試験における補足的パラメータでみられた差は、そのほとんどは統計学的に軽微かつ量的にも僅かであり、投与スケジュールの結果と解釈するには十分とは言えなかった。

2.6.6.8.2.6.　L-プロリン：公表文献

2.6.6.8.2.6.1.　Morris 水迷路課題における慢性高プロリン血症による記憶障害誘発

公表文献: Bavaresco et al. 2005

ラットの脳発達期間中、Morris の水迷路を用いて L-プロリンの反復投与試験を実施した。前述した試験（Moreira et al. 1989）と同一用量の L-プロリンをラットの生後 6～28 日に、8 時間間隔で 1 日 2 回皮下投与したところ、L-プロリンは投与後 1 時間で最高血漿中濃度 12.2～14.4 mmol/L に達し、投与後 6 時間には 1.3～2.6 mmol/L まで減少した。生後 60 日齢のラットを用いて水迷路試験を実施した。L-プロリンを投与したラットでは記憶獲得期の 5 日間で踏み台を見つけること及びその位置を覚えることに関する能力低下の傾向がみられた。また、それらの動物では踏み台を見つけ出すのに、5 日間以上の試行で計算した平均潜時が有意に高値を示した。これは、踏み台を発見するまでの時間に群間差はなかったとする探索的試験の結果を反映しなかった。同様に、L-プロリン投与群の動物は、踏み台があった位置を通過する頻度は対照群よりも少なかったものの、踏み台があった区画で費やす時間及びその区画を通過して反対側の区画で費やす時間には差はみられなかった。最終的に、作業記憶試験に関しては、L-プロリンを投与した動物は踏み台を発見する能力が低下することが示された。これらの結果より、高プロリン血症と関連した神経学的機能低下の一部と説明できるかもしれないと結論づけられている。

本文献での L-プロリン投与量（1 日 2 回、23 日間連日投与により L-プロリンの平均最高血清中濃度が高値を示した）は、IgPro10 の添付文書案（1 日 1 回、最長 5 日間連日投与）に従い患者に投与する場合の L-プロリンの用量、又は IgPro10 の海外臨床試験での L-プロリンの用量（L-プロリンの平均血清中濃度が毎日一過性に上昇したが、最高濃度は本文献の 1/4 であった；Hagan et al. 2012）とは同等ではない。

2.6.6.8.2.6.2.　回避及び非回避課題におけるラット行動に及ぼすプロリン投与の影響

公表文献: Moreira et al. 1989

上記の報告（Bavaresco et al. 2005）と同用量の L-プロリンを、ラットの生後 6～28 日に、10 時間間隔で 1 日 2 回連日皮下投与した。用量は生後 6～13 日の 1.5 g/kg から生後 22～28 日の 2.1 g/kg まで、ラットの日齢に応じて漸増した。L-プロリンの薬物動態パラメータの算出及びラットの行動薬理試験を実施した。

投与 1 時間後に L-プロリンの血漿中平均濃度は最高値（12.2～14.4 mmol/L）に達し、投与 6 時間後には 1.3～2.6 mmol/L に低下した。血漿中での L-プロリンの半減期は 66～102 分であった。脳全体の L-プロリンの組織中濃度は血漿中と比較して増加の程度がかなり小さかったが、

ほぼ同様の動態を示した。脳組織 100 g 当たりの L-プロリン含量は、投与前値の約 2.5 倍に増加した。投与 1 週間後及び 1 ヵ月後に行動薬理試験を実施した。L-プロリンは抑制性回避課題の成績には影響を及ぼさなかったが、オープンフィールド馴化課題では軽度の成績低下が報告された。

2.6.6.8.2.6.3. ラット脳のアラニンアミノトランスフェラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ及び酸性ホスファターゼ活性に及ぼすプロリンの影響

公表文献: Shanti et al. 2004

離乳前後ラットの生後 15～39 日に、上記の Moreira らの報告と同用量の L-プロリンを 1 日 2 回連日皮下投与した。L-プロリン投与により、急性の動作緩慢及び反応性低下が発現した。L-プロリン投与により､生後 40 日におけるミトコンドリア及び細胞質のアラニンアミノトランスフェラーゼが著しく阻害されたが､ミトコンドリアでの阻害は全脳領域で認められたのに対し、細胞質での阻害は嗅葉及び大脳新皮質でのみ認められた。アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼも小脳を除く脳の全領域で阻害された。ラットの尾を 5 秒以上保持すると痙攣が発現した。病理組織学的変化については、適切な評価をするために十分に詳細な説明が文献中にないが、検査をした脳の全領域（嗅葉、大脳、小脳、延髄）において神経細胞体及び神経線維の壊死性変化がみられ、細胞体の萎縮、空胞化及び残屑の蓄積を伴うと報告された。対照群ではこのような変化は報告されなかった。細胞体変化は L-プロリン投与の結果生じたと報告されたが、これに類似した細胞の暗色化は正常な脳の浸漬固定においてもアーチファクトとして生ずることがあると予想されるため、本文献で報告された病理組織学的所見に疑問の余地があると考えられる。

2.6.6.8.2.6.4. *In vivo* 及び *in vitro* におけるラット脳の数種の酸化ストレスパラメータに及ぼすプロリンの影響

公表文献: Delwing et al. 2003a

酸化ストレスはいくつかの神経変性疾患の発症に関与する重要な因子であるため、*in vivo* で L-プロリンを単回及び反復投与したときのラットの大脳皮質における酸化ストレス、並びに 29 日齢のラットの大脳皮質ホモジネートに *in vitro* で L-プロリンを曝露したときの酸化ストレスについて、各種パラメータを検討した。分析したパラメータは、化学発光法（過酸化脂質の測定)、総ラジカル捕捉抗酸化パラメータ（TRAP）（総非酵素的抗酸化防御)、並びに抗酸化酵素であるカタラーゼ（CAT)、グルタチオンペルオキシダーゼ（GSH-Px）及びスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）の活性であった。

L-プロリンを単回投与した結果､有意な化学発光強度の上昇及び TRAP の低下がみられたが、反復投与ではこれらのパラメータの変化はなかった。さらに、*in vitro* において、高プロリン血症患者の組織中濃度（0.5～1.0 mmol/L）と同程度の濃度の L-プロリンを脳組織に曝露したとき、

化学発光強度の上昇及び TRAP の低下がみられた。L-プロリンの単回投与により、抗酸化酵素のうち CAT 活性が有意に低下したが、SOD 及び GSH-Px 活性は変化しなかった。L-プロリンの反復投与により CAT 活性が有意に上昇し、GSH-Px 活性が低下したが、SOD 活性は変化しなかった。また、*in vitro* においてインキュベーション液に L-プロリンを添加した場合、CAT、GSH-Px 及び SOD 活性は変化しなかった。

以上のデータより、L-プロリンは *in vivo* 及び *in vitro* において酸化ストレスを誘発し、高プロリン血症患者で認められる脳の機能不全に関与している可能性があると結論づけられた。

2.6.6.8.2.6.5. ラット大脳皮質におけるプロリンによる酸化ストレスの誘発

公表文献: Delwing et al. 2003b

幼若ラットの大脳皮質における化学発光強度、TRAP、並びに CAT、GSH-Px 及び SOD 活性等の酸化ストレスパラメータに及ぼす L-プロリン単回投与の影響を *in vivo* 及び *in vitro* で検討した。生後 10 日のラットに 12.8 µmol/g の L-プロリン又は同容量の生理食塩液（対照群）を単回皮下投与し、1 時間後に大脳皮質を摘出して直ちにアッセイを行った。*In vitro* 試験では、生後 10 日の未処置ラットから摘出した大脳皮質のホモジネートを L-プロリン（3.0 µmol/L～1.0 mmol/L）とともに 37°C で 1 時間インキュベートした。L-プロリンを投与したラットでは、TRAP の低下（30%）及び化学発光強度の上昇（78%）が認められた。一方、CAT、GSH-Px 及び SOD 活性は、L-プロリンの単回投与により変化しなかった。さらに、高プロリン血症患者の組織中濃度（0.5～1.0 mmol/L）と同程度の濃度の L-プロリンをインキュベーション液に添加することにより、化学発光強度の上昇並びに TRAP 及び SOD 活性の低下がみられたが、CAT 及び GSH-Px 活性は変化しなかった。以上より、L-プロリンは脳において酸化ストレスを誘発すると結論づけられた。

2.6.6.8.2.6.6. プロリン投与により惹起される脳の酸化障害に対する抗酸化剤の保護効果

公表文献: Delwing et al. 2005a

新生児ラットの大脳皮質の酸化ストレスパラメータに及ぼす L-プロリンの単回及び反復投与の作用に対して、ビタミン E 及び C がどのような影響を与えるかについて検討した。試験デザインは、同著者によって公表された以前の報告と同様であった。単回投与試験では、ラットにビタミン E 及び C を 1 週間、連日腹腔内投与し、最終投与の 12 時間後に 18.2 mmol/kg の L-プロリンを単回投与した。反復投与試験では、Moreira らの方法（Moreira et al. 1989）に準じて L-プロリンの投与量を経時的に漸増させ、ラットの生後 6～28 日に、10 時間間隔で 1 日 2 回連日皮下投与した。ビタミン E 及び C は、L-プロリンの単回投与による CAT 活性の低下を抑制し、また、L-プロリンの反復投与による CAT 活性の上昇及び GSH-Px 活性の低下を抑制した。

2.6.6.8.2.6.7.　ラット海馬のシナプス細胞膜の Na^+, K^+-ATPase 活性に対するプロリンの阻害作用に酸化ストレスが関与する証拠

公表文献: Franzon et al. 2003

L-プロリンによる海馬の Na^+、K^+-ATPase 阻害作用に対して、ビタミン E 及び C がどのような影響を及ぼすかについて、生後 5 日のラットを用いて検討した。ビタミン E 及び C 又は生理食塩液を 1 週間、連日腹腔内投与した後、最終投与の 12 時間後に 12.8 mmol/kg の L-プロリン又は生理食塩液を単回皮下投与し、その 1 時間後にラットを安楽死させた。L-プロリンを投与したラットでは Na^+、K^+-ATPase 活性が低下し、ビタミン E 及び C の前投与により、この作用が抑制された。*In vitro* において、1 mmol/L の L-プロリンはラット海馬のシナプス細胞膜の Na^+、K^+-ATPase 活性を 30%阻害した。海馬ホモジネートを抗酸化剤のグルタチオン（GSH）、フリーラジカルスカベンジャーの trolox、又は一酸化窒素シンターゼ阻害剤の N-ニトロ-L-アルギニンメチルエステル（L-NAME）のそれぞれ単独、又は L-プロリンとともに処理した場合、GSH のみが L-プロリンの Na^+、K^+-ATPase 阻害作用を抑制し、これ以外では Na^+、K^+-ATPase 活性に変化はなかった。以上より、*in vivo* 及び *in vitro* における L-プロリンの Na^+, K^+-ATPase 阻害作用はフリーラジカルが媒介している可能性があると結論づけられた。

