目次

2.6.6 毒性試験の概要文 3
2.6.6.1 まとめ 3
2.6.6.2 単回投与毒性試験 8
2.6.6.3 反復投与毒性試験 9
2.6.6.4 遺伝毒性試験 15
2.6.6.5 がん原性試験 17
2.6.6.6 生殖発生毒性試験 20
2.6.6.7 局所刺激性試験 25
2.6.6.8 その他の毒性試験 27
2.6.6.9 考察及び結論 30
2.6.6.10 図表 35
2.6.6.11 参考文献 35

略語一覧表

語句略語	語句略語内容
ALT	alanine transaminase：アラニントランスアミナーゼ
AST	aspartate transaminase：アスパラギン酸トランスアミナーゼ
AUC	area under the 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 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
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
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
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay：酵素免疫測定法
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
IL-6	interleukin-6：インターロイキン-6
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]
NOAEL	no-observed-adverse-effect level：無毒性量
t_{max}	time to reach C_{max}：最高血漿中濃度到達時間
TNF-α	tumor necrosis factor alpha：腫瘍壊死因子-α
[redacted]	[redacted]

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6.1 まとめ

ビルトラルセンについて、新有効成分含有医薬品の製造販売承認申請に必要な毒性試験として、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）及び生殖発生毒性試験を実施した（表 2.6.6.1-1）。また First-in-human 試験以降において、治験原薬の製造法を[redacted]（[redacted]）から[redacted]（[redacted]）に変更し、さらに[redacted]（[redacted]）に変更したため、[redacted] 及び [redacted] 原薬の遺伝毒性試験、並びに [redacted]、[redacted] 及び [redacted] 原薬の毒性学的な同等性を確認する試験として反復投与による毒性比較試験を実施した。局所刺激性は反復投与毒性試験の中で評価した。

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。また、非げっ歯類の毒性試験ではビルトラルセンと相補的なゲノム配列を有するカニクイザルを用いた。げっ歯類はビルトラルセンと相補的なゲノム配列を有しておらず、げっ歯類の毒性試験では相補的結合に起因する毒性以外の毒性を評価した。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。

主要な試験はいずれも医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）を遵守して実施した。

表 2.6.6.1-1 ビルトラルセンの毒性試験プログラム一覧（1/2）

試験の種類	投与方法・期間	動物種	被験物質	GLP 適用
単回投与毒性試験	静脈内・単回	サル	[redacted] 原薬	不適
	筋肉内・単回	サル	[redacted] 原薬	適
反復投与毒性試験	静脈内・QW・13 週間（4 週間休薬）	マウス	[redacted] 原薬	適
	静脈内・QW・26 週間（8 週間休薬）	マウス	[redacted] 原薬	適
	静脈内・QW・12 週間（4 週間休薬）	サル	[redacted] 原薬	適
	静脈内・QW・39 週間（8 週間休薬）	サル	[redacted] 原薬	適
	筋肉内・QW・12 週間（4 週間休薬）	サル	[redacted] 原薬	適
遺伝毒性試験				
復帰突然変異試験	*in vitro*	ネズミチフス菌及び大腸菌	[redacted] 原薬	適
染色体異常試験	*in vitro*	CHL/IU 細胞	[redacted] 原薬	適
小核試験	静脈内・QD・2 日間	マウス	[redacted] 原薬	適

QD：1 日 1 回投与、QW：週 1 回投与、CHL/IU：チャイニーズハムスター肺由来線維芽細胞

[redacted]：[redacted]、[redacted]：[redacted]

表 2.6.6.1-1 ビルトラルセンの毒性試験プログラム一覧（2/2）

試験の種類	投与方法・期間	動物種	被験物質	GLP 適用
がん原性試験				
長期がん原性試験	静脈内・QW・4 週間（用量設定試験）	ラット	[redacted] 原薬	不適
	静脈内・QW・13 週間（用量設定試験）	ラット	[redacted] 原薬	適
短期又は中期がん原性試験	静脈内・QW・4 週間（用量設定試験）	マウス（トランスジェニック）	[redacted] 原薬	適
生殖発生毒性試験				
受胎能及び初期胚発生に関する試験	静脈内	マウス	[redacted] 原薬	適
新生児を用いた試験	皮下/静脈内・QW・4 週間（用量設定試験）	マウス（幼若）	[redacted] 原薬	不適
	皮下/静脈内・QW・4 週間（用量設定試験）	マウス（幼若）	[redacted] 原薬	不適
	皮下/静脈内・QW・10 週間（10 週間休薬）	マウス（幼若）	[redacted] 原薬	適
その他の毒性試験				
免疫毒性試験				
サル血清中抗薬物抗体測定試験	静脈内・QW・12 週間 筋肉内・QW・12 週間	サル	[redacted] 原薬	不適
不純物の毒性試験				
反復投与毒性比較試験	静脈内・QW・5 週間	サル	[redacted] 原薬 [redacted] 原薬	適
反復投与毒性比較試験	静脈内・QW・5 週間	サル	[redacted] 原薬 [redacted] 原薬	適
復帰突然変異試験	*in vitro*	ネズミチフス菌及び大腸菌	[redacted] 原薬	適
復帰突然変異試験	*in vitro*	ネズミチフス菌及び大腸菌	[redacted] 原薬	適
染色体異常試験	*in vitro*	CHL/IU 細胞	[redacted] 原薬	適
染色体異常試験	*in vitro*	CHL/IU 細胞	[redacted] 原薬	適

QW：週 1 回投与、CHL/IU：チャイニーズハムスター肺由来線維芽細胞
[redacted]

毒性試験成績の概要を以下に示す。

（1） 単回投与毒性試験

カニクイザル単回静脈内投与毒性試験（用量：0 及び 600 mg/kg）では、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。

カニクイザル単回筋肉内投与毒性試験（用量：0、1、10 及び 100 mg/kg）では、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）の高値、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） 反復投与毒性試験

1） マウス反復投与毒性試験

13 週間反復静脈内投与毒性試験（用量：0、60、240 及び 1000 mg/kg）では、240 mg/kg 以上の投与群で腎臓重量の増加、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、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。

26 週間反復静脈内投与毒性試験（用量：0、15、60、240 及び 1000 mg/kg）では、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、腎臓重量の増加、腎臓の線維化が認められた。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） カニクイザル反復投与毒性試験

12 週間反復静脈内投与毒性試験（用量：0、60、200 及び 600 mg/kg）では、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。

39 週間反復静脈内投与毒性試験（用量：0、10、60 及び 360 mg/kg）では、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、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。

12 週間反復筋肉内投与毒性試験（用量：0 及び 100 mg/kg）では 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。

（3） 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。

（4） がん原性試験

1） ラットがん原性用量設定試験

4 週間反復投与がん原性用量設定試験（用量：0、100、300 及び 1000 mg/kg）では、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。

13 週間反復投与がん原性用量設定試験（用量：0、250、500 及び 1000 mg/kg）では、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、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） 野生型トランスジェニックマウス（rasH2 マウス）がん原性用量設定試験

4 週間反復投与がん原性用量設定試験（用量：0、250、500 及び 1000 mg/kg）では、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に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。

（5） 生殖発生毒性試験

1） 雄の受胎能に関する試験

マウスを用いた試験（用量：0、60、240 及び 1000 mg/kg）において、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） 新生児を用いた試験

幼若マウスを用いた 4 週間反復投与用量設定試験を実施した。生後 7 日齢及び 14 日齢は皮下投与、以降は静脈内投与で実施した 4 週間試験（用量：0、60、240 及び 1000 mg/kg）では 1000 mg/kg の用量まで忍容性を示した。生後 14 日齢における投与経路を静脈内投与に変更（生後 7 日齢は皮下投与、以降は静脈内投与）し、さらに 2000 mg/kg 投与群を追加して実施した 4 週間試験（用量：0、60、240、1000 及び 2000 mg/kg）では、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、10 週間反復投与毒性試験を実施した。

幼若マウスを用いた 10 週間反復投与毒性試験（用量：0、15、60、240 及び 1200 mg/kg）を、生後 7 日齢は皮下投与、以降は静脈内投与で実施した。その結果、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。

（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。

（7） その他の毒性試験

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） 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。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

2.6.6.2.1 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）

各群 1 例の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 の用量で単回静脈内投与し、投与翌日まで観察した後、剖検した。

ビルトラルセン投与に起因した死亡は認められなかった。

血清中サイトカイン測定では、投与 4 時間後に一過性のインターロイキン-6（IL-6）の高値が認められた。病理組織学的検査では、腎臓の近位尿細管上皮の空胞化が軽度に認められた。

一般状態、体重、血液学的検査、血液生化学的検査、末梢血イムノフェノタイピング及び病理解剖学的検査では、ビルトラルセン投与に起因した変化は認められなかった。

以上､サルにビルトラルセンを単回静脈内投与した際の概略の致死量は 600 mg/kg 超であった。

2.6.6.2.2 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）

各群 8 例の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。各群 5 例は投与翌日に剖検を実施し、残る各群 3 例は投与後 14 日まで観察した後に剖検した。

ビルトラルセン投与に起因した死亡は認められなかった。

血液生化学的検査では、10 mg/kg 以上の投与群で AST 及び CK-MM の高値が投与翌日に認められたが、これらの変化は投与 14 日後には認められなかった。病理組織学的検査では、10 mg/kg 以上の投与群で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、100 mg/kg 投与群で投与部位の炎症性細胞浸潤、水腫及び出血が認められた。これらの変化は投与翌日では認められたものの、投与 14 日後には認められず、休薬により良好な回復性を示した。

一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査、血清中補体測定、血清中サイトカイン測定、末梢血イムノフェノタイピング及び病理解剖学的検査では、ビルトラルセン投与に起因した変化は認められなかった。トキシコキネティクス測定では、用量依存的な最高血漿中濃度（C_{max}）及び血漿中濃度-時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-}24hr}$）の増加が認められた。最高血漿中濃度到達時間（t_{max}）は 1 及び 10 mg/kg 投与群に比べて 100 mg/kg で延長した。

以上の結果より、サルにビルトラルセンを単回筋肉内投与した際の概略の致死量は 100 mg/kg 超であった。

表 2.6.6.2.2-1 サル単回筋肉内投与毒性試験におけるトキシコキネティクス測定結果

投与量（mg/kg）	1	10	100
動物数	雄：3	雄：3	雄：3
C_{max}（μg/mL）	1.943	11.42	66.15
$AUC_{0\text{-}24hr}$（μg·hr/mL）	3.914	41.45	319.7
t_{max}（hr）	0.8	1.0	2.7

各値は平均値

2.6.6.3 反復投与毒性試験

2.6.6.3.1 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。主群の動物数は各群 30 例とし、各群 15 例は投与期間終了後（13 回目投与翌日）に剖検を実施し、残る各群 15 例は 4 週間休薬して毒性所見の回復性を検討した。またサテライト群として、血液凝固検査のため各群 14 例、トキシコキネティクス測定のため各群 33 例（対照群は 6 例）、血清中サイトカイン測定及び血清中補体測定のため各群 35 例、抗薬物抗体測定のため各群 10 例を設定し、各検査に供した。マウス小核試験（2.6.6.4.3.1 項参照）において 1000 mg/kg を 2 日間連続で投与した結果、軽度の自発運動の減少及び軽度の体重減少が認められたのみであったが、ICH M3(R2)「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験実施についてのガイダンス」に従って、当時の予定臨床投与量（1 g/日以下）に基づき、1000 mg/kg を高用量に設定した。中間及び低用量は公比約 4 で減じて 240 及び 60 mg/kg を設定した。

ビルトラルセン投与に起因した死亡は認められなかった。

一般状態観察では、投与 9 週目以降の 1000 mg/kg 投与群で投与後に一過性の軽度な自発運動の減少が認められた。血液学的検査では、1000 mg/kg 投与群で血色素量、血球容積及び平均赤血球血色素量（MCH）の減少が認められた。血液生化学的検査では、1000 mg/kg 投与群で血中尿素窒素（BUN）、クレアチニン、C-反応性蛋白及びシスタチン C の増加、総ビリルビンの減少が認められた。尿検査では、1000 mg/kg 投与群で pH の低下が認められた。血清中サイトカイン測定では、1000 mg/kg 投与群で IL-6、腫瘍壊死因子-α（TNF-α）及び単球走化性因子-1（MCP-1）の僅かな増加が認められた。MCP-1 の増加は 240 mg/kg 投与群においても認められた。器官重量測定では、240 mg/kg 以上の投与群で腎臓重量の増加、1000 mg/kg 投与群で胸腺重量の減少が認められた。病理組織学的検査では、腎臓において 240 mg/kg 以上の投与群で遠位尿細管/集合管における上皮の空胞化、好塩基性物質の貯留及び拡張が、1000 mg/kg 投与群で近位尿細管上皮の空胞化が認められた。240 mg/kg 投与群で認められた腎臓の変化はいずれも軽微であった。1000 mg/kg 投与群では、横隔膜に筋線維の再生像が軽微に認められた。

体重、摂餌量、摂水量、眼科学的検査、末梢血イムノフェノタイピング、血清中補体測定及び病理解剖学的検査において、ビルトラルセン投与に起因した変化は認められなかった。

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、投与期間終了時及び回復期間終了時のいずれも血清中に抗ビルトラルセン抗体は検出されなかった。トキシコキネティクス測定では、投与初日（Day 0）及び投与最終日（Day 84）のいずれも用量依存的な C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ の増加が認められた。反復投与による影響はなかった。また、5 つの不純物（IM1～IM5）の曝露が 1000 mg/kg 投与群で認められた。

以上の結果より、マウスにビルトラルセンを週 1 回、13 週間反復静脈内投与した際の NOAEL は 60 mg/kg と判断した。

表 2.6.6.3.1-1 マウス 13 週間間歇静脈内投与毒性試験におけるトキシコキネティクス測定結果

投与量（mg/kg）	60	240	1000
動物数 [a]	雄：3	雄：3	雄：3
投与初日（Day 0）			
C_{max}（μg/mL）	187.8	749.3	4580
$AUC_{0\text{-}24hr}$（μg·hr/mL）	57.93	582.2	7946
投与最終日（Day 84）			
C_{max}（μg/mL）	230.0	854.4	5535
$AUC_{0\text{-}24hr}$（μg·hr/mL）	83.48	420.6	12300

各値は平均値
a：各測定時点の動物数

2.6.6.3.2 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。主群の動物数は、15 mg/kg 投与群では 15 例、それ以外の投与群では 1 群 30 例とし、各群 15 例は投与期間終了後（26 回目投与翌日）に剖検を実施し、15 mg/kg 以外の投与群の残る 15 例について 8 週間休薬して毒性所見の回復性を検討した。またサテライト群として、血液凝固検査のため各群 14 例（15 mg/kg 投与群は 7 例）、トキシコキネティクス測定のため各群 33 例（対照群は 6 例）、血清中サイトカイン測定及び血清中補体測定のため各群 35 例（15 mg/kg 投与群は 30 例）、抗薬物抗体測定のため各群 10 例（15 mg/kg 投与群は 5 例）を設定し、各検査に供した。マウス 13 週間間歇静脈内投与毒性試験（2.6.6.3.1 項参照）において、高用量の 1000 mg/kg 投与群では腎臓に変化が認められたものの死亡や体重減少は認められておらず、1000 mg/kg では 13 週間より長期の投与が可能と考えられたことから、本試験における投与量として、同 13 週間試験と同じ 1000、240 及び 60 mg/kg を設定するとともに、長期投与による影響を考慮して公比 4 で減じた 15 mg/kg を低用量に追加した。

投与 21 及び 24 週目に 1000 mg/kg 投与群において、主群及びサテライト群の各 1 例が腎障害により死亡した。

一般状態観察では、1000 mg/kg 投与群で投与後に一過性の軽度な自発運動の減少が投与 1 週目より認められた。同群では体重の低値も認められた。血液学的検査では、1000 mg/kg 投与群で血色素量、血球容積、平均赤血球容積及び MCH の減少が認められた。血液生化学的検査では、1000 mg/kg 投与群で AST、BUN、クレアチニン及びシスタチン C の増加が認められた。血清中サイトカイン測定では、1000 mg/kg 投与群で投与後一過性の IL-6、MCP-1 及び TNF-α の僅かな増加が認められた。血清中補体測定では、1000 mg/kg 投与群で初回投与 1 時間後と最終投与 1 及び 4 時間後に C3 の減少傾向が認められ、最終投与 24 時間後には C3 の増加傾向が認められた。尿検査では、240 mg/kg 以上の投与群で pH の低下が認められた。病理組織学的検査では、腎臓において 240 mg/kg 以上の投与群で遠位尿細管/集合管における上皮の空胞化、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 投与群で線維化が認められた。240 mg/kg 投与群で認められた変化はいずれも軽微なものであった。1000 mg/kg 投与群では腎臓重量の増加を伴っていた。膀胱においては 60 mg/kg 以上の投与群で移行上皮の細胞質内の好酸性物質が認められた。腎臓及び膀胱の電子顕微鏡検査では、腎臓の集合管管腔内に低電子密度物質及び高電子密度物質が、遠位尿細管管腔内に低電子密度物質が認められたほか、集合管、遠位尿細管及び近位尿細管上皮の細胞質内にファゴライソゾームと考えられる膜結合性空胞が認められた。また、膀胱では移行上皮の被蓋細胞の細胞質内に顆粒及び小胞を含む大型空胞が認められ、膀胱におけるこれら大型空胞はオートファゴゾームと考えられた。その他、精巣においては 1000 mg/kg 投与群で好塩基性物質を貪食したマクロファージが認められたが、毒性学的な意義は低いと判断した。

摂餌量、摂水量、眼科学的検査、末梢血イムノフェノタイピング、血液凝固検査及び病理解剖学的検査では、ビルトラルセン投与に起因した変化は認められなかった。

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、投与期間終了時及び回復期間終了時のいずれも血清中に抗ビルトラルセン抗体は検出されなかった。トキシコキネティクス測定では、投与初日（Day 0）及び投与最終日（Day 175）のいずれも用量依存的な C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ の増加が認められた。1000 mg/kg 投与群において、$AUC_{0\text{-}24hr}$ は投与初日と比較して最終投与日では増加したが、それ以外のパラメータに反復投与による影響は認められなかった。また、5 つの不純物（IM1～IM5）の曝露が 240 及び 1000 mg/kg 投与群で認められた。

以上の結果より、マウスにビルトラルセンを週 1 回、26 週間反復静脈内投与した際の NOAEL は 15 mg/kg と判断した。

表 2.6.6.3.2-1 マウス 26 週間間歇静脈内投与毒性試験におけるトキシコキネティクス測定結果

投与量（mg/kg）	15	60	240	1000
動物数 a	雄：3	雄：3	雄：3	雄：3
投与初日（Day 0）				
C_{max}（μg/mL）	57.70	229.7	981.1	4660
$AUC_{0\text{-}24hr}$（μg·hr/mL）	20.34	75.84	654.9	7458
投与最終日（Day 175）				
C_{max}（μg/mL）	47.11	210.2	682.4	4352
$AUC_{0\text{-}24hr}$（μg·hr/mL）	17.64	67.47	500.6	17280

各値は平均値
a：各測定時点の動物数

2.6.6.3.3 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）

各群 5 例の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。各群 3 例は投与期間終了後（12 回目投与翌日）に剖検を実施し、残る 2 例は 4 週間休薬して毒性所見の回復性を検討した。また、本試験で採取した血清サンプルを用いて抗薬物抗体測定を別途実施した（2.6.6.8.2.1 項参照）。サル単回静脈内投与毒性試験（2.6.6.2.1 項参照）において 600 mg/kg 投与群で腎臓に近位尿細管上皮の空胞化が軽度に認められたことから、反復投与による変化が予測される投与量として 600 mg/kg を高用量に設定した。中間及び低用量は公比約 3 で除した 200 及び 60 mg/kg を設定した。

ビルトラルセン投与に起因した死亡は認められなかった。

血液学的検査では、600 mg/kg 投与群で赤血球数、血球容積及び血色素量の減少、網赤血球率の増加が認められた。血液生化学的検査では、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が、600 mg/kg 投与群で BUN 及び C-反応性蛋白の増加が認められた。器官重量測定では、200 mg/kg 以上の投与群で脾臓重量の増加が、600 mg/kg 投与群で腎臓重量の増加が認められた。病理組織学的検査では、腎臓において 600 mg/kg 投与群で近位尿細管の好塩基性変化及び上皮の空胞化、単核細胞浸潤並びに髄放線間質の水腫が認められた。近位尿細管の好塩基性変化及び上皮の空胞化は 200 mg/kg 投与群でも認められたが軽微であった。また、投与部位において 600 mg/kg 投与群で皮下の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（2.6.6.7.1 項参照）。

一般状態、神経行動学的機能観察、体重、摂餌量、眼科学的検査、心電図検査、体温、血圧、呼吸数、血液凝固検査、尿検査、血清中サイトカイン測定、血清中補体測定、末梢血イムノフェノタイピング及び病理解剖学的検査において、ビルトラルセン投与に起因した変化は認められなかった。

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、200 mg/kg 投与群の 1 例で投与 29 日目に抗ビルトラルセン抗体の産生が認められたものの、その他の測定時点では抗体産生は認められなかった。同動物のトキシコキネティクスに抗体産生の影響は認められなかった。トキシコキネティクス測定では、投与初日及び

投与最終日のいずれも用量依存的な C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ の増加が認められた。反復投与による影響は認められなかった。また、5 つの不純物（IM1～IM5）の曝露が 200 及び 600 mg/kg 投与群で認められた。

以上の結果より、サルにビルトラルセンを週 1 回、12 週間反復静脈内投与した際の NOAEL は 60 mg/kg と判断した。

表 2.6.6.3.3-1 サル 12 週間間歇静脈内投与毒性試験におけるトキシコキネティクス測定結果

投与量（mg/kg）	60	200	600
動物数	雄：5	雄：5	雄：5
投与初日			
C_{max}（μg/mL）	699.2	2270	7835
$AUC_{0\text{-}24hr}$（μg·hr/mL）	276.3	917.1	5842
投与最終日			
C_{max}（μg/mL）	744.8	2368	7247
$AUC_{0\text{-}24hr}$（μg·hr/mL）	270.1	963.3	5581

各値は平均値

2.6.6.3.4 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。主群の動物数は 10 mg/kg 投与群では 5 例、それ以外の投与群では各群 8 例とし、各群 5 例は投与期間終了後（39 回目投与翌日）に剖検を実施し、10 mg/kg を除く投与群の残る 3 例は 8 週間休薬して毒性所見の回復性を検討した。サル 12 週間間歇静脈内投与毒性試験（2.6.6.3.3 項参照）において、200 及び 600 mg/kg 投与群で腎臓の変化が観察されたため、より長期間の投与による影響を考慮して 200 及び 600 mg/kg のほぼ中間量となる 360 mg/kg を高用量に設定し、以下公比 6 で除した 60 及び 10 mg/kg を中用量及び低用量に設定した。

ビルトラルセン投与に起因した死亡は認められなかった。

病理組織学的検査では、腎臓において 360 mg/kg 投与群で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軽微に認められた。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、腎臓の電子顕微鏡検査では近位尿細管上皮及び集合管上皮の細胞質内においてファゴライソゾームと考えられる膜結合性空胞が観察され、核酸に関連すると推察される明瞭な高電子密度又は低電子密度内容物を含有していたことから、好塩基性顆粒の沈着は糸球体から濾過されたビルトラルセンが尿細管上皮細胞に取り込まれた像であり、毒性学的意義は乏しいと判断した。

一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査、心電図検査、尿検査、血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査、血清中補体測定、血清中サイトカイン測定、末梢血イムノフェノタイピング、病理解剖学的検査及び器官重量において、ビルトラルセン投与に起因した変化は認められなかった。

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。

抗薬物抗体測定では、投与期間中及び回復期間終了時のいずれにおいても血清中に抗ビルトラルセン抗体は検出されなかった。トキシコキネティクス測定では、各投与回で用量依存的な C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ の増加が認められた。反復投与による影響は認められなかった。また、5 つの不純物（IM1～IM5）の曝露が 360 mg/kg 投与群で認められた。

以上の結果より、サ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際の NOAEL は 60 mg/kg と判断した。

表 2.6.6.3.4-1 サル 39 週間間歇静脈内投与毒性試験におけるトキシコキネティクス測定結果

投与量（mg/kg）	10	60	360
動物数	雄：3	雄：3	雄：3
投与初日			
C_{max}（μg/mL）	137.6	805.9	3665
$AUC_{0\text{-}24hr}$（μg·hr/mL）	50.25	269.3	2452
13 回目投与			
C_{max}（μg/mL）	134.6	700.3	3522
$AUC_{0\text{-}24hr}$（μg·hr/mL）	59.77	274.4	2081
26 回目投与			
C_{max}（μg/mL）	115.1	598.6	4198
$AUC_{0\text{-}24hr}$（μg·hr/mL）	43.00	251.9	2501
投与最終日			
C_{max}（μg/mL）	122.8	613.9	3711
$AUC_{0\text{-}24hr}$（μg·hr/mL）	54.69	261.1	2294

各値は平均値

2.6.6.3.5 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）

各群 5 例の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。各群 3 例は投与期間終了後（12 回目投与翌日）に剖検を実施し、残る 2 例は 4 週間休薬して毒性所見の回復性を検討した。また、本試験で採取した血清サンプルを用いて抗薬物抗体測定を別途実施した（2.6.6.8.2.1 項参照）。投与量は、被験物質の調製可能最大濃度が 200 mg/mL であること、またカニクイザルの筋肉内投与における許容最大投与容量として 0.5 mL/kg が推奨されている [1)]ことから、100 mg/kg を設定した。

ビルトラルセン投与に起因した死亡は認められなかった。

血液生化学的検査では、100 mg/kg 投与群で AST、CK-MM 及び C-反応性蛋白の増加が認められ、投与部位への刺激性に伴う変化と考えられた。病理解剖学的検査では、投与部位の白色化、硬結あるいは赤色巣が認められた。病理組織学的検査では、投与部位あるいは骨格筋（投与部位近傍の大腿四頭筋）に筋線維の変性/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。

一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査、心電図検査、尿検査、血液学的検査、血清中補体測定、血清中サイトカイン測定、末梢血イムノフェノタイピング及び器官重量において、ビルトラルセン投与に起因した変化は認められなかった。

投与期間中に認められた変化は、いずれも 4 週間の休薬後に回復傾向が認められた。

抗薬物抗体測定では、100 mg/kg 投与群の 1 例で投与 77 日目に抗ビルトラルセン抗体の産生が認められたものの、その他の測定時点では抗体産生は認められなかった。同動物のトキシコキネティクスに抗体産生の影響は認められなかった。トキシコキネティクス測定では、投与初日と比較して投与最終日では C_{max} は低値を示したが、$AUC_{0\text{-}24hr}$ については大きな違いは認められなかった。t_{max} は投与初日の 2.4 時間に比べて、最終投与日では 4.2 時間に延長した。また、5 つの不純物（IM1～IM5）はいずれの動物においても検出されなかった。

以上、サルにビルトラルセンを週 1 回、12 週間反復筋肉内投与した結果、投与局所における毒性のため NOAEL は算出できなかったが、局所毒性を除く全身毒性に対する NOAEL は 100 mg/kg と判断した。

表 2.6.6.3.5-1　サル 12 週間間歇筋肉内投与毒性試験におけるトキシコキネティクス測定結果

投与量（mg/kg）	100
動物数	雄：5
投与初日	
C_{max}（μg/mL）	85.93
$AUC_{0\text{-}24hr}$（μg·hr/mL）	621.4
t_{max}（hr）	2.4
投与最終日	
C_{max}（μg/mL）	49.28
$AUC_{0\text{-}24hr}$（μg·hr/mL）	540.0
t_{max}（hr）	4.2

各値は平均値

2.6.6.4 遺伝毒性試験

2.6.6.4.1 非哺乳動物細胞系での *In Vitro* 試験

2.6.6.4.1.1 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）

4 種類のネズミチフス菌（TA100、TA1535、TA98 及び TA1537）及び大腸菌（WP2*uvrA*）を用い、プレインキュベーション法により、代謝活性化系の存在下及び非存在下で、ビルトラルセンの遺伝子突然変異誘発性の有無を検討した。溶媒対照と比較して、復帰変異コロニー数が 2 倍以上増加し、用量依存性が認められるときを陽性とした。試験用量は用量設定試験の結果を基に、最高用量を 5000 μg/plate として、以下公比 2 で除した 2500、1250、625、313、156 μg/plate の計 6 段階を設定した。

その結果、ビルトラルセンは全ての菌株において、代謝活性化の有無にかかわらず、復帰変異コロニー数を増加させなかった。したがって、ビルトラルセンは遺伝子突然変異誘発性を示さないと判断した。

