目次

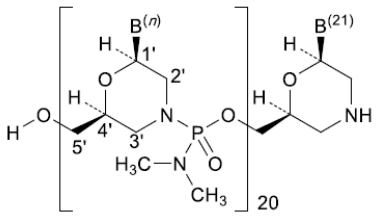
2.4 非臨床試験の概括評価 5
2.4.1 非臨床試験計画概略 5
2.4.2 薬理試験 6
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 6
2.4.2.2 副次的薬理試験 6
2.4.2.3 安全性薬理試験 7
2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験 8
2.4.2.5 薬理総括 8
2.4.3 薬物動態試験 10
2.4.3.1 分析法 10
2.4.3.2 吸収 10
2.4.3.3 分布 10
2.4.3.4 代謝 11
2.4.3.5 排泄 12
2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用 13
2.4.3.7 薬物動態総括 14
2.4.4 毒性試験 16
2.4.4.1 単回投与毒性試験 16
2.4.4.2 反復投与毒性試験 16
2.4.4.3 遺伝毒性試験 18
2.4.4.4 がん原性試験 18
2.4.4.5 生殖発生毒性試験 19
2.4.4.6 局所刺激性試験 20
2.4.4.7 その他の毒性試験 20
2.4.4.8 毒性総括 20
2.4.5 総括及び結論 25
2.4.6 参考文献一覧 26

略語一覧表

語句略語	語句略語内容
AST	aspartate transaminase：アスパラギン酸トランスアミナーゼ
AUC	area under plasma concentration-time curve：血漿中濃度-時間曲線下面積 $AUC_{0\text{-}24hr}$：時間 0 から投与後 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
BCRP	breast cancer resistance protein：乳癌耐性タンパク
BSEP	bile salt export pump：胆汁酸トランスポーター
BUN	blood urea nitrogen：血中尿素窒素
CHL/IU 細胞	チャイニーズハムスター肺由来線維芽細胞
CHO	chinese hamster ovary：チャイニーズハムスター卵巣
CK	creatine kinase：クレアチンキナーゼ
CK-MM	skeletal muscle type creatine kinase：骨格筋型クレアチンキナーゼ
C_{max}	maximum plasma concentration：最高血漿中濃度
CYP	cytochrome P450：シトクロム P450
DMD	Duchenne muscular dystrophy：デュシェンヌ型筋ジストロフィー
DNase	deoxyribonuclease：デオキシリボヌクレアーゼ
EC_{50}	50% effective concentration：50%有効濃度
FOB	Functional Observation Battery：機能観察総合評価
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
HEK293 細胞	human embryonic kidney 293 cells：ヒト胎児由来腎臓 293 細胞
hERG	human ether-a-go-go related gene：ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
HPLC	high performance liquid chromatography：高速液体クロマトグラフィー
IC_{50}	50% inhibition concentration：50%阻害濃度
IL-6	interleukin-6：インターロイキン-6
ITO-II 細胞	human testicular tumor cells：ヒト精巣がん細胞
Ki	inhibition constant：阻害定数
LC-MS/MS	liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry（spectrometer）：高速液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析（分析計）
MATE	multidrug and toxin extrusion：多剤排出輸送体
MCH	mean corpuscular hemoglobin：平均赤血球血色素量
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1：単球走化性因子-1
LOAEL	lowest-observed-adverse-effect-level：最小毒性量
[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]
NCNP	National Center of Neurology and Psychiatry：国立精神・神経医療研究センター
NOAEL	no-observed-adverse-effect level：無毒性量
OAT	organic anion transporter：有機アニオントランスポーター
OATP	organic anion transporting polypeptide：有機アニオン輸送ポリペプチド
OCT	organic cation transporter：有機カチオントランスポーター

語句略語	語句略語内容
P_{app}	apparent permeability coefficient：見かけの透過係数
PDE	phosphodiesterase：ホスホジエステラーゼ
P-gp	P-glycoprotein：P 糖タンパク
QWBA	quantitative whole body autoradiography：定量的全身オートラジオグラフィー
Radio-HPLC	high performance liquid chromatography coupled to radiation detector：放射線検出器を接続した高速液体クロマトグラフィー
RD 細胞	human rhabdomyosarcoma cells：ヒト横紋筋肉腫細胞
RLG	radioluminography：ラジオルミノグラフィー
RT-PCR	reverse transcriptase-polymerase chain reaction：逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応
TNF-α	tumor necrosis factor alpha：腫瘍壊死因子-α
[redacted]	[redacted] : [redacted]
UGT	uridine diphosphate glucuronosyltransferase：ウリジン二リン酸グルクロン酸転移酵素

申請品及び関連化合物の名称と構造式

NS-065/NCNP-01 及び関連化合物の名称	由来
［一般的名称］ビルトラルセン ［化合物名］ *all-P-ambo*-[2',3'-Azanediyl-*P*,2',3'-trideoxy-*P*-(dimethylamino)-2',3'-seco](2'-*N*→5')(CCTCCGGTTC TGAAGGTGTT C) ［分子式］$C_{244}H_{381}N_{113}O_{88}P_{20}$ ［分子量］6924.82 ［化学構造式］  $B^{(n)}$：5'末端から n 番目の塩基（ただし $B^{(21)}$は 21 番目の塩基を示す） 塩基配列：CCTCCGGTTC TGAAGGTGTT C	原薬
［略号］IM1 ［構造の特徴（分子量）］ [redacted]	不純物
［略号］IM2 ［構造の特徴（分子量）］ [redacted]	不純物
［略号］IM3 ［構造の特徴（分子量）］ [redacted]	不純物
［略号］IM4 ［構造の特徴（分子量）］ [redacted]	不純物
［略号］IM5 ［構造の特徴（分子量）］ [redacted]	不純物

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

ビルトラルセンは、国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター（NCNP）と日本新薬株式会社により、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）に対する治療薬として開発されたモルホリノ構造を有するアンチセンス核酸である。DMD は難治性進行性の疾患であり、現在国内で疾患本体に対する治療法はない。疾患本体に対する治療として、スプライシング制御により新たなジストロフィンタンパク質を発現させるエクソンスキッピング治療薬の開発が試みられており、ビルトラルセンはエクソン 53 を標的としたエクソンスキッピング治療薬である。

医薬品製造販売承認申請書添付資料の作成にあたり、NCNP 及び日本新薬株式会社が実施又は委託したビルトラルセンの薬理試験、薬物動態試験及び毒性試験の試験成績を収集した。

（1） 薬理試験

効力を裏付ける試験を、エクソン 45–52 欠損及びエクソン 48–52 欠損 DMD 患者由来線維芽細胞を用いて検討した。また、39 週間静脈内投与（週 1 回）したカニクイザルに対する影響を検討した。副次的薬理試験では、ヒト mRNA 及び pre-mRNA を対象としてオフターゲット候補遺伝子を *in silico* で解析した後、これらの候補遺伝子の発現変動についてヒト培養細胞を用いて検討し、オフターゲット作用（ジストロフィン以外の遺伝子配列へのハイブリダイゼーション依存的な作用）が生じる可能性について評価した。安全性薬理については、中枢神経系、心血管系及び呼吸系に対する影響を検討する試験を、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）適用下で実施し、評価資料とした。薬力学的薬物相互作用に該当する試験は実施しなかった。

（2） 薬物動態試験

ビルトラルセンの薬物動態試験として、吸収、分布、代謝、排泄及び薬物相互作用をマウス、ラット及びカニクイザルを用いて評価し、一部の試験はヒト試料を使用した。投与経路は臨床投与経路と同じ静脈内投与とし、一部の試験では筋肉内投与でも実施した。反復投与試験では、ビルトラルセンは週 1 回間歇投与した。試験ではビルトラルセンの ^{14}C-標識体及び非標識体を使用した。

（3） 毒性試験

ビルトラルセンの毒性試験として、単回投与毒性試験（サル）、反復投与毒性試験（マウス：26 週まで、サル：39 週まで）、遺伝毒性試験（細菌を用いる復帰突然変異試験、哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験、マウスを用いる小核試験）、がん原性用量設定試験（ラット：4 及び 13 週間、トランスジェニックマウス：4 週間）及び生殖発生毒性試験（ラット受胎能・初期胚発生試験、幼若マウスを用いた試験）を実施した。主要な試験については、ビルトラルセン及び 5 つの不純物の血漿中濃度を測定し、全身曝露を評価した。これらの毒性試験は一部を除いて GLP に準拠して行い、評価資料とした。

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

2.4.2.1.1 エクソン 45–52 欠損 DMD 患者由来線維芽細胞を用いた検討（試験番号 PH-065-001, PH-065-002, PH-065-005、資料番号 4.2.1.1-1, 4.2.1.1-2, 4.2.1.1-3、評価資料）

エクソン 45–52 欠損 DMD 患者由来線維芽細胞から分化させた筋管細胞にビルトラルセンを 2 日間適用した。適用終了直後及び適用開始 7 日後（適用終了 5 日後）にエクソン 53 スキッピング活性が認められ、その EC_{50} 値は 0.63 µmol/L（95%信頼区間 0.53～0.74 µmol/L）及び 0.90 µmol/L（95%信頼区間 0.61～1.32 µmol/L）と推定された。また、本薬の適用により新たなジストロフィンタンパク質の発現が認められた。