2.6.6.8.2.6.8.　ラットの慢性的高プロリン血症によって惹起される記憶障害に対する α-トコフェロール及びアスコルビン酸の抑制効果

公表文献: Delwing et al. 2006a

ラットを用いる Morris 水迷路試験の成績に及ぼす慢性的高プロリン血症の影響に対して、α-トコフェロール及びアスコルビン酸がどのような作用を示すかについて検討した。Moreira らの方法（Moreira et al. 1989）に準じて、ラットの生後 6～28 日に、L-プロリン（試験群）又は等液量の生理食塩液（対照群）を 10 時間間隔で 1 日 2 回連日皮下投与した。L-プロリン投与群のラットの半数には、生後 6～28 日に α-トコフェロール（40 mg/kg）及びアスコルビン酸（100 mg/kg）も連日腹腔内投与した。L-プロリンの用量は、最初の 8 日間は 12.8 mmol/kg とし、以後ラットの日齢とともに漸増させ、最後の 7 日間は 18.2 mmol/kg とした。生後 60 日に水迷路試験を実施した。参照記憶試験において、L-プロリンの反復投与群では生理食塩液投与群と比較して、記憶獲得潜時の延長並びにプローブテストで踏み台があった位置での遊泳時間及び横切った回数で示される空間学習成績が低下した。作業記憶試験においても、L-プロリン投与により踏み台を発見する成績が低下した。L-プロリンとともに α-トコフェロール及びアスコルビン酸を反復投与したラットでは、上記の L-プロリンの作用が抑制されたことから、L-プロリンの作用には酸化ストレスが関与していることが示唆された。

2.6.6.8.2.6.9. ラット大脳皮質のアセチルコリンエステラーゼ活性に対するプロリンの阻害作用

公表文献: Delwing et al. 2003c

幼若ラットの大脳皮質のアセチルコリンエステラーゼ（AChE）活性に及ぼすL-プロリンの作用を *in vivo* 及び *in vitro* において検討した。また、L-プロリンの作用に対するビタミンE及びCの影響を検討した。生後12日のラットに12.8 mmol/kgのL-プロリン又は生理食塩液を単回皮下投与し、1時間後に安楽死させた。他の試験では、生後5日のラットにビタミンE及びCを1週間、連日腹腔内投与し、最終投与の12時間後に12.8 mmol/kgのL-プロリン又は生理食塩液を単回皮下投与した。

L-プロリンを投与したラットの大脳皮質のAChE活性は有意に低下し（25%）、ビタミンE及びCの前投与によりこの作用が抑制されたことから、L-プロリンによるAChE活性阻害作用には酸化ストレスが関与していることが示唆された。生後12日のラットの大脳皮質ホモジネートを用いた *in vitro* 試験においても、L-プロリンはAChE活性を抑制し、ビタミンEはこの作用を抑制することが示された。

2.6.6.8.2.6.10. ラットのアセチルコリンエステラーゼ及びブチリルコリンエステラーゼ活性に及ぼす高プロリン血症の影響

公表文献: Delwing et al. 2005b

生後29日のラット大脳皮質のAChE及びブチリルコリンエステラーゼ（BuChE）活性に及ぼすL-プロリンの急性毒性及び反復投与毒性を *in vivo* において検討した。反復投与試験におけるビタミンE及びCの反復投与による前投与、又は単回投与試験におけるビタミンE、ビタミンC、L-NAME若しくはメラトニンの前投与が、AChE活性に対するL-プロリンの作用にどのような影響を与えるかについて検討した。単回投与試験では、L-プロリンを単回投与し、1時間後に安楽死させた。反復投与試験では、Moreiraらの方法（Moreira et al. 1989）に準じて、ラットの生後6～28日の期間に用量を漸増させて1日2回連日皮下投与し、最終投与の12時間後に安楽死させた。L-プロリンの単回投与により、生後29日のラットの大脳皮質AChE活性が32%低下し、この低下はビタミンE及び／又はCの前投与により抑制された。また、L-プロリンの単回投与により、生後29日のラットの血清中BuChE活性が22%増加した。これに対し、L-プロリンの反復投与ではAChE又はBuChE活性は変化しなかったことから、L-プロリン単回投与後の反応は一過性のものであり、蓄積性変化ではないことが示唆された。

2.6.6.8.2.6.11. プロリンによるラット血清中のヌクレオチド加水分解の変動

公表文献: Delwing et al. 2006b

本試験の目的は、血清中でのヌクレオチドの加水分解に及ぼすL-プロリンの影響を *in vivo*（単回及び反復投与）及び *in vitr*o において検討することであった。単回投与試験では、生後29日

のラットに 18.2 mmol/kg の L-プロリン又は対照として生理食塩液を単回皮下投与し、1、3 又は 12 時間後に安楽死させた。L-プロリンの単回投与 1 時間後にアデノシン三リン酸（ATP）（42%）及びアデノシン二リン酸（ADP）（49%）の加水分解が減少したが、投与 3 又は 12 時間後には加水分解の変動は認められなかった。

反復投与試験では、Moreira らの方法（Moreira et al. 1989）に準じて、ラットの生後 6～28 日に、L-プロリンを 10 時間間隔で 1 日 2 回連日皮下投与し、最終投与の 3 又は 12 時間後に安楽死させた。反復投与では、最終投与の 3 時間後に ATP（15%）及び ADP（32%）の加水分解が減少したが、12 時間後のヌクレオチド加水分解に影響は認められなかった。

血清中のヌクレオチドの加水分解に及ぼす L-プロリン（3.0 µmol/L～1.0 mmol/L）の影響を *in vitro* において検討した結果、1.0 mmol/L の L-プロリンは ATP（45%）、ADP（55%）及びアデノシン一リン酸（49%）の加水分解を有意に増加させた。

2.6.6.8.2.6.12. プロリンによる脳のシトクロムＣオキシダーゼ阻害作用及び抗酸化剤によるその抑制

公表文献: Delwing et al. 2007

L-プロリンがエネルギー代謝を変化させ、この変化は酸化ストレスにより惹起されるという仮説を検証するため、ラット大脳皮質のシトクロム C オキシダーゼ活性に及ぼす L-プロリンの影響を *in vivo*（単回及び反復投与）及び *in vitro* において検討した。単回投与試験では、生後 29 日及び 60 日のラットに 18.2 mmol/kg の L-プロリンを単回投与し、1 時間後に安楽死させた。反復投与試験では、Moreira らの方法（Moreira et al. 1989）に準じて、ラットの生後 6～28 日に、L-プロリンの用量を漸増させて 1 日 2 回連日皮下投与し、最終投与の 12 時間後（生後 29 日）又は 31 日後（生後 60 日）に安楽死させた。L-プロリンを単回投与した結果、生後 29 日及び 60 日のラットの大脳皮質シトクロム C オキシダーゼ活性が有意に低下した。一方、L-プロリンの反復投与により、シトクロム C オキシダーゼ活性は生後 29 日においてのみ低下し、生後 60 日には低下は認められなかった。L-プロリンの単回投与前、又は反復投与と同時に α-トコフェロール及びアスコルビン酸を投与することにより、L-プロリンによるシトクロム C オキシダーゼ阻害効果が有意に抑制された。また、*in vitro* において L-プロリンを 3.0 µmol/L～1.0 mmol/L 添加してもシトクロム C オキシダーゼ活性は変化しなかった。以上の結果から、L-プロリンのシトクロム C オキシダーゼ阻害作用には酸化ストレスが関与している可能性が示唆された。

2.6.6.8.2.6.13. L-プロリンのラット海馬ニューロンに対する毒性

公表文献: Nadler et al. 1988

L-プロリン及び D-プロリンを SD 系雄ラットの海馬体背部に投与した。1 週間後、ラットの脳を採取しホルマリン固定したのち、連続冠状切片を作製した。切片は、細胞質の障害程度を観察するためにクレシルバイオレットで染色した。

L-プロリン（400 nmol）投与により、投与部位近辺のニューロンが損傷を受けたが、海馬体の外側及び中隔海馬線維に損傷は認められなかった。興奮性アミノ酸のアンタゴニストであるキヌレン酸塩はL-プロリンとの併用投与により、そのようなニューロンの障害を顕著に抑制した。D-プロリン（400 nmol）は興奮性が非常に弱く、その投与により最低限の障害しか観察されなかった。

したがって、L-プロリンは脳に存在する興奮性神経毒性物質のリストに加えるべきであり、その興奮性神経毒性は、高プロリン血症に係る神経障害や認知障害と関連する可能性があると結論づけられている。

2.6.6.9. 考察及び結論

人免疫グロブリン製剤は免疫学的活性を有し、外来物反応性抗体を含むため、ヒトに外挿できない作用が動物で誘発される可能性があることから、人免疫グロブリン製剤を動物モデルに用いて試験することには限界がある。そのため、IgPro10 の毒性評価は局所刺激性のみに限定した。ウサギの局所刺激性試験 2 試験において、IgPro10 を皮下投与、静脈内投与、動脈内投与及び静脈周囲投与した結果、IgPro10 は忍容可能な局所刺激性を示した。

IgPro10 製剤は安定化剤として L-プロリンを含有する。L-プロリンは、もう一つの IgG 市販製剤であるハイゼントラ及び非経口栄養剤の有効成分としてに既に使用されている。IgPro10 製剤では、L-プロリンはこれらの市販製剤での 1 日当たりの用量よりも高い用量で適用される予定である。そのため、CSLB 社は IgPro10 の開発中及び IVIG の初期の開発計画中に得られた情報に基づき、L-プロリンの毒性プロファイルを検討した。

L-プロリンの 4 週までの反復投与毒性試験を実施した。反復投与毒性試験の最長期間（28 日間）は、L-プロリンの短い半減期及び IgPro10 の臨床試験（IgPro10 の 1 日当たり最高用量 1 g/kg）における投与方法から妥当であると考えられる。成熟動物を用いるほとんどの非臨床試験では、IgPro10 の予定される臨床適用を反映した最も適切な投与経路として、静脈内投与を選択した。1 日 7 時間の静脈内持続投与も、臨床適用方法及び IgPro10 の高用量を患者に投与することから使用した。