2.6.6.4.2 哺乳動物細胞系での *In Vitro* 試験

2.6.6.4.2.1 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）

チャイニーズハムスター肺由来線維芽細胞（CHL/IU 細胞）にビルトラルセンを代謝活性化系の存在下及び非存在下で 6 時間、並びに代謝活性化系の非存在下で 24 時間処理し、染色体異常誘発性を評価した。試験用量は用量設定試験の結果を基に、最高用量を 5000 μg/mL として、以下公比 2 で除した 2500、1250 μg/mL の計 3 段階を設定した。

その結果、ビルトラルセンはいずれの処理においても染色体の構造異常及び数的異常を有する細胞の割合を増加させなかった。したがって、ビルトラルセンは染色体異常誘発性を示さないと判断した。

2.6.6.4.3 哺乳動物系での *In Vivo* 試験

2.6.6.4.3.1 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）

各群 6 例の雄性 CD-1 マウスにビルトラルセン（SP 原薬）を 0（対照群）、250、500 及び 1000 mg/kg の用量で 1 日 1 回、2 日間静脈内投与した。投与量は、用量設定試験において 2000 mg/kg 投与群で死亡又は瀕死動物が認められ、1000 mg/kg 以上の投与群で体重減少が認められたのみであったことから、高用量を 1000 mg/kg として、中間及び低用量は公比 2 で除した 500 及び 250 mg/kg を設定した。

ビルトラルセン投与に起因した死亡例はなかった。その他には、1000 mg/kg 投与群で軽度の自発運動減少及び体重減少が認められたのみであった。また、多染性赤血球と正染性赤血球との割合並びに小核を有する多染性赤血球の出現頻度について、対照群と比較して有意な差は認められなかった。

トキシコキネティクス測定では、1000 mg/kg 投与群で $AUC_{0\text{-}24hr}$ が 2956 μg·hr/mL と高い値を示し、ビルトラルセンの骨髄への十分な曝露が確認された。また 5 つの不純物（IM1～IM5）についても曝露が全ての投与群で認められ、骨髄への曝露が確認された。

以上の結果より、ビルトラルセンは小核誘発性を示さないと判断した。

表 2.6.6.4.3.1-1 マウス骨髄を用いる小核試験におけるトキシコキネティクス測定結果

投与量（mg/kg）	250	500	1000
動物数 [a]	雄：3	雄：3	雄：3
2 回目投与			
C_{max}（μg/mL）	875.0	1453	5706
$AUC_{0\text{-}24hr}$（μg·hr/mL）	377.3	1036	2956

各値は平均値
a：各測定時点の動物数

2.6.6.5 がん原性試験

2.6.6.5.1 長期がん原性試験

2.6.6.5.1.1 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）

本試験は、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（2.6.6.5.1.2 項参照）の用量設定根拠となる情報を得ることを目的として実施した。各群 5 例の雄性 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。ラットを用いた安全性薬理試験（2.6.2.4.1.1 項参照）において 500 mg/kg で一過性の体温低下が認められ、250 mg/kg 以下では一般状態の異常は認められなかったことから、1000 mg/kg を高用量とし、中間及び低用量は公比約 3 で除した 300 及び 100 mg/kg を設定した。

ビルトラルセン投与に起因した死亡あるいは一般状態の変化は認められなかった。

体重測定では、300 mg/kg 以上の投与群では投与 1 日目及び 15 日目に体重増加抑制が認められ、摂餌量測定では、100 mg/kg 以上の投与群の 15 日目及び 1000 mg/kg 投与群の 1 日目に摂餌量の減少が認められた。血液生化学的検査では、1000 mg/kg 投与群で BUN の増加が認められた。器官重量測定では、1000 mg/kg 投与群で腎臓、副腎及び脾臓の重量増加が認められた。病理解剖学的検査では、1000 mg/kg 投与群で顆粒状変化を伴う腎臓の大型化が認められた。病理組織学的検査では、1000 mg/kg 投与群で尿細管拡張、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。

以上の結果より、ラットにビルトラルセンを週 1 回、4 週間反復静脈内投与したとき、1000 mg/kg の投与で腎臓に毒性所見が認められたものの、本薬に起因した死亡や明らかな一般状態の変化が認められなかったことから、より長期の投与は可能と判断した。

2.6.6.5.1.2 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）

本試験は、ラットを用いた長期がん原性試験の用量設定根拠となる情報を得ることを目的として実施した。各群 10 例の雄性 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。また、トキシコキネティクス測定のため、各群 6 例（対照群は 3 例）を別途設定した。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（2.6.6.5.1.1 項参照）において、1000 mg/kg 投与群で腎臓の病理組織変化が認められたものの、より長期の投与は可能と判断したことから、本試験における投与量は 1000 mg/kg を高用量とし、中間及び低用量は公比 2 で除した 500 及び 250 mg/kg を設定した。

ビルトラルセン投与に起因した死亡、一般状態及び体重の変化は認められなかった。1000 mg/kg 投与群では摂餌量の減少が投与初期に認められた。

血液学的検査では、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が、1000 mg/kg 投与群で網赤血球数の増加が認められた。その他、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が認められたが、後述の腎臓で認められた組織変化に起因すると考えられた。血液生化学的検査では、500 mg/kg 以上の投与群で BUN、クレアチニン及びリン濃度の増加が認められた。尿検査では、250 mg/kg 以上の投与群で尿タンパク及びグル

コースの増加が、500 mg/kg 以上の投与群で pH の低下並びにナトリウム及びクロールの減少が、1000 mg/kg 投与群でカリウムの減少が認められた。器官重量測定では、250 mg/kg 以上の投与群で腎臓重量の増加が、1000 mg/kg 投与群で脾臓重量の増加及び胸腺重量の減少が認められた。病理解剖学的検査では、500 mg/kg 投与群で腎臓の大型化が、1000 mg/kg 投与群で顆粒状変化を伴う腎臓の大型化及び褪色が認められた。病理組織学的検査では、腎臓において、250 mg/kg 以上の投与群で好塩基性尿細管、尿細管の拡張及び尿細管上皮の空胞化、500 mg/kg 以上の投与群で腎乳頭集合管の過形成／肥大、1000 mg/kg 投与群で硝子円柱が認められた。250 mg/kg 投与群で認められた変化は、いずれも軽微あるいは軽度なものであった。その他、1000 mg/kg 投与群では、腎障害に対するストレス性変化として、胸腺における皮質のアポトーシスの増加及び萎縮並びに膵臓における腺房細胞の分泌物の減少が認められた。

抗薬物抗体測定では、500 mg/kg 投与群の 1 例で抗ビルトラルセン抗体の産生が認められたが、用量相関性はなかった。トキシコキネティクス測定では、投与初日及び投与最終日のいずれも用量依存的な C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ の増加が認められた。最終投与日の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は投与初日に比べて高値を示した。

以上、ラットにビルトラルセンを週 1 回、13 週間反復静脈内投与したとき、250 mg/kg 以上の投与で腎臓に毒性所見が認められた。本結果に基づき、ラットを用いた 104 週間間歇（週 1 回）静脈内投与がん原性試験の実施を予定している。

表 2.6.6.5.1.2-1 ラットを用いた 13 週間間歇静脈内投与によるがん原性用量設定試験におけるトキシコキネティクス測定結果

投与量（mg/kg）	250	500	1000
動物数 [a]	雄：3	雄：3	雄：3
投与初日			
C_{max}（μg/mL）	608	1520	2790
$AUC_{0\text{-}24hr}$（μg·hr/mL）	367	1470	3990
投与最終日			
C_{max}（μg/mL）	1000	2040	4110
$AUC_{0\text{-}24hr}$（μg·hr/mL）	934	2340	7060

各値は平均値
a：各測定時点の動物数

2.6.6.5.2 短期又は中期がん原性試験

2.6.6.5.2.1 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）

本試験は、CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic トランスジェニックマウス（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の用量設定根拠となる情報を得ることを目的として実施した。各群 6 例の雄性の野生型 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。またサテライト群として、トキシコキネティクス測定のため各群 33 例（対照群は 18 例）を設定した。CD-1 マウスを用いた 26 週間間歇静脈内投与毒性試験（2.6.6.3.2 項参照）において、240 mg/kg 以上の投与群で腎臓に病理組織学的変化が認められ、1000 mg/kg 投与群では腎障害により 1 例が死亡した。動物の系統や投与期間

の差異による最大耐量の変動の可能性を考慮して、同試験と同じ 1000 mg/kg を高用量に設定し、中間及び低用量は公比 2 で除した 500 及び 250 mg/kg を設定した。

ビルトラルセン投与に起因した死亡は認められなかった。

血液生化学的検査では、1000 mg/kg 投与群で BUN の増加が認められた。器官重量測定では、500 mg/kg 以上の投与群で前立腺重量の減少が、1000 mg/kg 投与群で腎臓重量の増加が認められた。病理解剖学的検査では、1000 mg/kg 投与群で腎臓の褪色巣が認められた。病理組織学的検査では、ビルトラルセン投与に起因した変化が主に腎臓に認められ、250 mg/kg 以上の投与群で尿細管上皮の空胞化及び好塩基性尿細管が、1000 mg/kg 投与群で尿細管内に好塩基性物質の貯留及び尿細管の拡張が認められた。これらの腎臓の変化は 250 及び 500 mg/kg 投与群では軽微であったが、1000 mg/kg 投与群では重度であった。また、膀胱では 250 mg/kg 以上の投与群で尿路上皮における細胞質内好酸性物質及び表層細胞の肥大が軽微に認められた。500 mg/kg 以上の投与群で重量減少が認められた前立腺では、関連する組織学的変化は認められなかった。

一般状態、体重及び摂餌量では、ビルトラルセン投与に起因した変化は認められなかった。

抗薬物抗体測定では、抗ビルトラルセン抗体の産生は認められなかった。トキシコキネティクス測定では、投与初日及び投与最終日のいずれも用量依存的な C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ の増加が認められた。反復投与による影響は認められなかった。

以上、野生型 rasH2 マウスにビルトラルセンを週 1 回、4 週間反復静脈内投与したとき、250 mg/kg 以上で腎臓に毒性所見が認められたが、250 及び 500 mg/kg 投与群では軽微な変化に留まっていたことから、500 mg/kg まではより長期の投与は可能と判断した。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。

表 2.6.6.5.2.1-1 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におけるトキシコキネティクス測定結果

投与量（mg/kg）	250	500	1000
動物数 [a]	雄：3	雄：3	雄：3
投与初日			
C_{max}（μg/mL）	1080	2420	5740
$AUC_{0\text{-}24hr}$（μg·hr/mL）	540	1560	6040
投与最終日			
C_{max}（μg/mL）	1120	1770	4790
$AUC_{0\text{-}24hr}$（μg·hr/mL）	491	1070	5950

各値は平均値

a：各測定時点の動物数

2.6.6.5.3 その他の試験

該当試験なし。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

2.6.6.6.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

2.6.6.6.1.1 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）

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。投与は雄親動物のみに実施し、雌親動物には実施しなかった。投与期間は交配前の 9 週間、交配期間及び剖検前日までの計 12 週間（12 回投与）とした。主群の動物数は各群雌雄 25 例とした。サテライト群として、トキシコキネティクス測定のため各群雄 33 例（対照群は雄 18 例）、抗薬物抗体測定のため各群雄 5 例を設定し、各検査に供した。マウス 13 週間間歇静脈内投与毒性試験（2.6.6.3.1 項参照）において 1000 mg/kg で軽度の自発運動の低下及び BUN の増加が認められたが、240 mg/kg 以下の用量では一般状態、体重、摂餌量及び血液生化学的検査に変化は認められなかったことから、本試験での投与量は 1000 mg/kg を高用量とし、中間及び低用量は公比 4 で除して 240 及び 60 mg/kg を設定した。

雄親動物について、ビルトラルセン投与に起因した死亡、一般状態の変化は認められなかった。

血液生化学的検査では、1000 mg/kg 投与群で BUN の増加が認められた。本試験では腎臓の病理組織学的検査を実施していないものの、マウス 13 週間間歇静脈内投与毒性試験（2.6.6.3.1 項参照）の同用量においても腎障害を示す病理組織学的所見を伴った BUN の増加が認められており、本試験で認められた BUN の増加は腎障害を示唆する毒性変化と考えられた。

その他、体重、摂餌量、交尾率、交尾期間、受胎率、剖検、器官重量（精巣及び精巣上体）、精子検査、黄体数、着床数、着床率、着床前胚損失率、生存胚数、胚生存率、着床後損失胚数及び着床後胚損失率において、ビルトラルセン投与に起因した変化は認められなかった。

抗薬物抗体測定では、いずれの雄親動物からも抗体産生は認められなかった。トキシコキネティクス測定では、投与初日及び 10 回目投与のいずれも用量依存的な C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ の増加が認められた。反復投与による影響はなかった。

以上の結果より、雄マウスにビルトラルセンを交配前の 9 週間、交配期間及び剖検前日まで週 1 回、計 12 週間反復静脈内投与した際の NOAEL は、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。

表 2.6.6.6.1.1-1 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におけるトキシコキネティクス測定結果

投与量（mg/kg）	60	240	1000
動物数 [a]	雄：3	雄：3	雄：3
投与初日			
C_{max}（μg/mL）	246.1	804.3	3999
$AUC_{0\text{-}24hr}$（μg·hr/mL）	67.46	464.6	6432
10 回目投与（交配前最終投与、63 日目）			
C_{max}（μg/mL）	143.1	781.0	3717
$AUC_{0\text{-}24hr}$（μg·hr/mL）	57.09	453.4	7283

各値は平均値
a：各測定時点の動物数

2.6.6.6.2 胚及び胎児発生に関する試験

該当試験なし。

2.6.6.6.3 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

該当試験なし。

2.6.6.6.4 新生児を用いた試験

2.6.6.6.4.1 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）

本試験は、雄性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（2.6.6.6.4.3 項参照）の用量設定根拠となる情報を得ることを目的として実施した。各群 5 例の雄性幼若 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。低週齢を考慮し、投与ミスを避けるため、生後 7 日及び 14 日齢においては静脈内投与の代替経路として皮下投与を選択した。また、トキシコキネティクス測定のためのサテライト群として、各群 48 例（対照群は 12 例）を別途設定した。マウス 13 週間間歇静脈内投与毒性試験（2.6.6.3.1 項参照）において 1000 mg/kg 投与群で腎臓の病理組織学的変化が BUN の増加を伴って認められたことから、本試験における投与量は、投与期間及び投与経路の変更を考慮し、1000 mg/kg を高用量とした。中間及び低用量は公比 4 で除して 240 及び 60 mg/kg を設定した。

ビルトラルセン投与に起因した死亡は認められなかった。投与 1 週目にサテライト群の 3 例が死亡したが、母動物（投与対象外）の乳腺異常による授乳不良によるものであった。

血液生化学的検査では、60 mg/kg 以上の投与群でアラニントランスアミナーゼ（ALT）及び中性脂肪の減少が認められたが、肝臓の病理組織学的検査を実施していなかったため、これら変化の毒性学的意義は不明であった。腎臓重量の測定では、1000 mg/kg 投与群で重量増加が認められた。腎臓の病理組織学的検査では、240 mg/kg 以上の投与群では尿細管上皮の好塩基性顆粒が認められた。

一般状態、体重及び病理解剖学的検査において、ビルトラルセン投与に起因した変化は認められなかった。

トキシコキネティクス測定では、各投与回で用量依存的な C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ の増加が認められたが、2 回目の皮下投与時の値は初回の皮下投与時より低値であった。t_{max} は皮下投与では 1 時間、静脈内投与では 0.1 時間であった。

以上、ビルトラルセンを幼若マウスに生後 7 日及び 14 日は皮下投与、生後 21 日及び 28 日は静脈内投与により週 1 回、4 週間反復投与した結果、1000 mg/kg の用量まで忍容性を示した。しかしながら、生後 14 日の皮下投与による曝露量は、他の投与日に比べて著しく低値であった。

表 2.6.6.6.4.1-1 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）におけるトキシコキネティクス測定結果

投与量（mg/kg）	60	240	1000
動物数 [a]	雄：3	雄：3	雄：3
初回投与（皮下、生後 7 日）			
C_{max}（μg/mL）	109.4	450.8	1057
$AUC_{0\text{-}24hr}$（μg·hr/mL）	251.1	1324	5878
t_{max}（hr）	1.0	1.0	1.0
2 回目投与（皮下、生後 14 日）			
C_{max}（μg/mL）	14.11	154.9	468.8
$AUC_{0\text{-}24hr}$（μg·hr/mL）	29.77	315.8	1200
t_{max}（hr）	1.0	1.0	1.0
3 回目投与（静脈内、生後 21 日）			
C_{max}（μg/mL）	332.6	1240	8395
$AUC_{0\text{-}24hr}$（μg·hr/mL）	132.5	799.8	7108
t_{max}（hr）	0.1	0.1	0.1
4 回目投与（静脈内、生後 28 日）			
C_{max}（μg/mL）	393.0	2239	12640
$AUC_{0\text{-}24hr}$（μg·hr/mL）	164.8	1242	9239
t_{max}（hr）	0.1	0.1	0.1

各値は平均値
a：各測定時点の動物数

2.6.6.6.4.2 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（2）（試験番号 TX10896、資料番号 4.2.3.5.4-2、参考資料）

雄性幼若マウスを用いた 4 週間間歇皮下及び静脈内投与による用量設定試験（1）（2.6.6.6.4.1 項参照）において、生後 14 日の皮下投与における曝露量が低値であったため、当該日の投与方法を静脈内投与に変更して、再度、用量設定試験を実施した。

各群 5 例の雄性幼若 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。また、トキシコキネティクス測定のためのサテライト群として、各群 48 例（対照群は 12 例）を別途設定した。用量設定試験（1）において 1000 mg/kg まで良好な忍容性を示したことから、ICH M3(R2)「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験実施についてのガイダンス」で推奨されている投与用量の上限に従い、本試験の投与量は 2000 mg/kg を高用量に設定した。その他の用量は、用量設定試験（1）と同じく 1000、240 及び 60 mg/kg を設定した。

ビルトラルセン投与に起因した死亡は認められなかった。主群の 240 mg/kg 投与群 1 例及びサテライト群の 2000 mg/kg 投与群 1 例が死亡したが、用量相関性に乏しいこと、死亡の発生状況から投与過誤が疑われたこと、あるいは各種検査から死亡に繋がる関連所見は認められなかったことから、これらの死亡はビルトラルセン投与に起因したものではないと考えられた。

一般状態観察では、2000 mg/kg 投与群で活動性低下及び尾の先端部の紫色化が認められた。体重測定では、ビルトラルセン投与に起因した変化は認められなかった。

血液生化学的検査では、1000 mg/kg 以上の投与群で BUN の増加が認められた。病理解剖学的検査では、2000 mg/kg 投与群で腎臓の褐色巣が認められ、関連する病理組織学的所見として尿細管の拡張が観察された。腎臓重量の測定では、1000 mg/kg 以上の投与群で重量増加が認められた。腎臓の病理組織学的検査では、240 mg/kg 以上の投与群で尿細管上皮における好塩基性顆粒が、1000 mg/kg 以上の投与群で尿細管上皮の変性／壊死、尿細管の拡張、尿細管における好塩基性物質の貯留及び硝子円柱が認められた。60 及び 240 mg/kg 投与群においても BUN の僅かな増加が認められたが、変性や壊死を伴うものではなく、毒性学的意義は乏しいと考えられた。

トキシコキネティクス測定では、各投与回で用量依存的な C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ の増加が認められた。4 回目の静脈内投与時の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は、他の投与回より高値であった。t_{max} は皮下投与では 1 又は 4 時間、静脈内投与では 0.1 時間であった。

以上、ビルトラルセンを幼若マウスに生後 7 日は皮下投与により、生後 14 日、21 日及び 28 日は静脈内投与により週 1 回、4 週間反復投与した結果、2000 mg/kg の用量まで忍容性を示した。

表 2.6.6.6.4.2-1 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）におけるトキシコキネティクス測定結果

投与量（mg/kg）	60	240	1000	2000
動物数 [a]	雄：3	雄：3	雄：3	雄：3
初回投与（皮下、生後 7 日）				
C_{max}（μg/mL）	119.5	240.4	468	1431
$AUC_{0\text{-}24hr}$（μg·hr/mL）	277.5	747.2	2715	7713
t_{max}（hr）	1.0	1.0	4.0	4.0
2 回目投与（静脈内、生後 14 日）				
C_{max}（μg/mL）	90.3	1313	4668	11660
$AUC_{0\text{-}24hr}$（μg·hr/mL）	153.6	955.4	5308	21340
t_{max}（hr）	0.1	0.1	0.1	0.1
3 回目投与（静脈内、生後 21 日）				
C_{max}（μg/mL）	315.5	1194	7755	13470
$AUC_{0\text{-}24hr}$（μg·hr/mL）	126.1	920.8	9957	19770
t_{max}（hr）	0.1	0.1	0.1	0.1
4 回目投与（静脈内、生後 28 日）				
C_{max}（μg/mL）	448.9	2051	6726	18900
$AUC_{0\text{-}24hr}$（μg·hr/mL）	187.1	1405	7681	28400
t_{max}（hr）	0.1	0.1	0.1	0.1

各値は平均値
a：各測定時点の動物数

2.6.6.6.4.3 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。主群の動物数は各群 80 例とし、各群 40 例は 10 週間の投与期間終了後に剖検を実施し、残る各群 40 例は 10 週間休薬して毒性所見の回復性を検討した。

またサテライト群として、トキシコキネティクス測定のため各群 33 例（対照群は 9 例）を別途設定し、検査に供した。幼若マウスを用いた 4 週間間歇皮下及び静脈内投与による用量設定試験（2）（2.6.6.6.4.2 項参照）において、1000 mg/kg 以上の投与群で尿細管上皮の変性／壊死、尿細管の拡張、尿細管における好塩基性物質の貯留及び硝子円柱が認められ、2000 mg/kg 投与群ではこれらの変化がより重篤であったことから、より長期の投与となることを考慮して、本試験の投与量は 1200 mg/kg を高用量に設定した。その他の用量は、公比 4 又は 5 で除して 240、60 及び 15 mg/kg を設定した。

投与 3 週目以降に 1200 mg/kg 投与群の 5 例が腎障害により死亡した。その他にサテライト群を含めて 15、60、240、1200 mg/kg 投与群でそれぞれ 1、3、2、3 例が死亡（瀕死期安楽死を含む）したが、採血過誤による死亡、雌雄取り違えによる安楽死等の発現状況を踏まえると、何れもビルトラルセン投与に起因したものではないと考えられた。

一般状態観察では、1200 mg/kg 投与群で半眼、活動性の低下、発声の増加及び立毛が認められた。これら変化は投与 3 週目から投与 8 週目の間に 1 回あるいは複数回認められた。体重測定では、1200 mg/kg 投与群で投与 4 週目から投与 10 週目の間で対照群に比べて体重が低値を示した。性成熟の評価では、1200 mg/kg 投与群で亀頭包皮分離の開始時期の遅延（対照群 27.5 日に対して 28.4 日）が認められたが、この変化は試験施設における背景データの範囲内（背景データ：26.9 日～33.6 日、平均 29.8 日）であったことから、毒性学的意義は乏しいと考えられた。機能観察総合評価（FOB）では、1200 mg/kg 投与群で聴覚反応テストにおいて定位反応を示す動物数の減少及び驚愕反応を示す動物数の増加が認められた。しかしながら、投与期間中に実施された聴覚性驚愕反応試験では、ビルトラルセン投与に起因した変化は認められず、毒性学的意義は乏しいと考えられた。

病理組織学的検査では、15 mg/kg 以上の投与群において尾静脈（投与部位）周囲に軽微な炎症性細胞浸潤が認められた。腎臓において、240 mg/kg 以上の投与群では尿細管変性、好塩基性尿細管及び空胞化が、1200 mg/kg 投与群では尿細管拡張及び円柱が認められた。その他、15 mg/kg 以上の投与群で尿細管上皮の肥大が低頻度かつ軽微に認められ、1200 mg/kg 投与群では僅かに頻度が高かったが、被験物質投与に対する適応性変化であると考えられた。1200 mg/kg 投与群では胸腺で重量減少を伴うリンパ球減少が認められ、一般状態及び体重の変化もあることから、ストレスに関連した二次的変化と考えられた。また、240 mg/kg 以上の投与群で前立腺重量の減少が認められたが、関連する組織学的変化は認められなかった。

投与期間中に認められた変化は、いずれも 10 週間の休薬後に回復性ないしは回復傾向が認められた。その他、回復期間中の FOB において、1200 mg/kg 投与群ではテールピンチ法で振り向き反応を示す動物数の減少及び噛み付き反応を示す動物数の増加が認められたが、投与期間及び回復期間中に実施した他の神経行動学的検査あるいは神経病理学的検査においては何ら変化は認められず、毒性学的意義は明らかでなかった。なお、回復期間終了時の病理検査では、1200 mg/kg 投与群で腎臓の肉眼的異常が認められ、病理組織学的には 240 mg/kg 以上の投与群で尿細管基底膜の肥厚、好塩基性細胞質、核集簇、間質の単核細胞浸潤及び線維化を特徴とする慢性進行性腎症の発現頻度の増加が認められ、投与終了時に認められた腎臓の変化に続発した二次的変化である

と考えられたが、腎病変を有する動物数は休薬により低下しており、腎臓の変化は回復傾向にあると判断した。

摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、骨検査（大腿骨長、骨密度測定）、神経行動学的検査（聴覚性驚愕反応、運動活動、モーリス水迷路）、神経病理学的検査（脳重量、脳形態、神経系・骨格筋・眼の神経病理組織学的検査）において、ビルトラルセン投与に起因した変化は認められなかった。

抗薬物抗体測定では、投与期間終了時及び回復期間終了時のいずれも血清中に抗ビルトラルセン抗体は検出されなかった。トキシコキネティクス測定では、各投与回で用量依存的な C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ の増加が認められた。また、静脈内投与時（2 回目及び 10 回目）の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は反復投与によって低下した。t_{max} は皮下投与では 1 又は 4 時間、静脈内投与では 0.1 時間であった。

以上の結果より、ビルトラルセンを幼若マウスに生後 7 日は皮下投与、生後 14 日から生後 70 日までは静脈内投与により週 1 回、10 週間反復投与した際の 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。

表 2.6.6.6.4.3-1 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におけるトキシコキネティクス測定結果

投与量（mg/kg）	15	60	240	1200
動物数 [a]	雄：3	雄：3	雄：3	雄：3
初回投与（皮下、生後 7 日）				
C_{max}（μg/mL）	48.8	169.8	698.9	1106
$AUC_{0\text{-}24hr}$（μg·hr/mL）	111.3	410.4	1838	8928
t_{max}（hr）	1.0	1.0	1.0	4.0
2 回目投与（静脈内、生後 14 日）				
C_{max}（μg/mL）	101.4	355.0	1766	8483
$AUC_{0\text{-}24hr}$（μg·hr/mL）	203.5	716.4	4340	21030
t_{max}（hr）	0.1	0.1	0.1	0.1
最終（10 回目）投与（静脈内、生後 70 日）				
C_{max}（μg/mL）	64.9	253.9	1062	1988
$AUC_{0\text{-}24hr}$（μg·hr/mL）	130.6	542.4	2144	8970
t_{max}（hr）	0.1	0.1	0.1	0.1

各値は平均値
a：各測定時点の動物数

2.6.6.7 局所刺激性試験

2.6.6.7.1 サル 12 週間間歇静脈内投与毒性試験における局所刺激性評価（試験番号 TX10746、資料番号 4.2.3.2-3、評価資料）

サル 12 週間歇静脈内投与毒性試験（2.6.6.3.3 項参照）の一部として、局所刺激性を評価した。各群雄 5 例の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。各群雄 3 例は 12 週間の投与期間終了後に剖検を実施し、残る各群雄 2 例は 4 週間休薬して回復性の検討に供した。

病理解剖学的検査では、60 mg/kg 以上の投与群で投与部位の皮下組織に赤色巣が認められたが、対照群においても同様の変化が認められたため、投与手技に起因した変化であると判断した。病理組織学的検査では、600 mg/kg 投与群で投与部位の皮下組織に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。これらの変化は対照群を含む各群で散見されたが、600 mg/kg 投与群の雄 1 例でのみその程度が強く認められた。

投与部位への変化はいずれも 4 週間の休薬後に回復した。

以上の結果より、サルにビルトラルセンを週 1 回、12 週間反復静脈内投与したとき、600 mg/kg の雄 1 例で投与部位の皮下組織に炎症所見が認められ、局所刺激性に関して 200 mg/kg まで忍容性が認められた。

2.6.6.7.2 サル 39 週間間歇静脈内投与毒性試験における局所刺激性評価（試験番号 TX10818、資料番号 4.2.3.2-4、評価資料）

サル 39 週間歇静脈内投与毒性試験（2.6.6.3.4 項参照）の一部として、局所刺激性を評価した。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。動物数は 10 mg/kg 投与群では雄 5 例、それ以外の投与群では各群雄 8 例とし、各群雄 5 例は 39 週間の投与期間終了後に剖検を実施し、10 mg/kg 以外の投与群の残る 3 例は 8 週間休薬して毒性所見の回復性を検討した。