2.4.2.1.2 エクソン 48–52 欠損 DMD 患者由来線維芽細胞を用いた検討（試験番号 PH-065-006, PH-065-007、資料番号 4.2.1.1-4, 4.2.1.1-5、評価資料）

エクソン 48–52 欠損 DMD 患者由来線維芽細胞から分化させた筋管細胞にビルトラルセンを 2 日間適用した。適用開始 7 日後（適用終了 5 日後）にエクソン 53 スキッピング活性が認められ、その EC_{50} 値は 2.30 µmol/L（95%信頼区間 1.84～2.88 µmol/L）と推定された。また、本薬の適用により新たなジストロフィンタンパク質の発現が認められた。

2.4.2.1.3 カニクイザルに対する影響（試験番号 PH-065-004、資料番号 4.2.1.1-6、評価資料）

カニクイザルにビルトラルセンを週 1 回、39 週間反復静脈内投与したとき、投与期間終了時の骨格筋（60 及び 360 mg/kg）及び心筋（360 mg/kg）において、有意なエクソン 53 スキッピング活性が認められた。また、回復期間（8 週間）終了時の骨格筋及び心筋では、いずれも 360 mg/kg の用量においてスキッピング活性が認められた。

2.4.2.2 副次的薬理試験

2.4.2.2.1 *In silico* 解析によるオフターゲット候補遺伝子の検出（試験番号 TX-1829、資料番号 4.2.1.2-1、評価資料）

ビルトラルセン及びその n±1 mer の相補配列について、ヒト mRNA 及び pre-mRNA を対象として、ミスマッチ、インサーション及びデリーションの総数が 2 塩基以内の配列（以下、2 塩基以内相違配列）を含む遺伝子を *in silico* で解析した。ビルトラルセンの相補配列に関しては、ヒト mRNA、pre-mRNA ともに 2 塩基以内相違配列を含む遺伝子は検出されなかった。ビルトラルセンの n±1 mer の相補配列においても、完全一致もしくは 1 塩基相違配列を含む遺伝子は検出されなかったが、2 塩基相違配列を含む遺伝子として、30 遺伝子が検出された。このうち、11 遺伝子はカニクイザルの配列と一致しており、ヒト特異的なオフターゲット遺伝子として 19 遺伝子が抽出された。

2.4.2.2.2 遺伝子発現解析（試験番号 TX10902, TX10903, TX10904, TX10968, TX10967、資料番号 4.2.1.2-2, 4.2.1.2-3, 4.2.1.2-4, 4.2.1.2-5, 4.2.1.2-6、評価資料）

In silico 解析によって抽出されたヒト特異的な 19 個のオフターゲット候補遺伝子の発現変動に及ぼすビルトラルセンの影響について、エクソンマイクロアレイ法及び逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）法により評価した。ヒト由来細胞を用いたエクソンマイクロアレイ法においては、ヒト横紋筋肉腫細胞（RD 細胞）では発現変動した遺伝子は認められなかったが、ヒト胎児由来腎臓（HEK）293 細胞では 4 遺伝子（*APCDD1*、*CNTNAP2*、*FUT1* 及び *MYT1*）、ヒト精巣がん細胞（ITO-II 細胞）では 1 遺伝子（*ALDH1A2*）の発現変動が認められた。次に、エクソンマイクロアレイにより発現変動が認められたこれらの遺伝子及びいずれの細胞でも発現が認められず影響を評価できなかった遺伝子について RT-PCR 法を用いて検証した。HEK293 細胞ではエクソンマイクロアレイ法により発現変動の認められた 4 遺伝子（*APCDD1*、*CNTNAP2*、*FUT1* 及び *MYT1*）について、ITO-II 細胞ではエクソンマイクロアレイにより発現変動の認められた 1 遺伝子（*ALDH1A2*）及びいずれの細胞においてもエクソンマイクロアレイで発現を確認できなかった 2 遺伝子（*FSHR* 及び *SLC22A10*）について検証した。*APCDD1*、*CNTNAP2* 及び *MYT1* は発現低下、*FUT1* については発現増加の発現変動が認められ、*ALDH1A2*、*FSHR* 及び *SLC22A10* については発現変動が認められなかった。

2.4.2.3 安全性薬理試験

安全性薬理試験として、中枢神経系、心血管系及び呼吸系に及ぼす影響について検討した。また、サル 12 週間間歇静脈内及び筋肉内投与による毒性試験の中で、安全性薬理の主要評価項目である中枢神経系、心血管系及び呼吸系についても評価した。中枢神経系について、機能観察総合評価（FOB）法を用いてラットにおける一般症状及び行動を観察し中枢神経系に及ぼす影響を検討した結果、ビルトラルセン 500 mg/kg を静脈内投与した 2 時間後に 0.75°C の体温低下を一過性に示したが、この時の血漿中濃度を超えるその他の測定時点ではいずれも体温は低下しておらず、血漿中濃度推移との関連性が認められないことから、この一過性の体温低下は偶発的な変化であると考えられた。ラットにおいてそれ以外の中枢作用は認められなかった。また、サル 12 週間間歇静脈内投与毒性試験において、FOB 法を用いて一般症状及び行動を観察し中枢神経系に及ぼす影響を検討した結果、ビルトラルセンは 600 mg/kg（静脈内投与）まで中枢神経系に影響は認められなかった。以上より、ラットで認められた体温低下はヒトへ影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。心血管系について、hERG（human ether-a-go-go related gene）によりコードされたチャネルタンパク質を安定発現させたチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を用いた *in vitro* hERG 試験の結果、ビルトラルセンは 3 mg/mL まで、hERG 電流に影響を及ぼさなかった。また、サルを用いて血圧、心拍数並びに心電図に及ぼす影響を検討した結果、ビルトラルセンは 600 mg/kg（静脈内投与）あるいは 100 mg/kg（筋肉内投与）まで、血圧、心拍数並びに心電図パラメータに影響は認められなかった。呼吸系について、サルを用いて呼吸数及び血液ガスパラメータに及ぼす影響を検討した結果、ビルトラルセンは 600 mg/kg（静脈内投与）まで呼吸数及び血液ガスパラメータに影響は認められなかった。

2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験

該当試験なし。

2.4.2.5 薬理総括

DMD 患者由来線維芽細胞を用いてビルトラルセンのエクソン 53 スキッピング活性について検討した。エクソン 45–52 を欠損した DMD 患者由来線維芽細胞を筋管細胞に分化させ、ビルトラルセンを 2 日間適用したとき、適用終了直後及び適用開始 7 日後（適用終了 5 日後）におけるエクソン 53 スキッピング活性は非線形回帰分析から濃度依存的に増加すると考えられ、その EC_{50} 値はそれぞれ 0.63 µmol/L 及び 0.90 µmol/L と推定された。エクソン 48–52 欠損 DMD 患者由来線維芽細胞から分化させた筋管細胞を用いた場合にも、適用開始 7 日後（適用終了 5 日後）にエクソン 53 スキッピング活性が認められており、EC_{50} 値は 2.30 µmol/L と推定された。いずれの細胞においても、正常よりも短い新たなジストロフィンタンパク質の発現が確認され、それぞれエクソン 45–53、エクソン 48–53 に相当するアミノ酸が欠けたジストロフィンタンパク質と考えられた。

薬物動態試験において、筋ジストロフィーモデルマウスである *mdx* マウスに 20 mg/kg の用量で ^{14}C-ビルトラルセンを静脈内投与したとき、骨格筋における放射能濃度は最高（前肢下部の筋肉）で 47.3 µg eq./g であり（2.6.5.5.2 項参照）、この値はビルトラルセンの分子量（6924.82）から 6.8 µmol/L に相当する。上述したように、培養細胞を用いた検討において、概ね 1 µmol/L 前後の濃度域で活性が確認されており、本薬投与時もこの濃度域で薬効発現すると考えられた。

カニクイザルにビルトラルセンを 10、60 及び 360 mg/kg の用量で週 1 回、39 週間反復静脈内投与したとき、投与期間終了時の骨格筋におけるエクソン 53 スキッピング効率はそれぞれ 0.5%、2.3%及び 6.2%であり、Williams 多重比較検定の結果から用量依存的に増加したと考えられた。^{14}C-ビルトラルセンを用いた組織分布試験（2.6.4.4.2 項参照）において、*mdx* マウスでは野生型マウスと比較して筋肉組織中で高い放射能濃度を示した。これは、ビルトラルセンの基本骨格であるモルホリノ核酸は再生初期の筋線維に効率よく取り込まれ、筋再生が活発な DMD 患者の筋線維に取り込まれやすいという報告[1)]と一致しており、DMD 患者ではより高いスキッピング活性が得られると推察された。

*mdx*52 マウス（エクソン 52 欠損マウス）にエクソン 51 スキッピング薬（320 mg/kg）を週 1 回、7 週間反復投与したとき筋機能が回復したことが報告[2)]されており、エクソン 53 スキッピングすることでも、機能的なジストロフィンタンパク質が発現し筋機能の回復が期待できると考えられた。国内 P1/2 試験（2.7.6.2 項参照）において、ヒトに本薬 80 mg/kg を 1 時間かけて静脈内投与（週 1 回、24 週間）したときの最終投与時の最高血漿中濃度（C_{max}）は 47.5 µmol/L（329 µg/mL）、血漿中濃度-時間曲線下面積（$AUC_{0-\infty}$）は 73.4 µmol/L（508 µg·hr/mL）である。DMD 患者由来線維芽細胞から分化させた筋管細胞を用いた検討において、本薬のエクソン 53 スキッピング活性の EC_{50} 値は 1 µmol/L 前後と推定されていることから、ヒトに投与した際にもエクソン 53 をスキッピングすることで、正常よりも短いもののジストロフィンタンパク質を発現させると考えられた。