ラット及びイヌは、L-プロリンがこれらの動物種及びヒトで質的及び量的に同様な PK を示すことから適切な動物種であると考えられた。

ラットにおける 5 日間及び 28 日間反復投与毒性試験では、L-プロリンを投与可能な 1 日最高用量まで静脈内持続投与した結果、明らかな毒性を示さなかった。両試験における L-プロリンの無毒性量は最高用量の 1449 mg/kg/day と推定された。したがって、L-プロリンのヒトにおける最高用量（IgG を 1 g/kg で投与した場合 L-プロリンは 288 mg/kg 含有）と比較して、ラットの最高用量での安全域は 5 倍と推定された。イヌにおける 7 日間及び 28 日間反復投与毒性試験では、L-プロリンを 1 日最高用量まで静脈内持続投与した結果、明らかな毒性を示さなかった。両試験における L-プロリンの無毒性量は最高用量の 4350 mg/kg と推定された。したがって、

L-プロリンのヒトにおける 1 日最高用量（288 mg/kg）と比較して、イヌの最高用量での安全域は 15 倍と推定された。

前述の試験におけるトキシコキネティクスデータにより、L-プロリンの最高血清中濃度は、ラットでは雄で 3.1～4.1 mmol/L 及び雌で 2.2～2.8 mmol/L、また、イヌでは雄で 12.3～14.5 mmol/L 及び雌で 11.1～12.8 mmol/L であった。これらの最高血清中濃度を、臨床試験（試験番号 ZLB03_003CR、Hagan et al. 2012）で IgG の 1000 mg/kg/day を投与した免疫性血小板減少性紫斑病（ITP）の患者 57 名から得られた点滴静注前後での L-プロリンの平均血清中濃度の差である 2.8 mmol/L と比較すると、安全域はラットの雄で 1.3 倍及び雌で 0.9 倍、また、イヌの雄で 4.8 倍及び雌で 4.3 倍であった。

ラット及びイヌにおける反復投与毒性試験における 28 日間の最長投与期間は､動物及びヒトに投与された際の L-プロリンの半減期が非常に短いことから妥当であると考えられた。この妥当性は、ウサギの 90 日間投与毒性試験における無影響量は 320 mg/kg/day（Kotera et al. 1982）、ラットの 90 日間混餌投与試験における無毒性量が雄で 2772.9 mg/kg/day､雌で 3009.3 mg/kg/day であったとの文献情報（Tada et al. 2010）から裏付けられる。

CSLB 社で実施した一連の遺伝毒性試験では、混合添加物 8 に含まれる L-プロリンは遺伝毒性を示さなかった。3 種類の添加物は代謝が既知であり化合物間の相互作用が弱いことを考慮すると、これらの試験成績は L-プロリン単一の添加物としての結果とみなせると考えられた。

L-プロリンのみを用いたラット胚・胎児発生に関する試験（試験番号 AA30034）では、L-プロリン 1449 mg/kg/day を投与しても催奇形性及び胚毒性は認められなかった。この用量は当該試験での最高用量であり、無影響量と推定された。したがって、L-プロリンのヒトにおける最高用量（288 mg/kg）と比較して、ラットでの安全域は 5 倍と推定された。当該試験における血清中 L-プロリン濃度は、妊娠 6 日では 3.53 mmol/L 及び妊娠 17 日では 2.57 mmol/L であったため、前述の臨床試験で IgG の 1000 mg/kg/day（CIDP 患者における臨床試験と同一用量）を投与した ITP 患者から得られた初回点滴静注前後での L-プロリンの平均血清中濃度の差である 2.8 mmol/L と比較すると、安全域は 0.9～1.3 倍であった。

いくつかの研究報告（例 : Bavaresco et al. 2005 ; Delwing et al. 2003a ; 2003b ; Nadler et al. 1988）では、発達中の脳への L-プロリンの過剰負荷及びプロリン誘発性の興奮性神経毒性に関する脆弱性の問題を検討している。これらの試験で神経毒性の徴候及び神経化学的変化が認められた。CSLB 社は、L-プロリンの高用量を雄ラットに IVIG 適用と同等以上の厳しい条件下で投与した場合の急性神経毒性（Irwin 試験）に関連する臨床徴候を検討した。L-プロリンの平均最高血清中濃度 4.0 mmol/L まで明らかな神経行動学的変化は認められなかった。安全性薬理試験では、L-プロリンのかなり高い濃度を脳に直接投与すると、興奮性神経毒性が誘発されることが示されたことから、雌ラットを用いた単回投与 PK 試験では、L-プロリンの最高 12 mmol/L の平均血漿中濃度を得るのに十分高い用量で単回投与した場合の影響について、急性神経毒性に関連する臨床徴候をスコア化して検討した。その結果、この場合も L-プロリンに特有な毒性徴候は

認められず、初期の公表文献で L-プロリンを非常に高い用量でラットに経口投与した場合に興奮性神経毒性が誘発されなかったとの試験成績と一致していた。さらに、中枢神経系及び発達中の脳に対する高用量の L-プロリンの影響を調べるために、CSLB 社では、公表されている研究（Delwing et al. 2003a ; 2006a ; Bavaresco et al. 2005 ; Moreira et al. 1989）と同様のデザインで、CIDP 患者への臨床適用を想定して L-プロリンを皮下投与した幼若ラットの Morris 水迷路課題試験を実施した。2 つの投与スケジュールを設定し、スケジュール“1”では、CIDP 患者に IVIG を導入投与する最大期間を想定し、L-プロリン 1.5 g/kg を生後 9～13 日、5 日間連続で 1 日 2 回皮下投与した。スケジュール“2”では、CIDP 患者に IVIG を維持投与することを想定して、間歇投与による方法を設定した。L-プロリンを最高 2.0 g/kg まで 1 日 2 回、生後 9、16 及び 23 日のラットに皮下投与した。投与期間中、急性神経毒性の徴候はいずれの投与群にも認められなかった。Morris の水迷路試験は Bavaresco ら（Bavaresco et al. 2005）の試験方法に従って実施し、全群のすべての動物は、参照記憶の良好な獲得及び参照記憶と作業記憶に関する試験での良好な結果を示した。前投与を行った場合でも、参照記憶の獲得、及び参照又は作業記憶に対する負の影響を示唆する所見は認められなかった。要約すると、L-プロリンの 3.0～4.0 g/kg を生後 3 又は 5 日齢のラットに連日曝露しても神経発達に影響を及ぼさなかった。

結論として、IgPro10 及び L-プロリンの非臨床に関する以上の情報は、IgPro10 の安全性及び添付文書（1.8）の内容を裏付けるのに十分であると考えられる。

ピリヴィジェン 10%点滴静注
5 g/50 mL、10 g/100 mL、20 g/200 mL

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.7　毒性試験概要表

CSL ベーリング株式会社

目次

2.6.7. 毒性試験概要表 3
2.6.7.1. 毒性試験：一覧表 3
2.6.7.2. トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表 8
2.6.7.3. トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧 9
2.6.7.4. 毒性試験：被験物質一覧 10
2.6.7.5. 単回投与毒性試験 11
2.6.7.6. 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 11
2.6.7.7. 反復投与毒性試験：重要な試験 11
2.6.7.8. *In Vitro* 遺伝毒性試験 11
2.6.7.9. *In Vivo* 遺伝毒性試験 11
2.6.7.10. がん原性試験 11
2.6.7.11. 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 11
2.6.7.12. 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 11
2.6.7.13. 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 11
2.6.7.14. 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 11
2.6.7.15. 新生児を用いた試験 11
2.6.7.16. 局所刺激性試験 12
2.6.7.17. その他の毒性試験 14
2.6.7.17.1. 不純物に関する試験 14
2.6.7.17.2. 添加物に関する試験 15

2.6.7. 毒性試験概要表

2.6.7.1.　毒性試験：一覧表

表 2.6.7-1　毒性試験：一覧表

被験物質：IgPro10

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses	GLP Compliance	Testing Facility	Study No.	Location	
								Vol.	Section
Local Tolerance	Rabbit New Zealand White [redacted]: NZW	i.v., i.a., p.v.	8 days	**IgPro10:** 51.25 mg IgG/animal applied to right ear	Yes	[redacted]	143.143.482		4.2.3.6.1
Local Tolerance	Rabbit New Zealand White [redacted]: NZW	s.c.	4 days	**IgPro10:** Low dose: 50 mg IgG/animal High dose: 250 mg IgG/kg	Yes	[redacted]	143.143.552		4.2.3.6.2

表 2.6.7-1　毒性試験：一覧表（続き）

被験物質：L-proline

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses	GLP Compliance	Testing Facility	Study No.	Location	
								Vol.	Section
Others Repeat-Dose Toxicity	Rat Sprague Dawley [redacted] SD ([redacted] Caw)	i.v.	5 days	**L-proline**: 579, 1449* mg/kg/day	No	[redacted]	925/034		4.2.3.7.7.1
Others Repeat-Dose Toxicity	Rat Sprague Dawley, [redacted] (SD) [redacted] BR	i.v.	28 days	**L-proline**: 579, 1449* mg/kg/day	Yes	[redacted]	925/035		4.2.3.7.7.2
Others Repeat-Dose Toxicity	Beagle dogs	i.v.	7 days	**L-proline**: 2170, 4350* mg/kg/day	No	[redacted]	668316		4.2.3.7.7.3
Others Repeat-Dose Toxicity	Beagle dogs	i.v.	28 days	**L-proline**: 2170, 4350* mg/kg/day	Yes	[redacted]	668321		4.2.3.7.7.4
Others Reproductive and Developmental Toxicity	Rat Sprague Dawley rat: [redacted] (SD)	i.v.	Days 6 – 17 of gestation	**L-proline**: 1449** mg/kg/day	Yes	[redacted]	AA30034		4.2.3.7.7.9

* NOAEL doses in this study

** NOEL doses in this study

表 2.6.7-1　毒性試験：一覧表（続き）

被験物質：Additive 8

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses	GLP Compliance	Testing Facility	Study No.	Location	
								Vol.	Section
Others Genotoxicity	*S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA102	*In vitro*	-	**Additive 8**: L-proline: 0.7-69 µg/plate	Yes	[redacted]	22196		4.2.3.7.7.5
Others Genotoxicity	*S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA102	*In vitro*	-	**Additive 8**: L-proline: 73-6900 µg/plate	Yes	[redacted]	49196		4.2.3.7.7.6
Others Genotoxicity	Cultured CHO cells	*In vitro*	-	**Additive 8**: L-proline: 8.002, 10.67, 14.22 mmol/L	Yes	[redacted]	CLE 1554/3-D5140		4.2.3.7.7.7
Others Genotoxicity	Mouse [redacted]	*In vivo*	5 days	**Additive 8**: L-proline: 69-276 mg/kg/day	Yes	[redacted]	CLE 1554/4-D5140		4.2.3.7.7.8