病理解剖学的検査及び病理組織学的検査において、投与部位にビルトラルセン投与に起因した変化は認められなかった。

以上の結果より、サ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、局所刺激性に関して 360 mg/kg まで忍容性が認められた。

2.6.6.7.3 サル 12 週間間歇筋肉内投与毒性試験における局所刺激性評価（試験番号 TX10747、資料番号 4.2.3.2-5、評価資料）

サル 12 週間歇筋肉内投与毒性試験（2.6.6.3.5 項参照）の一部として、局所刺激性を評価した。各群雄 5 例の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。各群雄 3 例は 12 週間の投与期間終了後に剖検を実施し、残る各群雄 2 例は 4 週間休薬して毒性所見の回復性を検討した。

病理解剖学的検査では、100 mg/kg 投与群で投与部位の白色化、硬結あるいは赤色巣が認められた。病理組織学的検査では、100 mg/kg 投与群で投与部位あるいは骨格筋（投与部位近傍の大腿四頭筋）に筋線維の変性/壊死もしくは再生、炎症性細胞浸潤、線維化、筋外膜の水腫及びフィブリン滲出並びに血管周囲の単核細胞浸潤が認められた。

投与部位あるいは周囲の骨格筋への変化は、いずれも 4 週間の休薬後に回復傾向が認められた。

以上の結果より、サルにビルトラルセンを週 1 回、12 週間反復筋肉内投与したとき、100 mg/kg で投与部位あるいは周囲の骨格筋に炎症性変化が認められた。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 抗原性試験

該当試験なし。

2.6.6.8.2 免疫毒性試験

2.6.6.8.2.1 サル 12 週間間歇静脈内投与毒性試験及び 12 週間間歇筋肉内投与毒性試験から得られた血清中抗薬物抗体測定試験（試験番号 TX10759、資料番号 4.2.3.7.2-1、参考資料）

本試験では、サル 12 週間間歇静脈内投与毒性試験（2.6.6.3.3 項参照）及びサル 12 週間間歇筋肉内投与毒性試験（2.6.6.3.5 項参照）において得られた血清試料を用いて、血清中の抗薬物抗体を酵素免疫測定法（ELISA）により測定した。

静脈内投与毒性試験では、投与 29 日に 200 mg/kg 投与群の雄 5 例中 1 例で抗ビルトラルセン抗体産生が認められた。また、筋肉内投与毒性試験では、投与 77 日に 100 mg/kg 投与群の雄 5 例中 1 例で抗ビルトラルセン抗体産生が認められた。

以上、ビルトラルセンをサルに反復静脈内投与又は筋肉内投与することにより抗ビルトラルセン抗体の産生が確認された。

2.6.6.8.3 毒性発現の機序に関する試験

該当試験なし。

2.6.6.8.4 依存性試験

該当試験なし。

2.6.6.8.5 代謝物の毒性試験

該当試験なし。

2.6.6.8.6 不純物の毒性試験

ビルトラルセンの製造方法の変更に伴い、[redacted]原薬（[redacted] 原薬）、[redacted]（[redacted] 原薬）及び[redacted]原薬（[redacted] 原薬）に含まれる不純物による毒性を比較するため、これらの原薬を使用して、サルを用いた 5 週間間歇静脈内投与毒性試験、細菌を用いる復帰突然変異試験及び培養細胞を用いる染色体異常試験を実施した。

2.6.6.8.6.1 サル 5 週間間歇静脈内投与毒性比較試験（1）（試験番号 TX10832、資料番号 4.2.3.7.6-1、評価資料）

各群雄 5 例のカニクイザルにビルトラルセンの[redacted] 原薬（Lot 57）及び[redacted] 原薬（Lot 59）を 0（対照群）、200 及び 600 mg/kg の用量で週 1 回、5 週間反復静脈内投与し、その製造方法の違いによる毒性発現を比較した。サル 12 週間間歇静脈内投与毒性試験（2.6.6.3.3 項参照）において、200 及び 600 mg/kg で腎臓の近位尿細管の好塩基性変化及び上皮の空胞化、単核細胞浸潤並びに髄

放線間質の水腫が認められたことから、各所見の再現性と原薬間における毒性発現の違いを検討するため、本試験の投与量は 200 及び 600 mg/kg を設定した。

ビルトラルセン投与に起因した死亡は認められなかった。

尿検査では、両原薬の 600 mg/kg 投与群で尿蛋白の僅かな増加が同程度に認められた。血液生化学的検査では、両原薬の 600 mg/kg 投与群で BUN の増加が同程度に認められた。病理組織学的検査では、200 mg/kg 以上の投与群で腎臓の尿細管上皮に好塩基性顆粒の沈着が、600 mg/kg 投与群では近位尿細管曲部及び直部の上皮の空胞化、遠位尿細管の拡張が認められた。両原薬間でこれら病理組織学的変化の程度や出現頻度に差は認められなかった。

一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査、心電図検査、血液学的検査、血清中サイトカイン測定、血清中補体測定、末梢血イムノフェノタイピング、器官重量測定及び病理解剖学的検査において、ビルトラルセン投与に起因した変化は認められなかった。

抗薬物抗体測定では、血清中に抗ビルトラルセン抗体は検出されなかった。トキシコキネティクス測定では、投与初日及び投与最終日のいずれも用量依存的な C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ の増加が認められた。反復投与による影響は認められなかった。両原薬間でビルトラルセンの曝露に差は認められなかった。また、不純物に関して、[redacted] 原薬では 5 つの不純物（IM1～IM5）が検出され、[redacted] 原薬では IM4 を除く 4 つの不純物が検出された。[redacted] 原薬では、不純物測定の際に検量線サンプルのクロマトグラムにおける IM4 のピークが小さく、検量線を作成できなかったため、定量できなかった。

以上、[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。

表 2.6.6.8.6.1-1 サル 5 週間間歇静脈内投与毒性比較試験（1）におけるトキシコキネティクス測定結果

投与量（mg/kg）	200		600	
原薬	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
動物数	雄：3	雄：3	雄：3	雄：3
初回投与				
C_{max}（μg/mL）	1974	2443	6822	6723
$AUC_{0\text{-}24hr}$（μg·hr/mL）	715.1	903.7	4151	4670
最終投与（5 回目）				
C_{max}（μg/mL）	2536	2319	6897	7346
$AUC_{0\text{-}24hr}$（μg·hr/mL）	909.7	1035	3796	4777

各値は平均値

2.6.6.8.6.2 サル 5 週間間歇静脈内投与毒性比較試験（2）（試験番号 TX10837、資料番号 4.2.3.7.6-2、評価資料）

各群雄 5 例のカニクイザルにビルトラルセンの [redacted] 原薬（Lot 57）及び [redacted] 原薬（Lot 63）を 0（対照群）、200 及び 600 mg/kg の用量で週 1 回、5 週間反復静脈内投与し、その製造方法の違いによる毒性発現を比較した。本試験の投与量は 200 及び 600 mg/kg を設定した（投与量の設定理由は 2.6.6.8.6.1 項参照）。

ビルトラルセン投与に起因した死亡は認められなかった。

尿検査では、両原薬の 200 mg/kg 以上の投与群で尿蛋白の僅かな増加が同程度に認められた。血液生化学的検査では、両原薬の 600 mg/kg 投与群で BUN の増加が同程度に認められた。病理解剖学的検査では、[redacted] 原薬の 600 mg/kg 投与群で腎臓の腫大が腎臓重量の高値を伴って認められたが、[redacted] 原薬の 600 mg/kg 投与群では認められなかった。しかしながら、病理組織学的検査では両原薬の 200 mg/kg 以上の投与群で腎臓の尿細管上皮における好塩基性顆粒の沈着及び近位尿細管曲部又は直部の上皮の空胞化が、両原薬の 600 mg/kg 投与群で遠位尿細管の拡張が認められ、原薬間でこれらの変化の程度や出現頻度に差は認められなかった。

一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査、心電図検査、血液学的検査、血清中サイトカイン測定、血清中補体測定及び末梢血イムノフェノタイピングにおいて、ビルトラルセン投与に起因した変化は認められなかった。

抗薬物抗体測定では、血清中に抗ビルトラルセン抗体は検出されなかった。トキシコキネティクス測定では、投与初日及び投与最終日のいずれも用量依存的な C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ の増加が認められた。反復投与による影響は認められなかった。両原薬間でビルトラルセンの曝露に差は認められなかった。また、5 つの不純物（IM1～IM5）の曝露が全ての投与群で認められた。

以上、[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。

表 2.6.6.8.6.2-1 サル 5 週間間歇静脈内投与毒性比較試験（2）におけるトキシコキネティクス測定結果

投与量（mg/kg）	200		600	
原薬	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
動物数	雄：3	雄：3	雄：3	雄：3
初回投与				
C_{max}（μg/mL）	2440	2460	7317	6063
$AUC_{0\text{-}24hr}$（μg·hr/mL）	1156	1092	5147	4482
最終投与（5 回目）				
C_{max}（μg/mL）	2324	2348	7200	7507
$AUC_{0\text{-}24hr}$（μg·hr/mL）	1070	1018	4623	4347

各値は平均値

2.6.6.8.6.3 細菌を用いる復帰突然変異試験（2）（試験番号 TX10828、資料番号 4.2.3.7.6-3、評価資料）

4 種類のネズミチフス菌（TA100、TA1535、TA98 及び TA1537）及び大腸菌（WP2*uvrA*）を用い、プレインキュベーション法により、代謝活性化系の存在下及び非存在下で、ビルトラルセン（[redacted] 原薬）の遺伝子突然変異誘発性の有無を検討した。溶媒対照と比較して、復帰変異コロニー数が 2 倍以上増加し、用量依存性が認められるときを陽性とした。試験用量は最高用量を 5000 μg/plate として、以下公比 2 で除して 2500、1250、625、313、156 μg/plate の計 6 段階を設定した。

その結果、全ての菌株において、代謝活性化の有無にかかわらず、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。したがって、ビルトラルセン（[redacted] 原薬）は遺伝子突然変異誘発性を示さないと判断した。

2.6.6.8.6.4 細菌を用いる復帰突然変異試験（3）（試験番号 TX10838、資料番号 4.2.3.7.6-4、評価資料）

4 種類のネズミチフス菌（TA100、TA1535、TA98 及び TA1537）及び大腸菌（WP2*uvrA*）を用い、プレインキュベーション法により、代謝活性化系の存在下及び非存在下で、ビルトラルセン（[redacted] 原薬）の遺伝子突然変異誘発性の有無を検討した。溶媒対照と比較して、復帰変異コロニー数が 2 倍以上増加し、用量依存性が認められるときを陽性とした。試験用量は最高用量を 5000 µg/plate として、以下公比 2 で除して 2500、1250、625、313、156 µg/plate の計 6 段階を設定した。

その結果、全ての菌株において、代謝活性化の有無にかかわらず、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。したがって、ビルトラルセン（[redacted] 原薬）は遺伝子突然変異誘発性を示さないと判断した。

2.6.6.8.6.5 哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験（2）（試験番号 TX10829、資料番号 4.2.3.7.6-5、評価資料）

CHL/IU 細胞にビルトラルセン（[redacted] 原薬）を代謝活性化系の存在下及び非存在下で 6 時間、並びに代謝活性化系の非存在下で 24 時間処理し、染色体異常誘発性を評価した。試験用量は最高用量を 5000 µg/mL として、以下公比 2 で除して 2500、1250 µg/mL の計 3 段階を設定した。

その結果、いずれの処理においても染色体の構造異常及び数的異常を有する細胞の割合を増加させなかった。したがって、ビルトラルセン（[redacted] 原薬）は染色体異常誘発性を示さないと判断した。

2.6.6.8.6.6 哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験（3）（試験番号 TX10839、資料番号 4.2.3.7.6-6、評価資料）

CHL/IU 細胞にビルトラルセン（[redacted] 原薬）を代謝活性化系の存在下及び非存在下で 6 時間、並びに代謝活性化系の非存在下で 24 時間処理し、染色体異常誘発性を評価した。試験用量は最高用量を 5000 µg/mL として、以下公比 2 で除して 2500、1250 µg/mL の計 3 段階を設定した。

その結果、いずれの処理においても染色体の構造異常及び数的異常を有する細胞の割合を増加させなかった。したがって、ビルトラルセン（[redacted] 原薬）は染色体異常誘発性を示さないと判断した。

2.6.6.8.7 その他の試験

該当試験なし。

2.6.6.9 考察及び結論

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）及び生殖発生毒性試験を実施した。また、[redacted] 原薬及び [redacted] 原薬の遺伝毒性試験、並びに [redacted] 原薬、[redacted] 原薬及び [redacted] 原薬の毒性学的な同等性を確認する反復投与毒性比較試験を実施した。なお、局所刺激性は反復投与毒性試験の中で評価した。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。

2.6.6.9.1 一般毒性試験

2.6.6.9.1.1 急性毒性

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。一般状態及び体重について、いずれの投与経路においても変化は認められなかった。病理組織学的検査では、600 mg/kg の単回静脈内投与により腎臓の近位尿細管上皮の空胞化が認められたが、単回筋肉内投与では腎臓に関連した変化は認められなかった。

2.6.6.9.1.2 反復投与毒性

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 [2, 3]。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。なお、ラット試験（がん原性用量設定試験）では NOAEL を算出しなかった。

2.6.6.9.2 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。

2.6.6.9.3 がん原性試験（用量設定試験）

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 マウスを用いた用量設定試験の結果、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、用量設定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おり [4]、本薬では野生型 ras H2 マウスを用いた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。以上、本薬の毒性試験では発がん性を示唆する変化は認められず、臨床試験においても本薬の発がん性を示唆する有害事象はなかったことから、本薬のがん原性について現段階では特段の懸念はないと考えられる。

2.6.6.9.4 生殖発生毒性試験

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。なお、最初に実施した 4 週間の用量設定試験（2.6.6.6.4.1 項参照）において、初回投与（生後 7 日齢、皮下投与）に比べて 2 回目投与（生後 14 日齢、皮下投与）で曝露量が減少した。また、10 週間試験（2.6.6.6.4.3 項参照）では、2 回目投与（生後 14 日齢、静脈内投与）に比べて最終投与（生後 70 日齢、静脈内投与）で曝露量が減少した。本薬が主に腎臓から排泄されること（2.6.4.5.2.2 項参照）、及びマウスは出生後も腎機能が発達し生後 28～32 日齢において糸球体濾過量が最大になることが報告されていることから [5]、これらの試験でみられた反復投与による曝露量の減少は、生後 7 日齢から 14 日齢、あるいは生後 14 日齢から 70 日齢にかけて腎機能が発達し、糸球体濾過量が増加したことに起因する可能性は否定できない。しかしながら、投与方法を同一にして実施した 4 週間試験（2.6.6.6.4.2 項参照）と 10 週間試験（2.6.6.6.4.3 項参照）とを比較した場合、同一の生後日齢（生後 14 日齢）においても曝露量に差が認められており、上述の曝露量の減少は、週齢差による腎機能の発達の影響だけではなく、データのばらつきの可能性も考えられた。

2.6.6.9.5 局所刺激性試験

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。

2.6.6.9.6 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）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。

2.6.6.9.7 不純物の毒性試験

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れなかった。

2.6.6.9.8 動物種間の曝露比較

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（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。

マウス及びサルを用いた反復投与毒性試験では 5 つの不純物（IM1～IM5）についても曝露が認められ、各毒性試験の中で不純物の毒性評価は可能と判断した。

表 2.6.6.9.8-1 マウス、サル及びヒトにおけるビルトラルセンの曝露量の比較

試験	NOAEL			LOAEL		
	投与量 (mg/kg)	C_{max} [a] (ng/mL)	AUC_{0-24hr} [a] (ng·hr/mL)	投与量 (mg/kg)	C_{max} [a] (ng/mL)	AUC_{0-24hr} [a] (ng·hr/mL)
マウス 13 週間 (TX10800)	60	230000 [0.70 倍]	83480 [0.16 倍]	240	854400 [2.60 倍]	420600 [0.83 倍]
マウス 26 週間 (TX10827)	15	47110 [0.14 倍]	17640 [0.03 倍]	60 [b]	210200 [0.64 倍]	67470 [0.13 倍]
				240 [c]	682400 [2.07 倍]	500600 [0.99 倍]
幼若マウス 10 週間 (TX10844)	60	253900 [0.77 倍]	542400 [1.07 倍]	240	1062000 [3.23 倍]	2144000 [4.22 倍]
サル 12 週間 (TX10746)	60	744800 [2.26 倍]	270100 [0.53 倍]	200	2368000 [7.20 倍]	963300 [1.90 倍]
サル 39 週間 (TX10818)	60	613900 [1.87 倍]	261100 [0.51 倍]	360	3711000 [11.28 倍]	2294000 [4.52 倍]
ヒト [d]	80	C_{max}：329000 ng/mL AUC_{0-24hr}：508000 ng·hr/mL（$AUC_{0-\infty}$を AUC_{0-24hr} とした）				

a：各毒性試験における最終投与時の曝露量の平均値を示す。
[ ]内はヒト曝露量との比率を示す。ヒト曝露量については注釈 d 参照。
b：膀胱に変化が認められた投与量。
c：腎臓に変化が認められた投与量。
d：デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者を対象とした国内第 I/II 相臨床試験（NS065/NCNP01-P1/2 試験、2.7.6.2 項参照）における最終投与時（Visit 24）の平均値。

2.6.6.9.9 総括

以上、毒性試験において、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。また、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。

したがって、腎機能をモニタリングするなど腎機能に注意することで、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いと考えられた。

2.6.6.10 図表

図表は、本文中の適切な場所に記載した。

2.6.6.11 参考文献

1. Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. J Appl Toxicol. 2001;21:15-23. ＜資料番号 4.3-19＞

2. 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＞

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

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

5. Frazier KS. Species differences in renal development and associated developmental nephrotoxicity. Birth Defects Res. 2017;109:1243-56. ＜資料番号 4.3-20＞

目次

2.6.7 毒性試験概要表 2
2.6.7.1 毒性試験：一覧表 2
2.6.7.2 トキシコキネティクス：トキシコキネティスク試験の一覧表 5
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 7
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 12
2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 13
2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験 14
2.6.7.8 *In Vitro* 遺伝毒性試験 43
2.6.7.9 *In Vivo* 遺伝毒性試験 46
2.6.7.10 がん原性試験 48
2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 59
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 60
2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 63
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胎の機能に関する試験 63
2.6.7.15 新生児を用いた試験 64
2.6.7.16 局所刺激試験 75
2.6.7.17 その他の毒性試験 76
2.6.7.18 参考文献 90

2.6.7 毒性試験概要表

2.6.7.1 毒性試験：一覧表

一覧表（1/3）

被験物質：Viltolarsen

試験の種類	動物種/系統 [a]	投与方法 [b]	投与期間	投与量（mg/kg）[c]	GLP 適用	実施施設	試験番号	CTD 記載箇所
単回投与毒性試験	サル Cynomolgus	静脈内	—	0, 600	不適	[redacted]	TX10743	4.2.3.1-1（参考資料）
	サル Cynomolgus	筋肉内	—	0, 1, 10, 100	適	[redacted]	TX10762	4.2.3.1-2（評価資料）
反復投与毒性試験	マウス Crl:CD1 (ICR)	静脈内	13 週間	0, 60, 240, 1000	適	[redacted]	TX10800	4.2.3.2-1（評価資料）
	マウス Crl:CD1 (ICR)	静脈内	26 週間	0, 15, 60, 240, 1000	適	[redacted]	TX10827	4.2.3.2-2（評価資料）
	サル Cynomolgus	静脈内	12 週間	0, 60, 200, 600	適	[redacted]	TX10746	4.2.3.2-3（評価資料）
	サル Cynomolgus	静脈内	39 週間	0, 10, 60, 360	適	[redacted]	TX10818	4.2.3.2-4（評価資料）
	サル Cynomolgus	筋肉内	12 週間	0, 100	適	[redacted]	TX10747	4.2.3.2-5（評価資料）
遺伝毒性試験	ネズミチフス菌及び大腸菌	*In vitro*	—	0, 156 to 5000 µg/plate, ±S9	適	[redacted]	TX10751	4.2.3.3.1-1（評価資料）
	CHL/IU 細胞	*In vitro*	—	0, 1250 to 5000 µg/mL, ±S9	適	[redacted]	TX10752	4.2.3.3.1-2（評価資料）
	マウス Crl:CD1 (ICR)	静脈内	2 日間	0, 250, 500, 1000	適	[redacted]	TX10753	4.2.3.3.2-1（評価資料）

CHL/IU：チャイニーズハムスター肺由来線維芽細胞

a：*in vivo* 毒性試験では雄動物のみを用いて試験を実施した。

b：週 1 回の間歇投与（ただし、遺伝毒性試験は 1 日 1 回投与）。

c：反復投与毒性試験の項では無毒性量（NOAEL）と判断された用量に下線を付した。

一覧表（2/3）

試験の種類	動物種/系統 [a]	投与方法 [b]	投与期間	投与量（mg/kg）	GLP 適用	実施施設	試験番号	CTD 記載箇所
がん原性試験	ラット Han Wistar	静脈内	4 週間	0, 100, 300, 1000	不適	[redacted] [c] （英国）	TX10869	4.2.3.4.1-1 （参考資料）
	ラット Han Wistar	静脈内	13 週間	0, 250, 500, 1000	適	[redacted] [c] （英国）	TX10883	4.2.3.4.1-2 （評価資料）
	マウス wild-type CByB6F1- Tg(HRAS)2Jic	静脈内	4 週間	0, 250, 500, 1000	適	[redacted] [c] （英国）	TX10884	4.2.3.4.2-1 （評価資料）
生殖発生毒性試験	マウス Crl:CD1 (ICR)	静脈内	12 週間（交配前の 9 週間、交配期間及び剖検前日まで）	0, 60, 240, 1000	適	[redacted]	TX10958	4.2.3.5.1-1 （評価資料）
	マウス Crl:CD1 (ICR)	皮下 静脈内	生後 7、14 日（皮下） 生後 21、28 日（静脈内）	0, 60, 240, 1000	不適	[redacted] （米国）	TX10843	4.2.3.5.4-1 （参考資料）
	マウス Crl:CD1 (ICR)	皮下 静脈内	生後 7 日（皮下） 生後 14、21、28 日（静脈内）	0, 60, 240, 1000, 2000	不適	[redacted] （米国）	TX10896	4.2.3.5.4-2 （参考資料）
	マウス Crl:CD1 (ICR)	皮下 静脈内	生後 7 日（皮下） 生後 14～70 日（静脈内）	0, 15, 60, 240, 1200	適	[redacted] （米国）	TX10844	4.2.3.5.4-3 （評価資料）

a：*in vivo* 毒性試験では雄動物のみを用いて試験を実施した。
b：週 1 回の間歇投与。
c：現在の [redacted]。

一覧表（3/3）

試験の種類		動物種/系統 [a]	投与方法 [b]	投与期間	投与量（mg/kg）	GLP 適用	実施施設	試験番号	CTD 記載箇所
局所刺激性試験 [c]		サル Cynomolgus	静脈内	12 週間	0, 60, 200, 600	適	[redacted]	TX10746	4.2.3.2-3（評価資料）
		サル Cynomolgus	静脈内	39 週間	0, 10, 60, 360	適	[redacted]	TX10818	4.2.3.2-4（評価資料）
		サル Cynomolgus	筋肉内	12 週間	0, 100	適	[redacted]	TX10747	4.2.3.2-5（評価資料）
その他の毒性試験	免疫毒性試験	サル Cynomolgus	筋肉内 静脈内	12 週間	0, 100 (筋肉内) 0, 60, 200, 600 (静脈内)	不適	[redacted]	TX10759	4.2.3.7.2-1（参考資料）
	不純物の毒性試験	サル Cynomolgus	静脈内	5 週間	0, 200, 600	適	[redacted]	TX10832	4.2.3.7.6-1（評価資料）
		サル Cynomolgus	静脈内	5 週間	0, 200, 600	適	[redacted]	TX10837	4.2.3.7.6-2（評価資料）
		ネズミチフス菌及び大腸菌	*In vitro*	—	0, 156 to 5000 µg/plate, ±S9	適	[redacted]	TX10828	4.2.3.7.6-3（評価資料）
		ネズミチフス菌及び大腸菌	*In vitro*	—	0, 156 to 5000 µg/plate, ±S9	適	[redacted]	TX10838	4.2.3.7.6-4（評価資料）
		CHL/IU 細胞	*In vitro*	—	0, 1250 to 5000 µg/mL, ±S9	適	[redacted]	TX10829	4.2.3.7.6-5（評価資料）
		CHL/IU 細胞	*In vitro*	—	0, 1250 to 5000 µg/mL, ±S9	適	[redacted]	TX10839	4.2.3.7.6-6（評価資料）

CHL/IU：チャイニーズハムスター肺由来線維芽細胞

a：*in vivo* 毒性試験では雄動物のみを用いて試験を実施した。

b：週 1 回の間歇投与。

c：局所刺激性試験は反復毒性試験の一部として評価を行った。

2.6.7.2 トキシコキネティクス：トキシコキネティスク試験の一覧表

トキシコキネティクス試験の一覧表（1/2）

被験物質：Viltolarsen

試験の種類	試験系	投与方法[a]	投与量（mg/kg）	GLP 適用	試験番号	CTD 記載箇所
サル単回筋肉内投与毒性試験	サル Cynomolgus	筋肉内	0, 1, 10, 100	適	TX10762	4.2.3.1-2（評価資料）
マウス 13 週間反復静脈内投与毒性試験	マウス Crl:CD1 (ICR)	静脈内	0, 60, 240, 1000	適	TX10800	4.2.3.2-1（評価資料）
マウス 26 週間反復静脈内投与毒性試験	マウス Crl:CD1 (ICR)	静脈内	0, 15, 60, 240, 1000	適	TX10827	4.2.3.2-2（評価資料）
サル 12 週間反復静脈内投与毒性試験	サル Cynomolgus	静脈内	0, 60, 200, 600	適	TX10746	4.2.3.2-3（評価資料）
サル 39 週間反復静脈内投与毒性試験	サル Cynomolgus	静脈内	0, 10, 60, 360	適	TX10818	4.2.3.2-4（評価資料）
サル 12 週間反復筋肉内投与毒性試験	サル Cynomolgus	筋肉内	0, 100	適	TX10747	4.2.3.2-5（評価資料）
マウス骨髄細胞を用いる小核試験	マウス Crl:CD1 (ICR)	静脈内	0, 250, 500, 1000	適	TX10753	4.2.3.3.2-1（評価資料）
ラット 13 週間がん原性用量設定試験	ラット Han Wistar	静脈内	0, 250, 500, 1000	適	TX10883	4.2.3.4.1-2（評価資料）
マウス 4 週間がん原性用量設定試験	マウス wild-type CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic	静脈内	0, 250, 500, 1000	適	TX10884	4.2.3.4.2-1（評価資料）
マウス雄受胎能に関する試験	マウス Crl:CD1 (ICR)	静脈内	0, 60, 240, 1000	適	TX10958	4.2.3.5.1-1（評価資料）

a：週 1 回の間歇投与（ただし、マウス骨髄細胞を用いる小核試験は 1 日 1 回）。

トキシコキネティクス試験の一覧表（2/2）

試験の種類	試験系	投与方法 [a]	投与量（mg/kg）	GLP 適用	試験番号	CTD 記載箇所
幼若マウス 4 週間反復皮下及び静脈内投与毒性試験（1）	マウス Crl:CD1 (ICR)	皮下 静脈内	0, 60, 240, 1000	不適	TX10843	4.2.3.5.4-1（参考資料）
幼若マウス 4 週間反復皮下及び静脈内投与毒性試験（2）	マウス Crl:CD1 (ICR)	皮下 静脈内	0, 60, 240, 1000, 2000	不適	TX10896	4.2.3.5.4-2（参考資料）
幼若マウス 10 週間反復皮下及び静脈内投与毒性試験	マウス Crl:CD1 (ICR)	皮下 静脈内	0, 15, 60, 240, 1200	適	TX10844	4.2.3.5.4-3（評価資料）
サル 5 週間反復静脈内投与毒性試験（1）	サル Cynomolgus	静脈内	0, 200, 600	適	TX10832	4.2.3.7.6-1（評価資料）
サル 5 週間反復静脈内投与毒性試験（2）	サル Cynomolgus	静脈内	0, 200, 600	適	TX10837	4.2.3.7.6-2（評価資料）

a：週 1 回の間歇投与。

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

マウス、ラット及びサルにおけるビルトラルセンの $AUC_{0\text{-}24hr}$（μg·hr/mL）及び C_{max}（μg/mL）（1/3）

被験物質：Viltolarsen

投与量（mg/kg）	$AUC_{0\text{-}24hr}$（μg· hr/mL）			C_{max}（μg/mL）		
	マウス	ラット	サル	マウス	ラット	サル
1	–	–	3.914 (D0)[a]	–	–	1.943 (D0)[a]
10	–	–	41.45 (D0)[a] 54.69 (D259)[e]	–	–	11.42 (D0)[a] 122.8 (D259)[e]
15	17.64 (D175)[c] 130.6 (PND70)[m]	–	–	47.11 (D175)[c] 64.88 (PND70)[m]	–	–
60	83.48 (D84)[b] 67.47 (D175)[c] 57.09 (D63)[j] 164.8 (PND28)[k] 187.1 (PND28)[l] 542.4 (PND70)[m]	–	270.1 (D77)[d] 261.1 (D259)[e]	230.0 (D84)[b] 210.2 (D175)[c] 143.1 (D63)[j] 393.0 (PND28)[k] 448.9 (PND28)[l] 253.9 (PND70)[m]	–	744.8 (D77)[d] 613.9 (D259)[e]
100	–	–	319.7 (D0)[a] 540.0 (D77)[f]	–	–	66.15 (D0)[a] 49.28 (D77)[f]
200	–	–	963.3 (D77)[d] 909.7 (D28)[n] 1035 (D28)[o] 1070 (D28)[p] 1018 (D28)[q]	–	–	2368 (D77)[d] 2536 (D28)[n] 2319 (D28)[o] 2324 (D28)[p] 2348 (D28)[q]