副次的薬理試験ではオフターゲット作用を生じる可能性について検討した。ヒト mRNA 及び pre-mRNA を対象とした *in silico* 解析ではオフターゲット候補遺伝子として 30 遺伝子が抽出され、

このうちヒト特異的なオフターゲット候補遺伝子である 19 遺伝子について、エクソンマイクロアレイ法及び RT-PCR 法を用いて発現変動を解析したところ、*APCDD1*、*CNTNAP2* 及び *MYT1* は発現低下、*FUT1* については発現増加の発現変動が認められた。*CNTNAP2* 及び *MYT1* は、ともに神経系に発現するタンパク質をコードしており、*CNTNAP2* は神経発達障害に、*MYT1* は発育時の神経細胞の分化に関与している [3,4,5]。組織分布試験の結果（2.6.4.4.2 項及び 2.6.4.4.3 項参照）より、ビルトラルセンはヒトにおいて神経系への分布は少ないと考えられることから、ビルトラルセンをヒトに投与した場合に *CNTNAP2* 及び *MYT1* の遺伝子発現に影響を与える可能性は低いと考えられた。*FUT1* は赤血球の H 抗原の前駆体の生成に関与するフコシルトランスフェラーゼをコードしており、この遺伝子の突然変異は血液型のボンベイ型の原因となる [6]。エクソンマイクロアレイ試験では、遺伝子導入試薬である Endo-Porter® を用いたうえで、ビルトラルセンを最高 120 µmol/L（831 µg/mL）で適用している。これは、臨床試験（2.7.6.2 項参照）において 80 mg/kg を静脈内投与した時の C_{max} 値（329 µg/mL）より 2.5 倍高い条件であるが、このときの *FUT1* mRNA の増加は 1.53 倍と僅かであった。したがって、ビルトラルセンはヒトにおいて *FUT1* の遺伝子発現に影響を与える可能性は否定できないものの、ヒトの生理機能に影響を与える可能性は低いと考えられた。*APCDD1* は Wnt シグナル経路の抑制因子をコードしており、この遺伝子の変異は先天性貧毛症と関連性があるとされ、しばしば毛幹の脱色又は低色素化を伴うことが報告されている [7,8]。ヒトにおいて、*APCDD1* の発現低下により毛髪伸長の過程に影響を及ぼす可能性も考えられたものの、臨床試験において貧毛は認められなかった。国内 P1/2 試験において、16 例中 1 例の患者において毛髪変色が認められたが（2.7.4.2.1.5（3）項参照）、貧毛を伴うものではなく、オフターゲット作用との関連性は明らかでなかった。ヒトとカニクイザルで共通して発現するオフターゲット候補遺伝子（11 遺伝子）の評価は、カニクイザルを用いた非臨床試験の中で実施した。カニクイザルにビルトラルセンを反復静脈内投与した毒性試験で認められた所見は尿細管の好塩基性顆粒などの腎臓への影響に限定されたものであった（2.6.6.9.1.2 項参照）。これらはアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与した際に一般的に認められるものであり [9,10]、ハイブリダイゼーション非依存的な変化と推察された。これらのオフターゲット候補遺伝子（30 遺伝子）に関する検討結果より、ヒトに対してビルトラルセンの標的以外の配列へのハイブリダイゼーションに基づくオフターゲット作用が生じるリスクは低いと考えられた。

安全性薬理試験から、臨床使用にあたり特別に注意を要する作用は認められなかった。

以上より、本薬はジストロフィン pre-mRNA のエクソン 53 に結合してエクソン 53 をスキッピングさせ、新たなジストロフィンタンパク質を発現させた。

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 分析法

^{14}C-ビルトラルセンを投与したときの各種生体試料中放射能は液体シンチレーション計測（LSC）法で測定した。各種代謝物プロファイルは、生体試料を除タンパク処理後、放射線検出器を接続した高速液体クロマトグラフィー（Radio-HPLC）で測定した。定量的全身オートラジオグラフィー（QWBA）は、ラジオルミノグラフィー（RLG）で測定した。

ビルトラルセンを投与したときの血漿中ビルトラルセン濃度は、各種血漿を固相抽出処理後、高速液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析計（LC-MS/MS）により測定した。また、一部のTK 試験においては、ビルトラルセンの製造過程において混入する主な 5 つの不純物濃度（IM1～IM5）を高速液体クロマトグラフ法（HPLC 法）により測定した。これらの不純物は、各種血漿にビルトラルセンを添加し、除タンパク処理後の試料において、クロマトグラム上に認められた各不純物（IM1～IM5）のピークから、ビルトラルセンを基にした相対的な濃度として算出した。

2.4.3.2 吸収

2.4.3.2.1 ビルトラルセンの血漿中動態：単回及び反復（試験番号 BP-065-019, BP-065-008, TX10764, TX10762, TX10827, TX10818, TX10747, TX10832, TX10837、資料番号 4.2.2.2-1, 4.2.2.2-2, 4.2.1.3-1, 4.2.3.1-2, 4.2.3.2-2, 4.2.3.2-4, 4.2.3.2-5, 4.2.3.7.6-1, 4.2.3.7.6-2、評価資料）

ラットに ^{14}C-ビルトラルセン、カニクイザルにビルトラルセン又はその ^{14}C-標識体を単回静脈内投与したとき、投与量に比例した曝露量の増加が認められた。また、カニクイザルにビルトラルセンを単回筋肉内投与したときの吸収は良好であった。

マウス（静脈内）及びカニクイザル（静脈内及び筋肉内）にビルトラルセンを反復投与（週 1 回間歇投与）したとき、いずれの動物においても、C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は投与量に伴って増加した。投与初日と投与最終日の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ に大きな違いはなく、週 1 回の間歇投与による蓄積性はないと考えられた。

2.4.3.3 分布

2.4.3.3.1 *In vitro* タンパク結合及び血球移行（試験番号 BP-065-006, BP-065-039, BP-065-020、資料番号 5.3.2.1-1, 4.2.2.3-1, 5.3.2.3-1、評価資料）

マウス、ラット、カニクイザル及びヒトにおけるビルトラルセンの血清タンパク結合率はヒトを含めすべての動物種で低く、40.3%以下であった。

ラット、カニクイザル及びヒト血液におけるビルトラルセンの血球移行率は 0.4%～6.7%であり、いずれの動物種においても血球移行率は低かった。

2.4.3.3.2 マウス及びカニクイザルにおける組織分布（試験番号 BP-065-002, BP-065-009, BP-065-037、資料番号 4.2.2.3-2, 4.2.2.3-3, 4.2.2.3-4、評価資料）

雄性 C57BL/10ScSnJ マウス（野生型マウス）及び雄性 C57BL/10ScSn-Dmd^{mdx}J マウス（*mdx* マウス、筋ジストロフィーモデルマウス）に ^{14}C-ビルトラルセンを単回静脈内投与したときの放射能

は、脳、脊髄、眼球及び精嚢を除く多くの組織に速やかに分布し、腎臓に最も高濃度で分布した。多くの組織では放射能の消失は遅く、最終測定時点である投与後 168 時間においても放射能が検出された。

野生型マウス及び *mdx* マウスの放射能の分布パターンは同様であったが、投与後 24 時間までは *mdx* マウスの組織中放射能濃度は野生型マウスに比べて高く、特に投与 1 時間後の筋肉組織において顕著であった。

カニクイザルに ^{14}C-ビルトラルセンを単回静脈内投与したとき、放射能は大脳、小脳、脊髄及び眼球を除く多くの組織に速やかに分布し、腎臓に最も高濃度で分布した。多くの組織では放射能の消失は遅く、投与後 504 時間において約 1/3 の組織で放射能が検出された。また、投与後 504 時間（最終測定時点）のブドウ膜／網膜及び皮膚（濃色部）において放射能の残存が認められていないことから、ビルトラルセンはメラニンへの結合親和性はないと考えられた。

カニクイザルに ^{14}C-ビルトラルセンを反復静脈内投与（週 1 回間歇投与）したとき、単回投与時と同様に分布した。また、大部分の組織では反復投与時の組織中放射能濃度は単回投与時と比べて高かったが、その差は顕著なものでなく、投与後 504 時間の放射能濃度が定量下限付近まで低下していることから、反復投与による蓄積性はないと判断した。

2.4.3.4 代謝

2.4.3.4.1 代謝：*In vitro*（試験番号 BP-065-039, BP-065-010, BP-065-012、資料番号 4.2.2.3-2, 5.3.2.2-1, 5.3.2.2-2、評価資料）

マウス、ラット、カニクイザル及びヒトの血清及び肝臓由来試料（ミクロソーム又は S9）並びに deoxyribonuclease I（DNase I）及び phosphodiesterase 1（PDE 1）に対する代謝安定性について評価した。

いずれの試料を用いた場合も、^{14}C-ビルトラルセンは顕著に減少しなかった。また、不純物及びその他のピークの明らかな増減は認められず、明確な代謝物ピークは検出されなかった。

以上より、^{14}C-ビルトラルセンはマウス、ラット、カニクイザル及びヒトの血清、肝臓並びに DNase I 及び PDE 1 による代謝に対して安定であると考えられた。