Additive 8: [redacted] mmol/L nicotinamide, [redacted] mmol/L L-isoleucine, 120 mmol/L L-proline pH [redacted]

表 2.6.7-1　毒性試験：一覧表（続き）

被験物質：L-proline

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses	GLP Compliance	Testing Facility	Study No.	Location	
								Vol.	Section
Others Neurotoxicity	Rat SD ([redacted])	i.v. 5 days; daily 7-hrs infusions first 4 days, approx. 3 hrs 5th day	5 days	L-proline low dose: 579 mg/kg/day L-proline high dose: 1449 mg/kg/day	Yes	[redacted]	1657/ZLB/02		4.2.3.7.7.10
Others Neurotoxicity and Pharmacokinetics	Rat [redacted]	s.c., i.p. injection	24 hrs	s.c.: 2 g L-proline/kg i.p.: 2 g L-proline/kg, 4 g L-proline/kg	No	ZLB Behring GmbH	PSR 08/06		4.2.3.7.7.11

表 2.6.7-1　毒性試験：一覧表（続き）

被験物質：L-proline

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses	GLP Compliance	Testing Facility	Study No.	Location	
								Vol.	Section
Others Absorption after Single Dose	Juvenile rat Wistar	s.c.	Single dose	L-proline 1.9 g/kg	No	CSL Behring GmbH	PSR 03/07		4.2.3.7.7.12
Others Neurotoxicity in Juvenile Animals	Juvenile rat Wistar	s.c.	Schedule 1: Postnatal days 9-13 (5 days);	Schedule 1: L-proline (2 mol/L): 1.5 g/kg (6.5 mL/kg), 2x daily	No	Treatment phase: CSL Behring GmbH	PSR 01/07		4.2.3.7.7.13
			Schedule 2: Intermittent treatment on postnatal days 9 (low), 16 (medium), 23 (high dose)	Schedule 2: ascending doses L-proline (2 mol/L): 1.5, 1.8, 2.0 g/kg (6.5, 7.8, 8.7 mL/kg), 2x daily	No	Morris water maze: [redacted]	ZLB 06_006		4.2.3.7.7.14

2.6.7.2.　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表

表 2.6.7-2　トキシコキネティクス試験の一覧表

被験物質：L-proline

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study No.	Location	
					Vol.	Section
Absorption after Single Dose	Rats	s.c., i.p.	ZLB Behring GmbH	PSR 08/06		4.2.3.7.7.11
Absorption after Repeated Doses	Rats	i.v.	[redacted]	925/034		4.2.3.7.7.1
Absorption after Repeated Doses*+	Rats	i.v.	[redacted]	925/035		4.2.3.7.7.2
Absorption after Single Dose	Rats	s.c.	ZLB Behring GmbH	PSR 03/07		4.2.3.7.7.12
Absorption after Repeated Doses+	Dogs	i.v.	[redacted]	668316		4.2.3.7.7.3
Absorption after Repeated Doses*+	Dogs	i.v.	[redacted]	668321		4.2.3.7.7.4
Study in Pregnant or Nursing Animals*	Rats	i.v.	[redacted]	AA30034		4.2.3.7.7.9

* Report contains a GLP Compliance Statement.

+ Includes urinary excretion data

2.6.7.3.　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧

表 2.6.7-3　トキシコキネティクス試験成績の一覧

被験物質：L-proline

Daily Dose (mg/kg)	Study No.	Study type	L-Proline : mean C_{max} (mmol/L)		
			Rats	Dogs	Humans
4350 (i.v.)*	668316	repeat dose toxicity, 7 days		16.5 (males)	
				14.5 (females)	
	668321	repeat dose toxicity, 28 days		13.5 (males)	
				11.8 (females)	
2170 (i.v.)*	668316	repeat dose toxicity, 7 days		6.5 (male)	
				4.7 (female)	
	668321	repeat dose toxicity, 28 days		6.2 (males)	
				4.6 (females)	
2000 (s.c.)	PSR 08/06	exploratory	12 (females)		
1900 (s.c.)	PSR 03/07	Juvenile animals	14.6 (males)		
1449 (i.v.)	925/034	repeat dose toxicity, 5 days	4.0 (males)		
1449 (i.v.)	925/035	repeat dose toxicity, 28 days	3.1 - 4.1 (males)		
			2.2 - 2.8 (females)		
1449 (i.v.)	AA30034	reproduction toxicity	2.6 - 3.5 (females)		
579 (i.v.)	925/034	repeat dose toxicity, 5 days	1.6 (males)		
579 (i.v.)	925/035	repeat dose toxicity, 28 days	1.2 - 1.4 (males)		
			1.0 - 1.2 (females)		
288 (i.v.)	ZLB03_003CR	clinical, ITP			3.2 mmol/L**

* only studies with L-proline alone

** The difference between post- and pre-infusion L-proline serum levels was 2.8 mmol/L.

2.6.7.4.　毒性試験：被験物質一覧

表 2.6.7-4　使用ロット

Early batches of L-proline produced in 1995 were from animal source, later batches used in non-clinical studies and all batches used for manufacturing clinical trial material were from plant sources. (For a characterization of impurities please see section 3.2.P.5.5)

Test Article	Batch No.	Purity L-proline (%)	Study No.	Type of Study
IgPro10				
IgPro10	[redacted]	99.8 (IgG: 99)	143'143'482	Local Tolerance
IgPro10	[redacted]	99.8 (IgG: 99)	143'143'552	Local Tolerance
L-proline				
L-proline	[redacted]*	99.9	925/034	Repeat-Dose Toxicity
L-proline	[redacted]*	99.8	925/035	Repeat-Dose Toxicity
L-proline	[redacted]*	99.6	668316	Repeat-Dose Toxicity
L-proline	[redacted]*	99.6	668321	Repeat-Dose Toxicity
Additive 8	[redacted]**	98.6	22196	Genotoxicity
Additive 8	[redacted]**	98.6	49196	Genotoxicity
Additive 8	[redacted]*	99.7	CLE 1554/3-D5140	Genotoxicity
Additive 8	[redacted]*	99.7	CLE 1554/4-D5140	Genotoxicity
L-proline	[redacted]*	99.8	AA30034	Reproductive and Developmental Toxicity
L-proline	[redacted]*	99.9	1657/ZLB/02	Neurotoxicity
L-proline	[redacted]*	-	PSR 08/06	Neurotoxicity
L-proline	[redacted]*	99.6	PSR 03/07	Absorption after Single Dose
L-proline	[redacted]*	99.6	PSR 01/07, ZLB06_006	Neurotoxicity in Juvnile Animals

* plant origin　　** animal source

- Purity of this batch (batch no. [redacted]) was not described in the study report.

2.6.7.5. 単回投与毒性試験

該当試験なし

2.6.7.6. 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

該当試験なし

2.6.7.7. 反復投与毒性試験：重要な試験

該当試験なし

2.6.7.8. *In Vitro* 遺伝毒性試験

該当試験なし

2.6.7.9. *In Vivo* 遺伝毒性試験

該当試験なし

2.6.7.10. がん原性試験

該当試験なし

2.6.7.11. 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

該当試験なし

2.6.7.12. 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

該当試験なし

2.6.7.13. 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

該当試験なし

2.6.7.14. 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

該当試験なし

2.6.7.15. 新生児を用いた試験

該当試験なし

2.6.7.16. 局所刺激性試験

表 2.6.7-5　局所刺激性試験

報告書標題：ウサギを用いた IgPro10 及び生理食塩液の局所刺激性試験

被験物質：IgPro10

Species/ Strain	Method of Administration	Dose	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number	Location in CTD (section)
Rabbit New Zealand White [redacted]	i.v. (group 1), i.a. (group 2), p.v. (group 3)	IgPro10: 0.5 mL/animal applied to right ear Control: 0.5 mL/animal physiological saline applied to left ear	2 males/1 female/group; n=9	All 3 application routes: erythema formation, very slight edema formation, both slightly more pronounced after p.v.	143.143.482	section 4.2.3.6.1

Conclusion:	A single administration of IgPro10 i.v., i.a. and p.v. will be locally tolerated. p.v. administration of IgPro10 may cause slight irritations within the first 24 hrs, which are in a tolerable range.

表 2.6.7-6　局所刺激性試験

報告書標題：ウサギを用いた調整済みのタンパク質溶液の局所刺激性試験（皮下投与後 96 時間観察）

被験物質：IgPro10

Species/ Strain	Method of Administration	Dose (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number	Location in CTD (section)
Rabbit NZW [redacted]	s.c. single injection (low dose) s.c. single infusion over 30 min (high dose)	**IgPro10**: Low dose: 0.5 mL/animal: 50 mg IgG/animal High dose: 2.5 mL/kg : 250 mg IgG/kg **IgPro20**: Low dose: 0.5 mL/animal: 100 mg IgG/animal High dose: 2.5 mL/kg : 500 mg IgG/kg [redacted] Low dose: [redacted] High dose: [redacted] [redacted] Low dose: [redacted] High dose: [redacted] **Beriglobin P**: Low dose: 0.5 mL/animal: 80 mg IgG/animal High dose: 2.5 mL/kg: 400 mg IgG/kg **L-proline** (250 mmol/L, pH 4.8): Low dose: 0.5 mL/animal High dose: 2.5 mL/kg **Controls**: Low dose: 0.5 mL/animal physiological saline High dose: 2.5 mL/kg physiological saline	3/sex/group; n=36	Erythema formation: with [redacted] and IgPro20 (moderate) Edema formation: dose dependent No differences between s.c. bolus and s.c. infusion IgPro10, [redacted]: tolerability similar to negative control and formulation buffer	143.143.552	section 4.2.3.6.2

Conclusion:	All IgPro products tested showed similar or better local tolerability as compared to Beriglobin P when applied at equal volumes. The slight differences observed between test articles could be primarily ascribed to the different protein doses applied with equal volumes of the test articles. Thus IgPro10 was locally better tolerated than the best among all immunoglobulin product tested including IgPro20 (Hizentra). No differences could be identified between genders.