D=day of dosing (study day); PND=postnatal day

a：サル単回筋肉内投与毒性試験（4.2.3.1-2）
b：マウス 13 週間反復静脈内投与毒性試験（4.2.3.2-1）
c：マウス 26 週間反復静脈内投与毒性試験（4.2.3.2-2）
d：サル 12 週間反復静脈内投与毒性試験（4.2.3.2-3）
e：サル 39 週間反復静脈内投与毒性試験（4.2.3.2-4）
f：サル 12 週間反復筋肉内投与毒性試験（4.2.3.2-5）
g：マウス骨髄細胞を用いる小核試験（4.2.3.3.2-1）
h：マウス 4 週間がん原性用量設定試験（4.2.3.4.2-1）
i：ラット 13 週間がん原性用量設定試験（4.2.3.4.1-2）
j：マウス雄受胎能に関する試験（4.2.3.5.1-1）
k：幼若マウス 4 週間反復皮下及び静脈内投与毒性試験（1）（4.2.3.5.4-1）
l：幼若マウス 4 週間反復皮下及び静脈内投与毒性試験（2）（4.2.3.5.4-2）
m：幼若マウス 10 週間反復皮下及び静脈内投与毒性試験（4.2.3.5.4-3）
n：Lot 57: サル 5 週間反復静脈内投与毒性試験（1）（4.2.3.7.6-1）
o：Lot 59: サル 5 週間反復静脈内投与毒性試験（1）（4.2.3.7.6-1）
p：Lot 57: サル 5 週間反復静脈内投与毒性試験（2）（4.2.3.7.6-2）
q：Lot 63: サル 5 週間反復静脈内投与毒性試験（2）（4.2.3.7.6-2）

マウス、ラット及びサルにおけるビルトラルセンの $AUC_{0\text{-}24hr}$（μg·hr/mL）及び C_{max}（μg/mL）（2/3）

投与量（mg/kg）	$AUC_{0\text{-}24hr}$（μg· hr/mL）			C_{max}（μg/mL）		
	マウス	ラット	サル	マウス	ラット	サル
240	420.6 (D84)[b] 500.6 (D175)[c] 453.4 (D63)[j] 1242 (PND28)[k] 1405 (PND28)[l] 2144 (PND70)[m]	–	–	854.4 (D84)[b] 682.4 (D175)[c] 781.0 (D63)[j] 2239 (PND28)[k] 2051 (PND28)[l] 1062 (PND70)[m]	–	–
250	377.3 (D1)[g] 491 (D22)[h]	934 (D85)[i]	–	875.0 (D1)[g] 1120 (D22)[h]	1000 (D85)[i]	–
360	–	–	2294 (D259)[e]	–	–	3711 (D259)[e]
500	1036 (D1)[g] 1070 (D22)[h]	2340 (D85)[i]	–	1453 (D1)[g] 1770 (D22)[h]	2040 (D85)[i]	–
600	–	–	5581 (D77)[d] 3796 (D28)[n] 4777 (D28)[o] 4623 (D28)[p] 4347 (D28)[q]	–	–	7247 (D77)[d] 6897 (D28)[n] 7346 (D28)[o] 7200 (D28)[p] 7507 (D28)[q]

D= day of dosing (study day); PND=postnatal day

a：サル単回筋肉内投与毒性試験（4.2.3.1-2）
b：マウス 13 週間反復静脈内投与毒性試験（4.2.3.2-1）
c：マウス 26 週間反復静脈内投与毒性試験（4.2.3.2-2）
d：サル 12 週間反復静脈内投与毒性試験（4.2.3.2-3）
e：サル 39 週間反復静脈内投与毒性試験（4.2.3.2-4）
f：サル 12 週間反復筋肉内投与毒性試験（4.2.3.2-5）
g：マウス骨髄細胞を用いる小核試験（4.2.3.3.2-1）
h：マウス 4 週間がん原性用量設定試験（4.2.3.4.2-1）
i：ラット 13 週間がん原性用量設定試験（4.2.3.4.1-2）
j：マウス雄受胎能に関する試験（4.2.3.5.1-1）
k：幼若マウス 4 週間反復皮下及び静脈内投与毒性試験（1）（4.2.3.5.4-1）
l：幼若マウス 4 週間反復皮下及び静脈内投与毒性試験（2）（4.2.3.5.4-2）
m：幼若マウス 10 週間反復皮下及び静脈内投与毒性試験（4.2.3.5.4-3）
n：Lot 57: サル 5 週間反復静脈内投与毒性試験（1）（4.2.3.7.6-1）
o：Lot 59: サル 5 週間反復静脈内投与毒性試験（1）（4.2.3.7.6-1）
p：Lot 57: サル 5 週間反復静脈内投与毒性試験（2）（4.2.3.7.6-2）
q：Lot 63: サル 5 週間反復静脈内投与毒性試験（2）（4.2.3.7.6-2）

マウス、ラット及びサルにおけるビルトラルセンの $AUC_{0\text{-}24hr}$（μg·hr/mL）及び C_{max}（μg/mL）（3/3）

投与量（mg/kg）	$AUC_{0\text{-}24hr}$（μg· hr/mL）			C_{max}（μg/mL）		
	マウス	ラット	サル	マウス	ラット	サル
1000	12300 (D84)[b] 17280 (D175)[c] 2956 (D1)[g] 5950 (D22)[h] 7283 (D63)[j] 9239 (PND28)[k] 7681 (PND28)[l]	7060 (D85)[i]	–	5535(D84)[b] 4352 (D175)[c] 5706 (D1)[g] 4790 (D22)[h] 3717 (D63)[j] 12640 (PND28)[k] 6726 (PND28)[l]	4110 (D85)[i]	–
1200	8970 (PND70)[m]	–	–	1988 (PND70)[m]	–	–
2000	28400 (PND28)[l]	–	–	18900 (PND28)[l]	–	–

D=day of dosing (study day); PND=postnatal day

a：サル単回筋肉内投与毒性試験（4.2.3.1-2）
b：マウス 13 週間反復静脈内投与毒性試験（4.2.3.2-1）
c：マウス 26 週間反復静脈内投与毒性試験（4.2.3.2-2）
d：サル 12 週間反復静脈内投与毒性試験（4.2.3.2-3）
e：サル 39 週間反復静脈内投与毒性試験（4.2.3.2-4）
f：サル 12 週間反復筋肉内投与毒性試験（4.2.3.2-5）
g：マウス骨髄細胞を用いる小核試験（4.2.3.3.2-1）
h：マウス 4 週間がん原性用量設定試験（4.2.3.4.2-1）
i：ラット 13 週間がん原性用量設定試験（4.2.3.4.1-2）
j：マウス雄受胎能に関する試験（4.2.3.5.1-1）
k：幼若マウス 4 週間反復皮下及び静脈内投与毒性試験（1）（4.2.3.5.4-1）
l：幼若マウス 4 週間反復皮下及び静脈内投与毒性試験（2）（4.2.3.5.4-2）
m：幼若マウス 10 週間反復皮下及び静脈内投与毒性試験（4.2.3.5.4-3）
n：Lot 57: サル 5 週間反復静脈内投与毒性試験（1）（4.2.3.7.6-1）
o：Lot 59: サル 5 週間反復静脈内投与毒性試験（1）（4.2.3.7.6-1）
p：Lot 57: サル 5 週間反復静脈内投与毒性試験（2）（4.2.3.7.6-2）
q：Lot 63: サル 5 週間反復静脈内投与毒性試験（2）（4.2.3.7.6-2）

2.6.7.4 毒性試験：被験物質一覧

使用ロット（1/2）

被験物質：Viltolarsen

バッチ番号	純度（%）	水分（%）	規格設定された不純物（%）						試験番号	試験の種類
			[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	Total		
申請規格 [a]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]		
試験ロットの規格 [b]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]		
20 ([redacted])	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	TX10743 TX10759	サル単回静脈内投与毒性試験 サル 12 週間反復静脈内及び筋肉内投与免疫毒性試験
23 ([redacted])	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	TX10762 TX10746 TX10747 TX10751 TX10752 TX10753	サル単回筋肉内投与毒性試験 サル 12 週間反復静脈内投与毒性試験 サル 12 週間反復筋肉内投与毒性試験 細菌を用いる復帰突然変異試験 ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験 マウス骨髄細胞を用いる小核試験
56 ([redacted])	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	TX10818	サル 39 週間反復静脈内投与毒性試験
57 ([redacted])	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	TX10827 TX10832 TX10837 TX10828 TX10829	マウス 26 週間反復静脈内投与毒性試験 サル 5 週間反復静脈内投与毒性試験（1） サル 5 週間反復静脈内投与毒性試験（2） 細菌を用いる復帰突然変異試験（2） ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験（2）
59 ([redacted])	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	TX10832	サル 5 週間反復静脈内投与毒性試験（1）
60 ([redacted])	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	TX10843 TX10844	幼若マウス 4 週間反復皮下及び静脈内投与毒性試験（1） 幼若マウス 10 週間反復皮下及び静脈内投与毒性試験

[redacted]：[redacted]，[redacted]：[redacted]，[redacted]：[redacted]

a：詳細はモジュール 3.2.S.4.1「規格及び試験方法」に記載。

b：ロット 20、23、56、57、59、60 及び 63 の規格値。

使用ロット（2/2）

バッチ番号	純度（%）	水分（%）	規格設定された不純物（%）						試験番号	試験の種類
								Total		
63 ( )									TX10869 TX10896 TX10837 TX10838 TX10839	ラット 4 週間がん原性用量設定試験 幼若マウス 4 週間反復皮下及び静脈内投与毒性試験（2） サル 5 週間反復静脈内投与毒性試験（2） 細菌を用いる復帰突然変異試験（3） ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験(3)
試験ロットの規格（ロット 47, 72）	～[a] ～[b]									
47 ( )									TX10800	マウス 13 週間反復静脈内投与毒性試験
72 ( )									TX10884 TX10869 TX10883 TX10958	マウス 4 週間がん原性用量設定試験 ラット 4 週間がん原性用量設定試験 ラット 13 週間がん原性用量設定試験 マウス雄受胎能に関する試験

: ; : , :

a：ロット 47 の規格値。

b：ロット 72 の規格値。

2.6.7.5 単回投与毒性試験

被験物質：Viltolarsen

<table>
<tr><th>動物種/
系統</th><th>投与方法
（溶媒/投与形態）</th><th>投与量
（mg/kg）</th><th>性別及び一群の動物数</th><th>最大非致死量
（mg/kg）</th><th>概略の致死量
（mg/kg）</th><th>特記すべき所見</th><th>試験番号
（CTD 記載箇所）</th></tr>
<tr><td>サル
Cynomolgus</td><td>静脈内
（生理食塩液）</td><td>0, 600</td><td>M:1</td><td>600</td><td>>600</td><td>腎臓の近位尿細管上皮の空胞化（軽度）
IL-6 の高値</td><td>TX10743
（4.2.3.1-1、参考資料）</td></tr>
<tr><td>サル
Cynomolgus</td><td>筋肉内
（生理食塩液）</td><td>0, 1, 10, 100</td><td>M:8[a]</td><td>100</td><td>>100</td><td>1 mg/kg: NOAEL
10 mg/kg: AST 及び CK-MM の高値、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
100 mg/kg: AST 及び CK-MM の高値、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、投与部位の炎症性細胞浸潤、水腫、出血

トキシコキネティクス
<table>
<tr><th>投与量</th><th>1 mg/kg</th><th>10 mg/kg</th><th>100 mg/kg</th></tr>
<tr><td>C_{max}
(μg/mL)</td><td>1.943</td><td>11.42</td><td>66.15</td></tr>
<tr><td>$AUC_{0\text{-}24hr}$
(μg·hr/mL)</td><td>3.914</td><td>41.45</td><td>319.7</td></tr>
<tr><td>t_{max}
(hr)</td><td>0.8</td><td>1.0</td><td>2.7</td></tr>
</table>
平均値（n=3）</td><td>TX10762
（4.2.3.1-2、評価資料）</td></tr>
</table>

AST：aspartate transaminase, CK-MM：skeletal muscle type creatine kinase, IL-6：interleukin-6, M：male, NOAEL：no-observed-adverse-effect-level
a：各群 5 例は投与翌日に剖検を実施し、残る各群 3 例は投与後 14 日まで観察した後に剖検した。

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

重要な試験以外の試験

被験物質：Viltolarsen

<table>
<tr><th>動物種/
系統</th><th>投与方法
（溶媒/投与形態）</th><th>投与期間 [a]</th><th>投与量
（mg/kg）</th><th>性別及び一群の動物数</th><th>無毒性量
（mg/kg）</th><th>特記すべき所見</th><th>試験番号
（CTD 記載箇所）</th></tr>
<tr><td>サル
Cynomolgus</td><td>筋肉内
（生理食塩液）</td><td>12 週間</td><td>0, 100</td><td>M:5</td><td>NE</td><td>AST、CK-MM、C-反応性蛋白の増加
投与部位の白色化、硬結、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）の筋線維の変性/壊死/再生、炎症性細胞浸潤、線維化、筋外膜の水腫、フィブリン滲出、血管周囲の単核細胞浸潤
いずれの所見も回復期間終了時に回復傾向が認められた。
100 mg/kg 投与群の 1 例で投与 77 日目に抗 viltolarsen 抗体の産生が認められた [b]。

トキシコキネティクス [c]
<table><tr><th></th><th>Day0</th><th>Day77</th></tr><tr><td>C_{max}
(μg/mL)</td><td>85.93</td><td>49.28</td></tr><tr><td>$AUC_{0\text{-}24hr}$
(μg·hr/mL)</td><td>621.4</td><td>540.0</td></tr><tr><td>t_{max}
(hr)</td><td>2.4</td><td>4.2</td></tr></table>平均値（n=5）</td><td>TX10747
（4.2.3.2-5、評価資料）</td></tr>
</table>

AST：aspartate transaminase, CK-MM：skeletal muscle type creatine kinase, M：male, NE：not established

a：週 1 回の間歇投与。

b：抗薬物抗体測定試験（試験番号 TX10759、資料番号 4.2.3.7.2-1）において、馴化期間（-6 日目）、投与 4 週目（29 日目）、投与 11 週目（77 日目）及び回復期間（休薬 27 日目）の血清サンプルを用いて抗 viltolarsen 抗体を ELISA により測定した。77 日目に 100 mg/kg の雄 1 例で抗体産生が認められたが、その他、抗体産生は認められなかった。

c：トキシコキネティクス測定の結果、いずれの時点においても不純物の曝露は認められなかった。

2.6.7.7　反復投与毒性試験：重要な試験

2.6.7.7.1 反復投与毒性試験（マウス 13 週間反復静脈内投与毒性試験）

報告書の題名：A 13-Week Intermittent Intravenous Dose Toxicity Study of NS-065 (NDK-65) in Mice Followed by a 4-Week Recovery Period

被験物質：Viltolarsen

動物種/系統：	Mouse, Crl:CD1 (ICR)	投与期間：	13 Weeks	試験番号：	TX10800
投与開始日齢：	7 Weeks (Initiation of Dosing)	休薬期間：	4 Weeks	CTD における記載箇所：	4.2.3.2-1
初回投与年月日：	[redacted], [redacted]	投与方法：	IV, Weekly	GLP 適用：	Yes
		溶媒/投与形態：	Saline		

特記事項：　Only males were used; cytokines (IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12p70, MCP-1, IFN-γ, TNF-α), complement (C3), immunophenotyping and anti-viltolarsen antibody analyses were conducted; toxicokinetic evaluation was performed in 3 animals/dose

無毒性量：　60 mg/kg

C3=complement analysis

（1/7）

Dose (mg/kg)	0 (Control)	60	240	1000
Number of Animals	M: 30	M: 30	M: 30	M: 30
Toxicokinetics of Viltolarsen:				
$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)				
Day 0	NA	57.93	582.2	7946
Day 84	NA	83.48	420.6	12300
C_{max} (μg/mL)				
Day 0	BLQ	187.8	749.3	4580
Day 84	BLQ	230.0	854.4	5535
t_{max} (hr)				
Day 0	NA	0.1	0.1	0.1
Day 84	NA	0.1	0.1	0.1
Concentration (μg/mL)				
Day 0 – 5 min	BLQ	187.8±30.1	749.3±150.2	4580±728
15 min	NA	52.47±12.72	474.2±143.4	2668±378
1 hr [a]	NA	5.547±0.423	142.4±21.0	1638±308

BLQ=below the lower limit of quantification (<1000 μg/mL); M=male; NA=not applicable

Toxicokinetic results are expressed as mean or mean±SD (n=3).

a：Where no impurities were detected at the corresponding time points or concentrations, viltolarsen concentration values per time point have been omitted from this table (but are available in the study report).

（2/7）

Dose (mg/kg)	0 (Control)	60	240	1000
Number of Animals	M: 30	M: 30	M: 30	M: 30
Day 84 – 5 min	BLQ	230.0±31.8	854.4±82.5	5535±724
15 min	NA	91.12±30.19	353.7±60.7	2991±778
1 hr [a]	NA	6.914±1.141	76.26±40.69	2832±755
Toxicokinetics of Impurity 1 (IM1):				
Concentration (µg/mL)				
Day 0 – 5 min	BLQ	BLQ	BLQ	4279±382
15 min	NA	BLQ	BLQ	2516±310
1 hr	NA	BLQ	BLQ	1429±218
Day 84 – 5 min	BLQ	BLQ	BLQ	4832±801
15 min	NA	BLQ	BLQ	2638±614
1 hr	NA	BLQ	BLQ	2398±788
Toxicokinetics of Impurity 2 (IM2):				
Concentration (µg/mL)				
Day 0 – 5 min	BLQ	BLQ	BLQ	4114±343
15 min	NA	BLQ	BLQ	2510±318
1 hr	NA	BLQ	BLQ	1407±238
Day 84 – 5 min	BLQ	BLQ	BLQ	4624±753
15 min	NA	BLQ	BLQ	2618±591
1 hr	NA	BLQ	BLQ	2375±773
Toxicokinetics of Impurity 3 (IM3):				
Concentration (µg/mL)				
Day 0 – 5 min	BLQ	BLQ	BLQ	4456±440
15 min	NA	BLQ	BLQ	2595±351
1 hr	NA	BLQ	BLQ	1503±237
Day 84 – 5 min	BLQ	BLQ	BLQ	4955±867
15 min	NA	BLQ	BLQ	2746±645
1 hr	NA	BLQ	BLQ	2537±876

BLQ=below the lower limit of quantification (<1000 µg/mL); M=male; NA=not applicable
Toxicokinetic results are expressed as mean±SD (n=3).
a：Where no impurities were detected at the corresponding time points or concentrations, viltolarsen concentration values per time point have been omitted from this table (but are available in the study report).

（3/7）

Dose (mg/kg)	0 (Control)	60	240	1000
Number of Animals	M: 30	M: 30	M: 30	M: 30
Toxicokinetics of Impurity 4 (IM4):				
Concentration (μg/mL)				
Day 0 – 5 min	BLQ	BLQ	BLQ	4826±323
15 min	NA	BLQ	BLQ	2662±291
1 hr	NA	BLQ	BLQ	1473±205
Day 84 – 5 min	BLQ	BLQ	BLQ	5455±1040
15 min	NA	BLQ	BLQ	2596±735
1 hr	NA	BLQ	BLQ	2437±825
Toxicokinetics of Impurity 5 (IM5):				
Concentration (μg/mL)				
Day 0 – 5 min	BLQ	BLQ	BLQ	4478±372
15 min	NA	BLQ	BLQ	2588±338
1 hr	NA	BLQ	BLQ	1473±156
Day 84 – 5 min	BLQ	BLQ	BLQ	5120±906
15 min	NA	BLQ	BLQ	2819±697
1 hr	NA	BLQ	BLQ	2547±874
Noteworthy Findings:				
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
Body Weight [a] (%)	41.72 g	-1.6	+2.5	-0.5
Food Consumption [a] (%)	4.9 g/day	0.0	+10.2	+6.1
Water Consumption [a] (%)	10.1 g	-4.0	-8.9	-5.0
Clinical Observations (No. of Animals Concerned)				
Decreased Spontaneous Activity	0	0	0	2–8
Ophthalmoscopy	–	–	–	–
Hematology				
Hematocrit (%)	39.80	39.66	39.94	36.40**
Hemoglobin (g/dL)	12.90	12.88	12.94	11.65*
Mean Corpuscular Hemoglobin (pg)	15.75	15.33	15.44	14.94*

BLQ=below the lower limit of quantification (<1000 μg/mL); M=male; NA=not applicable
Toxicokinetic results are expressed as mean±SD (n=3).
*p<0.05, **p<0.01 (Bartlett's Test followed by Dunnett's test or Dunnet-type test for hematology and blood chemistry).
– : No noteworthy findings.
a : At end of dosing or recovery period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

（4/7）

Dose (mg/kg)	0 (Control)	60	240	1000
Number of Animals	M: 30	M: 30	M: 30	M: 30
Hematology				
Hematocrit (%)	39.80	39.66	39.94	36.40**
Hemoglobin (g/dL)	12.90	12.88	12.94	11.65*
Mean Corpuscular Hemoglobin (pg)	15.75	15.33	15.44	14.94*
Blood Coagulation [a]	–	–	–	–
Blood Chemistry				
Bilirubin (mg/dL)	0.119	0.114	0.114	0.083*
Urea Nitrogen (mg/dL)	19.80	21.94	21.41	48.73**
Creatinine (mg/dL)	0.087	0.084	0.083	0.123**
Cystatin C (ng/mL)	454.173	450.723	428.037	707.016**
C-Reactive Protein (ng/mL)	4610.363	3818.326	4238.550	7591.090**
Urinalysis				
pH	6–8	5–8.5	6–8.5	5.5–6**
Terminal Necropsy				
Number Evaluated	M: 15	M: 15	M: 15	M: 15
Organ Weights [b] (%)				
Kidney	611.1 mg	-4.1	+12.4**	+15.3**
Thymus	29.8 mg	-7.7	-13.8	-25.8**
Gross Pathology	–	–	–	–
Histopathology				
Number evaluated	M: 15	M: 15	M: 15	M: 15
Diaphragm (Longitudinal) – Regeneration, Muscle Fiber, Very Slight	0	0	0	5
Diaphragm (Transverse) – Regeneration, Muscle Fiber, Very Slight	1	0	0	7

M=male

*p<0.05, **p<0.01 (Bartlett's Test followed by Dunnett's test or Dunnet-type test for hematology, blood chemistry, and organ weights; Wilcoxon's rank sum test for urinalysis).

– : No noteworthy findings.

a : Satellite animals used.

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

（5/7）

Dose (mg/kg)	0 (Control)	60	240	1000
Number of Animals	M: 30	M: 30	M: 30	M: 30
Kidney (Left)				
Basophilic Material, Intratubular, DT/CD	0	0	5	6
Very Slight	0	0	5	5
Slight	0	0	0	1
Dilatation, DT/CD	0	0	1	14
Very Slight	0	0	1	9
Slight	0	0	0	5
Vacuolation, Epithelium, DT/CD	0	0	10	15
Very Slight	0	0	10	0
Slight	0	0	0	6
Moderate	0	0	0	9
Vacuolation, Epithelium, PT	0	1	0	1
Very Slight	0	0	0	1
Slight	0	1	0	0
Kidney (Right)				
Basophilic Material, Intratubular, DT/CD	0	0	3	8
Very Slight	0	0	3	7
Slight	0	0	0	1
Dilatation, DT/CD	0	0	1	14
Very Slight	0	0	1	11
Slight	0	0	0	3
Vacuolation, Epithelium, DT/CD	0	0	13	15
Very Slight	0	0	13	0
Slight	0	0	0	7
Moderate	0	0	0	8
Vacuolation, Epithelium, PT	0	1	0	1
Very Slight	0	0	0	1
Slight	0	1	0	0
Additional Examinations [a]:				
Serum Cytokines				
IL-6 (pg/mL)				
Day 0				
1 hr	5.08	6.27	8.68	18.52
4 hr	0.00	0.00	7.08	41.80

DT/CD=distal tubule/collecting duct; IL-6=interleukin-6; M=male; PT=proximal tubule

a：Satellite animals used.

（6/7）

Dose (mg/kg)	0 (Control)	60	240	1000
Number of Animals	M: 30	M: 30	M: 30	M: 30
Day 84				
1 hr	4.38	6.19	6.14	18.66
4 hr	0.00	0.85	9.41	12.54
MCP-1 (pg/mL)				
Day 0				
4 hr	20.70	29.59	46.36	44.18
Day 84				
4 hr	14.37	14.55	27.92	50.62
TNF-α (pg/mL)				
Day 0				
1 hr	0.00	0.00	0.00	2.19
4 hr	0.00	1.04	0.00	4.84
Day 84				
1 hr	0.00	0.00	0.81	3.77
4 hr	0.00	0.00	0.00	0.82
Serum Complement	–	–	–	–
Immunophenotyping in Peripheral Blood	–	–	–	–
Anti-Viltolarsen Antibody Analysis	–	–	–	–
Postdose Evaluation				
Number Evaluated	M: 15	M: 15	M: 15	M: 15
Body Weight [a] (%)	43.37 g	-0.7	+2.7	-0.3
Blood Chemistry				
Urea Nitrogen (mg/dL)	24.33	23.73	23.03	40.77**
Creatinine (mg/dL)	0.087	0.084	0.083	0.109*
Cystatin C (ng/mL)	441.173	485.626	463.320	639.333**
Urinalysis				
pH	7.5–8.5	7–8.5	8–8.5	5.5–6**
Organ Weights [b] (%)				
Kidney (Right and Left), Relative	1475.8 mg/100 g BW	-0.4	+1.1	+12.6**

BW=body weight; M=male; MCP-1=monocyte chemoattractant protein-1; TNF-α=tumor necrosis factor-α

*p<0.05, **p<0.01 (Bartlett's Test followed by Dunnett's test or Dunnet-type test for blood chemistry and organ weights; Wilcoxon's rank sum test for urinalysis).

– : No noteworthy findings.

a : At end of dosing or recovery period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

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

（7/7）

Dose (mg/kg)	0 (Control)	60	240	1000
Number of Animals	M: 30	M: 30	M: 30	M: 30
Histopathology				
Diaphragm (Longitudinal) – Regeneration, Muscle Fiber, Very Slight	0	0	1	2
Diaphragm (Transverse) – Regeneration, Muscle Fiber, Very Slight	0	1	0	0
Kidney (Left)				
Basophilic Material, Intratubular, DT/CD, Very Slight	0	0	4	9
Dilatation, DT/CD	0	0	2	12
Very Slight	0	0	2	10
Slight	0	0	0	2
Vacuolation, Epithelium, DT/CD	0	0	9	15
Very Slight	0	0	9	8
Slight	0	0	0	6
Moderate	0	0	0	1
Kidney (Right)				
Basophilic Material, Intratubular, DT/CD	0	0	7	9
Very Slight	0	0	7	6
Slight	0	0	0	3
Dilatation, DT/CD	0	0	2	12
Very Slight	0	0	2	8
Slight	0	0	0	4
Vacuolation, Epithelium, DT/CD	0	0	10	15
Very Slight	0	0	10	7
Slight	0	0	0	7
Moderate	0	0	0	1
Additional Information: Since there was no standard substance, the concentrations for the impurities are based on the relative peak area for the impurity in the plasma sample compared to the peak area of the impurity in the reference standard viltolarsen and expressed using the concentration of viltolarsen from the calibration curve. The concentrations of the impurities were BLQ at all sampling times after 1 hour.				