2.4.3.4.2 *In vivo* 代謝（試験番号 BP-065-023, BP-065-013、資料番号 4.2.2.4-1, 4.2.2.4-2、評価資料）

ラットに ^{14}C-ビルトラルセンを単回静脈内投与したとき、投与後 2 時間及び 24 時間における腎臓中には ^{14}C-ビルトラルセンは主に未変化体として存在していた。

カニクイザルに ^{14}C-ビルトラルセンを単回静脈内投与したときの、投与後 5 分、15 分、30 分及び 1 時間における血漿と、投与直後～投与後 6 時間及び投与後 6～24 時間にわたり回収した尿において、^{14}C-ビルトラルセンは主に未変化体として存在していた。

2.4.3.4.3 CYP 阻害（試験番号 BP-065-021, BP-065-041、資料番号 5.3.2.2-3, 5.3.2.2-4、評価資料）

ヒト肝ミクロソームを用いて、ビルトラルセンの 1～100 μmol/L の濃度範囲での CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1 及び CYP3A4/5 に対する阻害作用を評価したところ、CYP1A2 を除いて阻害作用を示さなかった。CYP1A2 に対する Ki 値（競合阻害）は 661 μmol/L であり、CYP1A2 に対する阻害作用は弱いものと考えられた。

より高濃度（0.1～3 mmol/L）で CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4 に対する阻害作用を評価したところ、CYP3A4（基質：テストステロン）を除いて阻害作用を示さなかった。CYP3A4 に対する Ki 値は 1.09 mmol/L であり、阻害作用を有すると考えられた。

両試験において、ビルトラルセンはヒト CYP 各分子種に対し、時間依存的阻害作用を示さなかった。

2.4.3.4.4 UGT 阻害（試験番号 BP-065-043、資料番号 5.3.2.2-5、評価資料）

ヒト肝ミクロソームを用いて、ビルトラルセンの 0.1～3 mmol/L の濃度範囲での UGT1A1 及び UGT2B7 に対する阻害作用を評価したところ、UGT2B7 に対して阻害作用を示さなかった。一方、UGT1A1 に対して阻害作用を示し、Ki 値は 0.642 mmol/L であった。

2.4.3.4.5 CYP 誘導（試験番号 BP-065-004, BP-065-032, BP-065-042、資料番号 5.3.2.2-6, 5.3.2.2-7, 5.3.2.2-8、評価資料）

ヒト肝細胞を用いて、ビルトラルセンの CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4（試験番号 BP-065-004 では CYP3A4/5）に対する誘導作用を評価した。

ビルトラルセン濃度を 0.1～10 μmol/L としたときの各 CYP 分子種の酵素活性又は 1～100 μmol/L としたときの各 CYP 分子種の mRNA 発現量を指標に評価したところ、ビルトラルセンはいずれの分子種に対しても誘導作用を示さなかった。

ビルトラルセン濃度を 0.03～3 mmol/L として、各 CYP 分子種の mRNA 量を指標として評価した結果、CYP1A2 及び CYP2B6 の mRNA 発現量に対して誘導作用を示さなかった。一方、CYP3A4 に対しては、検討したヒト肝細胞の 3 ロット中 2 ロットではビルトラルセンによる mRNA 発現量の誘導作用は認められなかったが、1 ロットにおいて、ビルトラルセンは 3 mmol/L の濃度で mRNA 発現量を溶媒対照の 2.33 倍に増加させた。E_{max} モデルにおける EC_{50} 値及び E_{max} 値の算出を試みたものの、mRNA 発現量の上昇が小さく、これらの値を算出することは出来なかった。

2.4.3.5 排泄

2.4.3.5.1 尿糞中排泄（試験番号 BP-065-007, BP-065-008、資料番号 4.2.2.5-1, 4.2.2.2-2、評価資料）

ラットに ^{14}C-ビルトラルセンを単回静脈内投与したとき、投与後 168 時間までに投与した放射能の 89.60%が尿中に、7.74%が糞中に排泄され、呼気中に放射能は検出されなかった。なお、投与

後 168 時間後の腎臓には投与した放射能の 1.20%が残存していた。ラットにおける主要排泄経路は尿中であると考えられた。

カニクイザルに ^{14}C-ビルトラルセンを単回静脈内投与したとき、投与後 168 時間までに、投与した放射能の 76.99%が排泄された。尿中には 28.40%、ケージ洗液には 27.32%、ケージ堆積物には 20.06%が排泄されたが、糞中への排泄は 1.20%と低く、ケージ洗液及びケージ堆積物中の放射能は尿由来であると推察されたことから、カニクイザルの主要排泄経路は尿中であると考えられた。

いずれの動物種においても、排泄された放射能の大部分が投与後 24 時間までに排泄されており、体内からの排泄は速やかであった。

2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用

2.4.3.6.1 各種薬物トランスポーターに対する基質認識性（試験番号 BP-065-038、資料番号 5.3.2.2-9、評価資料）

ヒトの主要なトランスポーターに対する ^{14}C-ビルトラルセン（10 µmol/L 又は 100 µmol/L）の基質認識性について、各トランスポーター（P-gp、BCRP、OAT1、OAT3、OCT2 及び MATE1）を安定的に発現させた LLC-PK1 細胞又は HEK293 細胞を用いて評価した。MATE2-K の評価には、MATE2-K を一過性に発現させた HEK293 細胞を用いた。

P-gp 及び BCRP の基質認識性の評価は、LLC-PK1 細胞の頂端膜側→基底膜側（A→B）及び基底膜側→頂端膜側（B→A）への見かけの膜透過係数の比より算出した P_{app} 比（B→A / A→B）を用いて求めた Corrected P_{app} ratio（トランスポーター発現細胞における P_{app} 比（B→A / A→B）／コントロール細胞における P_{app} 比（B→A / A→B））を指標とした。また、OAT1、OAT3、OCT2、MATE1 及び MATE2-K の基質認識性の評価は、トランスポーター発現細胞とコントロール細胞における取り込み活性（Cleared volume）の比を指標とした。

Corrected P_{app} ratio 及び Cleared volume の比はいずれも低い値であり、各トランスポーターの典型阻害薬存在下においても変化しなかったことから、ビルトラルセンはこれらトランスポーターの基質ではないと考えられた。

2.4.3.6.2 各種薬物トランスポーターに対する阻害作用（試験番号 BP-065-033, BP-065-044、資料番号 5.3.2.2-10, 5.3.2.2-11、評価資料）

ヒトの主要なトランスポーターに対するビルトラルセンの阻害作用について検討した。

P-gp 及び BCRP の評価には、各トランスポーターを安定的に発現させた LLC-PK1 細胞を用いた。OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT1、OCT2 及び MATE1 の評価には、各トランスポーターを安定的に発現させた HEK293 細胞を用いた。MATE2-K の評価には、MATE2-K を一過性に発現させた HEK293 細胞を用いた。BSEP については、BSEP 発現細胞から調製した膜小胞を用いた。

ビルトラルセン（1～100 µmol/L）存在下での P-gp 及び BCRP の典型基質の Corrected P_{app} ratio はそれぞれ溶媒対照の 86.4%～103.6%及び 81.6%～96.1%であった。また、ビルトラルセン（0.1～50 µmol/L）存在下での OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT1、OCT2、MATE1、MATE2-

K 及び BSEP の典型基質の Cleared volume の溶媒対照に対する比率（%）は 84.2%以上であった。以上より、ビルトラルセンは 1～100 μmol/L 又は 0.1～50 μmol/L の濃度範囲において、各トランスポーターに対して阻害作用を示さなかった。

より高濃度（30～3000 μmol/L）でのビルトラルセンの阻害作用について検討した。ビルトラルセン存在下での P-gp 及び BCRP の典型基質の Corrected P_{app} ratio はそれぞれ溶媒対照の 88.5%～113.4%及び 88.1%～104.6%であった。BCRP では 1000 及び 3000 μmol/L の濃度で、コントロール細胞の膜透過係数がビルトラルセンの濃度依存的に減少しており、評価が困難であったことから、BCRP 発現細胞から調製した膜小胞も用いた。BCRP の膜小胞を用いた実験において、典型基質の Cleared volume の溶媒対照に対する比率はビルトラルセンの濃度依存的に減少しており、3000 μmol/L では 35.3%であった。IC_{50} 値は 1970 μmol/L と算出された。

また、ビルトラルセン存在下での OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT1、OCT2、MATE1、MATE2-K 及び BSEP の典型基質の Cleared volume の溶媒対照に対する比率（%）を算出した。OATP1B1、OATP1B3 及び OAT3 においては、典型基質の Cleared volume の溶媒対照に対する比率はビルトラルセンの濃度依存的に減少しており、3000 μmol/L ではそれぞれ 14.1%、7.0%及び 6.0%であった。IC_{50} 値はそれぞれ 485、448 及び 176 μmol/L と算出された。

OAT1、OCT1、OCT2、MATE1、MATE2-K 及び BSEP における Cleared volume の溶媒対照に対する比率は 70.4%以上であった。

以上より、ビルトラルセン（30～3000 μmol/L）は BCRP、OATP1B1、OATP1B3 及び OAT3 に対して阻害作用を示し、P-gp、OAT1、OCT1、OCT2、MATE1、MATE2-K 及び BSEP に対して阻害作用を示さなかった。