2.6.7.17. その他の毒性試験

2.6.7.17.1. 不純物に関する試験

該当試験なし

2.6.7.17.2. 添加物に関する試験

表 2.6.7-7　反復投与毒性試験（925/034）

報告書標題：L-プロリン及びグリシンのラットにおける 5 日間静脈内持続投与用量設定試験

被験物質：L-proline

Species/Strain:	Rat SD [redacted] SD ([redacted] Caw)	Duration of Dosing:	5 days, 7 hrs/day	Study No.:	925/034
Initial Age:	9 weeks	Duration of Postdose:	None	Location in CTD:	section 4.2.3.7.7.1
Date of First Dose:	[redacted] 20[redacted]	Method of Administration:	i.v. infusion		
		Vehicle/Formulation:	saline/solution	GLP Compliance:	No

Special Features:	None
No Observed Adverse-Effect Level:	L-proline: 1449 mg/kg/day

Toxicokinetics:	Treament with L-proline at a dose of 1449 mg/kg/day caused a transient increase of approximately 12 x baseline levels (4.0 mmol/L). The administration of one amino acid did not significantly influence the serum concentration of the other.

Daily Dose (mg/kg)	0 (control)		579 L-proline		1449 L-proline	
Number of Animals	M: 5	F: 0	M: 5	F: 0	M: 5	F: 0
Noteworthy Findings						
Died or Sacrificed Moribund	0		0		0	
Body Weight	-		-		-	
Food Consumption	-		-		-	
Water Consumption						
Clinical Observation	-		-		-	
Ophthalmoscopy						
Electrocardiography						

表 2.6.7-7　反復投与毒性試験（925/034）（続き）

Daily Dose (mg/kg)	0 (control)		579 L-proline		1449 L-proline	
Number of Animals	M: 5	F: 0	M: 5	F: 0	M: 5	F: 0
Hematology: Eosinophils (%)/day 5	2.1		1.2*		1.4	
Serum Chemistry						
ALAT (IU/L)/day 5	22		24		28*	
Urinalysis						
Organ Weights	-		-		-	
Histopathology	-		-		-	
Additional Examinations						

Conclusion:	No evidence of toxicity in either dose group with L-proline. The high dose level is a NOAEL, i.e. 1449 mg/kg/day for L-proline. Both doses of test articles can be employed in the subsequent 28-day repeat-dose toxicity study.

- = no noteworthy findings

* = p≤ 0.05

表 2.6.7-8　反復投与毒性試験：重要な試験（925/035）

報告書標題：L-プロリン及びグリシンのラットを用いた 28 日間連日 7 時間静脈内持続投与毒性試験及び 2 週間回復性試験

被験物質：L-proline

Species/Strain:	Rat Sprague Dawley rat: [redacted] (SD) [redacted]BR	Duration of Dosing:	28 days 7 hrs/day	Study No.:	925/035
Initial Age:	9 weeks	Duration of Postdose:	14 days	Location in CTD:	section 4.2.3.7.7.2
Date of First Dose:	[redacted] 20[redacted] (M)	Method of Administration:	i.v. infusion		
	[redacted] 20[redacted] (F)	Vehicle/Formulation:	saline/solution	GLP Compliance:	Yes

Special Features:	-
No Observed Adverse-Effect Level:	L-proline: 1449 mg/kg/day

Toxicokinetics:	Maximal serum levels of 3.1 - 4.1 mmol/L and 2.2 - 2.8 mmol/L L-proline were found at termination of the administration on days of measurements at the high dose level for males and females, respectively.　No accumulation of L-proline occurred at both doses as serum concentrations of L-proline were similar to baseline levels during the period before daily administration.

Daily Dose (mg/kg)	0 (control)		579 L-proline		1449 L-proline	
Number of Animals	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10
Noteworthy Findings						
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0
Body Weight gains (g)						
Day 1-8	42.9	16.5	35.5	19.7	35.8	15.9
Day 8-14	31.5	10.1	27.4	11.7	25.8	11.7
Day 1-28	133.2	55.2	120.7	51.1	118.1	50.9
Food Consumption lowered [a)]	-	-	+	-	+	-
Clinical Observation	-	-	-	-	-	-

a) = 4-weeks period

表 2.6.7-8　反復投与毒性試験：重要な試験（925/035）（続き）

Daily Dose (mg/kg)	0 (control)		579 L-proline		1449 L-proline	
Number of Animals	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-
Hematology						
White blood cells (k/mm^3) [a)]	-	6.13	-	7.26	-	7.35
Eosinophils (k/mm^3) [a)]	0.16	0.11	0.24*	0.13	0.14	0.17
APTT (sec) [a)]	27.4	19.2	30.6	20.0	30.2*	18.7
Serum Chemistry: total Cholesterol (g/L) [a)]	0.64	-	0.63	-	0.57	-
Urinalysis: urine volume reduced	-	-	+	-	-	-
Organ Weights	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-
Histopathology	-	-	-	-	-	-
Postdose Evaluations: Number Evaluated	M: 5	F: 5	M: 0	F: 0	M: 5	F: 5

Conclusions:	The only treatment-related changes were slight (not statistically significant) reductions on body weight gain and food consumption, especially in males. Consequently, No Observed Adverse Effect Levels (NOAEL) of 1449 mg/kg/day for L-proline could be established.

- = no noteworthy findings
* = p≤ 0.05
a) = on day 29
+ = present

表 2.6.7-9　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（668316）

報告書標題：L-プロリンのビーグル犬を用いた 7 日間静脈内持続投与用量設定試験

被験物質：L-proline

Species/Strain:	Beagle dogs	Duration of Dosing:	7 days, 7 hrs/day	Study No.:	668316
Initial Age:	7 months	Duration of Postdose:	None	Location in CTD:	section 4.2.3.7.7.3
Date of First Dose:	[redacted] 20[redacted]	Method of Administration:	i.v. infusion		
		Vehicle/Formulation:	saline/solution	GLP Compliance:	No

Special Features:	None
No Observed Adverse-Effect Level:	L-proline: 4350 mg/kg/day

Toxicokinetics:	Peak serum concentrations of 16.5 mmol/L (male) and 14.5 mmol/L (female) were measured on Day 6 at the end of the high dose L-proline administration.

Daily Dose (mg/kg)	0 (control)		2170		4350	
Number of Animals	M: 1	F: 1	M: 1	F: 1	M: 1	F: 1
Noteworthy Findings						
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0
Body Weight	-		-		-	
Food Consumption	-		-		-	
Clinical Observation	-		-		-	
Hematology	-		-		-	
Serum Chemistry	-		-		-	
Urinalysis	-		-		-	
Organ weight	-		-		-	
Gross pathology	-		-		-	

- = no noteworthy findings

Conclusions:	The intravenous (7 hrs) infusion of L-proline at dose levels of 2170 and 4350 mg/kg (infusion rates of 9 and 18 mL/kg/hr) for 7 consecutive days was considered to be well tolerated by Beagle dogs. Some not noteworthy findings in the urinary parameters were considered to be due to the physiological electrolyte imbalance caused by the large volumes administered. The dosing regime was considered acceptable for use on a subsequent 28 day study.

表 2.6.7-10　反復投与毒性試験：重要な試験（668321）

報告書標題：L-プロリン：ビーグル犬を用いた 7 時間静脈内持続投与による 28 日間投与毒性試験及び 14 日間回復性試験

被験物質：L-proline

Species/Strain:	Dog Beagle dog	Duration of Dosing:	28 days 7 hrs infusion/day	Study No.:	668321
Initial Age:	5-7 months	Duration of Postdose:	14 days	Location in CTD:	section 4.2.3.7.7.4
Date of First Dose:	[redacted] 20[redacted]	Method of Administration:	i.v. infusion		
		Vehicle/Formulation:	Water for injection (saline for a controrl group) /solution	GLP Compliance:	Yes

Special Features:	None
No Observed Adverse-Effect Level:	L-proline: 4350 mg/kg/day

Toxicokinetics:	Maximal serum levels of 12.3 - 14.5 mmol/L and 11.1 - 12.8 mmol/L L-proline were found at termination of the administration on days of measurements at the high dose level for males and females, respectively. No accumulation of L-proline in the serum was detected since serum trough levels were similar to baseline before daily administration. Less than 5% of the infused L-proline dose was excreted with urine.

Daily Dose (mg/kg)	0 (control)		2170		4350	
Number of Animals	M: 5	F: 5	M: 3	F: 3	M: 5	F: 5
Noteworthy Findings						
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0
Body Weight gains (kg):						
Day 1-30	0.6	0.6	0.9	0.6	0.6	0.4
Day 30-44 (n=2)	0.6	0.5			0.6	0.6
Food Consumption lowered	-	-	-	-	+	+, ++
Clinical Observation: emesis	(+)[1]	-	-	-	+	+
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography	-	-	-	-	-	-

表 2.6.7-10　反復投与毒性試験：重要な試験（668321）（続き）

Daily Dose (mg/kg)	0 (control)		2170		4350	
Number of Animals	M: 5	F: 5	M: 3	F: 3	M: 5	F: 5
Hematology	-	-	-	-	-	-
Serum Chemistry	-	-	-	-	-	-
Urinalysis:						
urine volume Day 30 (mL)	1041.2	932.0	524.5***	422.8**	959.1	761.5
Urinary creatinine Day 30 (µmol/L)	2925	2451	5436***	5532***	2598	2584
Creatinine Clearance	-	-	-	-	-	-
Organ Weights	-	-	-	-	-	-
Small testes (no. of males)	-		-		3	
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-
Histopathology	-	-	-	-	-	-
Postdose (recovery) Evaluations: Number Evaluated	M: 2	F: 2	M: 0	F: 0	M: 2	F: 2

Conclusions:	The intravenous (7 hrs) infusion of L-proline at dose levels of 2170 and 4350 mg/kg and at infusion rates of 9 and 18 mL/kg/hr, respectively, for 28 consecutive days was considered to be well tolerated by Beagle dogs. Changes in the urinary parameters were considered to be due to the physiological electrolyte imbalance caused by the large volumes administered. Histologically, there were no changes that were indicative of any treatment related effects. The No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) was considered to be 4350 mg/kg.