BLQ=below the lower limit of quantification (<1000 µg/mL); DT/CD=distal tubule/collecting duct; M=male

2.6.7.7.2 反復投与毒性試験（マウス 26 週間反復静脈内投与毒性試験）

報告書の題名：A 26-Week Intermittent Intravenous Dose Toxicity Study of NS-065 (NDK-65) in Mice Followed by an 8-Week Recovery Period

被験物質：Viltolarsen

動物種/系統：	Mouse, Crl:CD1 (ICR)	投与期間：	26 Weeks	試験番号：	TX10827
投与開始日齢：	7 Weeks (Initiation of Dosing)	休薬期間：	8 Weeks	CTD における記載箇所：	4.2.3.2-2
初回投与年月日：	[redacted], [redacted]	投与方法：	IV, Weekly	GLP 適用：	Yes
		溶媒/投与形態：	Saline		

特記事項： Only males were used; electron microscopy performed on the kidney and urinary bladder; cytokines (IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12p70, MCP-1, IFN-γ, TNF-α), complement (C3), immunophenotyping and anti-viltolarsen analyses were conducted; toxicokinetic evaluation was performed in 3 animals/dose

無毒性量： 15 mg/kg

C3=complement analysis

（1/10）

Dose (mg/kg)	0 (Control)	15	60	240	1000
Number of Animals	M: 30	M: 15	M: 30	M: 30	M: 30
Toxicokinetics of Viltolarsen:					
$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)					
Day 0	NA	20.34	75.84	654.9	7458
Day 175	NA	17.64	67.47	500.6	17280
C_{max} (μg/mL)					
Day 0	BLQ	57.70	229.7	981.1	4660
Day 175	BLQ	47.11	210.2	682.4	4352
t_{max} (hr)					
Day 0	NA	0.1	0.1	0.1	0.1
Day 175	NA	0.1	0.1	0.1	0.1

BLQ=below the lower limit of quantification (<1000 μg/mL); M=male; NA=not applicable

Toxicokinetic results are expressed as mean (n=3).

Dose (mg/kg)	0 (Control)	15	60	240	1000
Number of Animals	M: 30	M: 15	M: 30	M: 30	M: 30
Concentration (µg/mL)					
Day 0 – 5 min	BLQ	57.70±18.52	229.7±48.8	981.1±291.6	4660±320
15 min	NA	15.80±3.31	65.67±9.04	543.9±119.0	2633±198
1 hr	NA	3.137±0.705	9.083±1.108	149.2±58.2	1315±424
4 hr[a]	NA	BLQ	BLQ	0.2775±0.4806	277.0±205.0
Day 175 – 5 min	BLQ	47.11±4.68	210.2±5.4	682.4±255.5	4352±446
15 min	NA	17.33±0.30	58.78±14.71	328.9±46.2	3417±648
1 hr	NA	2.032±0.879	7.603±2.293	77.97±25.66	1747±365
4 hr [a]	NA	BLQ	BLQ	10.29±13.97	1031±1019
Toxicokinetics of Impurity 1 (IM1):					
Concentration (µg/mL)					
Day 0 – 5 min	BLQ	BLQ	BLQ	412.3	4737±150
15 min	NA	BLQ	BLQ	BLQ	2575±214
1 hr	NA	BLQ	BLQ	BLQ	946.3±824.9
4 hr	NA	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Day 175 – 5 min	BLQ	BLQ	BLQ	375.3	4325±773
15 min	NA	BLQ	BLQ	BLQ	3385±602
1 hr	NA	BLQ	BLQ	BLQ	1673±435
4 hr	NA	BLQ	BLQ	BLQ	623.7±1080.2
Toxicokinetics of Impurity 2 (IM2):					
Concentration (µg/mL)					
Day 0 – 5 min	BLQ	BLQ	BLQ	399.0	4638±145
15 min	NA	BLQ	BLQ	BLQ	2605±218
1 hr	NA	BLQ	BLQ	BLQ	978.0±852.3
4 hr	NA	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ

BLQ=below the lower limit of quantification (<1000 µg/mL); M=male; NA=not applicable

Toxicokinetic results are expressed as mean±SD (n=3).

a：Where no impurities were detected at the corresponding time points or concentrations, viltolarsen concentration values per time point have been omitted from this table (but are available in the study report).

Dose (mg/kg)	0 (Control)	15	60	240	1000
Number of Animals	M: 30	M: 15	M: 30	M: 30	M: 30
Day 175 – 5 min	BLQ	BLQ	BLQ	366.7	4272±757
15 min	NA	BLQ	BLQ	BLQ	3415±596
1 hr	NA	BLQ	BLQ	BLQ	1728±437
4 hr	NA	BLQ	BLQ	BLQ	649.0±1124.1
Toxicokinetics of Impurity 3 (IM3):					
Concentration (µg/mL)					
Day 0 – 5 min	BLQ	BLQ	BLQ	419.0	4720±126
15 min	NA	BLQ	BLQ	BLQ	2620±217
1 hr	NA	BLQ	BLQ	BLQ	971.3±847.6
4 hr	NA	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Day 175 – 5 min	BLQ	BLQ	BLQ	378.3	4339±799
15 min	NA	BLQ	BLQ	BLQ	3433±615
1 hr	NA	BLQ	BLQ	BLQ	1723±451
4 hr	NA	BLQ	BLQ	BLQ	651.3±1128.1
Toxicokinetics of Impurity 4 (IM4):					
Concentration (µg/mL)					
Day 0 – 5 min	BLQ	BLQ	BLQ	435.7	4702±175
15 min	NA	BLQ	BLQ	BLQ	2325±208
1 hr	NA	BLQ	BLQ	BLQ	789.3±700.1
4 hr	NA	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Day 175 – 5 min	BLQ	BLQ	BLQ	349.3	4388±701
15 min	NA	BLQ	BLQ	BLQ	3317±670
1 hr	NA	BLQ	BLQ	BLQ	1130±999
4 hr	NA	BLQ	BLQ	BLQ	536.0±928.4
Toxicokinetics of Impurity 5 (IM5):					
Concentration (µg/mL)					
Day 0 – 5 min	BLQ	BLQ	BLQ	775.7	4728±117
15 min	NA	BLQ	BLQ	BLQ	2634±210
1 hr	NA	BLQ	BLQ	BLQ	963.7±844.4
4 hr	NA	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ

BLQ=below the lower limit of quantification (<1000 µg/mL); M=male; NA=not applicable
Toxicokinetic results are expressed as mean±SD (n=3).

Dose (mg/kg)	0 (Control)	15	60	240	1000
Number of Animals	M: 30	M: 15	M: 30	M: 30	M: 30
Day 175 – 5 min	BLQ	BLQ	BLQ	372.0	4510±859
15 min	NA	BLQ	BLQ	BLQ	3481±713
1 hr	NA	BLQ	BLQ	BLQ	1669±487
4 hr	NA	BLQ	BLQ	BLQ	590.3±1022.5
Noteworthy Findings:					
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	1[a]
Body Weight[b] (%)	49.65 g	+0.8	-0.5	-2.6	-10.1**
Food Consumption[b] (%)	4.9 g/day	+6.1	+8.2	+2.0	+2.0
Water Consumption[b] (%)	7.5 g/day	+14.7	+4.0	-5.3	+5.3
Clinical Observations (No. of Animals Concerned)					
Decreased Spontaneous Activity	0	0	0	0	15[c]
Ophthalmoscopy	–	–	–	–	–
Hematology					
Hematocrit (%)	36.44	38.26	37.84	36.19	33.23**
Hemoglobin (g/dL)	11.76	12.40	12.29	11.65	10.68**
Mean Corpuscular Hemoglobin (pg)	15.04	15.25	14.61	15.13	14.23**
Mean Corpuscular Volume (fL)	46.73	47.09	45.09	46.96	44.34*
Blood Coagulation[d]	–	–	–	–	–

BLQ=below the lower limit of quantification (<1000 μg/mL); M=male; NA=not applicable
Toxicokinetic results are expressed as mean±SD (n=3).
*p<0.05, **p<0.01 (Bartlett's test followed by Dunnett's test or Dunnet-type test for body weight, hematology and organ weight; Wilcoxon's rank sum test for urinalysis).
– : No noteworthy findings.
a : This animal exhibited decreased spontaneous activity, enlarged kidneys, and microscopic changes in the kidney (vacuolation, dilatation, and basophilic material in distal and/or collecting tubules, vacuolation of proximal tubules). These data are not reported in the table above. At 1000 mg/kg, 1 male in the toxicity group (main study) died approximately 1.5 hours after dosing on Day 140 and 1 male in the satellite group (toxicokinetic study) died on Day 169.
b : At end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).
c : The incidence varied from 15 on Day 0 to 12 on Day 7, 6 on Day 14 and 7 on Day 21. For the remaining days, the incidence was from 1 to 4.
d : Satellite animals used.

Dose (mg/kg)	0 (Control)	15	60	240	1000
Number of Animals	M: 30	M: 15	M: 30	M: 30	M: 30
Blood Chemistry					
Aspartate Transaminase (IU/L)	46.3	58.9	48.1	53.4	65.5*
Urea Nitrogen (mg/dL)	21.29	21.90	21.83	22.61	48.20**
Creatinine (mg/dL)	0.096	0.089	0.086	0.094	0.127
Cystatin C (ng/mL)	706.811	618.287	600.201	654.183	1002.002
Urinalysis					
pH (Week 25)	6–8.5	6.5–9**	6–8.5	6–7.5**	5–6**
Terminal Necropsy					
Number Evaluated	M: 15	M: 15	M: 15	M: 15	M: 14
Organ Weights [a] (%)					
Kidney (Right and Left), Absolute	640.3 mg	-0.6	+4.6	+5.4	+17.4**
Kidney (Right and Left), Relative	1313.8 mg/100g BW	+0.5	+8.9	+9.4	+36.7*
Gross Pathology	–	–	–	–	–
Histopathology					
Number Evaluated	M: 15	M: 14	M: 15	M: 15	M: 14
Diaphragm (Longitudinal) – Muscle Fiber Regeneration, Very Slight	0	0	0	0	1
Diaphragm (Transverse) – Muscle Fiber Regeneration, Very Slight	0	0	0	0	2
Kidney (Left)					
Basophilic Material, Intratubular, DT/CD	0	0	0	9	14
Very Slight	0	0	0	9	11
Slight	0	0	0	0	3
Dilatation, DT/CD	0	0	0	1	14
Very Slight	0	0	0	1	10
Slight	0	0	0	0	4
Fibrosis, focal, Very Slight	0	0	0	0	3

BW=body weight; DT/CD=distal tubule/collecting duct; M=male

*p<0.05, **p<0.01 (Bartlett's test followed by Dunnett's test or Dunnet-type test for clinical chemistry and organ weight; Wilcoxon's rank sum test for urinalysis).

–：No noteworthy findings.

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

Dose (mg/kg)	0 (Control)	15	60	240	1000
Number of Animals	M: 30	M: 15	M: 30	M: 30	M: 30
Kidney (Left)					
Vacuolation, Epithelium, DT/CD	0	0	0	14	14
Very Slight	0	0	0	14	0
Slight	0	0	0	0	11
Moderate	0	0	0	0	3
Vacuolation, Epithelium, PT	0	0	0	8	13
Very Slight	0	0	0	8	9
Slight	0	0	0	0	4
Kidney (Right)					
Basophilic Material, Intratubular, DT/CD	0	0	0	13	14
Very Slight	0	0	0	13	11
Slight	0	0	0	0	3
Dilatation, DT/CD	0	0	0	1	14
Very Slight	0	0	0	1	8
Slight	0	0	0	0	6
Fibrosis, focal, Very Slight	0	0	0	0	6
Vacuolation, Epithelium, DT/CD	0	0	0	14	14
Very Slight	0	0	0	14	0
Slight	0	0	0	0	11
Moderate	0	0	0	0	3
Vacuolation, Epithelium, PT	0	0	0	10	14
Very Slight	0	0	0	10	11
Slight	0	0	0	0	3
Testis (Left)					
Basophilic Material-Laden Macrophage, Interstitium, Very Slight	0	0	0	0	10
Testis (Right)					
Basophilic Material-Laden Macrophage, Interstitium, Very Slight	0	0	0	0	11
Urinary Bladder					
Eosinophilic Material, Cytoplasmic, Transitional Epithelium, Very Slight	0	0	3	9	11

DT/CD=distal tubule/collecting duct; M=male; PT=proximal tubule

Dose (mg/kg)	0 (Control)	15	60	240	1000
Number of Animals	M: 30	M: 15	M: 30	M: 30	M: 30
Additional Examinations:					
Serum Cytokines [a]					
IL-6 (pg/mL)					
Day 0					
1 hr	8.12	15.47	1.14	7.15	25.61
4 hr	4.70	33.86	4.52	11.08	101.66
24 hr	0.00	0.00	2.47	0.00	1.21
Day 175					
1 hr	10.49	72.01	10.56	13.04	24.70
4 hr	4.26	9.17	5.57	30.98	24.83
24 hr	2.42	12.82	5.97	0.00	0.00
MCP-1 (pg/mL)					
Day 0					
1 hr	2.64	2.55	2.30	2.81	3.64
4 hr	9.67	8.27	3.52	12.21	46.40
24 hr	2.88	5.48	5.09	2.74	8.05
Day 175					
1 hr	14.17	23.52	21.36	21.28	25.76
2 hr	24.68	18.22	39.97	60.82	30.11
24 hr	27.30	18.35	21.11	6.29	19.77
TNF-α (pg/mL)					
Day 0					
1 hr	0.79	0.00	0.00	0.00	2.77
4 hr	0.78	1.33	0.00	0.82	6.20
Day 175					
1 hr	0.69	5.96	1.02	4.01	6.84
4 hr	0.00	0.84	0.00	1.80	1.02

IL-6=interleukin-6; M=male; MCP-1=monocyte chemoattractant protein-1; TNF-α=tumor necrosis factor-α

a：Satellite animals used.

Dose (mg/kg)	0 (Control)	15	60	240	1000
Number of Animals	M: 30	M: 15	M: 30	M: 30	M: 30
Serum (C3) Complement (mg/dL) [a]					
Day 0					
1 hr	98.092	93.282	83.712	76.960	66.614
4 hr	76.204	95.148	80.894	84.034	61.576
24 hr	81.576	73.334	82.014	80.830	103.344
Day 175					
1 hr	86.022	118.840	84.832	79.902	58.588
4 hr	86.470	106.992	88.292	93.780	57.600
24 hr	78.348	84.430	84.782	72.696	134.346
Immunophenotyping in Peripheral Blood [a]	–	–	–	–	–
Anti-Viltolarsen Antibody Analysis [a]	–	–	–	–	–
Electron Microscopy					
Kidney (Left)	M: 4	NE	NE	NE	M: 4
EDM, Intratubular, CD, Slight	0				1
ELM, Intratubular, CD, Slight	0				1
ELM, Intratubular, DT, Slight	0				1
MBV, Intracytoplasmic, Epithelium, CD, Moderate	0				4
MBV, Intracytoplasmic, Epithelium, DT	0				4
Slight	0				1
Moderate	0				3
MBV, Intracytoplasmic, Epithelium, PT, Slight	0				4
Urinary bladder	M: 3	NE	NE	NE	M: 14
Large Vesicle, Intracytoplasmic, Umbrella Cell, Transitional Epithelium, Very Slight	0				11

C3=complement analysis; DT/CD=distal tubule/collecting duct; EDM=electron-dense material; ELM=electron-lucent material; M=male; MBV=membrane-bounded vacuole
NE=not examined; PT=proximal tubule

– : No noteworthy findings.

a : Satellite animals used.

Dose (mg/kg)	0 (Control)	15	60	240	1000
Number of Animals	M: 30	M: 15	M: 30	M: 30	M: 30
Postdose Evaluation:					
Number Evaluated	M: 15	NE	M: 15	M: 15	M: 15
Body Weight [a] (%)	51.47 g		+3.1	-2.1	-7.9
Hematology					
Red Blood Cell Count (10^6/μL)	8.078		8.126	8.001	7.358**
Hematocrit (%)	37.69		37.84	36.88	33.24**
Hemoglobin (g/dL)	12.24		12.21	12.05	10.96**
Blood Chemistry					
Urea Nitrogen (mg/dL)	19.69		20.04	21.59	44.73**
Creatinine (mg/dL)	0.080		0.083	0.096*	0.126**
Cystatin C (ng/mL)	680.496		624.371	661.084	989.947**
Urinalysis					
pH	6–8.5		5.5–8.5	5–8*	5–6**
Organ Weights [b] (%)					
Kidney (Right and Left), Absolute	703.0 mg		+1.9	+0.9	+17.1**
Kidney (Right and Left), Relative	1399.9 mg/100 g BW		-1.0	+3.1	+28.1**
Histopathology					
Diaphragm (Longitudinal) – Muscle Fiber Regeneration, Very Slight	0		0	0	0
Diaphragm (Transverse) – Muscle Fiber Regeneration, Very Slight	1		0	0	0

BW=body weight; M=male; NE=not examined

*p<0.05, **p<0.01 (Bartlett's test followed by Dunnett's test or Dunnet-type test for body weight, hematology, clinical chemistry, and organ weight; Wilcoxon's rank sum test for urinalysis).

a：At end of recovery period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

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

Dose (mg/kg)	0 (Control)	15	60	240	1000
Number of Animals	M: 30	M: 15	M: 30	M: 30	M: 30
Kidney (Left)					
Basophilic Material, Intratubular, DT/CD	0		0	8	14
Very Slight	0		0	8	13
Slight	0		0	0	1
Dilatation, DT/CD, Very Slight	0		0	0	14
Fibrosis, Focal, Very Slight	0		0	0	3
Vacuolation, Epithelium, DT/CD	0		0	14	15
Very Slight	0		0	14	10
Slight	0		0	0	5
Kidney (Right)					
Basophilic Material, Intratubular, DT/CD	0		0	9	14
Very Slight	0		0	9	12
Slight	0		0	0	2
Dilatation, DT/CD, Very Slight	0		0	1	13
Fibrosis, Focal, Very Slight	0		0	0	2
Vacuolation, Epithelium, DT/CD	0		0	13	15
Very Slight	0		0	13	8
Slight	0		0	0	7
Testis (Left)					
Basophilic Material-Laden Macrophage, Interstitium, Very Slight	0		0	0	9
Testis (Right)					
Basophilic Material-Laden Macrophage, Interstitium, Very Slight	0		0	0	10
Urinary Bladder					
Eosinophilic Material, Cytoplasmic, Transitional Epithelium, Very Slight	0		1	2	8

Additional Information:
Since there was no standard substance, the concentrations for the impurities are based on the relative peak area for the impurity in the plasma sample compared to the peak area of the impurity in the reference standard viltolarsen and expressed using the concentration of viltolarsen from the calibration curve. The concentrations of the impurities were BLQ at all sampling times after 4 hours.

BLQ=below the lower limit of quantification (<1000 µg/mL); DT/CD=distal tubule/collecting duct; M=male

2.6.7.7.3 反復投与毒性試験（サル 12 週間反復静脈内投与毒性試験）

報告書の題名：NS-065（NDK-65）のカニクイザルにおける 12 週間間歇静脈内投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

被験物質：Viltolarsen

動物種/系統：	サル、Cynomolgus	投与期間：	12 週間	試験番号：	TX10746
投与開始日齢：	2 歳齢（馴化開始時）	休薬期間：	4 週間	CTD における記載箇所：	4.2.3.2-3
初回投与年月日：	[redacted] 年 [redacted] 月 [redacted] 日	投与方法：	静脈内、週 1 回	GLP 適用：	適
		溶媒/投与形態：	生理食塩液		

特記事項：　雄動物のみを検討に用いた。神経行動学的機能観察、体温、血圧、呼吸数、血清中サイトカイン測定（IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、TNF、IFN-γ）、血清中補体測定（CH50、C3）、末梢血イムノフェノタイピング及び抗薬物抗体測定を実施した。トキシコキネティクス測定には各群雄 5 例を設定した。

無毒性量：　60 mg/kg

（1/7）

投与量（mg/kg）	0（対照）	60	200	600
動物数	M: 5	M: 5	M: 5	M: 5
トキシコキネティクス：Viltolarsen				
$AUC_{0\text{-}24hr}$（μg·hr/mL）				
初回投与日	NA	276.3	917.1	5842
最終投与日	NA	270.1	963.3	5581
C_{max}（μg/mL）				
初回投与日	BLQ	699.2	2270	7835
最終投与日	BLQ	744.8	2368	7247
t_{max}（hr）				
初回投与日	NA	0.0	0.0	0.0
最終投与日	NA	0.0	0.0	0.0

トキシコキネティクスは mean（n=5）で示す。

BLQ=below the lower limit of quantification（<1000 μg/mL）; M=male; NA=not applicable

（2/7）

投与量（mg/kg）	0（対照）	60	200	600
動物数	M: 5	M: 5	M: 5	M: 5
血漿中濃度（μg/mL）				
初回投与日 – 投与終了直後	BLQ	699.2±55.0	2270±182	7835±578
15 分	BLQ	153.5±11.4	541.9±111.3	2185±266
30 分	BLQ	90.45±8.34	306.6±47.3	1219±246
1 時間 [a]	BLQ	52.15±3.38	164.4±15.4	875.3±161.8
最終投与日 – 投与終了直後	BLQ	744.8±101.2	2368±332	7247±603
15 分	BLQ	131.9±17.6	467.0±73.4	1873±301
30 分	BLQ	86.26±9.82	313.1±59.8	1292±177
1 時間 [a]	BLQ	42.76±5.88	174.2±60.7	846.3±190.6
トキシコキネティクス：不純物 1（IM1）				
血漿中濃度（μg/mL）				
初回投与日 –投与終了直後	NA	BLQ	2488±149	7637±421
15 分	NA	BLQ	BLQ	2204±241
30 分	NA	NA	NA	1336±162
1 時間	NA	NA	NA	220.2±492.4
最終投与日 –投与終了直後	NA	BLQ	2440±273	7702±501
15 分	NA	BLQ	BLQ	1955±180
30 分	NA	NA	NA	1399±150
1 時間	NA	NA	NA	242.0±541.1
トキシコキネティクス：不純物 2（IM2）				
血漿中濃度（μg/mL）				
初回投与日 –投与終了直後	NA	BLQ	2391±137	7518±405
15 分	NA	BLQ	BLQ	2191±250
30 分	NA	NA	NA	1380±173
1 時間	NA	NA	NA	440.4±606.3

トキシコキネティクスは mean±SD（n=5）で示す。

BLQ=below the lower limit of quantification（<1000 μg/mL）; M=male; NA=not applicable

a：不純物の曝露が認められなかった採血時点については、viltolarsen の血漿中濃度の記載を省略した。

（3/7）

投与量（mg/kg）	0（対照）	60	200	600
動物数	M: 5	M: 5	M: 5	M: 5
最終投与日 –投与終了直後	NA	BLQ	2384±250	7610±560
15 分	NA	BLQ	BLQ	1960±188
30 分	NA	NA	NA	1440±174
1 時間	NA	NA	NA	271.2±606.4
トキシコキネティクス：不純物 3（IM3）				
血漿中濃度（μg/mL）				
初回投与日 –投与終了直後	NA	BLQ	2568±138	7797±477
15 分	NA	BLQ	BLQ	2307±261
30 分	NA	NA	NA	1409±181
1 時間	NA	NA	NA	443.6±610.3
最終投与日 –投与終了直後	NA	BLQ	2317±251	8106±592
15 分	NA	BLQ	BLQ	2099±210
30 分	NA	NA	NA	1489±187
1 時間	NA	NA	NA	257.4±575.6
トキシコキネティクス：不純物 4（IM4）				
血漿中濃度（μg/mL）				
初回投与日 –投与終了直後	NA	663.8±607.7	3239±129	9942±662
15 分	NA	BLQ	BLQ	3387±478
30 分	NA	NA	NA	1471±186
1 時間	NA	NA	NA	201.8±451.2
最終投与日–投与終了直後	NA	889.8±500.2	3403±470	9659±461
15 分	NA	BLQ	BLQ	2714±343
30 分	NA	NA	NA	1668±257
1 時間	NA	NA	NA	437.4±599.3

トキシコキネティクスは mean±SD（n=5）で示す。

BLQ=below the lower limit of quantification（<1000 μg/mL）; M=male; NA=not applicable

（4/7）

投与量（mg/kg）	0（対照）	60	200	600
動物数	M: 5	M: 5	M: 5	M: 5
トキシコキネティクス：不純物 5（IM5）				
血漿中濃度（μg/mL）				
初回投与日 –投与終了直後	NA	BLQ	2322±113	7610±438
15 分	NA	BLQ	BLQ	2240±286
30 分	NA	NA	NA	1388±192
1 時間	NA	NA	NA	439.4±604.5
最終投与日 –投与終了直後	NA	BLQ	2600±334	7995±552
15 分	NA	BLQ	BLQ	2054±201
30 分	NA	NA	NA	1488±151
1 時間	NA	NA	NA	444.2±611.8
特記すべき所見:				
死亡及び瀕死期安楽死処置動物数	0	0	0	0
体重[a]（%）	2.644 kg	+1.5	-3.6	-2.0
摂餌量[a]（%）	105.02 g/day	-0.6	-1.0	-0.7
一般状態	–	–	–	–
神経行動学的機能観察	–	–	–	–
眼科学的検査	–	–	–	–
心電図検査	–	–	–	–
体温	–	–	–	–
血圧	–	–	–	–
呼吸数	–	–	–	–

トキシコキネティクスは mean±SD（n=5）で示す。
BLQ=below the lower limit of quantification（<1000 μg/mL）; M=male; NA=not applicable
–：特記すべき所見なし.
a：投与期間終了時。対照群は平均値を示す。投与群は対照群との比率の差を示す。

（5/7）

投与量（mg/kg）	0（対照）	60	200	600
動物数	M: 5	M: 5	M: 5	M: 5
血液学的検査				
赤血球数（10^6/μL）	5.692	5.630	5.458	4.876**
血色素量（g/dL）	13.50	13.64	13.76	11.64**
血球容積（%）	43.76	43.66	43.60	38.74**
網赤血球率（%）	0.92	0.92	1.00	2.42**
血液凝固検査	–	–	–	–
血液生化学的検査				
AST（IU/L）	71.8	89.0	167.8	113.6
CK（IU/L）	1056.4	1248.8	3285.2	1167.4
CK-MM（IU/L）	988.0	1169.0	3194.2	1113.4
総ビリルビン（mg/dL）	0.142	0.158	0.192	0.410*
BUN（mg/dL）	19.98	19.64	20.78	27.52
C-反応性蛋白（mg/dL）	0.40	0.54	0.76	1.68**
尿検査	–	–	–	–
剖検: 投与期間終了時				
検査動物数	M: 3	M: 3	M: 3	M: 3
器官重量[a]（%）				
腎臓（右、左）、絶対重量	10.70 g	+9.6	-6.3	+35.8
腎臓（右、左）、相対重量	4.480 g/kg BW	+1.0	+1.3	+31.5
脾臓、絶対重量	2.23 g	+31.4	+16.6	+52.5
脾臓、相対重量	0.933 g/kg BW	+21.1	+28.9	+47.9*
病理解剖学的検査	–	–	–	–

M=male

*p<0.05, **p<0.01 (Bartlett's Test/ Dunnett's test/ Dunnet-type test).