2.4.3.7 薬物動態総括

ビルトラルセンの吸収、代謝、分布及び排泄について検討した。ラット及びカニクイザルにビルトラルセンを単回静脈内投与したとき、投与量に比例した曝露量の増加が認められた。マウス（静脈内）及びカニクイザル（静脈内及び筋肉内）にビルトラルセンを反復投与（週 1 回間歇投与）したとき、投与初日と投与最終日の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ に大きな違いはなく、週 1 回の間歇投与による蓄積はないと考えられた。マウス及びカニクイザルに ^{14}C-ビルトラルセンを単回静脈内投与した後の放射能は脳、脊髄、眼球及び精嚢を除く多くの組織に分布した。筋ジストロフィーモデルマウスである *mdx* マウスにおいて、コントロールマウスと比較して高い筋肉組織中濃度を示した。カニクイザルに ^{14}C-ビルトラルセンを反復静脈内投与（週 1 回間歇投与）したとき、単回投与時と比較して大部分の組織で組織中放射能濃度が高かったが、その差は顕著なものではなく、反復投与による蓄積性はないと考えられた。ビルトラルセンはマウス、ラット、カニクイザル及びヒトの血清、肝臓由来試料並びに DNase I 及び PDE 1 を用いた *in vitro* 試験でほとんど代謝を受けなかった。^{14}C-ビルトラルセンを静脈内投与後のラット腎臓中、カニクイザル血漿及び尿中には主に未変化体として存在し、ビルトラルセンは *in vivo* においても代謝を受けないと考えられた。また、ラット及びカニクイザルにおいて、^{14}C-ビルトラルセンを静脈内投与した後の放射能の主な排泄経路は尿中であった。

ビルトラルセンはCYP3A4（基質：テストステロン）、UGT1A1、BCRP、OATP1B1、OATP1B3及びOAT3に対して阻害作用を示した。しかしながら、これら分子種のKi値又はIC_{50}値、並びに国内第I/II相臨床試験（NS065/NCNP01-P1/2試験、2.7.6.2項参照）でのC_{max}の平均値（329000 ng/mL、47.5 µmol/L）を用いて、「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン」（平成30年7月23日付け　薬生薬審発0723第4号）に基づきビルトラルセンの阻害作用について評価したところ、いずれの分子種も臨床において薬物相互作用を引き起こすリスクは低いことから、臨床薬物相互作用試験は不要と判断した。

2.4.4 毒性試験

ビルトラルセンの毒性評価のために単回投与毒性試験、反復投与毒性試験、遺伝毒性試験、がん原性試験（用量設定試験のみ）及び生殖発生毒性試験を実施した（表 2.6.6.1-1 参照）。ビルトラルセンはエクソン 53 スキッピングによる治療が可能な男性のデュシェンヌ型筋ジストロフィー患者を対象としているため、*in vivo* 毒性試験では全て雄動物を用い、生殖発生毒性試験のうち、胚及び胎児発生に関する試験、出生前及び出生後の発生並びに母胎の機能に関する試験は実施しなかった。がん原性試験については、製造販売承認申請後に成績を入手する予定である。

2.4.4.1 単回投与毒性試験

単回投与毒性試験はカニクイザルを用いて静脈内投与又は筋肉内投与により実施した。

2.4.4.1.1 サル単回静脈内投与毒性試験（試験番号 TX10743、資料番号 4.2.3.1-1、参考資料）

雄性カニクイザルにビルトラルセンを 0（対照群）及び 600 mg/kg の用量で静脈内投与した。一過性のインターロイキン-6（IL-6）の高値、腎臓の近位尿細管上皮の空胞化が認められ、概略の致死量は 600 mg/kg 超であった。

2.4.4.1.2 サル単回筋肉内投与毒性試験（試験番号 TX10762、資料番号 4.2.3.1-2、評価資料）

雄性カニクイザルにビルトラルセンを 0（対照群）、1、10 及び 100 mg/kg の用量で単回筋肉内投与した。10 mg/kg 以上の投与群でアスパラギン酸トランスアミナーゼ（AST）及び骨格筋型クレアチンキナーゼ（CK-MM）の増加、投与部位及び投与部位近傍の大腿四頭筋の筋線維の変性/壊死が認められ、100 mg/kg 投与群では投与部位の炎症性細胞浸潤、水腫及び出血を伴っていた。概略の致死量は 100 mg/kg 超であった。

2.4.4.2 反復投与毒性試験

反復投与毒性試験はマウスを用いて静脈内投与により、カニクイザルを用いて静脈内投与及び筋肉内投与により実施した。

2.4.4.2.1 マウス 13 週間間歇静脈内投与毒性試験及び 4 週間回復性試験（試験番号 TX10800、資料番号 4.2.3.2-1、評価資料）

雄性 CD-1 マウスにビルトラルセンを 0（対照群）、60、240 及び 1000 mg/kg の用量で週 1 回、13 週間反復静脈内投与した。240 mg/kg 以上の投与群で単球走化性因子-1（MCP-1）の僅かな増加、腎臓重量の増加、腎臓における遠位尿細管/集合管上皮の空胞化、好塩基性物質の貯留及び拡張が、1000 mg/kg 投与群で自発運動の減少、血色素量、血球容積及び平均赤血球血色素量（MCH）の減少、血中尿素窒素（BUN）、クレアチニン、C-反応性蛋白及びシスタチン C の増加、尿 pH の低下、IL-6 及び腫瘍壊死因子（TNF-α）の僅かな増加、腎臓における近位尿細管上皮の空胞化が認め

られた。以上より、無毒性量（NOAEL）は 60 mg/kg と判断した。投与期間中に認められた変化は、いずれも 4 週間の休薬により回復性ないしは回復傾向が認められた。

2.4.4.2.2 マウス 26 週間間歇静脈内投与毒性試験及び 8 週間回復性試験（試験番号 TX10827、資料番号 4.2.3.2-2、評価資料）

雄性 CD-1 マウスにビルトラルセンを 0（対照群）、15、60、240 及び 1000 mg/kg の用量で週 1 回、26 週間反復静脈内投与した。60 mg/kg 以上の投与群で膀胱における移行上皮の細胞質内好酸性物質が、240 mg/kg 以上の投与群で尿 pH の低下、腎臓における遠位尿細管/集合管上皮の空胞化、好塩基性物質の貯留及び拡張並びに近位尿細管上皮の空胞化が、1000 mg/kg 投与群で自発運動の減少、体重の低値、血色素量、血球容積、平均赤血球容積及び MCH の減少、AST、BUN、クレアチニン及びシスタチン C の増加、IL-6、MCP-1 及び TNF-α の僅かな増加、補体の変動傾向、腎臓重量の増加、腎臓の線維化が認められた。膀胱における移行上皮の細胞質内好酸性物質は、電子顕微鏡検査によりオートファゴゾームと考えられた。1000 mg/kg 投与群では腎障害による死亡も認められた。以上より、NOAEL は 15 mg/kg と判断した。投与期間中に認められた変化は、赤血球パラメータの減少を除き、いずれも 8 週間の休薬により回復性ないしは回復傾向が認められた。

2.4.4.2.3 サル 12 週間間歇静脈内投与毒性試験及び 4 週間回復性試験（試験番号 TX10746、資料番号 4.2.3.2-3、評価資料）

雄性カニクイザルにビルトラルセンを 0（対照群）、60、200 及び 600 mg/kg の用量で週 1 回、12 週間反復静脈内投与した。200 mg/kg 以上の投与群で AST、CK（CK-MM に起因）及び総ビリルビンの増加、脾臓重量の増加、腎臓における近位尿細管の好塩基性変化及び上皮の空胞化、600 mg/kg 投与群で赤血球数、血球容積及び血色素量の減少、網赤血球率の増加、BUN 及び C-反応性蛋白の増加、腎臓重量の増加、単核細胞浸潤並びに髄放線間質の水腫、投与部位の皮下における好中球浸潤及び水腫並びに血管壁への好中球浸潤が認められた。以上より、NOAEL は 60 mg/kg と判断した。投与期間中に認められた変化は、いずれも 4 週間の休薬により回復性ないしは回復傾向が認められた。

2.4.4.2.4 サル 39 週間間歇静脈内投与毒性試験及び 8 週間回復性試験（試験番号 TX10818、資料番号 4.2.3.2-4、評価資料）

雄性カニクイザルにビルトラルセンを 0（対照群）、10、60 及び 360 mg/kg の用量で週 1 回、39 週間反復静脈内投与した。360 mg/kg 投与群で腎臓における近位尿細管上皮の空胞化、尿細管の拡張及び近位尿細管直部の好塩基性変化が認められた。10 mg/kg 以上の投与群では尿細管上皮に好塩基性顆粒の沈着が認められたが、同変化は電子顕微鏡検査によりビルトラルセンが尿細管上皮に取り込まれた像と考えられ、毒性学的意義は乏しいと判断した。以上より、NOAEL は 60 mg/kg と判断した。投与期間中に認められた変化は、いずれも 8 週間の休薬後に回復傾向が認められた。