- = no noteworthy findings

[1] during recovery period　(+) = present

** = p< 0.01

***= p<0.001

+ mild or slight

++ moderate

+++ marked

表 2.6.7-11　*In Vitro* 遺伝毒性試験（22196）

報告書標題：ネズミチフス菌を用いる哺乳類ミクロソームのプレート法による復帰突然変異試験

被験物質：Additive 8

Test of induction of :	Reverse mutations in plate incorporation Ames study		No. of Independent Assays:	2	Study No.:	22196
Strain:	*S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA102		No. of Replicate Cultures:	3	Location in CTD:	section 4.2.3.7.7.5
Metabolizing System:	S9 microsomal fraction from livers of rats treated with Aroclor-1254		No. of Cells Analyzed/Culture:	n.a.		
Vehicles:	For Test Article:	Saline	For Positive Controls:	Saline	GLP Compliance:	Yes
Treatment:	Plate incubation for 48 hrs				Date of Treatment:	[redacted] to [redacted] 19[redacted]
Cytotoxic Effects:	None					
Genotoxic Effects:	None					

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level- (µg Additive 8/plate /µg L-proline/plate) [a]	Revertant colony counts (mean ± SD)				
			TA 98	TA 100	TA 102	TA 1535	TA 1537
Without Activation Study 1	Solvent Additive 8	-/-	18.7 ± 4.62	193.7 ± 12.74	590.7 ± 38.50	16.3 ± 1.53	3.7 ± 2.08
		52/0.7	23.7 ± 7.51	190.3 ± 20.50	522.0 ± 28.51	16.3 ± 3.79	4.0 ± 1.73
		164/2.3	28.7 ± 4.04	212.7 ± 4.73	527.0 ± 60.92	15.0 ± 4.58	2.7 ± 2.52
		512/7.1	24.3 ± 4.51	196.0 ± 12.53	583.7 ± 88.00	17.3 ± 2.08	3.0 ± 2.65
		1600/22	25.7 ± 10.60	195.0 ± 16.52	587.3 ± 29.14	16.0 ± 4.36	4.3 ± 2.08
		5000/69	21.3 ± 2.31	173.7 ± 11.93	524.3 ± 32.25	15.3 ± 6.03	1.3 ± 1.15
Without Activation Study 2	Solvent Additive 8	-/-	26.7 ± 5.86	166.7 ± 21.83	456.3 ± 47.18	32.3 ± 5.51	5.7 ± 2.31
		492/6.8	31.0 ± 8.89	166.0 ± 16.37	446.7 ± 21.22	26.0 ± 7.55	4.7 ± 1.53
		878/12	25.3 ± 9.29	169.0 ± 12.12	504.0 ± 57.56	33.3 ± 6.81	6.7 ± 2.08
		1568/22	29.0 ± 7.21	170.3 ± 10.97	527.0 ± 28.51	31.0 ± 5.57	4.0 ± 1.73
		2800/39	21.7 ± 4.93	165.3 ± 7.23	467.0 ± 48.50	26.7 ± 2.52	5.0 ± 1.73
		5000/69	31.3 ± 6.43	169.0 ± 10.44	476.3 ± 52.84	29.0 ± 6.93	5.7 ± 4.04

表 2.6.7-11　*In Vitro* 遺伝毒性試験（22196）（続き）

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level- (µg Additive 8/plate /µg L-proline/plate) [a]	Revertant colony counts (mean ± SD)				
			TA 98	TA 100	TA 102	TA 1535	TA 1537
With Activation Study 1	Solvent	-/-	37.7 ± 7.57	129.7 ± 28.75	713.7 ± 22.48	9.7 ± 0.58	10.7 ± 5.13
	Additive 8	52/0.7	37.7 ± 3.51	120.0 ± 10.44	671.0 ± 99.86	13.7 ± 5.86	14.7 ± 4.16
		164/2.3	34.0 ± 3.00	131.7 ± 2.08	729.3 ± 104.58	14.7 ± 3.06	9.7 ± 5.03
		512/7.1	28.0 ± 4.00	147.0 ± 16.09	725.7 ± 17.95	14.0 ± 8.19	8.7 ± 3.51
		1600/22	30.0 ± 2.65	134.0 ± 20.07	623.3 ± 86.05	14.7 ± 4.51	14.0 ± 2.00
		5000/69	27.3 ± 7.23	107.3 ± 12.86	703.7 ± 42.74	16.7 ± 3.79	14.7 ± 0.58
With Activation Study 2	Solvent	-/-	35.3 ± 1.15	130.7 ± 25.70	628.0 ± 80.17	19.0 ± 5.00	7.0 ± 5.29
	Additive 8	492/6.8	52.0 ± 2.65 **	131.0 ± 9.64	556.3 ± 29.94	18.7 ± 5.86	15.7 ± 0.58
		878/12	42.3 ± 4.51	140.0 ± 11.53	576.7 ± 23.97	12.7 ± 3.06	11.0 ± 5.00
		1568/22	42.3 ± 8.39	133.7 ± 4.51	633.0 ± 72.58	12.3 ± 3.21	10.0 ± 6.93
		2800/39	38.7 ± 3.79	114.3 ± 5.77	562.3 ± 37.02	14.0 ± 1.73	5.7 ± 1.15
		5000/69	46.0 ± 9.00	114.0 ± 8.72	680.0 ± 92.50	13.0 ± 7.55	10.0 ± 4.58

Results:	In study 2 a statistically significant increase in the number of revertants was observed with strain TA98 at 492 µg/plate (1.47 fold the negative control value). As no increases and no toxicity was observed at higher dose levels this finding is considered to be of no biological relevance. Neither cytotoxicity nor reproducible statistically significant increase in the number of revertants was observed with or without metabolic activation. Positive controls: increase in revertants.

** p≤ 0.01 Dunnett's test　　n.a. not applicable

[a] L-proline doses calculated

表 2.6.7-12　*In Vitro* 遺伝毒性試験（49196）

報告書標題：細菌を用いたプレインキュベーション法による復帰突然変異試験

被験物質：Additive 8

Test of induction of :	Reverse mutations in bacterial cells		No. of Independent Assays:	2	Study No.:	49196
Strain:	*S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA102		No. of Replicate Cultures:	3	Location in CTD:	section 4.2.3.7.7.6
Metabolizing System:	S9 fraction from liver of rats treated with a mixture of phenobarbital and methylcholanthrene		No. of Cells Analyzed/Culture:	n.a.		
Vehicles:	For Test Article:	Saline	For Positive Controls:	Saline	GLP Compliance:	Yes
Treatment:	Pre-incubation for 25 min.				Date of Treatment:	[redacted] to [redacted] 19[redacted]
Cytotoxic Effects:	None					
Genotoxic Effects:	None					

Metabolic Activation	Test Article	L-proline/ Nicotinamide Dose Level- (µg/plate) [a]	Revertant colony counts (mean ± SD)				
			TA 98	TA 100	TA 102	TA 1535	TA 1537
Without Activation Study 1	Solvent Additive 8	-/-	28.3 ± 4.04	131.0 ± 4.36	572.3 ± 26.10	20.7 ± 6.66	2.3 ± 0.58
		73/[redacted]	23.7 ± 10.79	141.0 ± 19.92	574.7 ± 51.48	20.3 ± 3.21	5.0 ± 3.46
		226/[redacted]	21.7 ± 4.62	130.3 ± 12.66	562.0 ± 50.76	17.7 ± 1.53	6.3 ± 3.06
		707/[redacted]	25.0 ± 2.00	129.0 ± 6.56	532.3 ± 52.79	21.3 ± 2.31	4.0 ± 1.73
		2208/[redacted]	28.7 ± 6.66	119.7 ± 17.16	525.7 ± 26.41	14.7 ± 4.04	3.3 ± 2.52
		6900/[redacted]	23.0 ± 2.00	133.0 ± 15.10	558.7 ± 36.47	14.0 ± 2.65	4.0 ± 1.73
With Activation Study 1	Solvent Additive 8	-/-	37.0 ± 5.00	145.3 ± 17.79	768.7 ± 61.03	21.3 ± 3.51	4.0 ± 2.65
		73/[redacted]	33.3 ± 7.09	145.3 ± 19.30	664.3 ± 57.40	17.3 ± 3.06	7.7 ± 1.15
		226/[redacted]	36.3 ± 4.93	154.7 ± 1.53	744.3 ± 46.11	19.0 ± 2.65	6.3 ± 1.15
		707/[redacted]	29.3 ± 7.23	139.0 ± 15.39	646.0 ± 27.62	13.3 ± 2.31	4.0 ± 2.65
		2208/[redacted]	30.3 ± 2.31	125.3 ± 11.37	638.0 ± 34.07	17.7 ± 2.31	10.0 ± 5.00*
		6900/[redacted]	30.0 ± 1.73	133.3 ± 9.71	664.7 ± 67.68	13.7 ± 4.04	8.7 ± 1.53

表 2.6.7-12　*In Vitro* 遺伝毒性試験（49196）（続き）

Metabolic Activation	Test Article	L-proline/ Nicotinamide Dose Level- (µg/plate) [a]	Revertant colony counts (mean ± SD)				
			TA 98	TA 100	TA 102	TA 1535	TA 1537
Without Activation Study 2	Solvent Additive 8	-/-	23.3 ± 5.51	118.7 ± 9.07	473.0 ± 20.42	18.7 ± 6.81	6.3 ± 0.58
		679/[redacted]	20.0 ± 1.00	131.7 ± 13.28	449.3 ± 35.10	18.7 ± 4.04	6.0 ± 3.00
		1212/[redacted]	25.3 ± 1.53	137.0 ± 18.19	431.3 ± 13.28	14.3 ± 3.51	4.0 ± 1.73
		2164/[redacted]	20.3 ± 4.62	132.7 ± 23.03	448.0 ± 69.74	15.3 ± 4.16	4.7 ± 2.52
		3864/[redacted]	20.3 ± 3.21	103.3 ± 9.07	423.3 ± 45.24	14.3 ± 5.77	5.0 ± 2.00
		6900/[redacted]	27.7 ± 8.08	135.0 ± 11.36	423.0 ± 41.58	18.0 ± 2.65	6.7 ± 4.93
With Activation Study 2	Solvent Additive 8	-/-	27.0 ± 4.36	138.3 ± 11.37	583.7 ± 82.12	16.7 ± 7.09	5.0 ± 2.65
		679/[redacted]	23.7 ± 3.51	119.3 ± 9.24	609.7 ± 45.00	17.0 ± 6.56	6.7 ± 0.58
		1212/[redacted]	25.7 ± 2.08	124.0 ± 13.11	580.7 ± 57.05	16.0 ± 2.00	6.3 ± 2.31
		2164/[redacted]	22.7 ± 1.53	118.3 ± 3.79	541.3 ± 19.66	17.7 ± 2.52	6.0 ± 3.00
		3864/[redacted]	21.7 ± 2.31	131.7 ± 5.77	487.3 ± 17.95	16.7 ± 2.08	5.3 ± 2.08
		6900/[redacted]	15.7 ± 8.50	127.0 ± 15.72	545.0 ± 56.56	17.3 ± 8.02	6.3 ± 2.31

Results:	Neither cytotoxicity nor a reproducible statistically significant increase in the number of revertants was observed with or without metabolic activation in the 1st and 2nd experiments. Positive controls: increase in revertants.