–：特記すべき所見なし.

a：対照群は平均値を示す。投与群は対照群との比率の差を示す。統計学的有意差は実測値に基づく。

投与量（mg/kg）	0（対照）	60	200	600
動物数	M: 5	M: 5	M: 5	M: 5
病理組織学的検査				
検査動物数	M: 3	M: 3	M: 3	M: 3
投与部位				
皮下組織の好中球浸潤	1	1	2	3
軽微	0	1	0	1
軽度	1	0	2	1
中等度	0	0	0	1
血管壁の好中球浸潤	1	1	1	1
軽微	1	1	1	0
軽度	0	0	0	1
皮下組織の水腫	0	1	1	1
軽微	0	1	1	0
中等度	0	0	0	1
腎臓（左）				
近位尿細管の好塩基性変化	0	0	1	3
軽微	0	0	1	2
中等度	0	0	0	1
単核細胞浸潤	3	1	0	2
軽微	3	1	0	1
軽度	0	0	0	1
髄放線間質の水腫、軽微	0	0	0	2
近位尿細管上皮の空胞化	0	0	1	3
軽微	0	0	1	1
中等度	0	0	0	2
腎臓（右）				
近位尿細管の好塩基性変化	0	0	1	3
軽微	0	0	1	2
中等度	0	0	0	1
単核細胞浸潤	1	1	1	2
軽微	1	1	1	1
軽度	0	0	0	1

M=male

（7/7）

投与量（mg/kg）	0（対照）	60	200	600
動物数	M: 5	M: 5	M: 5	M: 5
髄放線間質の水腫、軽微	0	0	0	2
近位尿細管上皮の空胞化	0	0	1	3
軽微	0	0	1	1
中等度	0	0	0	2
その他の検査項目:				
血清中サイトカイン測定	–	–	–	–
血清中補体測定	–	–	–	–
末梢血イムノフェノタイピング	–	–	–	–
抗 viltolarsen 抗体測定 [a]	–	–	1 M, Day 29	–
回復性の評価:				
検査動物数	M: 2	M: 2	M: 2	M: 2
体重 [b]（%）	2.850 kg	-5.8	+2.6	-9.6
病理組織学的検査				
腎臓（左）				
近位尿細管上皮の空胞化	0	0	0	2
軽微	0	0	0	1
軽度	0	0	0	1
腎臓（右）				
近位尿細管上皮の空胞化、軽微	0	0	0	2

特記事項：
不純物については標準品がないため、血漿中不純物濃度測定の際は、測定試料のピーク面積比を viltolarsen 標準品（不純物を含有）を用いて作成した検量線に当てはめ、検量線の viltolarsen 濃度を用いて表記した。投与後 1 時間以降、血漿中の不純物濃度は BLQ であった。

BLQ=below the lower limit of quantification（<1000 µg/mL）; M=male
*p<0.05, **p<0.01 (Bartlett's Test/ Dunnett's test/ Dunnet-type test).
–：特記すべき所見なし.
a：抗薬物抗体測定試験（試験番号 TX10759、資料番号 4.2.3.7.2-1）において、馴化期間（-5 日目）、投与 4 週目（29 日目）、投与 11 週目（77 日目）及び回復期間（休薬 27 日目）の血清サンプルを用いて抗 viltolarsen 抗体を ELISA により測定した。29 日目に 200 mg/kg の雄 1 例で抗体産生が認められたが、その他、抗体産生は認められなかった。
b：回復期間終了時。対照群は平均値を示す。投与群は対照群との比率の差を示す。

2.6.7.7.4 反復投与毒性試験（サル 39 週間反復静脈内投与毒性試験）

報告書の題名：A 39-Week Intermittent Intravenous Dose Toxicity Study of NS-065 (NDK-65) in Cynomolgus Monkeys Followed by an 8-Week Recovery Period

被験物質：Viltolarsen

動物種/系統：	Monkey, cynomolgus	投与期間：	39 Weeks	試験番号：	TX10818
投与開始日齢：	1 Year (acclimation)	休薬期間：	8 Weeks	CTD における記載箇所：	4.2.3.2-4
初回投与年月日：	[redacted], [redacted]	投与方法：	IV, Weekly	GLP 適用：	Yes
		溶媒/投与形態：	Saline		

特記事項： Only males were used; electron microscopy performed on the kidney; cytokines (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TNF, IFN-γ, IL-1β, IL-1ra, IL-8), complement (CH50, C3), immunophenotyping and antibody analyses were conducted; toxicokinetic evaluation was performed in 3 animals/dose

無毒性量： 60 mg/kg

C3=complement analysis

（1/5）

Dose (mg/kg)	0 (Control)	10	60	360
Number of Animals	M: 8	M: 5	M: 8	M: 8
Toxicokinetics of Viltolarsen:				
$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)				
Day 0	NA	50.25	269.3	2452
Day 84	NA	59.77	274.4	2081
Day 175	NA	43.00	251.9	2501
Day 259	NA	54.69	261.1	2294
C_{max} (μg/mL)				
Day 0	BLQ	137.6	805.9	3665
Day 84	BLQ	134.6	700.3	3522
Day 175	BLQ	115.1	598.6	4198
Day 259	BLQ	122.8	613.9	3711
t_{max} (hr)				
Day 0	NA	0.0	0.0	0.0
Day 84	NA	0.0	0.0	0.0
Day 175	NA	0.0	0.0	0.0
Day 259	NA	0.0	0.0	0.0

BLQ=below the lower limit of quantification (<1000 μg/mL); M=Male; NA=not applicable. Toxicokinetic results are expressed as mean (n=3)

（2/5）

Dose (mg/kg)	0 (Control)	10	60	360
Number of Animals	M: 8	M: 5	M: 8	M: 8
Concentration (µg/mL)				
Day 0 – End of Administration	BLQ	137.6±6.0	805.9±56.5	3665±672
15 min [a]	BLQ	30.95±2.92	154.7±23.6	1016±329
Day 84 – End of Administration	BLQ	134.6±9.3	700.3±113.9	3522±179
15 min [a]	BLQ	35.54±5.96	173.7±4.7	904.3±122.5
Day 175 – End of Administration	BLQ	115.1±14.9	598.6±106.2	4198±265
15 min [a]	BLQ	25.88±0.73	137.4±7.3	1090±252
Day 259 – End of Administration	BLQ	122.8±19.6	613.9±106.8	3711±63
15 min [a]	BLQ	30.40±6.55	145.7±11.2	932.9±158.7
Toxicokinetics of Impurity 1 (IM1):				
Concentration (µg/mL)				
Day 0 – End of Administration	BLQ	BLQ	BLQ	2889±499
15 min	BLQ	BLQ	BLQ	361.7±626.4
Day 84 – End of Administration	BLQ	BLQ	BLQ	3714±81
15 min	BLQ	BLQ	BLQ	371.7±643.7
Day 175 – End of Administration	BLQ	BLQ	BLQ	4114±271
15 min	BLQ	BLQ	BLQ	807.3±700.2
Day 259 – End of Administration	BLQ	BLQ	BLQ	4313±218
15 min	BLQ	BLQ	BLQ	846.7±733.4
Toxicokinetics of Impurity 2 (IM2):				
Concentration (µg/mL)				
Day 0 – End of Administration	BLQ	BLQ	BLQ	2819±507
15 min	BLQ	BLQ	BLQ	374.0±647.8
Day 84 – End of Administration	BLQ	BLQ	BLQ	3305±96
15 min	BLQ	BLQ	BLQ	356.0±616.6
Day 175 – End of Administration	BLQ	BLQ	BLQ	3919±261
15 min	BLQ	BLQ	BLQ	780.0±676.4
Day 259 – End of Administration	BLQ	BLQ	BLQ	4220±219
15 min	BLQ	BLQ	BLQ	873.3±756.5

BLQ=below the lower limit of quantification (<1000 µg/mL); M=Male

Toxicokinetic (concentration) results are expressed as mean±SD (n=3)

a：Where no impurities were detected at the corresponding time points or concentrations, viltolarsen concentration values per time point have been omitted from this table (but are available in the study report).

（3/5）

Dose (mg/kg)	0 (Control)	10	60	360
Number of Animals	M: 8	M: 5	M: 8	M: 8
Toxicokinetics of Impurity 3 (IM3):				
Concentration (μg/mL)				
Day 0 – End of Administration	BLQ	BLQ	BLQ	2873±521
15 min	BLQ	BLQ	BLQ	355.7±616.0
Day 84 – End of Administration	BLQ	BLQ	BLQ	3482±138
15 min	BLQ	BLQ	BLQ	369.7±640.3
Day 175 – End of Administration	BLQ	BLQ	BLQ	4064±248
15 min	BLQ	BLQ	BLQ	810.7±703.6
Day 259 – End of Administration	BLQ	BLQ	BLQ	4267±217
15 min	BLQ	BLQ	BLQ	842.7±730.0
Toxicokinetics of Impurity 4 (IM4):				
Concentration (μg/mL)				
Day 0 – End of Administration	BLQ	BLQ	BLQ	2832±617
15 min	BLQ	BLQ	BLQ	334.0±578.5
Day 84 – End of Administration	BLQ	BLQ	BLQ	3192±252
15 min	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Day 175 – End of Administration	BLQ	BLQ	BLQ	4010±293
15 min	BLQ	BLQ	BLQ	767.0±667.8
Day 259 – End of Administration	BLQ	BLQ	BLQ	4072±325
15 min	BLQ	BLQ	BLQ	759±657.7
Toxicokinetics of Impurity 5 (IM5):				
Concentration (μg/mL)				
Day 0 – End of Administration	BLQ	BLQ	BLQ	2902±501
15 min	BLQ	BLQ	BLQ	353.3±612.0
Day 84 – End of Administration	BLQ	BLQ	BLQ	3534±116
15 min	BLQ	BLQ	BLQ	368.0±637.4
Day 175 – End of Administration	BLQ	BLQ	BLQ	4015±273
15 min	BLQ	BLQ	BLQ	786.3±683.8
Day 259 – End of Administration	BLQ	BLQ	BLQ	4358±244
15 min	BLQ	BLQ	BLQ	824.3±714.0

BLQ=below the lower limit of quantification (<1000 μg/mL); M=Male
Toxicokinetic (concentration) results are expressed as mean±SD (n=3)

（4/5）

Dose (mg/kg)	0 (Control)	10	60	360
Number of Animals	M: 8	M: 5	M: 8	M: 8
Noteworthy Findings:				
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
Body Weight [a] (%)	2.494 kg	+3.5	+2.6	+5.4
Food Consumption [a] (%)	108.00 g/day	-0.1	0.0	-1.5
Clinical Observations	–	–	–	–
Ophthalmoscopy	–	–	–	–
Electrocardiography	–	–	–	–
Hematology	–	–	–	–
Blood Coagulation	–	–	–	–
Blood Chemistry	–	–	–	–
Urinalysis	–	–	–	–
Terminal Necropsy				
Number Evaluated	M: 5	M: 5	M: 5	M: 5
Organ Weights (%)	–	–	–	–
Gross Pathology	–	–	–	–
Histopathology				
Number Evaluated	M: 5	M: 5	M: 5	M: 5
Kidney [b] (Left)				
Basophilic Granules, Tubular Epithelium, Very Slight	0	4	5	4
Basophilic Change, Straight PT, Very Slight	0	0	0	1
Vacuolation, Epithelium, Convoluted PT, Very Slight	0	0	0	2
Vacuolation, Epithelium, Straight PT	0	0	0	4
Very Slight	0	0	0	2
Slight	0	0	0	2
Dilatation, Renal Tubules, Focal, Very Slight	0	0	0	2

M=Male; PT=proximal tubule

– : No noteworthy findings.

a : At end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

b : Data are presented for the left kidney; similar findings were noted in the right kidney.

（5/5）

Dose (mg/kg)	0 (Control)	10	60	360
Number of Animals	M: 8	M: 5	M: 8	M: 8
Additional Examinations:				
Serum Cytokines	–	–	–	–
Serum Complement	–	–	–	–
Immunophenotyping in Peripheral Blood	–	–	–	–
Anti-Viltolarsen Antibody Analysis	–	–	–	–
Electron Microscopy				
Number Evaluated	M: 3	NE	NE	M: 3
Kidney (Left, Cortex)				
MBV, Intracytoplasmic, Epithelium, PT	0			3
Very Slight	0			2
Slight	0			1
MBV, Intracytoplasmic, Epithelium, CD, Very Slight	0			1
Postdose Evaluation:				
Number Evaluated	M: 3	NE	M: 3	M: 3
Body Weight [a] (%)	2.357 kg		+4.2	-4.1
Histopathology				
Kidney [b] (Left)				
Basophilic Granules, Tubular Epithelium, Very Slight	0		0	3
Dilatation, Renal Tubules, Very Slight	0		0	2
Vacuolation, Epithelium, Straight PT, Very Slight	0		0	1
Additional Information: Since there was no standard substance, the concentrations for the impurities are based on the relative peak area for the impurity in the plasma sample compared to the peak area of the impurity in the reference standard viltolarsen and expressed using the concentration of viltolarsen from the calibration curve. The concentrations of the impurities were BLQ at all sampling times after 15 minutes.				

BLQ=below the lower limit of quantification (<1000 µg/mL); CD=collecting duct; M=Male; MBV=membrane bound vacuoles; NE=Not examined; PT=proximal tubule

– : No noteworthy findings.

a : At end of recovery period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

b : Data are presented for the left kidney; similar findings were noted in the right kidney.

2.6.7.8 *In Vitro* 遺伝毒性試験

2.6.7.8.1 細菌を用いる復帰突然変異試験

報告書の題名：NS-065（NDK-65）の細菌を用いる復帰突然変異試験

被験物質：Viltolarsen

試験の種類：	細菌を用いる復帰突然変異試験	独立して実施した試験数：	2[a]	試験番号：	TX10751
菌株：	ネズミチフス菌（TA100、TA1535、TA98、TA1537）及び大腸菌（WP2*uvrA*）	プレート数：	2	CTD における記載箇所：	4.2.3.3.1-1
代謝活性化系：	S9mix（ラット肝 S9）			GLP 適用：	適
溶媒：	生理食塩液（被験物質）、注射用蒸留水/DMSO（陽性対照）			処理年月：	[redacted] 年 [redacted] 月
処理：	プレインキュベーション法で 48 時間				
細胞毒性：	なし				
遺伝毒性：	なし				

a：本試験の結果のみ表中に記載した。用量設定試験の結果については試験報告書中に記載されている。

（1/2）

代謝活性化	被験物質	濃度 (μg/plate)	復帰変異数（コロニー数/plate、平均値）				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
代謝活性化なし	生理食塩液	0	104	9	20	23	4
	Viltolarsen	156	108	8	20	27	3
		313	126	8	21	30	3
		625	108	5	19	22	5
		1250	110	9	20	16	4
		2500	106	12	21	23	5
		5000	120	9	19	16	4
	AF-2	0.01	421	–	–	–	–
		0.02	–	–	578	–	–
		0.1	–	–	–	526	–
	SA	0.5	–	336	–	–	–
	9AA	80	–	–	–	–	380

AF-2=2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; 2AA=2-aminoanthracene; 9AA=9-aminoacridine hydrochloride hydrate; SA=sodium azide

（2/2）

代謝活性化	被験物質	濃度 (μg/plate)	復帰変異数（コロニー数/plate、平均値）				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
代謝活性化あり	生理食塩液	0	110	11	24	29	9
	Viltolarsen	156	122	8	20	29	9
		313	119	9	20	29	8
		625	106	10	24	28	8
		1250	99	7	20	23	8
		2500	109	7	22	28	8
		5000	121	10	22	21	12
	2AA	0.5	–	–	–	422	–
		1	541	–	–	–	–
		2	–	201	–	–	154
		10	–	–	314	–	–

2AA=2-aminoanthracene

2.6.7.8.2 ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

報告書の題名：NS-065（NDK-65）のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

被験物質：Viltolarsen

試験の種類：	ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験	独立して実施した試験数：	2[a]	試験番号：	TX10752
細胞株：	CHL/IU 細胞	プレート数：	2	CTD における記載箇所：	4.2.3.3.1-2
代謝活性化系：	S9mix（ラット肝 S9）	分析細胞数：	200	GLP 適用：	適
溶媒：	生理食塩液（被験物質）、注射用蒸留水/生理食塩液（陽性対照）			処理年月：	[redacted] 年 [redacted] 月
処理：	代謝活性化なしで 6、24 時間、代謝活性化ありで 6 時間				
細胞毒性：	なし				
遺伝毒性：	なし				

a：本試験の結果のみ表中に記載した。用量設定試験の結果については試験報告書中に記載されている。用量設定試験の細胞増殖率に基づいて本試験の用量を決定した。

代謝活性化	被験物質	濃度 (μg/mL)	処理時間 (hr)	細胞増殖率 (%)	構造異常細胞 出現頻度 (%)	数的異常細胞 出現頻度 (%)
代謝活性化なし	生理食塩液	0	6	100	0.5	0.5
	Viltolarsen	1250	6	99.2	0.0	0.0
		2500	6	100.8	0.0	0.0
		5000	6	99.2	0.0	0.0
	MMC	0.15	6	55.6	37.5	0.5
	生理食塩液	0	24	100	0.0	0.5
	Viltolarsen	1250	24	90.1	0.0	0.0
		2500	24	86.4	0.0	0.0
		5000	24	77.6	0.5	0.0
	MMC	0.05	24	66.3	21.5	0.5
代謝活性化あり	生理食塩液	0	6	100	0.5	0.5
	Viltolarsen	1250	6	98.0	0.5	0.0
		2500	6	96.0	0.5	0.5
		5000	6	89.1	1.0	1.0
	CP	10	6	57.6	37.5	0.0

CP=cyclophosphamide monohydrate; MMC=mitomycin C

2.6.7.9 *In Vivo* 遺伝毒性試験

2.6.7.9.1 マウス骨髄細胞を用いる小核試験

報告書の題名：NS-065（NDK-65）のマウスを用いる小核試験

被験物質：Viltolarsen

試験方法：	骨髄細胞を用いる小核試験	処理計画：	1 日 1 回、2 日間	試験番号：	TX10753
動物種/系統：	マウス、Crl:CD1 (ICR)	計測時間：	最終投与後 24 時間	CTD における記載箇所：	4.2.3.3.2-1
週齢：	9 週齢	投与方法：	静脈内、1 日 1 回	GLP 適用：	適
評価した細胞：	多染性赤血球（PCE）	溶媒/投与形態：	生理食塩液	投与年月：	[redacted] 年 [redacted] 月
分析細胞数/動物：	2000				
特記事項：	トキシコキネティクス測定は各群雄 3 例を設定した。				
毒性/細胞毒性：	用量設定試験において、2000 mg/kg 投与群で 3 例中 2 例の死亡又は瀕死動物が認められた。 本試験において、1000 mg/kg 投与群で軽度の自発運動の減少及び体重減少が認められた。				
遺伝毒性：	なし				
曝露証明：	試験内で実施				

（小核試験結果）

被験物質	投与量 (mg/kg)	動物数	PCEs (%、Mean ± SD)	MNPCEs (%、Mean ± SD)	トキシコキネティクス		
					$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	C_{max} (μg/mL)	t_{max} (hr)
生理食塩液	0	M: 5	46.56±2.97	0.03±0.03	NA	BLQ	NA
Viltolarsen	250	M: 5	48.16±1.75	0.01±0.02	377.3	875.0	0.1
	500	M: 5	47.48±3.30	0.01±0.02	1036	1453	0.1
	1000	M: 5	47.28±2.61	0.08±0.04	2956	5706	0.1
MMC	2	M: 5	41.96±4.38	4.09±0.28*	NA	NA	NA

BLQ=below the lower limit of quantification; M=Male; MMC=mitomycin C; MNPCEs=micronucleated polychromatic erythrocytes; NA=not applicable; PCEs=polychromatic erythrocytes
*p<0.05 (Kastenbaum and Bowman's method).
トキシコキネティクスは mean（n=3）で示す。

（トキシコキネティクス）

採血時点 （投与後からの時間）	投与量 (mg/kg)	投与 2 日目における血漿中濃度 [a]（μg/mL）					
		Viltolarsen	不純物 1 (IM1)	不純物 2 (IM2)	不純物 3 (IM3)	不純物 4 (IM4)	不純物 5 (IM5)
5 分	250	875.0±47.3	721.7±626.9	368.0±637.4	744.0±645.0	1332±173	748.3±649.1
15 分		368.7±87.8	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
30 分		339.8±39.0	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
5 分	500	1453±290	1710±389	1669±364	1687±344	2199±538	1642±407
15 分		874.9±203.5	431.3±747.1	438.3±759.2	420.7±728.6	445.0±770.8	424.7±735.5
30 分		577.1±93.2	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
5 分	1000	5706±2084	6359±2408	6186±2382	6307±2507	7357±2550	6353±2396
15 分		2916±175	3308±46	3326±99	3280±32	3550±122	3239±37
30 分		1532±202	1780±241	1859±253	1761±257	1790±244	1809±207
特記事項: 不純物については標準品がないため、血漿中不純物濃度測定の際は、測定試料のピーク面積比を viltolarsen 標準品（不純物を含有）を用いて作成した検量線に当てはめ、検量線の viltolarsen 濃度を用いて表記した。投与後 1 時間以降の測定時点では、血漿中の不純物濃度は BLQ（<1000 μg/mL）であった。							

トキシコキネティクスは mean±SD（n=3）で示す。

BLQ=below the lower limit of quantification（<1000 μg/mL）

a：いずれの用量においても不純物の曝露が認められなかった投与 1 時間以降の採血時点については、viltolarsen の血漿中濃度の記載を省略した。

2.6.7.10 がん原性試験

2.6.7.10.1 ラット 4 週間がん原性用量設定試験

報告書の題名：NS-065/NCNP-01: Preliminary Toxicity Study by Once-Weekly Intravenous (Bolus) Administration to Male Han Wistar Rats for 4 Weeks

被験物質：Viltolarsen

動物種/系統：	Rat, Han Wistar	投与期間：	4 Weeks	試験番号：	TX10869
投与開始日齢：	53 to 60 Days	投与方法：	IV, Weekly	CTD における記載箇所：	4.2.3.4.1-1
初回投与年月日：	[redacted], [redacted]	溶媒/投与形態：	Saline	GLP 適用：	No
		対照群の処置：	Saline		

用量設定根拠： Toxicity-based endopint of a safety pharmacology study in rats (Study Number: TX10764).

特記事項： Only males were used.

（1/3）

Dose (mg/kg)	0 (Control)	100	300	1000
Gender	M	M	M	M
Toxicokinetics:	NE	NE	NE	NE
Number of Animals				
At Start	5	5	5	5
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
Terminal Sacrifice	5	5	5	5
Survival (%)	100	100	100	100
Body Weight [a] (%)	302 g	-0.7	-5.0	-5.0
Weight Gain [b] (%)				
Day 1–8	33 g	-3.0	-12.1	-18.2
Day 8–15	27 g	-7.4	-3.7	-11.1
Day 15–22	24 g	-4.2	-20.8*	-37.5**

M=male; NE=not examined

*p<0.05, **p<0.01 (Williams' test)

a：At end of dosing. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

b：For controls, groups means difference are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

（2/3）

Dose (mg/kg)	0 (Control)	100	300	1000
Gender	M	M	M	M
Food Consumption [a] (%)				
Week 1	148 g/week	-4.1	+4.1	-7.4
Week 2	150 g/week	-6.0	-4.7	-3.3
Week 3	155 g/week	-7.1	-9.7	-12.9
Number of Animals with Neoplastic Lesions:	–	–	–	–
Noteworthy Findings:				
Clinical Observations	–	–	–	–
Blood Chemistry				
Urea Nitrogen (mmol/L)	8.81	7.99	8.64	19.78**
Necropsy				
Organ Weight [a] (%)				
Kidneys, Absolute	1.927 g	-6.3	-6.5	+73.0
Kidneys, Body Weight-Adjusted	1.881 g	-6.3	-1.1	+78.7**
Adrenals, Absolute	60 mg	+10.0	+11.7	+23.3
Adrenals, Body Weight-Adjusted	60 mg	+10.0	+11.7	+25.0*
Spleen, Absolute	0.557 g	+5.4	+5.4	+24.2
Spleen, Body Weight-Adjusted	0.547 g	+5.7	+9.5	+27.8**
Gross Pathology				
Kidneys				
Enlarged	0	0	0	4
Granular	0	0	0	4

M=male

*p<0.05, **p<0.01 (Williams' test)

– : No noteworthy findings.

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

（3/3）

Dose (mg/kg)	0 (Control)	100	300	1000
Gender	M	M	M	M
Histopathology – Non-Neoplastic				
Lesions				
Kidneys				
Dilatation, Tubular	1	0	0	5
Minimal	1	0	0	1
Slight	0	0	0	2
Moderate	0	0	0	1
Marked	0	0	0	1
Vacuolation, Tubular Epithelium	0	0	0	5
Slight	0	0	0	4
Moderate	0	0	0	1
Basophilia, Tubular	0	0	0	5
Minimal	0	0	0	2
Slight	0	0	0	3
Hyperplasia, Epithelial, CD, Minimal	0	0	0	2
Accumulation of Hyaline Droplets, Minimal	3	0	0	0

CD=collecting ducts; M=male

2.6.7.10.2　ラット 13 週間がん原性用量設定試験

報告書の題名：NS-065/NCNP-01: Preliminary Carcinogenicity Study by Once Weekly Intravenous (Bolus) Administration to Male Han Wistar Rats for 13 Weeks

被験物質：Viltolarsen

動物種/系統：	Rat, Han Wistar	投与期間：	13 Weeks	試験番号：	TX10883
投与開始日齢：	44 to 50 Days	投与方法：	IV, Weekly	CTD における記載箇所：	4.2.3.4.1-2
初回投与年月日：	[redacted], [redacted]	溶媒/投与形態：	Saline	GLP 適用：	Yes
		対照群の処置：	Saline		

用量設定根拠：　Toxicity-based endopint of a 4-week rat study (Study Number: TX10869).

特記事項：　Only males were used; anti-viltolarsen antibody analysis was conducted; toxicokinetic evaluation was performed in 3 animals/dose.

（1/5）

Dose (mg/kg)	0 (Control)	250	500	1000
Gender	M	M	M	M
Toxicokinetics:				
$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)				
Day 1	NA	367	1470	3990
Day 85	NA	934	2340	7060
C_{max} (μg/mL)				
Day 1	BLQ	608	1520	2790
Day 85	BLQ	1000	2040	4110
t_{max} (hr)				
Day 1	NA	0.083	0.083	0.083
Day 85	NA	0.083	0.083	0.083
Number of Animals				
At Start [a]	13	16	16	16
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
Terminal Sacrifice	10	10	10	10

Toxicokinetic results are expressed as mean (n=3)

BLQ=below the lower limit of quantification（<0.5 μg/mL）; M=male; NA=not applicable.

a：Animal used in main study (n=10/dose) and satellite study (each dose containing 6 animals except control which contains 3 animals).

（2/5）

Dose (mg/kg)	0 (Control)	250	500	1000
Gender	M	M	M	M
Survival (%)	100	100	100	100
Body Weight [a] (%)				
Week 12	388 g	+4.1	-1.3	0.0
Food Consumption [a] (%)				
Week 1	138.5 g	-0.4	-1.4	-7.2
Week 2	135.5 g	+0.7	-1.1	-5.9
Week 12	147.5 g	-0.7	-3.4	+1.0
Number of Animals with Neoplastic Lesions:	–	–	–	–
Noteworthy Findings:				
Clinical Observations	–	–	–	–
Hematology				
Red Blood Cell Count (10^{12}/L)				
Week 6	8.46	8.55	8.09	8.03
Week 13	7.49	7.60	6.86**	7.07**
Hemoglobin (g/dL)				
Week 6	15.7	15.7	15.3	14.8*
Week 13	14.7	14.7	13.8**	13.9**
Hematocrit (%)				
Week 6	46.9	46.8	45.4	44.4**
Week 13	39.6	40.1	36.9**	37.4**
Reticulocyte Count (10^{12}/L)				
Week 6	0.147	0.161	0.159	0.179*
Week 13	0.143	0.182	0.172	0.135
White Blood Cell Count (10^{9}/L)				
Week 6	6.73	8.29	8.05	7.95
Week 13	5.63	7.17	7.51*	8.08**

M=male

*p<0.05, **p<0.01 (Williams' test).

–：No noteworthy findings.

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

（3/5）

Dose (mg/kg)	0 (Control)	250	500	1000
Gender	M	M	M	M
Differential Leucocyte Count				
Neutrophil (10^9/L)				
Week 6	1.03	1.60*	1.53*	1.22*
Week 13	1.10	1.69	1.80	2.20**
Lymphocyte (10^9/L)				
Week 6	5.45	6.30	6.13	6.41
Week 13	4.29	5.14	5.36	5.45
Monocyte (10^9/L)				
Week 6	0.12	0.19*	0.21*	0.19*
Week 13	0.10	0.20*	0.22**	0.28**
Blood Coagulation	–	–	–	–
Blood Chemistry				
Urea Nitrogen (mmol/L)				
Week 6	8.51	8.21	9.01	9.16
Week 13	7.13	7.88	11.21**	16.33**
Creatinine (μmol/L)				
Week 6	28	28	29	28
Week 13	32	31	38	57††
Phosphorus (mmol/L)				
Week 6	1.74	1.79	1.64	1.89
Week 13	1.46	1.56	1.81**	2.16**
Urinalysis				
pH				
Week 6	6.4	6.3	6.3	5.7**
Week 13	6.6	6.7	6.0**	5.7**
Protein (mg)				
Week 6	7.192	6.190	4.550**	4.030**
Week 13	5.968	12.325†	28.839†	63.948††

M=male

*p<0.05, **p<0.01 (Williams' test); †p<0.05, ††p<0.01 (Shirley's test).

– : No noteworthy findings.