2.4.4.2.5 サル 12 週間間歇筋肉内投与毒性試験及び 4 週間回復性試験（試験番号 TX10747、資料番号 4.2.3.2-5、評価資料）

雄性カニクイザルにビルトラルセンを 0（対照群）及び 100 mg/kg の用量で週 1 回、12 週間反復筋肉内投与した。100 mg/kg 投与群で AST、CK-MM 及び C-反応性蛋白の増加、投与部位の白色化、硬結あるいは赤色巣、投与部位あるいは骨格筋（投与部位近傍の大腿四頭筋）における筋線維の変性/壊死もしくは再生、炎症性細胞浸潤、線維化、筋外膜での水腫及びフィブリン滲出並びに血管周囲での単核細胞浸潤が認められた。以上、局所毒性により NOAEL は算出できなかったが、全身毒性に関する NOAEL は 100 mg/kg と判断した。

2.4.4.3 遺伝毒性試験

2.4.4.3.1 細菌を用いる復帰突然変異試験（試験番号 TX10751、資料番号 4.2.3.3.1-1、評価資料）、哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験（試験番号 TX10752、資料番号 4.2.3.3.1-2、評価資料）、マウス骨髄を用いる小核試験（試験番号 TX10753、資料番号 4.2.3.3.2-1、評価資料）

細菌を用いる復帰突然変異試験、哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験及びマウスを用いる小核試験を実施した。いずれの試験においても、ビルトラルセンは遺伝子突然変異誘発性又は染色体異常誘発性を示さなかった。

2.4.4.4 がん原性試験

ラット及びトランスジェニックマウスを用いてがん原性試験用量設定試験を実施した。がん原性試験の最終成績については、製造販売承認後に入手する予定である。

2.4.4.4.1 ラットを用いた 4 週間間歇静脈内投与がん原性用量設定試験（試験番号 TX10869、資料番号 4.2.3.4.1-1、参考資料）、ラットを用いた 13 週間間歇静脈内投与がん原性用量設定試験（試験番号 TX10883、資料番号 4.2.3.4.1-2、評価資料）

雄性 Han Wistar ラットにビルトラルセンを 0（対照群）、100、300 及び 1000 mg/kg の用量で週 1 回、4 週間反復静脈内投与した。100 mg/kg 以上の投与群で摂餌量の減少、300 mg/kg 以上の投与群で体重増加抑制、1000 mg/kg 投与群で BUN の増加、腎臓、副腎及び脾臓の重量増加、顆粒状変化を伴う腎臓の大型化、腎臓における尿細管拡張、尿細管上皮の空胞化、好塩基性尿細管、集合管の過形成及び硝子滴の減少が認められた。以上より、1000 mg/kg はより長期の投与が可能と考えられた。続いて、雄性 Han Wistar ラットにビルトラルセンを 0（対照群）、250、500 及び 1000 mg/kg の用量で週 1 回、13 週間反復静脈内投与した。250 mg/kg 以上の投与群で好中球数、リンパ球数、単球数及び白血球数の増加、尿タンパク及びグルコースの増加、腎臓重量の増加、腎臓における好塩基性尿細管、尿細管の拡張及び尿細管上皮の空胞化が、500 mg/kg 以上の投与群で血球容積、血色素量及び赤血球数の減少、BUN、クレアチニン及びリン濃度の増加、pH の低下並びにナトリウム及びクロールの減少、腎臓の大型化、腎臓における腎乳頭集合管の過形成／肥大が、1000 mg/kg 投与群で網赤血球数の増加、カリウムの減少、脾臓重量の増加、胸腺重量の減少、顆

粒状変化を伴う腎臓の大型化及び褪色、腎臓における硝子円柱が認められた。本結果に基づき、ラットを用いた長期がん原性試験の実施を予定している。

2.4.4.4.2 野生型 rasH2 マウスを用いた 4 週間間歇静脈内投与がん原性用量設定試験（試験番号 TX10884、資料番号 4.2.3.4.2-1、評価資料）

野生型の雄性 CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic トランスジェニックマウス（rasH2 マウス）にビルトラルセンを 0（対照群）、250、500 及び 1000 mg/kg の用量で週 1 回、4 週間反復静脈内投与した。250 mg/kg 以上の投与群で腎臓における尿細管上皮の空胞化及び好塩基性尿細管、膀胱における尿路上皮の細胞質内好酸性物質及び表層細胞の肥大が、1000 mg/kg 投与群で BUN の増加、腎臓重量の増加、腎臓の褪色巣、腎臓における尿細管内の好塩基性物質の貯留及び尿細管の拡張が認められた。本結果に基づき、rasH2 マウスを用いた 26 週間間歇（週 1 回）静脈内投与がん原性試験を実施中である。

2.4.4.5 生殖発生毒性試験

2.4.4.5.1 マウスを用いた間歇静脈内投与による雄の受胎能に関する試験（試験番号 TX10958、資料番号 4.2.3.5.1-1、評価資料）

雄性 CD-1 マウスにビルトラルセンを 0（対照群）、60、240 及び 1000 mg/kg の用量で週 1 回、反復静脈内投与した。1000 mg/kg 投与群で BUN の増加が認められたが、生殖能及び胎児の発育状態にビルトラルセン投与の影響は認められなかったことから、NOAEL は、雄親動物の一般毒性に関しては 240 mg/kg、生殖能及び胚・胎児に関しては 1000 mg/kg と判断した。

2.4.4.5.2 幼若マウスを用いた 4 週間間歇皮下及び静脈内投与用量設定試験（1）（試験番号 TX10843、資料番号 4.2.3.5.4-1、参考資料）、幼若マウスを用いた 4 週間間歇皮下及び静脈内投与用量設定試験（2）（試験番号 TX10896、資料番号 4.2.3.5.4-2、参考資料）

雄性幼若 CD-1 マウスにビルトラルセンを 0（対照群）、60、240 及び 1000 mg/kg の用量で生後 7 日及び 14 日は皮下投与（投与初回及び 2 回目）、生後 21 日及び 28 日は静脈内投与（投与 3 及び 4 回目）により、週 1 回、4 週間反復投与した。その結果、最高用量の 1000 mg/kg まで忍容性を示した。そこで、生後 14 日齢における投与経路を静脈内投与に変更し、さらに 2000 mg/kg 投与群を加えて追加試験を実施した。即ち、雄性幼若 CD-1 マウスにビルトラルセンを 0（対照群）、60、240、1000 及び 2000 mg/kg の用量で、生後 7 日（初回）は皮下投与により、生後 14 日（2 回目）、21 日（3 回目）及び 28 日（4 回目）は静脈内投与により、週 1 回、4 週間反復投与した。240 mg/kg 以上の投与群で腎臓における尿細管上皮の好塩基性顆粒が、1000 mg/kg 以上の投与群で BUN の増加、腎臓重量の増加、腎臓における尿細管上皮の変性／壊死、尿細管の拡張、尿細管の好塩基性物質の貯留及び硝子円柱が、2000 mg/kg 投与群で活動性低下、尾の先端部の紫色化、腎臓の褐色巣が認められた。以上に基づいて、引き続き幼若マウスを用いた 10 週間反復投与毒性試験を実施した。

2.4.4.5.3 幼若マウスを用いた 10 週間間歇皮下及び静脈内投与毒性試験（試験番号 TX10844、資料番号 4.2.3.5.4-3、評価資料）

雄性幼若 CD-1 マウスにビルトラルセンを 0（対照群）、15、60、240 及び 1200 mg/kg の用量で生後 7 日（初回）は皮下投与、生後 14 日（2 回目）から生後 70 日（10 回目）の間は静脈内投与により、週 1 回、10 週間反復投与した。15 mg/kg 以上の投与群で尾静脈（投与部位）周囲に軽微な炎症性細胞浸潤が、240 mg/kg 以上の投与群で腎臓における尿細管変性、好塩基性尿細管及び空胞化が、1200 mg/kg 投与群で半眼、活動性の低下、発声の増加、立毛、体重の低値、腎臓における尿細管拡張及び円柱が認められた。投与期間中に認められた変化は、いずれも 10 週間の休薬により回復性ないしは回復傾向が認められた。以上より、NOAEL は、一般毒性に関しては 60 mg/kg、骨成長及び神経毒性に関しては 1200 mg/kg と判断した。幼若マウスで認められた毒性は成熟マウスで認められた毒性と類似していた。

2.4.4.6 局所刺激性試験

局所刺激性は、カニクイザル反復投与毒性試験の中で評価した。静脈内投与では、600 mg/kg の 1 例で投与部位の皮下組織に炎症が認められ、360 mg/kg の用量まで忍容性が認められた。筋肉内投与では、100 mg/kg で投与部位あるいは近傍の骨格筋に炎症が認められた。

2.4.4.7 その他の毒性試験

2.4.4.7.1 免疫毒性試験

カニクイザル 12 週間反復投与毒性試験（静脈内投与、筋肉内投与）で採取した血清を用いて、血清中抗ビルトラルセン抗体産生を評価した。その他の反復投与毒性試験、がん原性用量設定試験（ラット 4 週試験を除く）及び生殖発生毒性試験（幼若マウス 4 週試験を除く）では、試験の一部として評価した。カニクイザル 12 週間反復投与毒性試験（静脈内投与、筋肉内投与）及びラット 13 週間反復投与がん原性用量設定試験の一部の動物で抗ビルトラルセン抗体の産生が認められた。

2.4.4.7.2 不純物の毒性試験

[redacted] 原薬及び [redacted] 原薬は遺伝子突然変異誘発性又は染色体異常誘発性を示さず、原薬の製造法変更にかかわらずビルトラルセンは生体内で遺伝毒性を示さないと考えられた。また、製造法の異なる原薬を用いてカニクイザル 5 週間反復投与毒性試験を実施した結果、[redacted] 原薬、[redacted] 原薬及び [redacted] 原薬の間で毒性発現に差は認められなかった。