[a] Nicotinamide doses indicated in report,　L-proline doses calculated

* p≤ 0.05 Dunnett's test

表 2.6.7-13　*In Vitro* 遺伝毒性試験（CLE 1554/3-D5140）

報告書標題：培養チャイニーズ ハムスター卵巣細胞（CHO）を用いた染色体異常試験

被験物質：Additive 8

Test of induction of :	Chromosome aberrations		No. of Independent Assays:	2	Study No.:	CLE 1554/3-D5140
Strain:	Cultured CHO cells		No. of Replicate Cultures:	2	Location in CTD:	section 4.2.3.7.7.7
Metabolizing System:	Mammalian liver post-mitochondrial fraction (S9)		No. of Cells Analyzed/Culture:	200		
Vehicles:	For Test Article:	Culture medium	For Positive Controls:	DMSO	GLP Compliance:	Yes
Treatment:	1: 3 hrs + 17 hrs recovery period; 2; continous for 20 hrs (without S-9), 3 hrs + 17 hrs recovery (with S-9)				Date of Treatment:	[redacted] - [redacted] 19[redacted]
Cytotoxic Effects:	Cytotoxicity at 14.22 mmol/L					
Genotoxic Effects:	None					

Metabolic Activation	Test Article	L-proline/ Nicotinamide Dose Level- (mmol/L) [a]	Structural aberrations				Numerical aberrations		
			Chr del	Chr exch	Ctd del	Ctd exch	H	E	P
Without Activation Exp. 1	Solvent	-/-	0	0	0	0	0	0	8
	Additive 8	8.002/[redacted]	3	0	2	0	1	0	9
		10.67/[redacted]	1	0	1	0	0	0	9
		14.22/[redacted]	1	0	1	0	0	0	4
	NQO	0.25 µg/mL	12	0	33	43	1	1	5
With Activation Exp. 1	Solvent	-/-	0	1	2	0	1	0	8
	Additive 8	8.002/[redacted]	3	0	0	0	0	0	5
		10.67/[redacted]	3	0	2	0	1	0	11
		14.22/[redacted]	1	0	4	0	1	1	7
	CPA	12.5 µg/mL	66	0	69	52	0	0	10

表 2.6.7-13　*In Vitro* 遺伝毒性試験（CLE 1554/3-D5140）（続き）

Metabolic Activation	Test Article	L-proline/ Nicotinamide Dose Level- (mmol/L) [a]	Structural aberrations				Numerical aberrations		
			Chr del	Chr exch	Ctd del	Ctd exch	H	E	P
Without Activation Exp. 2	Solvent	-/-	0	0	1	0	1	0	1
	Additive 8	8.002/[redacted]	0	0	2	0	0	0	5
		10.67/[redacted]	6	0	1	0	1	0	9
		14.22/[redacted]	2	0	1	0	0	0	6
	NQO	0.25 µg/mL	12	0	43	55	0	0	6
With Activation Exp. 2	Solvent	-/-	2	0	3	0	1	0	4
	Additive 8	8.002/[redacted]	7	0	1	1	1	0	4
		10.67/[redacted]	5	1	3	0	0	0	6
		14.22/[redacted]	3	0	1	0	0	0	5
	CPA	30 µg/mL	49	0	57	58	0	0	8

NQO: 4-Nitroquinoline 1-oxide
CPA: cyclophosphamide
Chr del: Chromosome deletions
Chr exch: Chromosome exchanges
Ctd del: Chromatid deletions
Ctd exch: Chromatid exchanges
H: hyperdiploid (24-32 chromosomes)
E: endoreduplicated
P: polyploid (>32 chromosomes)

Results:	Exp 1: No clear evidence of toxicity. Exp 2: 17% and 31% reductions in cell number in treatment groups with and without S9, respectively at 14.22 mmol/L L-proline.　No genotoxic effects for both experiments at 8.002, 10.67 and 14.22 mmol/L L-proline. Positive controls induced statistically significant increases in the number of cells with structural aberrations. Additive 8 did not induce chromosomal aberrations in cultured CHO cells at concentrations up to 14.22 mmol/L L-proline in the absence or presence of S9.

[a] Nicotinamide doses indicated in report,　L-proline doses calculated

表 2.6.7-14　*In Vivo* 遺伝毒性試験（CLE 1554/4-D5140）

報告書標題：マウス骨髄を用いた小核試験

被験物質：Additive 8

Test of induction of :	micronuclei	Treatment schedule:	Once daily for 5 days	Study No.:	CLE 1554/4-D5140
Species/Strain:	Mouse, [redacted] Target cells: Erythrocyte progenitors in bone marrow	Sampling Time:	24 h after last dose	Location in CTD:	section 4.2.3.7.7.8
Age:	35-42 days	Method of Administration:	i.v.		
Cells Evaluated: polychromatic erythrocytes (PCE)		Vehicle/Formulation:	water/solution	GLP Compliance:	Yes
No. of Cells Analyzed/Animal:	2000			Date of Dosing:	[redacted] - [redacted] 19[redacted]
Special Features:	None				
Toxic/Cytotoxic Effects:	No signs of clinical toxicity; no induction of micronuclei in PCEs in tested doses				
Genotoxic Effects:	None				
Evidence of Exposure:	None				

Test Article	Dose (mL/kg/day) /L-proline (mg/kg/day) [a]	No. of Animals	PCE/NCE mean ± SD	micronucleated PCE/1000 mean ± SD
Saline	20/-	8M	0.98±0.33	0.50±0.38
Additive 8	5/69	8M	0.92±0.21	0.44±0.32
	10/138	8M	1.18±0.50	0.44±0.32
	20/276	8M	1.31±0.21	0.31±0.37
Cyclophosphamide	40 mg/kg+	8M	1.32±0.55	5.56±2.68*

Results:	Additive 8 did not induce micronuclei in the PCEs of bone marrow of mice. Positive control:　Statistically significant increase in frequency of micronucleated PCEs

+ = single dose on day 5　　* = chi square test p≤0.001

[a] L-Proline doses calculated

表 2.6.7-15　生殖発生毒性試験 – 胚・胎児発生に関する試験（AA30034）

報告書標題：L-プロリン及びグリシンのラットにおける連日 7 時間静脈内持続投与による胚・胎児発生毒性試験

被験物質：L-proline

Design similar to ICH 4.1.3:	Yes	Duration of Dosing:	Days 6 to 17 of gestation	Study No.:	AA30034
		Day of Mating:			
Species/Strain:	Sprague Dawley rat: [redacted] (SD)	Day of C-Section:	Day 20 of gestation	Location in CTD:	section 4.2.3.7.7.9
Initial Age:	Age at mating: 10-13 weeks	Method of Administration:	i.v. infusion (7 hrs/day)		
Date of First Dose:	[redacted] 20[redacted]	Vehicle/Formulation:		GLP Compliance:	Yes
Special Features:	None				
No Observed Adverse-Effect Level:					
F_0 Females:	L-proline : 1449 mg/kg/day				
F_1 Litters:	L-proline : 1449 mg/kg/day				

Dams/Does:

Test article	Control	L-proline
Daily Dose (mg/kg)	0	1449
Toxicokinetics	Mean maximum serum levels on Days G6 and G17 were 3.53 mmol/L and 2.57 mmol/L L-proline in the animals infused with L-proline. No accumulation of L-proline in serum occured.	
No. Pregnant	24	24
No. Died or Sacrificed Moribund	1 (not pregnant)	0
No. Aborted or with Total Resorption of Litter	0	0
Clinical Observations	-	-
Necropsy Observations	-	-
Body Weight	-	-
Food Consumption	-	-
Mean No. Corpora Lutea	13.5	14.7
Mean No. Implantations	12.0	13.0
Mean % Preimplantations Loss	10.7	11.9

- = no noteworthy findings

表 2.6.7-15　生殖発生毒性試験 - 胚・胎児発生に関する試験（AA30034）（続き）

	Test article	Control	L-proline
Dams/Does:	No. Litters Evaluated	22	24
	No. Live Fetuses (mean)	10.2	11.5
	Mean No. Resorptions - early	1.4	1.4
	- late	0.3	0.1
	No. of Litters with Dead Fetuses	0	0
	Mean % Postimplantation Loss	19.2	11.5
	Mean Fetal Body Weight (g)	3.8	3.9
	Fetal sex ratios (M/F)	51/49	51/49
	Fetal Anomalies: Gross External	-	-
	Visceral	-	-
	Skeletal Anomalies	-	-
	Total Affected Fetuses	-	-

- = no noteworthy findings

Results:	No indications of maternal toxicity or embryo-toxicity or teratogenicity. 1449 mg/kg L-proline is a NOEL for maternal toxicity, fetotoxicity and teratogenicity.

表 2.6.7-16　神経毒性試験（1657/ZLB/02）

報告書標題：L-プロリン及びグリシンの行動及び生理状態への影響

被験物質：L-proline

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number Location in CTD
Behavior and physiological state (Irwin test, on day 1 and day 5, 3 hrs after start of infusion, on day 5 after infusion) and body temperatures (before infusion and after Irwin test)	Rat Sprague-Dawley ([redacted]) 195 – 340 g at study start	i.v. 5 days; daily 7hrs infusions first 4 days, approx. 3 hrs 5th day	**Naive:** no treatment **Vehicle:** Physiological saline, 42 mL/kg/day **Test Article I:** Glycine low dose: 120 mmol/L*, 42 mL/kg/day: 378 mg/kg/day Glycine high dose: 300 mmol/L, 42 mL/kg/day: 945 mg/kg/day **Test Article II:** L-Proline low dose: 120 mmol/L*, 42 mL/kg/day: 579 mg/kg/day L-Proline high dose: 300 mmol/L, 42 mL/kg/day: 1449 mg/kg/day * adjusted to 300 mOsm/L with physiological saline **Doses 5th day:** approx. 18 mL/kg for all test article concentrations	60M (6 groups of 10 animals)	Glycine: - dose and time-dependent decreases in spontaneous activity - CNS excitability increased - autonomie measures significantly affected - neuromuscular and sensomotoric function not affected L-Proline: - small, not statistically significant modifications of behavior Glycine and L-proline: - Statistically significant increases of body temperature	Yes	1657/ZLB/02 section 4.2.3.7.7.10

Conclusion:	CNS excitability as well as the decrease in spontaneous activity observed after glycine administration are considered as specific effects: Glycine is one of the major inhibitory neurotransmitters in the CNS, consequently CNS effects were expected at high doses exceeding the doses administered with IVIG. It was concluded that both, L-proline and glycine, are suitable as excipients in IgPro10 at 250 mmol/L, however L-proline might have an advantage over glycine, as glycine affected more significantly spontaneous activity, CNS excitability and autonomic measures than L-proline. Daily infusion of glycine or L-proline during 5 days induced hyperthermia.