Dose (mg/kg)	0 (Control)	250	500	1000
Gender	M	M	M	M
Sodium (mmol)				
Week 6	0.266	0.226	0.219	0.194
Week 13	0.488	0.644	0.346	0.304*
Potassium (mmol)				
Week 6	0.891	0.839	0.789	0.907
Week 13	0.680	0.798	0.648	0.557*
Chloride (mmol)				
Week 6	0.291	0.252	0.265	0.352
Week 13	0.448	0.581	0.290	0.233†
Glucose (μmol)				
Week 6	3.099	3.030	2.714	2.960
Week 13	3.924	4.991*	6.167**	7.255**
Necropsy				
Organ Weight [a] (%)				
Kidneys, Absolute	2.027 g	+16.7	+43.4	+167.8
Kidneys, Body Weight-Adjusted	2.041 g	+13.5**	+43.5**	+162.1**
Spleen	0.668 g	+6.6	+4.6	+16.6
Spleen, Body Weight-Adjusted	0.679 g	+1.9	+5.2	+13.8*
Thymus	0.368 g	-8.2	-14.4	-26.1
Thymus, Body Weight-Adjusted	0.374 g	-12.6	-13.6	-28.1**
Gross Pathology				
Kidneys				
Abnormal color (pale)	0	0	0	10
Enlarged	0	0	6	10
Granular	0	0	0	10

M=male

*p<0.05, **p<0.01 (Williams' test); †p<0.05 (Shirley's test).

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

Dose (mg/kg)	0 (Control)	250	500	1000
Gender	M	M	M	M
Histopathology – Non-Neoplastic				
Lesions				
Kidneys				
Dilatation, Tubular	0	5	10	10
Minimal	0	5	2	0
Slight	0	0	7	0
Moderate	0	0	1	1
Marked	0	0	0	9
Vacuolation, Tubular Epithelium	0	2	10	10
Minimal	0	2	5	0
Slight	0	0	5	1
Moderate	0	0	0	9
Basophilia, Tubular	0	9	10	10
Minimal	0	7	0	0
Slight	0	2	6	2
Moderate	0	0	4	5
Marked	0	0	0	3
Hyperplasia/Hypertrophy, Epithelial, CD, Minimal	0	0	2	5
Hyaline Casts, Minimal	0	0	0	7
Thymus				
Apoptosis Increased, Cortex, Minimal	0	0	0	2
Atrophy, Minimal	0	0	0	2
Pancreas				
Secretory Depletion, Acinar Cell	1	0	0	9
Minimal	1	0	0	7
Slight	0	0	0	2
Basophilic Focus, Acinar Cells, Minimal	0	0	0	1
Additional Examinations [a]:				
Anti-Viltolarsen Antibody Analysis	–	–	1 M, Day 85	–

CD=collecting ducts; M=male

– : No noteworthy findings.

a : Satellite animals used.

2.6.7.10.3　マウス 4 週間がん原性用量設定試験

報告書の題名：NS-065/NCNP-01 (Oligonucleotide Drug): Preliminary Carcinogenicity Study by Intravenous (Bolus) Administration to Male CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic, Wild Type Mice for 4 Weeks

被験物質：Viltolarsen

動物種/系統：	Mouse CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic Wild-type	投与期間：	4 Weeks	試験番号：	TX10884
投与開始日齢：	8 Weeks	投与方法：	IV, Weekly	CTD における記載箇所：	4.2.3.4.2-1
初回投与年月日：	[redacted], [redacted]	溶媒/投与形態：	Saline	GLP 適用：	Yes
		対照群の処置：	Saline		

用量設定根拠：　Toxicity-based endopint of a 26-week mouse study (Study Number: TX10827)

特記事項：　Only males were used; anti-viltolarsen antibody analysis was conducted; toxicokinetic evaluation was performed in 3 animals/dose

（1/3）

Dose (mg/kg)	0 (Control)	250	500	1000
Gender	M	M	M	M
Toxicokinetics:				
$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)				
Day 1	NA	540	1560	6040
Day 22	NA	491	1070	5950
C_{max} (μg/mL)				
Day 1	BLQ	1080	2420	5740
Day 22	BLQ	1120	1770	4790
t_{max} (hr)				
Day 1	NA	0.083	0.083	0.083
Day 22	NA	0.083	0.083	0.083

Toxicokinetic results are expressed as mean (n=3)

BLQ=below the lower limit of quantification（<0.5 μg/mL）; M=male; NA=not applicable.

（2/3）

Dose (mg/kg)	0 (Control)	250	500	1000
Gender	M	M	M	M
Number of Animals				
At Start [a]	24	39	39	39
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
Terminal Sacrifice	6	6	6	6
Survival (%)	100	100	100	100
Body Weight [b] (%)	29.6 g	-0.7	-3.7	-7.8
Food Consumption [b] (%)	27 g/week	-3.7	-3.7	-3.7
Number of Animals with Neoplastic Lesions:	–	–	–	–
Noteworthy Findings:				
Clinical Observations	–	–	–	–
Blood Chemistry				
Urea Nitrogen (mmol/L)	6.64	6.43	6.30	8.49**
Necropsy				
Organ Weight [c] (%)				
Kidneys, Absolute	425.4 mg	+1.3	+2.0	+8.6
Kidneys, Body Weight-Adjusted	405.4 mg	+2.5	+8.3	+21.5**
Prostate, Absolute	48.1 mg	-0.4	-28.5	-27.4
Prostate, Body Weight-Adjusted	51.7 mg	-1.9	-35.4*	-43.1*
Gross Pathology				
Kidneys, Pale Areas	0	0	0	3

M=male

*p<0.05, **p<0.01 (Williams' test)

– : No noteworthy findings.

a : Animal used in main study (n=6/dose) and satellite study (each dose containing 33 animals except control which contains 18 animals).

b : At end of dosing. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

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

（3/3）

Dose (mg/kg)	0 (Control)	250	500	1000
Gender	M	M	M	M
Histopathology – Non-Neoplastic				
Lesions				
Kidneys				
Basophilic Material, Intratubular	0	0	0	6
Minimal	0	0	0	2
Slight	0	0	0	2
Moderate	0	0	0	1
Marked	0	0	0	1
Vacuolation, Tubular Epithelium	0	2	4	6
Minimal	0	2	4	1
Slight	0	0	0	3
Moderate	0	0	0	1
Marked	0	0	0	1
Dilatation, Tubular	0	0	0	6
Slight	0	0	0	4
Moderate	0	0	0	1
Marked	0	0	0	1
Basophila, Tubular	0	1	3	4
Minimal	0	1	3	2
Slight	0	0	0	2
Urinary Bladder				
Eosinophilic Material, Cytoplasmic, Minimal	0	3	4	5
Hypertrophy, Urothelium, Minimal	0	3	4	5
Additional Examinations [a]:				
Anti-Viltolarsen Antibody Analysis	–	–	–	–

– : No noteworthy findings.

a : Satellite animals used.

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

2.6.7.12.1 マウス雄受胎能に関する試験

報告書の題名：Study for Effects of NS-065/NCNP-01 (NDK-65) on Fertility and Early Embryonic Development to Implantation by Intermittent Intravenous Administration in Male Mice

被験物質：Viltolarsen

試験計画：	comforms to ICH S5	投与期間：	雄	12 Weeks (from 9 weeks before mating through the mating period [2 weeks] to the day before necropsy)	試験番号：	TX10958	
動物種/系統：	Mouse, Crl:CD1 (ICR)		雌	—	CTD における記載箇所：	4.2.3.5.1-1	
試験開始週齢：	6 Weeks	交尾成立日：		Day 0	GLP 適用：	Yes	
初回投与年月日：	[redacted], [redacted]	帝王切開日：		Day 13 of Gestation			
		投与方法：		IV, Weekly			
		溶媒/投与形態：		Saline			

特記事項：Only males were treated; anti-viltolarsen antibody analysis was conducted; toxicokinetic evaluation was performed in 3 animals/dose.

無毒性量：F_0 Males: 240 mg/kg (general toxicity) and 1000 mg/kg (reproductive function)
F_0 Females: –
F_1 Litters: 1000 mg/kg

（1/3）

Dose (mg/kg)	0 (Control)	60	240	1000
Males				
Toxicokinetics:				
$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)				
Day 0	NA	67.46	464.6	6432[a]
Day 63	NA	57.09	453.4	7283
C_{max} (μg/mL)				
Day 0	BLQ	246.1	804.3	3999[a]
Day 63	BLQ	143.1	781.0	3717

Toxicokinetic results are expressed as mean (n=3)
BLQ=below the lower limit of quantification（<0.5 μg/mL）; NA=not applicable
a：Values for parameters excluded data from 1 male at 5 minutes after dosing because concentration in plasma from this male was abnormally low compared with those of other 2 males in the same group at the same sampling point.

（2/3）

Dose (mg/kg)	0 (Control)	60	240	1000
t_{max} (hr)				
Day 0	NA	0.1	0.1	0.1[a]
Day 63	NA	0.1	0.1	0.1
No. Evaluated	25	25	25	25
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
Clinical Observations	–	–	–	–
Blood Chemistry				
Urea Nitrogen (mg/dL)	27.41	27.31	26.43	54.48**
Necropsy Observations				
Testis: Small	0	1	0	0
Organ Weight	–	–	–	–
Body Weight[b] (%)	39.02 g	+2.5	+2.6	+4.9*
Food Consumption[b] (%)				
Day 0	4.73 g/day	+0.6	-0.6	-12.7**
Day 38	4.81 g/day	+6.9	+3.5	+9.4*
Day 45	4.84 g/day	+9.9**	+6.4	+9.1*
Day 62	5.16 g/day	+6.2	+11.2*	+9.7*
Mean No. Days Prior to Mating	2.8	3.0	3.0	2.5
No. of Males that Mated	25	24	24	25
Copulation Rate (%)	100	96	96	100
No. of Fertile Males	24	22	24	24
Fertility Rate (%)	96.0	91.7	100.0	96.0
Sperm Examination				
Weight of Caudal Epididymis (mg)	20.37	20.04	21.31	20.15
Sperm Activity (%)	81.63	83.92	82.25	79.17
Motile Sperm (%)	82.94	83.43	82.66	80.50**
Total Sperm Count in Caudal Epididymis ($\times 10^6$)	19.10	19.10	18.96	18.18
Sperm Count in Caudal Epididymis ($\times 10^4$/mg)	93.36	95.41	89.14	91.07
Abnormal Sperm	5.19	4.23	4.45	4.88

Toxicokinetic results are expressed as mean (n=3). NA=not applicable. *p<0.05, **p<0.01 (Bartlett's test; Dunnett's test or Dunnett type test)

– : No noteworthy findings.

a : Values for parameters excluded data from 1 male at 5 minutes after dosing because concentration in plasma from this male was abnormally low compared with those of other 2 males in the same group at the same sampling point.

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

（3/3）

Dose (mg/kg)	0 (Control)	60	240	1000
Additional Examinations [a]:				
Anti-Viltolarsen Antibody Analysis	–	–	–	–
Females (Non-treated)				
Toxicokinetics:	NE	NE	NE	NE
No. Evaluated	25	25	25	25
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
Clinical Observations	–	–	–	–
Necropsy Observations	–	–	–	–
Premating Body Weight (%)	–	–	–	–
Gestation Body Weight (%)	–	–	–	–
Premating Food Consumption (%)	NE	NE	NE	NE
Gestation Food Consumption (%)	NE	NE	NE	NE
Mean No. Estrous Cycles/14 days	NE	NE	NE	NE
Mean No. Days Prior to Mating	2.8	3.0	3.0	2.5
No. of Females Sperm Positive	25	24	24	25
No. of Pregnant Females	24	22	24	24
No. Aborted or with Total Resorption of Litter	–	–	–	–
Mean No. Corpora Lutea	13.4	13.3	12.4	13.4
Mean No. Implantations	12.5	12.8	12.2	13.1
Mean Implantation Rate (%)	93.9	95.3	97.0	97.9
Mean % Preimplantation Loss	6.1	4.7	3.0	2.1
Mean No. Live Conceptuses	12.0	12.3	11.1	12.4
Mean Embryonic Viability Rate (%)	95.3	94.1	88.4	94.6
Mean No. Resorptions	–	–	–	–
No. Dead Conceptuses	1	1	1	2
Mean No. Postimplantation Loss	0.5	0.5	1.0	0.7
Mean % Postimplantation Loss	4.7	5.9	11.7	5.4
Implantation Site (%)	0.0	0.0	0.0	0.0
Placental Remnant (%)	4.4	5.6	11.4	4.7
Dead Embryo (%)	0.3	0.3	0.3	0.7

NE=not examined.

– : No noteworthy findings, a : Satellite animals used.

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（治療対象患者は男性のみであるため、胚及び胎児発生に関する試験は実施しなかった）。

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

該当試験なし（治療対象患者は男性のみであるため、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）。

2.6.7.15 新生児を用いた試験

2.6.7.15.1 反復投与毒性試験（幼若マウス 4 週間反復皮下及び静脈内投与毒性試験（1））

報告書の題名：A Subcutaneous and Intravenous Dose-Range Finding Study of NS-065/NCNP-01 in Juvenile Mice

被験物質：Viltolarsen

動物種/系統：	Mouse, Crl:CD1 (ICR)	投与期間：	4 Weeks	試験番号：	TX10843
投与開始日齢：	PND 7	投与方法：	SC on PND 7 and 14, IV on PND 21 and 28	CTD における記載箇所：	4.2.3.5.4-1
初回投与年月日：	[redacted], [redacted]	溶媒/投与形態：	Saline	GLP 適用：	No
		対照群の処置：	Saline		
用量設定根拠：	Toxicity-based endpoint of a 13-week adult mice study (Study Number TX10827)				
特記事項：	Only males were used; toxicokinetic evaluation was performed in 3 animals/dose.				

（1/2）

Dose (mg/kg)	0 (Control)	60	240	1000
Number of Animals	M: 5	M: 5	M: 5	M: 5
Toxicokinetics:				
$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)				
PND 7	NA	251.1	1324	5878
PND 14	NA	29.77	315.8	1200
PND 21	NA	132.5	799.8	7108
PND 28	NA	164.8	1242	9239
C_{max} (μg/mL)				
PND 7	BLQ	109.4	450.8	1057
PND 14	BLQ	14.11	154.9	468.8
PND 21	BLQ	332.6	1240	8395
PND 28	BLQ	393.0	2239	12640
t_{max} (hr)				
PND 7	NA	1.0	1.0	1.0
PND 14	NA	1.0	1.0	1.0
PND 21	NA	0.1	0.1	0.1
PND 28	NA	0.1	0.1	0.1

Toxicokinetic results are expressed as mean (n=3).

BLQ=below the lower limit of quantification（<0.5 μg/mL）; M=male; NA=not applicable; PND=postnatal day.

（2/2）

Dose (mg/kg)	0 (Control)	60	240	1000
Number of Animals	M: 5	M: 5	M: 5	M: 5
Noteworthy Findings:				
Died or Sacrificed Moribund	0	0	3 [a]	0
Body Weight [b] (%)	25.40 g	-7.87	-4.41	+2.36
Body Weight Gain [c] (%)	21.12 g	-10.9	-6.9	-1.3
Clinical Observations	–	–	–	–
Blood Chemistry [d]				
Alanine Transaminase(U/L)	60.40	34.00	34.00	33.60
Triglyceride (mg/dL)	180.50	141.67	121.50	102.80
Necropsy				
Number Evaluated	M: 5	M: 5	M: 5	M: 5
Organ Weights [e] (%)				
Kidneys, Absolute	0.3994 g	-12.4631*	-2.1782	+13.2192**
Kidneys, Relative to Body Weight	1.5725%	-4.4704	+2.4516	+10.8704
Gross Pathology				
Kidneys				
Cyst; Clear, Fluid, Bilateral	0	1	0	0
Discoloration; Red, Bilateral	0	0	0	1
Histopathology				
Number Evaluated	M: 5	M: 5	M: 5	M: 5
Kidneys				
Basophilic Granules, Tubular	0	0	5	5
Minimal	0	0	5	0
Mild	0	0	0	5

M=male

*p<0.05, **p<0.01 (Dunnett's test)

– : No noteworthy findings.

a : Three males in the 240 mg/kg dose toxicokinetic group were found dead on PND 9. These deaths were not related to viltolarsen.

b : At end of dosing. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

c : For controls, group mean body weight gain (change) from PND 7–29 are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown

d : For controls, means are shown. For treated groups, x-fold from mean control values are shown.

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

2.6.7.15.2 反復投与毒性試験（幼若マウス 4 週間反復皮下及び静脈内投与毒性試験（2））

報告書の題名：A Subcutaneous and Intravenous Dose Range-Finding Study of NS-065/NCNP-01 in Juvenile Mice – (2)

被験物質：Viltolarsen

動物種/系統：	Mouse, Crl:CD1 (ICR)	投与期間：	4 Weeks	試験番号：	TX10896
投与開始日齢：	PND 7	投与方法：	SC on PND 7, IV on PND 14, 21 and 28	CTD における記載箇所：	4.2.3.5.4-2
初回投与年月日：	[redacted], [redacted]	溶媒/投与形態：	Saline	GLP 適用：	No
		対照群の処置：	Saline		

用量設定根拠： Toxicity-based endpoint of a 4-week juvenile mice study (Study Number TX10843)

特記事項： Only males were used; toxicokinetic evaluation was performed in 3 animals/dose.

（1/3）

Dose (mg/kg)	0 (Control)	60	240	1000	2000
Number of Animals	M: 5	M: 5	M: 5	M: 5	M: 5
Toxicokinetics:					
$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)					
PND 7	NA	277.5	747.2	2715	7713
PND 14	NA	153.6	955.4	5308	21340
PND 21	NA	126.1	920.8	9957	19770
PND 28	NA	187.1	1405	7681	28400
C_{max} (μg/mL)					
PND 7	BLQ	119.5	240.4	468.0	1431
PND 14	BLQ	90.32	1313	4668	11660
PND 21	BLQ	315.5	1194	7755	13470
PND 28	BLQ	448.9	2051	6726	18900
t_{max} (hr)					
PND 7	NA	1.0	1.0	4.0	4.0
PND 14	NA	0.1	0.1	0.1	0.1
PND 21	NA	0.1	0.1	0.1	0.1
PND 28	NA	0.1	0.1	0.1	0.1

Toxicokinetic results are expressed as mean (n=3).

BLQ=below the lower limit of quantification（<0.5 μg/mL）; M=male; NA=not applicable; PND=postnatal day

（2/3）

Dose (mg/kg)	0 (Control)	60	240	1000	2000
Number of Animals	M: 5	M: 5	M: 5	M: 5	M: 5
Noteworthy Findings:					
Died or Sacrificed Moribund	0	0	1 [a]	0	1 [a]
Body Weight [b] (%)	23.02 g	+13.5	+20.1	+18.8	+13.0
Body Weight Gain [c] (%)	20.28 g	+8.5	+9.5	+10.8	+5.4
Clinical Observations	–	–	–	–	–
Blood Chemistry					
Urea Nitrogen (mg/dL)	13.4	17.7	18.0	20.7*	24.6**
Alanine Transaminase (U/L)	31	31	29	27	19*
Aspartate Transaminase (U/L)	57	47	61	50	42**
Alkaline Phosphatase (U/L)	246	197	185	170	137
Necropsy					
Number Evaluated	M: 5	M: 5	M: 5	M: 5	M: 5
Organ Weights [d] (%)					
Kidneys, Absolute	0.3394 g	+5.8928	+19.1809	+24.2781*	+38.0672**
Kidneys, Relative to Body Weight	1.48014%	-6.9500	-1.1006	+4.2205	–21.7067**
Gross Pathology					
Kidneys, Focus, Tan	0	0	0	0	2
Histopathology					
Number Evaluated	M: 5	M: 5	M: 5	M: 5	M: 5
Kidneys					
Basophilic Granules, Tubular	0	0	4	5	5
Minimal	0	0	4	0	0
Mild	0	0	0	3	0
Moderate	0	0	0	2	1
Marked	0	0	0	0	4

M=male

*p<0.05, **p<0.01 (Dunnett's test).

– : No noteworthy findings.

a : Two males were found dead, one main study male on PND 28 in the 240 mg/kg dose group and one toxicokinetic male on PND 15 in the 2000 mg/kg dose group. These death were not related viltolarsen.

b : At end of dosing. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

c : For controls, group mean body weight gain (change) from PND 7–29 are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

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

（3/3）

Dose (mg/kg)	0 (Control)	60	240	1000	2000
Number of Animals	M: 5	M: 5	M: 5	M: 5	M: 5
Degeneration/Necrosis, Tubular	0	0	0	4	5
Minimal	0	0	0	4	0
Mild	0	0	0	0	1
Moderate	0	0	0	0	4
Degeneration, Tubular, Minimal	0	0	0	1	0
Basophilic Material, Intratubular	0	0	0	5	5
Minimal	0	0	0	5	0
Moderate	0	0	0	0	5
Cast, Hyaline, Minimal	0	0	0	2	4
Dilatation, Tubular	0	0	0	5	5
Minimal	0	0	0	5	1
Mild	0	0	0	0	1
Moderate	0	0	0	0	3

M=male

2.6.7.15.3 反復投与毒性試験（幼若マウス 10 週間反復皮下及び静脈内投与毒性試験）

報告書の題名：A 10 Week Subcutaneous and Intravenous Study of NS-065/NCNP-01 in Juvenile Mice, Including a 10 Week Recovery Period

被験物質：Viltolarsen

動物種/系統：	Mouse, Crl:CD1 (ICR)	投与期間：	10 Weeks	試験番号：	TX10844
投与開始日齢：	PND 7	休薬期間：	10 Weeks	CTD における記載箇所：	4.2.3.5.4-3
初回投与年月日：	[redacted], [redacted]	投与方法：	SC on PND 7, IV on PND 14 to 70, Weekly	GLP 適用：	Yes
溶媒/投与形態：	Saline	対照群の処置：	Saline		
用量設定根拠：	Toxicity-based endpoint of a 4-week juvenile mice study (Study Number TX10896)				
特記事項：	Only males were used; anti-viltolarsen antibody analysis was conducted; toxicokinetic evaluation was performed in 3 animals/dose.				

（1/6）

Dose (mg/kg)	0 (Control)	15	60	240	1200
Number of Animals	M: 80	M: 80	M: 80	M: 79 [a]	M: 80
Toxicokinetics:					
$AUC_{0\text{-}24hr}$ (µg·hr/mL)					
PND 7	NA	111.3	410.4	1838	8928
PND 14	NA	203.5	716.4	4340	21030
PND 70	NA	130.6	542.4	2144	8970
C_{max} (µg/mL)					
PND 7	BLQ	48.8	169.8	698.9	1106
PND 14	BLQ	101.4	355.0	1766	8483
PND 70	BLQ	64.9	253.9	1062	1988
t_{max} (hr)					
PND 7	NA	1.0	1.0	1.0	4.0
PND 14	NA	0.1	0.1	0.1	0.1
PND 70	NA	0.1	0.1	0.1	0.1

Toxicokinetic results are expressed as mean (n=3).
BLQ=below the lower limit of quantification; M=male; NA=not applicable; PND=postnatal day
a：One animal in the main study group was determined to be a female and was removed from the study.

（2/6）

Dose (mg/kg)	0 (Control)	15	60	240	1200
Number of Animals	M: 80	M: 80	M: 80	M: 79 [a]	M: 80
Noteworthy Findings:					
Died or Sacrificed Moribund	0	1[b]	3[b]	2[b]	8[b]
Unknown Cause of Death	0	1	2	0	0
Procedural (Blood Collection)	0	0	1	0	2
Incorrect Sex	0	0	0	1	0
Cannibalized	0	0	0	1	1
Test Article-Related (Tubular Degeneration)	0	0	0	0	5
Body Weight [c] (%)					
PND 31	26.59 g	+6.58	+0.50	+0.37	-6.81†
PND 70	38.62 g	+0.22	-0.13	-1.73	-3.67†
Body Weight Gain, PND 7-70 [d] (%)	34.40 g	-0.23	-0.20	-1.37	-4.07
Food Consumption, PND 21-70 [c] (%)	5.1 g/day	+0.0	+0.0	+0.0	-2.0
Clinical Observations					
Eye, Partly Closed					
PND 7-40					
Number of Animals Affected	0	0	0	0	28
Number of Times Recorded	0	0	0	0	104
% of Affected Animals	0	0	0	0	25
First to Last Seen	–	–	–	–	21–28
PND 41-70					
Number of Animals Affected	0	0	0	0	8
Number of Times Recorded	0	0	0	0	26
% of Affected Animals	0	0	0	0	10
First to Last Seen	–	–	–	–	49–51

M=male; PND=postnatal day

†$p<0.05$ (Dunnett's test or Dunn's test).

– : No noteworthy findings.

a : One animal in the main study group was determined to be a female and was removed from the study.

b : Fourteen males were found dead, one (recovery phase) in 15 mg/kg dose group, three (one in each main study, recovery phase and toxicokinetic study) in 60 mg/kg dose group, two (one in main study and one in recovery phase) in 240 mg/kg dose group and eight (one in main study, 5 in recovery phase and 2 in toxicokinetic study) in 1200 mg/kg dose group. These death were not related viltolarsen at 15, 60, or 240 mg/kg. At 1200 mg/kg, 5 of the 8 males that did not survive to scheduled euthanasia had viltolarsen-related pathologic changes in the kidneys.

c : For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

d : For controls, group mean body weight gain (change) from PND 7–70 are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

（3/6）

Dose (mg/kg)	0 (Control)	15	60	240	1200
Number of Animals	M: 80	M: 80	M: 80	M: 79 [a]	M: 80
Activity Decreased					
PND 41-70					
Number of Animals Affected	0	0	0	0	20
Number of Times Recorded	0	0	0	0	55
% of Affected Animals	0	0	0	0	26
First to Last Seen	–	–	–	–	42–58
Vocalization Increased					
PND 41-70					
Number of Animals Affected	0	0	0	0	2
Number of Times Recorded	0	0	0	0	3
% of Affected Animals	0	0	0	0	3
First to Last Seen	–	–	–	–	42–42
Fur, Erected					
PND 41-70					
Number of Animals Affected	0	1	0	0	31
Number of Times Recorded	0	1	0	0	42
% of Affected Animals	0	1	0	0	40
First to Last Seen	–	49–49	–	–	42–52
Sexual Maturation	–	–	–	–	–
Ophthalmology	–	–	–	–	–
Neurobehavioral Assessments					
Functional Observation Battery					
Auditory Reaction (Mean Score)	2.4	2.6	2.7	2.6	2.8
None	0	0	0	0	0
Orienting	23	15	12	16	10**
Startle	17	25	22	23	30**
More Energetic Reaction	0	0	1	0	0
Intense Vocalization	0	0	0	0	0
Motor Activity	–	–	–	–	–
Acoustic Startle Habituation	–	–	–	–	–
Morris Water Maze	–	–	–	–	–

M=male; PND=postnatal day

**p<0.01 (Fisher's exact test)

– : No noteworthy findings.

a : One animal in the main study group was determined to be a female and was removed from the study.

（4/6）

Dose (mg/kg)	0 (Control)	15	60	240	1200
Number of Animals	M: 80	M: 80	M: 80	M: 79 [a]	M: 80
Hematology	–	–	–	–	–
Blood Chemistry	–	–	–	–	–
Urinalysis	–	–	–	–	–
Necropsy					
Number Evaluated	M: 20	M: 19	M: 19	M: 19	M: 19
Organ Weights [b] (%)					
Prostate, Absolute	0.0608 g	-23.85	-18.37	-27.20†	-31.61††
Prostate, Relative to Body Weight	0.161%	-22.86	-16.90	-23.21	-30.68†
Thymus, Absolute	0.0475 g	-4.74	+1.49	-10.49	-22.58†
Thymus, Relative to Body Weight	0.126%	-3.44	+1.41	-6.06	-21.35†
Gross Pathology	–	–	–	–	–
Bone Measurements					
Femur Lengths	–	–	–	–	–
Ex Vivo Bone Densitometry	–	NE	NE	NE	–
Histopathology					
Number Evaluated	M: 20	M: 20	M: 19	M: 19	M: 19
Kidneys					
Basophilia, Tubular	0	0	0	12	19
Minimal	0	0	0	7	1
Mild	0	0	0	5	4
Moderate	0	0	0	0	8
Marked	0	0	0	0	6
Degeneration, Tubular	0	0	0	4	19
Minimal	0	0	0	4	0
Mild	0	0	0	0	9
Moderate	0	0	0	0	9
Marked	0	0	0	0	1

M=male; NE=not examined

†p<0.05, ††p<0.01 (Dunnett's test or Dunn’s test).