2.4.4.8 毒性総括

急性毒性はサルを用いた単回静脈内投与及び単回筋肉内投与により評価した。サルの概略の致死量は、単回静脈内投与時で 600 mg/kg 超、単回筋肉内投与時で 100 mg/kg 超であった。静脈内投与時に腎臓の病理組織学的検査では近位尿細管上皮の空胞化が認められたのみで、一般状態及び体重ではいずれの投与経路においても変化は認められなかった。

反復投与毒性はマウス（13 及び 26 週）及びサル（12 及び 39 週）を用いた反復投与毒性試験並びにマウス（4 週）及びラット（4 週及び 13 週）を用いたがん原性用量設定試験において、週 1 回の反復静脈内投与により評価した。一連の試験を通じて、赤血球パラメータの減少、血清中サイトカイン及び補体の変動、腎臓及び膀胱に病理組織学的変化が認められた。

腎臓は本薬の主要な標的組織であると考えられ、腎臓の臨床病理パラメータの変化がマウス 4 週、13 週及び 26 週間試験の 1000 mg/kg 投与群、ラット 4 週及び 13 週間試験の 500 mg/kg 以上の投与群、サル 12 週間試験の 600 mg/kg 投与群で認められ、また、腎尿細管の病理組織学的変化がマウス 4 週、13 週及び 26 週間試験の 240 mg/kg 以上の投与群、ラット 4 週及び 13 週間試験の 250 mg/kg 以上の投与群、サル 12 週及び 39 週間試験の 200 mg/kg 以上の投与群で認められた。腎臓の器官重量の高値も併せて認められた。これらの変化は、腎臓へ高濃度に分布し（2.6.4.4.2 項及び 2.6.4.4.3 項参照）、また主に尿中排泄される（2.6.4.5.2.2 項参照）ビルトラルセンの薬物動態に関連すると考えられた。尿細管の好塩基性顆粒は、投与された核酸薬がライソゾーム又はファゴライソゾームに取り込まれた像として報告されている [9, 10]。尿細管腔内に貯留していた好塩基性物質は、これらの好塩基性顆粒と類似した染色性を示しており、同質のものと推察された。

膀胱の変化として、マウス 26 週間試験の 60 mg/kg 以上の投与群において、オートファゴゾームが移行上皮の細胞質内の好酸性物質として認められたが、壊死や炎症等の変化を伴うものではなかった。

赤血球系の変化として、マウス 13 週及び 26 週間試験の 1000 mg/kg 投与群、ラット 13 週間試験の 500 mg/kg 以上の投与群、サル 12 週間試験の 600 mg/kg 投与群で赤血球パラメータの低値が認められ、ラット及びサルでは網赤血球数の増加を伴っていた。しかしながら、変化の程度、溶血性の変化あるいは顕著な摂餌量の減少が認められないこと、病理組織学的検査で骨髄抑制又は出血が認められなかったことから、赤血球パラメータの低値は腎障害に伴う二次的変化と考えられた。網赤血球数の増加は、赤血球パラメータの低値に対する適応性変化と考えられた。

血清中サイトカイン及び補体の変化として、マウス 13 週間試験の 240 mg/kg 以上の投与群及びマウス 26 週間試験の 1000 mg/kg 投与群で IL-6、TNF-α 及び MCP-1 の増加あるいは補体の変動が認められた。しかしながら、変化の程度、白血球パラメータに変化が認められないこと、免疫応答を示唆する一般状態の変化あるいは病理組織学的変化が認められないことから、サイトカインの増加に関する毒性学的な意義は不明であった。サルでは血清中サイトカイン及び補体に変化は認められなかった。

上記の変化はいずれも、マウス及びサル試験において、4 週間又は 8 週間の休薬後に回復性ないしは回復傾向が認められた。

抗薬物抗体測定では、マウス 4 週、13 週及び 26 週間試験、サル 39 週間試験においては抗体産生が認められなかった。一方、サル 12 週間試験の 200 mg/kg の雄 1 例及びラット 13 週間試験の 500 mg/kg の雄 1 例で抗体産生が認められた。しかしながら、該当するサル筋肉組織において投与終了時にスキッピング活性が認められていること（2.6.2.2.3.1 項参照）、曝露に反復投与による影響が認められないことから、抗薬物抗体産生は各試験の毒性評価に影響しないと判断した。

以上の結果より、反復投与毒性試験における NOAEL は、マウス 13 週間試験で 60 mg/kg、マウス 26 週間試験で 15 mg/kg、サル 12 週間試験で 60 mg/kg、サル 39 週間試験で 60 mg/kg と判断し

た。カニクイザル 12 週間反復投与毒性試験（静脈内投与、筋肉内投与）及びラット 13 週間がん原性用量設定試験の一部の動物で抗ビルトラルセン抗体の産生が認められた。

細菌を用いる復帰突然変異試験、哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験及びマウスを用いる小核試験を実施した。いずれの試験においても、ビルトラルセンは遺伝子突然変異誘発性又は染色体異常誘発性を示さなかったことから、ビルトラルセンは生体内で遺伝毒性を示さないと判断した。

がん原性試験の用量設定試験として、トランスジェニックマウス（rasH2 マウス）を用いた 4 週間試験並びにラットを用いた 4 週及び 13 週間試験を週 1 回、反復静脈内投与により実施した。野生型 rasH2 マウスを用いた 4 週間試験の結果より、長期投与による腎障害の進行を考慮し、rasH2 マウスを用いた 26 週間がん原性試験の高用量は 500 mg/kg が妥当と考えられた。また、ラットでは、13 週間試験の結果に基づいて、ラットを用いた 104 週間長期がん原性試験を実施する予定である。なお、本薬は遺伝毒性試験で陰性を示しており、またマウス 26 週間反復投与毒性試験及びサル 39 週間反復投与毒性試験のいずれにおいても、前がん病変と考えられる変化又は腫瘍性病変、ホルモン作用と関連する内分泌系器官における所見は認められていない。本薬と同じモルホリノ核酸である eteplirsen ではラットを用いた毒性試験で膀胱において異型を伴う大型で不整形の細胞からなる尿路上皮の肥大が認められている [11)]。本薬では野生型 ras H2 マウスを用いた 4 週間毒性試験で尿路上皮の肥大が認められたが、本薬による変化は異型や不整形を示さず、発がん性を示す変化ではなかった。

現在進行中の rasH2 マウスを用いた 26 週間がん原性試験（51 匹/群）では、50 及び 150 mg/kg 投与群のそれぞれ 1 及び 2 例で剖検において尿管に腫瘤又は肥大が認められ、病理組織学的検査で移行上皮癌と確認された。いずれも低頻度であり、500 mg/kg では発現がなく用量依存性が認められなかったが、本薬の影響を否定できない変化と考えられた。マウスの尿細管腔内に本薬を含む好塩基性物質の貯留が認められたこと、移行上皮癌が発生していた rasH2 マウス 3 例のみで腎盂拡張が発症していたこと、腎盂拡張の関連所見である尿管拡張があっても腫瘍が発現していない個体がいたことから腫瘍による閉塞の結果として腎盂や尿管の拡張が生じたわけではないこと、rasH2 マウスの起源となる系統のマウスで自然発生性の腎盂拡張が報告されていることなどから考えて、この移行上皮癌は、自然発生性の腎盂拡張を発症したマウスに本薬を投与したことで、本薬由来の不溶物を含む尿が尿管内に滞留して継続的に上皮細胞を刺激し、上皮細胞の障害と再生を繰り返すことで生じた可能性が高いと考えられた。しかしながら、rasH2 マウスではボーラス条件下で本薬を静脈内投与したのに対してヒトでは 1 時間かけて静脈内投与するため、ヒトの尿中ビルトラルセンのピーク濃度は rasH2 マウスより低いと考えられる。また、カニクイザルでは尿細管腔を含めて尿路に好塩基性物質の貯留は認められず、臨床試験においても尿沈渣に本薬由来の不溶物を疑う異常構造物は認められなかったことから、ヒトにおいて本薬由来の不溶物が形成される可能性は低いと考えられた。さらには、ヒトはげっ歯類に比べて尿管径が大きいため（ヒト：内径約 3.4 mm、げっ歯類：外径約 0.3 mm）、仮に不溶物が形成されたとしても、尿管の移行上皮細胞を傷害することなく体外に排出される可能性が高いと推察される。尿管における尿路上

皮の傷害は、ヒトでは尿沈渣、尿潜血、自覚症状によりモニター可能であるが、臨床試験では不溶物による尿路上皮の傷害を示唆する有害事象は認められなかった。

以上、ヒトにおいて本薬由来の不溶物が形成される可能性は低いと考えられること、尿沈渣、尿潜血及び自覚症状によって不溶物による尿路上皮の傷害をモニターすることで移行上皮癌への進展は回避可能と考えられることから、本薬による発がんのリスクは低いと考えられる[12)]。