表 2.6.7-17　薬物動態及び神経毒性試験（PSR 08/06）

報告書標題：L-プロリンをラットに単回で皮下及び腹腔内投与した場合の薬物動態試験

被験物質：L-proline

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Admin.	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number Location in CTD
Clinical signs (each group divided into 2 subgroups of 3 animals): subgroup A: analysis at baseline, immediately upon dosing, at 15 min, 1 hr, 4 hrs and 24 hrs; subgroup B: analysis at baseline, immediately upon dosing, at 30 min, 2 hrs and 8 hrs	Rat [redacted] 195 – 223 g	s.c., i.p. injection	**Test article :** L-Proline (low-dose), s.c.: 2.0 mol/L L-proline (2100 mOsm/L) 8.7 mL/kg: 2 g/kg L-Proline (low-dose), i.p.: 2.0 mol/L L-proline (2100 mOsm/L) 8.7 mL/kg: 2 g/kg L-Proline (high-dose), i.p.: 4.0 mol/L L-proline (4240 mOsm/L) 8.7 mL/kg: 4 g/kg **Control:** Sodium chloride, s.c.: 2.2 mol/L (4240 mOsm/L); 8.7 mL/kg Sodium chloride, i.p.: 2.2 mol/L (4240 mOsm/L); 8.7 mL/kg	30F (5 groups of 6 animals each)	L-Proline, s.c.: No findings L-Proline, i.p.: - transient high muscle tonus in the hind limbs accompanied by vocalization in some animals immediately upon dosing - vocalization also at later time points - Defecation (at > 1 hr) Control, s.c., i.p.: - transient high muscle tonus in the hind limbs accompanied by vocalization in some animals immediately upon dosing - vocalization also at later time points	No	PSR 08/06 section 4.2.3.7.7.11

Conclusion:	No clinical signs such as seizures were found. There were no clinical signs after subcutaneous injection of 2 g L-proline/kg. All other groups of animals including control group animals showed comparable clinical signs primarily shortly after test article administration. These effects are not considered to be specific for L-proline as they were also observed in the control group animals. Defecation obtained in i.p. L-proline groups but not in the s.c. L-proline group is considered to be due to the administration route and/or osmolarity as the incidence did not correlate with the maximum L-proline plasma concentrations.

表 2.6.7-18　単回投与後の吸収に関する試験（PSR 03/07）

報告書標題：幼若ラットに L-プロリン及びグリシンを単回皮下投与した場合の薬物動態試験

被験物質：L-proline

		Location in CTD:	section 4.2.3.7.7.12
		Study No. :	PSR 03/07
		GLP compliance:	No
Species: Gender (M/F) / Number of animals: Feeding condition: Vehicle/Formulation: Method of Administration: Dose : Analyte: Assay: PK parameters:	Rat Wistar 25 g/postnatal day 19 total: 24M (8 males/group) fed solution s.c. Control: physiological saline solution: 8.3 mL/kg L-proline: 8.3 mL/kg (2 mol/L): 1.9 g/kg Glycine: 8.3 mL/kg (2 mol/L): 1.2 g/kg L-proline, glycine HPLC (after PITC-derivatization) Plasma concentrations were analyzed before and 15 min and 4 hr after administration. Each group divided into 3 subgroups for determination of plasma concentrations according to an alternating scheme (baseline: n=2; 15 min: n=3; 4 hrs: n=3).		

Results:	Rapid increase of L-proline mean plasma concentration from 0.27 mmol/L to the maximum of 14.6 mmol/L 15 min after injection, drop to 2.6 mmol/L, equivalent to 16% of C_{max}, 4 hrs after injection. Rapid increase of glycine mean plasma concentration from 0.17 mmol/L to the maximum of 14.7 mmol/L 15 min after injection, drop to 0.8 mmol/L, equivalent to 4% of C_{max}, 4 hrs after injection.

表 2.6.7-19　幼若動物を用いた神経毒性試験（PSR 01/07）

報告書標題：幼若ラットを用いた L-プロリン及びグリシン投与による Morris 水迷路行動に及ぼす影響–投与期間中–

被験物質：L-proline

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number Location in CTD
Clinical signs of acute neurotoxicity (modified Irwin test) scored immediately after injection	Rat Wistar study start at day 9 of life	s.c. twice daily **Schedule 1:** postnatal days 9-13 (5 days) **Schedule 2:** Intermittent treatment, postnatal days 9, 16, 23	**Schedule 1:** **Control:** Physiological saline: 6.5 mL/kg **Test Article:** L-proline (2 mol/L): 1.5 g/kg (6.5 mL/kg) **Schedule 2: ascending doses** **Control:** Physiological saline: 6.5, 7.8, 8.7 mL/kg **Test Article:** L-proline (2 mol/L): 1.5, 1.8, 2.0 g/kg (6.5, 7.8, 8.7 mL/kg)	144M (6 groups of 24 animals)	**Schedule 1 and Schedule 2:** saline, L-proline: no signs of acute neurotoxicity L-proline 2 mol/L solution: transient minimal to moderate clinical signs of local intolerance at the injection site (local loss of fur, red skin, local swelling)	No	PSR 01/07 section 4.2.3.7.7.13

表 2.6.7-20　幼若動物を用いた神経毒性試験（ZLB06_006）

報告書標題：幼若ラットを用いた L-プロリン及びグリシン投与による Morris 水迷路行動に及ぼす影響

被験物質：L-proline

Species/ Strain	Method of Administration	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number Location in CTD
Rat Wistar study start at day 9 of life	s.c. twice daily **Schedule 1:** postnatal days 9-13 (5 days) **Schedule 2:** Intermittent treatment on postnatal days 9 (low), 16 (medium), 23 (high dose)	**Schedule 1:** **Vehicle:** Physiological saline: 6.5 mL/kg **Test Article I:** L-proline (2 mol/L): 1.5 g/kg (6.5 mL/kg) **Test Article II:** glycine (2 mol/L): 1.0 g/kg (6.5 mL/kg) **Schedule 2: ascending doses** **Vehicle**: Physiological saline: 6.5, 7.8, 8.7 mL/kg **Test Article I:** L-proline (2 mol/L): 1.5, 1.8, 2.0 g/kg (6.5, 7.8, 8.7 mL/kg) **Test Article II:** glycine (2 mol/L): 1.0, 1.2, 1.3 g/kg (6.5, 7.8, 8.7 mL/kg)	(6 groups of 12 animals)	Reference memory/acquisition sessions: No significant difference in parameters between groups of a treatment schedule, improved performance from session 1 through 6 for all groups, optimum generally at session 3 Reference memory/test sessions: No significant differences between the treatment groups of both schedules concerning main parameters. No significant differences between L-proline and control groups in both schedules for any parameter. Working memory: No significant differences between the groups of a treatment schedule regarding the main success-related parameters. For all parameters significant time effects reflecting learning effects. No significant differences between L-proline and control groups in both schedules for any parameter.	No	ZLB06_006 section 4.2.3.7.7.14

表 2.6.7-20　幼若動物を用いた神経毒性試験（ZLB06_006）（続き）

Treatment	Schedule 1 : vehicle	Schedule 1 : L-proline	Schedule 1 : glycine	Schedule 2 : vehicle	Schedule 2 : L-proline	Schedule 2 : glycine
Reference memory/aquisition						
Number of Animals	M: 11	M: 11	M: 11	M: 11	M: 10	M: 10
Latency to find platform S1/S2/S3/S4/S5/S6 (s)*	40.4/20.7/14.9/12.5/ 10.7/11.0	35.4/15.6/11.4/12.7/ 9.3/9.8	40.2/20.5/14.0/14.0/ 11.4/11.4	40.5/25.8/19.6/16.5/ 14.5/14.5	32.7/18.1/19.3/16.8/ 10.6/10.4	34.9/22.7/15.1/ 15.0/12.9/11.0
Distance travelled to reach platform S1/S2/S3/S4/S5/S6 (cm)*	1101/533/351/263/ 228/241	971/396/230/277/ 179/223	1072/516/302/330/ 222/229	1060/604/397/348/ 283/259	923/458/405/401/ 240/211	815/534/306/312/ 247/223
Distance relative to shortest line S1/S2/S3/S4/S5/S6 (%)*	1443/740/519/336/ 297/294	1213/499/333/346/ 202/277	1562/745/406/389/ 274/250	1396/874/535/414/ 326/328	1273/659/459/480/ 306/231	1040/725/384/ 406/273/255
Reference memory/ test						
Number of Animals	M: 12	M: 12	M: 12	M: 12	M: 12	M: 12
Latency to find position of removed platform (s)	15.4	14.5	19.7	15.7	15.0	10.1
Distance travelled (cm)	377.8	372.9	410.3	319.2	341.6	227.7
Distance needed relative to shortest line (%)	299.6	295.2	325.5	250.0	273.7	182.3
Working memory task						
Number of Animals	M: 12	M: 12	M: 10	M: 12	M: 11	M: 12
Latency to find platform T1/T2/T3/T4 (s)**	45.9/16.4/13.0/7.7	45.4/14.3/11.0/5.9	44.6/21.2/11.5/8.2	46.1/13.6/13.5/6.9	41.9/17.6/18.2/9.8	46.9/14.6/12.0/ 9.1
Distance travelled to reach platform T1/T2/T3/T4 (cm)**	1248/406/351/191	1249/385/302/149	1125/549/286/206	1168/313/331/141	1093/460/487/229	1237/358/293/ 215
Distance needed relative to shortest line T1/T2/T3/T4 (%)**	981/963/280/373	982/837/240/295	878/1099/226/395	912/666/261/267	860/973/385/447	968/720/232/413

* S1….S6: Session 1….Session 6　　** T1…T4: Trial 1…Trial 4

Conclusion:	Animals of all test groups showed a successful acquisition of reference memory and a good performance in the testing of reference and working memory according to the protocol used in the study. There were no indications of any negative effects on acquisition of reference memory, reference or working memory by any of the different pre-treatments.