– : No noteworthy findings.

a : One animal in the main study group was determined to be a female and was removed from the study.

b : For controls, group mean absolute and relative weights are show. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

Dose (mg/kg)	0 (Control)	15	60	240	1200
Number of Animals	M: 80	M: 80	M: 80	M: 79 [a]	M: 80
Vacuolation, Tubular	0	0	0	10	19
Minimal	0	0	0	5	2
Mild	0	0	0	4	5
Moderate	0	0	0	1	10
Marked	0	0	0	0	2
Hypertrophy, Tubular, Minimal	0	3	4	2	6
Nephropathy, chronic progressive	2	4	4	4	2
Minimal	2	2	2	4	2
Mild	0	2	2	0	0
Thymus					
Depletion, Lymphoid	1	0	0	0	6
Minimal	1	0	0	0	3
Mild	0	0	0	0	3
Injection Site, Tail Vein					
Inflammation, Mixed Cell, Minimal	1	3	8	7	6
Additional Examinations:					
Neuropathology	–	–	–	–	–
Brain Weight	–	–	–	–	–
Gross Brain Length	–	–	–	–	–
Neurohistopathology	–	–	–	–	–
Brain Morphometry	–	–	–	–	–
Anti-Viltolarsen Antibody Analysis	–	–	–	–	–
Postdose Evaluation:					
Number Evaluated	40	40	40	40	40
Body Weight, PND 141 [b] (%)	43.11 g	+2.93	+2.13	+0.63	-1.54
Food Consumption, PND 73-136 [b] (%)	4.7 g/day	+0.0	+2.1	+0.0	+2.1
Neurobehavioral Assessments					

M=male

– : No noteworthy findings.

a : One animal in the main study group was determined to be a female and was removed from the study.

b : For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

（6/6）

Dose (mg/kg)	0 (Control)	15	60	240	1200
Number of Animals	M: 80	M: 80	M: 80	M: 79 [a]	M: 80
Functional Observation Battery					
Tail-Pinch Reaction (Mean Score)	2.4	2.4	2.4	2.5	2.8††
None	0	0	0	0	0
Orienting	26	22	23	21	7**
Startle	14	17	17	18	28**
More Energetic Reaction	0	0	0	0	0
Attacks	0	0	0	0	0
Necropsy					
Number Evaluated	M: 20	M: 20	M: 19	M: 20	M: 18
Organ Weights (%)	–	–	–	–	–
Gross Pathology					
Kidneys					
Abnormal Appearance	0	0	0	0	2
Cyst	0	0	0	0	1
Histopathology					
Number Evaluated	M: 20	NE	M: 19	M: 20	M: 18
Kidneys					
Basophilia, Tubular	0		0	0	14
Minimal	0		0	0	10
Mild	0		0	0	4
Degeneration, Tubular	0		0	3	16
Minimal	0		0	3	7
Mild	0		0	0	8
Moderate	0		0	0	1
Vacuolation, Tubular	0		0	0	14
Minimal	0		0	0	10
Mild	0		0	0	4
Hypertrophy, Tubular, Minimal	2		1	4	5
Nephropathy, chronic progressive	0		2	5	11
Minimal	0		2	5	7
Mild	0		0	0	3
Moderate	0		0	0	1

M=male; NE=not examined

**p<0.01 (Fisher’s exact test); †p<0.05, ††p<0.01 (Dunnett's test or Dunn’s test).

– : No noteworthy findings, a : One animal in the main study group was determined to be a female and was removed from the study.

2.6.7.16 局所刺激試験

被験物質：Viltolarsen

動物種/系統	投与方法[a]（溶媒/投与形態）	投与期間	投与量（mg/kg）	性別及び一群の動物数	特記すべき所見	試験番号（CTD 記載箇所）
サル Cynomolgus	静脈内（生理食塩液）	12 週間	0, 60, 200, 600	M:5	600 mg/kg で投与部位の皮下組織に好中球浸潤、水腫、血管壁への好中球浸潤が認められた。投与部位への変化はいずれも 4 週間の休薬後に回復した。	TX10746（4.2.3.2-3、評価資料）
サル Cynomolgus	静脈内（生理食塩液）	39 週間	0, 10, 60, 360	M:8（10mg/kg は M:5）	特記すべき所見なし	TX10818（4.2.3.2-4、評価資料）
サル Cynomolgus	筋肉内（生理食塩液）	12 週間	0, 100	M:5	投与部位あるいは骨格筋（投与部位近傍の大腿四頭筋）に筋線維の変性/壊死もしくは再生、炎症性細胞浸潤、線維化、筋外膜の水腫、フィブリン滲出、血管周囲の単核細胞浸潤が認められた。投与部位あるいは周囲の骨格筋への変化は、いずれも 4 週間の休薬後に回復傾向が認められた。	TX10747（4.2.3.2-5、評価資料）

M=male

a：週 1 回の間歇投与。

2.6.7.17 その他の毒性試験

2.6.7.17.1 免疫毒性試験

被験物質：Viltolarsen

動物種/系統	投与方法 [a] （溶媒/投与形態）	投与期間	投与量 (mg/kg)	性別及び一群の動物数	特記すべき所見	試験番号 （CTD 記載箇所）
サル Cynomolgus	筋肉内（生理食塩液） 静脈内（生理食塩液）	12 週間	筋肉内： 0, 100 静脈内： 0, 60, 200, 600	M:5	100 mg/kg の筋肉内投与で投与 77 日に雄 5 例中 1 例で抗 Viltolarsen 抗体産生が認められた（試験番号 TX10747 において得られた血清試料）。 200 mg/kg の静脈内投与で投与 29 日に雄 5 例中 1 例で抗 Viltolarsen 抗体産生が認められた（試験番号 TX10746 において得られた血清試料）。	TX10759 （4.2.3.7.2-1、参考資料）

M=male
a：週 1 回の間歇投与。

2.6.7.17.2 不純物の毒性試験

2.6.7.17.2.1 反復投与毒性比較試験（1）

（1/3）

被験物質：Viltolarsen

<table>
<tr><th>動物種/系統</th><th>投与方法 [a]
(溶媒/投与形態)</th><th>投与期間</th><th>投与量 (mg/kg)</th><th>性別及び一群の動物数</th><th>特記すべき所見</th><th>試験番号
（CTD 記載箇所）</th></tr>
<tr><td>Monkey, Cynomolgus</td><td>IV (Saline)</td><td>5 Weeks</td><td>0, 200, 600 [b]</td><td>M:5</td><td>≥200 mg/kg (Lot 57): Very slight deposition of basophilic granules in renal tubular epithelium

≥200 mg/kg (Lot 59): Very slight deposition of basophilic granules in renal tubular epithelium

600 mg/kg (Lot 57): Increased urea nitrogen; very slight epithelial vacuolation in convoluted PT, very slight to slight epithelial vacuolation in straight PT, very slight dilatation of DT

600 mg/kg (Lot 59): Increased urea nitrogen; very slight epithelial vacuolation in convoluted PT, very slight to slight epithelial vacuolation in straight PT, very slight to slight dilatation of DT

Anti-viltolarsen antibodies were not detected at any dose level

Toxicokinetic parameters: Viltolarsen
<table>
<tr><td></td><td></td><td colspan="2">Lot 57</td><td colspan="2">Lot 59</td></tr>
<tr><td>Dose (mg/kg)</td><td></td><td>200</td><td>600</td><td>200</td><td>600</td></tr>
<tr><td>$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)</td><td rowspan="3">Day 0</td><td>715.1</td><td>4151</td><td>903.7</td><td>4670</td></tr>
<tr><td>C_{max} (μg/mL)</td><td>1974</td><td>6822</td><td>2443</td><td>6723</td></tr>
<tr><td>t_{max} (hr)</td><td>0.0</td><td>0.0</td><td>0.0</td><td>0.0</td></tr>
<tr><td>$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)</td><td rowspan="3">Day 28</td><td>909.7</td><td>3796</td><td>1035</td><td>4777</td></tr>
<tr><td>C_{max} (μg/mL)</td><td>2536</td><td>6897</td><td>2319</td><td>7346</td></tr>
<tr><td>t_{max} (hr)</td><td>0.0</td><td>0.0</td><td>0.0</td><td>0.0</td></tr>
<tr><td colspan="6">mean(n=3)</td></tr>
</table>
</td><td>TX10832
（4.2.3.7.6-1、評価資料）</td></tr>
</table>

DT=distal tubule; M=male; PT=proximal tubule

a：Dosing in the repeat-dose study occurred once per week.

b：The toxicity of Lot 57 from the [redacted] ([redacted]) and Lot 59 from the [redacted] ([redacted]) was compared.

（2/3）

動物種/系統	投与方法 [a]（溶媒/投与形態）	投与期間	投与量 (mg/kg)	性別及び一群の動物数	特記すべき所見						試験番号（CTD 記載箇所）
					Concentrations (μg/mL)[b]						
							Lot 57		Lot 59		
					Dose (mg/kg)		200	600	200	600	
					Viltolarsen	Day 0 – EOA	1974	6822	2443	6723	
						15 min	395.9	1543	437.9	2014	
						30 min	216.4	1087	316.1	1223	
						1 hr [c]	145.0	761.5	149.9	876.2	
						Day 28 – EOA	2536	6897	2319	7346	
						15 min	491.9	1691	565.1	1975	
						30 min	299.6	1064	328.5	1286	
						1 hr [c]	163.0	721.6	199.1	898.0	
					Impurity 1 (IM1)	Day 0 – EOA	2560	6784	2490	7298	
						15 min	BLQ	1531	BLQ	2067	
						30 min	BLQ	715.7	BLQ	1340	
						1 hr	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	
						Day 28 – EOA	2644	6998	2594	7064	
						15 min	BLQ	1824	BLQ	2001	
						30 min	BLQ	1192	BLQ	1306	
						1 hr	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	
					Impurity 2 (IM2)	Day 0 – EOA	2487	6522	2993	7734	
						15 min	BLQ	1530	BLQ	2064	
						30 min	BLQ	735.0	BLQ	1269	
						1 hr	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	
						Day 28 – EOA	2547	6799	2648	7254	
						15 min	BLQ	1806	BLQ	2236	
						30 min	BLQ	1232	BLQ	1449	
						1 hr	BLQ	352.3	BLQ	372.3	
					mean(n=3)						

BLQ=below the lower limit of quantification(<1000 μg/mL); EOA=end of administration

a：Dosing in the repeat-dose study occurred once per week.　b：Since there was no standard substance, the relative values of 5 impurities in the 1st (Day 0) and 5th (Day 28) dosing samples were calculated based on the viltolarsen concentration. Exposure was confirmed and there were no clear individual differences between Lot 57 and 59. The concentrations of the impurities were BLQ (<1000 μg/mL) at all sampling times after 1 hour.　c：Where no impurities were detected at the corresponding time points or concentrations, viltolarsen concentration values per time point have been omitted from this table (but are available in the study report).

（3/3）

動物種/系統	投与方法[a]（溶媒/投与形態）	投与期間	投与量 (mg/kg)	性別及び一群の動物数	特記すべき所見						試験番号（CTD 記載箇所）
					Concentrations (μg/mL)[b]						
							Lot 57		Lot 59		
					Dose (mg/kg)		200	600	200	600	
					Impurity 3 (IM3)	Day 0 – EOA	2516	6649	2556	7857	
						15 min	BLQ	1516	BLQ	2189	
						30 min	BLQ	384.0	BLQ	1283	
						1 hr	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	
						Day 28 – EOA	2635	6813	2691	7080	
						15 min	BLQ	1768	BLQ	1992	
						30 min	BLQ	1163	BLQ	1302	
						1 hr	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	
					Impurity 4 (IM4)	Day 0 – EOA	2447	6589	ND	ND	
						15 min	BLQ	838.3	ND	ND	
						30 min	BLQ	BLQ	ND	ND	
						1 hr	BLQ	BLQ	ND	ND	
						Day 28 – EOA	2428	7180	ND	ND	
						15 min	BLQ	1435	ND	ND	
						30 min	BLQ	355.3	ND	ND	
						1 hr	BLQ	BLQ	ND	ND	
					Impurity 5 (IM5)	Day 0 – EOA	2556	6939	2419	7541	
						15 min	BLQ	1581	BLQ	2100	
						30 min	BLQ	363.3	BLQ	1417	
						1 hr	BLQ	BLQ	BLQ	763.0	
						Day 28 – EOA	2734	7268	2709	7217	
						15 min	BLQ	2025	BLQ	2087	
						30 min	BLQ	1339	BLQ	1429	
						1 hr	BLQ	372.3	BLQ	346.7	
					mean(n=3)						

BLQ=below the lower limit of quantification(<1000 μg/mL); EOA=end of administration; ND=not determined (IM4 peak of the lower limit of quantification calibration sample was not detected and a calibration curve was not constructed)

a：Dosing in the repeat-dose study occurred once per week.　b：Since there was no standard substance, the relative values of 5 impurities in the 1st (Day 0) and 5th (Day 28) dosing samples were calculated based on the viltolarsen concentration. Excluding IM4 of Lot 59, exposure was confirmed and there were no clear individual differences between Lot 57 and 59. The concentrations of the impurities were BLQ (<1000 μg/mL) at all sampling times after 1 hour.

2.6.7.17.2.2 反復投与毒性比較試験（2）

（1/4）

被験物質：Viltolarsen

<table>
<tr><th>動物種/系統</th><th>投与方法 [a]
(溶媒/投与形態)</th><th>投与期間</th><th>投与量 (mg/kg)</th><th>性別及び一群の動物数</th><th>特記すべき所見</th><th>試験番号
（CTD 記載箇所）</th></tr>
<tr><td>Monkey, Cynomolgus</td><td>IV (Saline)</td><td>5 Weeks</td><td>0, 200, 600 [b]</td><td>M:5</td><td>≥200 mg/kg (Lot 63): High protein content in urine; very slight deposition of basophilic granules in the tubular epithelia, very slight to slight epithelial vacuolation in straight PT

≥200 mg/kg (Lot 57): High protein content in urine; very slight deposition of basophilic granules in the tubular epithelia, very slight to slight epithelial vacuolation in straight PT

600 mg/kg (Lot 63): Increased urea nitrogen; very slight epithelial vacuolation in convoluted PT, very slight dilatation of DT

600 mg/kg (Lot 57): Increased urea nitrogen, increased kidney size and weight; very slight epithelial vacuolation in convoluted PT, very slight dilatation of DT

Anti-viltolarsen antibodies were not detected at any dose level

Toxicokinetic parameters: Viltolarsen
<table>
<tr><th colspan="2"></th><th colspan="2">Lot 57</th><th colspan="2">Lot 63</th></tr>
<tr><td colspan="2">Dose (mg/kg)</td><td>200</td><td>600</td><td>200</td><td>600</td></tr>
<tr><td>$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)</td><td>Day 0</td><td>1156</td><td>5147</td><td>1092</td><td>4482</td></tr>
<tr><td>C_{max} (μg/mL)</td><td></td><td>2440</td><td>7317</td><td>2460</td><td>6063</td></tr>
<tr><td>t_{max} (hr)</td><td></td><td>0.0</td><td>0.0</td><td>0.0</td><td>0.0</td></tr>
<tr><td>$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)</td><td>Day 28</td><td>1070</td><td>4623</td><td>1018</td><td>4347</td></tr>
<tr><td>C_{max} (μg/mL)</td><td></td><td>2324</td><td>7200</td><td>2348</td><td>7507</td></tr>
<tr><td>t_{max} (hr)</td><td></td><td>0.0</td><td>0.0</td><td>0.0</td><td>0.0</td></tr>
<tr><td colspan="6">mean(n=3)</td></tr>
</table>
</td><td>TX10837
（4.2.3.7.6-2、評価資料）</td></tr>
</table>

DT=distal tubule; M=male; PT=proximal tubule

a：Dosing in the repeat-dose study occurred once per week.

b：The toxicity of Lot 57 from the [redacted] ([redacted]) and Lot 63 from [redacted] ([redacted]) was compared.

（2/4）

動物種/系統	投与方法 [a] (溶媒/投与形態)	投与期間	投与量 (mg/kg)	性別及び一群の動物数	特記すべき所見						試験番号 (CTD 記載箇所)
					Concentrations (μg/mL)[b]						
							Lot 57		Lot 63		
					Dose (mg/kg)		200	600	200	600	
					Viltolarsen	Day 0 – EOA	2440	7317	2460	6063	
						15 min	535.8	1878	587.8	1639	
						30 min	382.4	1201	392.5	1068	
						1 hr [c]	252.3	812.7	228.9	794.4	
						Day 28 – EOA	2324	7200	2348	7507	
						15 min	559.7	1926	571.3	1911	
						30 min	352.1	1135	320.9	1131	
						1 hr [c]	214.9	735.2	198.0	809.7	
					Impurity 1 (IM1)	Day 0 – EOA	2784	8427	2750	7653	
						15 min	362.3	2252	BLQ	2023	
						30 min	BLQ	1548	BLQ	1413	
						1 hr	BLQ	1135	BLQ	738.0	
						Day 28 – EOA	3020	8460	3008	9044	
						15 min	BLQ	2197	BLQ	2225	
						30 min	BLQ	1379	BLQ	1423	
						1 hr	BLQ	366.3	BLQ	358.3	
					mean(n=3)						

BLQ=below the lower limit of quantification; EOA=end of administration

a：Dosing in the repeat-dose study occurred once per week.

b：Since there was no standard substance, the relative values of 5 impurities in the 1st (Day 0) and 5th (Day 28) dosing samples were calculated based on the viltolarsen concentration. The systemic exposures of 5 impurities were confirmed and there were no clear individual differences between Lot 57 and 63. The concentrations of the impurities were BLQ (<1000 μg/mL) at all sampling times after 1 hour.

c：Where no impurities were detected at the corresponding time points or concentrations, viltolarsen concentration values per time point have been omitted from this table (but are available in the study report).

（3/4）

動物種/系統	投与方法[a] (溶媒/投与形態)	投与期間	投与量 (mg/kg)	性別及び一群の動物数	特記すべき所見						試験番号 （CTD 記載箇所）
					Concentrations (μg/mL)[b]						
							Lot 57		Lot 63		
					Dose (mg/kg)		200	600	200	600	
					Impurity 2 (IM2)	Day 0 – EOA	2779	8376	2701	7456	
						15 min	372.7	2254	BLQ	1989	
						30 min	BLQ	1590	BLQ	1398	
						1 hr	BLQ	1142	BLQ	714.7	
						Day 28 – EOA	2968	8286	2854	8807	
						15 min	BLQ	2146	BLQ	2217	
						30 min	BLQ	1383	BLQ	1491	
						1 hr	BLQ	354.3	BLQ	773.7	
					Impurity 3 (IM3)	Day 0 – EOA	2833	8552	2758	7754	
						15 min	356.3	2262	BLQ	2058	
						30 min	BLQ	1553	BLQ	1447	
						1 hr	BLQ	776.3	BLQ	758.0	
						Day 28 – EOA	3069	8540	3049	9036	
						15 min	BLQ	2211	BLQ	2286	
						30 min	BLQ	1384	BLQ	1453	
						1 hr	BLQ	355.7	BLQ	691.3	
					mean(n=3)						

BLQ=below the lower limit of quantification; EOA=end of administration

a：Dosing in the repeat-dose study occurred once per week.

b：Since there was no standard substance, the relative values of 5 impurities in the 1st (Day 0) and 5th (Day 28) dosing samples were calculated based on the viltolarsen concentration. The systemic exposures of 5 impurities were confirmed and there were no clear individual differences between Lot 57 and 63. The concentrations of the impurities were BLQ (<1000 μg/mL) at all sampling times after 1 hour.

（4/4）

動物種/系統	投与方法[a]（溶媒/投与形態）	投与期間	投与量 (mg/kg)	性別及び一群の動物数	特記すべき所見						試験番号（CTD 記載箇所）
					Concentrations (μg/mL)[b]						
							Lot 57		Lot 63		
					Dose (mg/kg)		200	600	200	600	
					Impurity 4 (IM4)	Day 0 – EOA	2860	8443	2935	7775	
						15 min	355.3	2044	BLQ	2057	
						30 min	BLQ	1407	BLQ	1339	
						1 hr	BLQ	345.0	BLQ	BLQ	
						Day 28 – EOA	2918	8525	2849	8799	
						15 min	BLQ	1816	BLQ	2342	
						30 min	BLQ	1112	BLQ	1441	
						1 hr	BLQ	BLQ	BLQ	343.3	
					Impurity 5 (IM5)	Day 0 – EOA	2904	8631	2900	7281	
						15 min	391.3	2241	BLQ	1848	
						30 min	BLQ	1519	BLQ	1218	
						1 hr	BLQ	723.3	BLQ	BLQ	
						Day 28 – EOA	3180	8654	3037	9357	
						15 min	BLQ	2250	BLQ	2414	
						30 min	BLQ	1369	BLQ	1410	
						1 hr	BLQ	355.3	BLQ	423.0	
					mean(n=3)						

BLQ=below the lower limit of quantification; EOA=end of administration

a：Dosing in the repeat-dose study occurred once per week.

b：Since there was no standard substance, the relative values of 5 impurities in the 1st (Day 0) and 5th (Day 28) dosing samples were calculated based on the viltolarsen concentration. The systemic exposures of 5 impurities were confirmed and there were no clear individual differences between Lot 57 and 63. The concentrations of the impurities were BLQ (<1000 μg/mL) at all sampling times after 1 hour.

2.6.7.17.2.3 細菌を用いる復帰突然変異試験（2）

報告書の題名：A Bacterial Reverse Mutation Test of NS-065 (NDK-65) – (2)

被験物質：Viltolarsen

試験の種類：	Reverse mutations	独立して実施した試験数：	1	試験番号：	TX10828
菌株：	S. typhimurium (TA100, TA1535, TA98, TA1537); E. coli WP2*uvrA*	プレート数：	3	CTD における記載箇所：	4.2.3.7.6-3
代謝活性化系：	Liver S9 fraction from male rats administered phenobarbital and 5,6-benzoflavone			GLP 適用：	Yes
溶媒：	For Test Article: Saline, For Positive Controls: Water or Dimethyl sulfoxide			処理年月：	[redacted], [redacted]
処理：	Pre-incubation				
細胞毒性：	None				
遺伝毒性：	None				

（1/2）

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (μg/plate)	Number of Revertant Colonies (Mean)				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
Without Activation	Saline	0	114	8	26	22	6
	Viltolarsen	156	109	8	25	21	5
		313	110	7	26	19	4
		625	115	8	23	22	3
		1250	114	8	27	15	6
		2500	111	9	25	14	5
		5000	103	8	25	17	4
	AF-2	0.01	529	–	–	–	–
		0.02	–	–	635	–	–
		0.1	–	–	–	496	–
	SA	0.5	–	358	–	–	–
	9AA	80	–	–	–	–	501

AF-2=2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; 9AA=9-aminoacridine hydrochloride hydrate; SA=sodium azide

（2/2）

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (μg/plate)	Number of Revertant Colonies (Mean)				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
With Activation	Saline	0	121	8	27	28	12
	Viltolarsen	156	114	7	27	26	10
		313	110	7	23	24	7
		625	102	9	24	25	9
		1250	119	10	26	20	7
		2500	115	7	24	22	7
		5000	118	6	26	25	12
	2AA	0.5	–	–	–	441	–
		1	687	–	–	–	–
		2	–	212	–	–	161
		10	–	–	324	–	–

2AA=2-aminoanthracene

2.6.7.17.2.4 細菌を用いる復帰突然変異試験（3）

報告書の題名：A Bacterial Reverse Mutation Test of NS-065//NCNP-01 (NDK-65) – (3)

被験物質：Viltolarsen

試験の種類：	Reverse mutations	独立して実施した試験数：	1	試験番号：	TX10838
菌株：	S. typhimurium (TA100, TA1535, TA98, TA1537); E. coli WP2*uvrA*	プレート数：	3	CTD における記載箇所：	4.2.3.7.6-4
代謝活性化系：	Liver S9 fraction from male rats administered phenobarbital and 5,6-benzoflavone			GLP 適用：	Yes
溶媒：	For Test Article: Saline, For Positive Controls: Water or Dimethyl sulfoxide			処理年月：	[redacted], [redacted]
処理：	Pre-incubation				
細胞毒性：	None				
遺伝毒性：	None				

（1/2）

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (μg/plate)	Number of Revertant Colonies (Mean)				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
Without Activation	Saline	0	102	9	28	26	6
	Viltolarsen	156	111	6	32	18	6
		313	114	8	33	19	5
		625	106	12	39	18	4
		1250	110	9	29	19	4
		2500	103	7	27	18	3
		5000	106	7	35	19	4
	AF-2	0.01	457	–	–	–	–
		0.02	–	–	708	–	–
		0.1	–	–	–	509	–
	SA	0.5	–	266	–	–	–
	9AA	80	–	–	–	–	404

AF-2=2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; 9AA=9-aminoacridine hydrochloride hydrate; SA=sodium azide

（2/2）

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (μg/plate)	Number of Revertant Colonies (Mean)				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
With Activation	Saline	0	117	10	28	29	10
	Viltolarsen	156	105	10	32	29	9
		313	108	7	34	32	10
		625	109	12	30	32	5
		1250	109	8	25	28	8
		2500	105	10	29	29	7
		5000	103	9	27	28	9
	2AA	0.5	–	–	–	443	–
		1	677	–	–	–	–
		2	–	187	–	–	162
		10	–	–	239	–	–

2AA=2-aminoanthracene

2.6.7.17.2.5 ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験（2）

報告書の題名：A Chromosomal Aberration Test of NS-065 (NDK-65) in Cultured Mammalian Cells – (2)

被験物質：Viltolarsen

試験の種類：	Chromosomal aberrations	独立して実施した試験数：	1	試験番号：	TX10829
細胞株：	CHL/IU Cells	プレート数：	2	CTD における記載箇所：	4.2.3.7.6-5
代謝活性化系：	Liver S9 fraction from male rats administered phenobarbital and 5,6-benzoflavone	分析細胞数：	200	GLP 適用：	Yes
溶媒：	For Test Article: Saline, For Positive Controls: Water or Saline			処理年月：	[redacted], [redacted]
処理：	Continuous treatment without S9 for 24 hours; pulse treatment for 6 hours and continued incubation for 18 hours with and without S9				
細胞毒性：	None				
遺伝毒性：	None				

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (μg/mL)	Incubation Time (hr)	Cell Proliferation Ratio (%)	Cells with Structural Aberrations (%)	Cells with Numerical Aberrations (%)
Without Activation	Saline	0	6	100	0.0	1.0
	Viltolarsen	1250	6	103.6	0.0	0.0
		2500	6	101.0	0.0	0.0
		5000	6	104.6	0.0	0.5
	MMC	0.15	6	45.1	41.0	0.5
	Saline	0	24	100	0.0	0.5
	Viltolarsen	1250	24	102.1	0.0	1.0
		2500	24	101.6	1.0	0.5
		5000	24	96.7	0.5	0.0
	MMC	0.05	24	73.9	22.5	0.0
With Activation	Saline	0	6	100	0.0	0.0
	Viltolarsen	1250	6	102.2	0.0	0.5
		2500	6	101.8	0.5	1.0
		5000	6	95.0	0.0	1.0
	CP	10	6	59.0	15.0	0.0

CP=cyclophosphamide monohydrate; MMC=mitomycin C

2.6.7.17.2.6 ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験（3）

報告書の題名：A Chromosomal Aberration Test of NS-065/NCNP-01 (NDK-65) in Cultured Mammalian Cells – (3)

被験物質：Viltolarsen

試験の種類：	Chromosomal aberrations	独立して実施した試験数：	1	試験番号：	TX10839
細胞株：	CHL/IU Cells	プレート数：	2	CTD における記載箇所：	4.2.3.7.6-6
代謝活性化系：	Liver S9 fraction from male rats administered phenobarbital and 5,6-benzoflavone	分析細胞数：	200	GLP 適用：	Yes
溶媒：	For Test Article: Saline, For Positive Controls: Water or Saline			処理年月：	[redacted], [redacted]
処理：	Continuous treatment without S9 for 24 hours; pulse treatment for 6 hours and continued incubation for 18 hours with and without S9				
細胞毒性：	None				
遺伝毒性：	None				

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (μg/mL)	Incubation Time (hr)	Cell Proliferation Ratio (%)	Cells with Structural Aberrations (%)	Cells with Numerical Aberrations (%)
Without Activation	Saline	0	6	100	0.0	0.5
	Viltolarsen	1250	6	99.2	0.0	1.0
		2500	6	103.1	0.5	0.5
		5000	6	99.2	0.0	0.5
	MMC	0.15	6	76.7	51.0	0.0
	Saline	0	24	100	0.0	0.5
	Viltolarsen	1250	24	105.7	0.0	0.5
		2500	24	93.9	0.0	0.5
		5000	24	102.9	0.0	1.0
	MMC	0.05	24	86.6	26.0	0.5
With Activation	Saline	0	6	100	0.5	0.5
	Viltolarsen	1250	6	103.0	0.5	0.5
		2500	6	102.2	0.5	0.0
		5000	6	90.4	0.0	0.0
	CP	10	6	81.7	26.5	1.0

CP=cyclophosphamide monohydrate; MMC=mitomycin C

2.6.7.18 参考文献

なし。