マウス雄受胎能試験では、雄マウスにビルトラルセンを交配前 9 週間、交配期間及び剖検前日まで週 1 回、反復静脈内投与したところ、1000 mg/kg で腎障害を示唆する BUN の増加が認められ、雄親動物の一般毒性に対する NOAEL は 240 mg/kg と判断した。雄親動物の生殖能及び胚・胎児に対する NOAEL は 1000 mg/kg と判断した。本薬のターゲット配列を有するサルを用いた反復投与毒性試験（12 及び 39 週）では雄性生殖器に病理組織学的変化は認められなかった。本薬はジストロフィン遺伝子のエクソン部分を標的としており、正常よりやや短いジストロフィンタンパク質を発現させることで機能改善を目指している。ジストロフィンが精子形成に影響するという報告はなく、また、やや短いジストロフィンタンパク質を発現しているベッカー型筋ジストロフィー患者に明らかな生殖機能の異常が認められないことから、本薬投与により産生する正常よりやや短いジストロフィンタンパク質についても雄の生殖能に影響を与えないと考えられた。したがって、本薬はオンターゲット作用に基づき受胎能に影響を及ぼさないと判断した。

幼若マウスを用いて、4 週間の用量設定試験に続いて 10 週間試験を実施した。10 週間試験では、腎臓において尿細管変性、好塩基性尿細管及び空胞化を含む変化が 240 mg/kg 以上の投与群で認められた。骨成長及び神経毒性に関する所見は 1200 mg/kg 投与群においても認められなかった。以上の結果より、幼若マウスにおける一般毒性に関する NOAEL は 60 mg/kg、骨成長及び神経毒性に関する NOAEL は 1200 mg/kg であると判断した。幼若マウスで認められた毒性は成熟マウスで認められた毒性と類似していた。

局所刺激性は、サルの一般毒性試験の一部として評価した。静脈内投与では、600 mg/kg の 1 例で投与部位の皮下組織に炎症が認められ、360 mg/kg の用量まで忍容性が認められた。筋肉内投与では、100 mg/kg で投与部位あるいは近傍の骨格筋に炎症が認められた。

原薬の製造方法変更に伴う毒性発現を比較した。[redacted] 原薬及び [redacted] 原薬は遺伝子突然変異誘発性又は染色体異常誘発性を示さず、原薬の製造法変更にかかわらずビルトラルセンは生体内で遺伝毒性を示さないと考えられた。また、サル 5 週間間歇静脈内投与毒性試験を実施した結果、[redacted] 原薬、[redacted] 原薬及び [redacted] 原薬の間で毒性発現に差は認めらなかった。

マウス及びサルでの NOAEL、最小毒性量（LOAEL）及び臨床試験におけるヒト曝露量を C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ を用いて比較した（2.6.6.9.8 項、表 2.6.6.9.8-1 参照）。ヒト曝露量は、国内第 I/II 相臨床試験（NS065/NCNP01-P1/2 試験、2.7.6.2 項参照）において、デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者にビルトラルセンを 80 mg/kg の用量で週 1 回、1 時間かけて静脈内投与したときの最終投与時（Visit 24）における C_{max}（329000 ng/mL）及び $AUC_{0\text{-}24hr}$（508000 ng·hr/mL、$AUC_{0\text{-}\infty}$を

$AUC_{0\text{-}24hr}$とした）を用いた。NOAELにおける曝露量のヒト曝露量に対する比率（以下、曝露比）は、C_{max}を比較した場合で0.14～2.26倍、$AUC_{0\text{-}24hr}$を比較した場合で0.03～1.07倍であった。また、LOAELにおける曝露比は、C_{max}を比較した場合で0.64～11.28倍、$AUC_{0\text{-}24hr}$を比較した場合で0.13～4.52倍であった。LOAELでは腎臓及び膀胱の変化が認められたが、腎臓の変化は病理組織学的に軽微で、壊死あるいは臨床病理パラメータの変動を伴っておらず、膀胱の変化（マウス26週のみ）は病理組織学的に軽微で、組織傷害あるいは炎症性変化を伴わなかった。したがって、曝露比では十分な安全域が確認されているとは言えないが、LOAELで認められたこれらの所見はいずれも忍容性があると考えられた。しかしながら高用量においては腎機能への影響がみとめられており、腎臓の変化は注意すべき事象に該当すると考えられた。

2.4.5 総括及び結論

ビルトラルセンは、DMD に対する治療薬として開発されたモルホリノ構造を有するアンチセンス核酸であり、DMD の原因遺伝子であるジストロフィン pre-mRNA のエクソン 53 内の相補配列に結合することでスプライシングを制御し、エクソン 53 をスキッピングする。

本薬をサルに 39 週間反復静脈内投与（週 1 回）したとき、骨格筋においてエクソン 53 スキッピング活性が認められているが、筋ジストロフィーモデルマウスでは野生型マウスに比べて筋肉組織に多く分布したことから、DMD 患者では本薬が筋肉組織へ取り込まれた際、より高いスキッピング活性が期待できると考えられた。培養細胞を用いた検討では概ね 1 μmol/L 前後の EC_{50} 値で本薬のエクソン 53 スキッピング活性が認められ、正常よりも短い新たなジストロフィンタンパク質の発現が確認されている。ヒトに投与した際にもこの濃度域で薬理作用を発揮し、臨床での用法・用量（80 mg/kg を週 1 回、静脈内投与）での血漿中濃度においても十分薬効発現が可能と考えられた。

副次的薬理試験からはオフターゲット作用が生じるリスクは低いと考えられ、また、安全性薬理試験では臨床使用にあたり特別に注意を要する作用は認められなかった。

本薬は反復投与による蓄積性はないものの、投与後は腎臓に高濃度で分布する。毒性試験においては腎臓が本薬の主な毒性標的組織と考えられ、高用量時には腎機能パラメータの異常を含む腎臓への影響が認められたが、ヒトの 80 mg/kg（臨床適用量）に相当する用量では影響は限定的で、重篤なものではなかった。膀胱においてもビルトラルセン投与の影響が認められたが、いずれの用量においても重篤なものではなかった。なお、これらの変化の回復性は良好であった。

以上の非臨床試験成績より、本薬はエクソン 53 スキッピング活性により新たなジストロフィンタンパク質を発現させた。安全性面では腎臓への影響が懸念されるが、腎機能をモニタリングするなど十分に注意することで、ビルトラルセンがヒトにおいて重篤な副作用を誘発する可能性は低く、DMD 治療に貢献すると考えられた。

2.4.6 参考文献一覧

1. Aoki Y, Nagata T, Yokota T, Nakamura A, Wood MJ, Partridge T, et al. Highly efficient *in vivo* delivery of PMO into regenerating myotubes and rescue in laminin-α2 chain-null congenital muscular dystrophy mice. Hum Mol Genet. 2013;22:4914-28. ＜資料番号 4.3-1＞

2. Aoki Y, Nakamura A, Yokota T, Saito T, Okazawa H, Nagata T, et al. In-frame dystrophin following exon 51-skipping improves muscle pathology and function in the exon 52-deficient *mdx* mouse. Mol Ther. 2010;18:1995-2005. ＜資料番号 4.3-2＞

3. Clemm von Hohenberg C, Wigand MC, Kubicki M, Leicht G, Giegling I, Karch S, et al. *CNTNAP2* polymorphisms and structural brain connectivity: a diffusion-tensor imaging study. J Psychiatr Res. 2013;47:1349-56. ＜資料番号 4.3-3＞

4. Scott-Van Zeeland AA, Abrahams BS, Alvarez-Retuerto AI, Sonnenblick LI, Rudie JD, Ghahremani D, et al. Altered functional connectivity in frontal lobe circuits is associated with variation in the autism risk gene *CNTNAP2*. Sci Transl Med. 2010;2:56-80. ＜資料番号 4.3-4＞

5. Vasconcelos FF, Castro DS. Coordinating neuronal differentiation with repression of the progenitor program: Role of the transcription factor MyT1. Neurogenesis. 2017;4:e1329683. ＜資料番号 4.3-5＞

6. Kelly RJ, Ernst LK, Larsen RD, Bryant JG, Robinson JS, Lowe JB. Molecular basis for H blood group deficiency in Bombay (O_h) and para-Bombay individuals. Proc Natl Acad Sci USA. 1994;91:5843-7. ＜資料番号 4.3-6＞

7. Rabbani P, Takeo M, Chou W, Myung P, Bosenberg M, Chin L, et al. Coordinated activation of Wnt in epithelial and melanocyte stem cells initiates pigmented hair regeneration. Cell. 2011;145:941-55. ＜資料番号 5.4-52＞

8. Shimomura Y, Agalliu D, Vonica A, Luria V, Wajid M, Baumer A, et al. APCDD1 is a novel Wnt inhibitor mutated in hereditary hypotrichosis simplex. Nature. 2010;464:1043-7. ＜資料番号 5.4-53＞

9. Sazani P, Ness KP, Weller DL, Poage DW, Palyada K, Shrewsbury SB. Repeat-dose toxicology evaluation in cynomolgus monkeys of AVI-4658, a phosphorodiamidate morpholino oligomer (PMO) drug for the treatment of duchenne muscular dystrophy. Int J Toxicol. 2011;30:313-21. ＜資料番号 4.3-7＞

10. Engelhardt JA. Comparative renal toxicopathology of antisense oligonucleotides. Nucleic Acid Ther. 2016;26:199-209. ＜資料番号 4.3-8＞

11. Exondys: CHMP assessment report. EMA/691796/2018, 20 September 2018. ＜資料番号 4.3-9＞

12. PRELIMINARY REPORT - Viltolarsen: Tumors in a 26-week carcinogenicity study in Tg-rasH2 mice. ＜資料番号 4.3-21＞