

アキラルックス点滴静注 250 mg

第 2 部（モジュール 2）CTD の概要（サマリー）

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.6 毒性試験の概要文

楽天メディカルジャパン株式会社

目次

2.6.6 毒性試験の概要文.....	3
1. まとめ.....	3
2. 単回投与毒性	5
2.1 SD 雄ラットにおける IR 700 カルボン酸体の薬物動態及び忍容性評価 ..	5
2.2 SD ラットにおける IR 700-CO ₂ の単回静脈内投与毒性試験及び 2 週間回復性試験	7
2.3 カニクイザルにおける RM-1929 の単回投与毒性試験及び薬物動態試験	10
2.4 カニクイザルにおける RM-1929 の単回静脈内持続投与毒性試験及びトキシコキネティクス試験	11
3. 反復投与毒性試験.....	13
4. 遺伝毒性.....	14
4.1 IR 700-CO ₂ の細菌を用いる復帰突然変異試験.....	14
4.2 ヒト末梢血培養リンパ球を用いる <i>IN VITRO</i> 小核試験	15
4.3 IR 700-CO ₂ の SD ラットへの静脈内（急速）投与による <i>IN VIVO</i> 遺伝毒性試験.....	16
5. がん原性.....	18
6. 生殖発生毒性	18
6.1 ERBITUX の生殖発生毒性試験	19
6.1.1 胚への影響	19
7. 局所刺激性	20
8. その他の毒性試験.....	20
8.1 ASP-1929 をカニクイザルに単回で静脈内持続投与した後の光による励起状態にした場合の非腫瘍性変化の検討	20
8.2 添加物の安全性評価	22
9. 考察及び結論	23
10. 参考文献.....	25

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6 毒性試験の概要文

1. まとめ

セツキシマブ サロタロカンナトリウム（遺伝子組換え）（ASP-1929/RM-1929、以下本薬）は、モノクローナル抗体のセツキシマブと非熱性赤色蛍光色素の IRDye®700DX NHS エステル（以下 IR 700）とのタンパク共有結合複合体である。遊離色素 IR 700 は、リジン残基のようなアミノ酸の脂肪族第一アミンと反応し、安定したアミド共有結合体を形成する N-ヒドロキシスクシンイミドエステルとして得られる。RM-1929 は ASP-1929 と同じくセツキシマブと IR 700 の複合体であるが、XXXXXXXXXX 社ではなく XXXXXX 社が製造するセツキシマブを用いて製造されたものである。RM-1929 と ASP-1929 の同等性は、物理化学的試験で確立しており、ASP-1929 を用いた試験は繰り返し実施していない。

ASP-1929 の最終製剤（ロット番号 XXXXXXXXXX）及びサル GLP 適用毒性試験で使用した製剤（ロット番号 XXXXXXXXXX）は、抗体に対する色素の比率（DAR）値として両者とも同一の 2.9 を示した。アミド結合は安定であるが、血漿中に存在するアミダーゼにより色素が IR 700 遊離カルボン酸体として本薬の抗体から遊離する可能性がある。この遊離カルボン酸体は色素の完全な化学的中心部を含有する。本薬は無菌注射用溶液として供給される。セツキシマブと同様に、本薬は上皮成長因子受容体（EGFR）に特異的に結合する。EGFR を過剰発現しているがん細胞は本薬に結合して、光照射で薬剤が励起する際の選択的な標的とされるため、本薬を用いた治療はがん特異的である。

ヒトとカニクイザルの EGFR は 99% のアミノ酸配列相同性があることから、RM-1929 の非臨床安全性評価にカニクイザルを選択した（プロテインブラスト、ヒト ACN No.: P00533 ; アミノ酸鎖長 1210 ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/P00533.2>; サル ACN No.: EHH17303 ; アミノ酸鎖長 1181 ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/EHH17303.1>）。これと比較して、ヒトとラットの EGFR は 89% のアミノ酸配列相同性がある（プロテインブラスト、ラット ACN No. : AAF14008; アミノ酸鎖長 1209 ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAF14008.1>）。加えて、RM-1929 はヒトとサルの EGFR に高親和性で結合し、サブナノモルのレベルでセツキシマブに匹敵する解離定数（ K_d ）を示した（Module 2.6.2 参照）。重要なことは、ヒト以外では非ヒト霊長類はセツキシマブと交差反応を示す唯一の動物種ということである¹⁾。したがって、カニクイザルは、RM-1929 の安全性評価に用いる最も適切な動物種として選択した。

ASP-1929 の光毒性はカニクイザルを用いて検討した。

全ての主要な毒性試験は GLP に準拠して実施した。RM-1929 の開発は、医薬品規制調和国際会議（ICH）及び関連するガイダンスにも準じて行った。In vitro 遺伝毒性試験と

2.6.6 毒性試験の概要文

して、細菌を用いる復帰突然変異試験、ヒト末梢血培養リンパ球を用いる小核試験及び *in vivo* 小核試験を実施し、IR 700-CO₂ の変異原性を検討した。ラット及びカニクイザルにおける単回投与毒性試験（GLP 適用、GLP 非適用）は、提案された臨床試験を支持するために実施しており、RM-1929 又は ASP-1929 の臨床投与経路である 2 時間静脈内持続投与で実施した。

RM-1929 及び ASP-1929 の非臨床毒性試験リストを表 1 に示した。

毒性試験概要表は Module 2.6.7 に示した。

表 1：非臨床毒性試験リスト

Study Title	Testing Facility	GLP	Study Number CRO/Aspyrian	Status
Pharmacokinetic Evaluation of Carboxylate IRDye 700DX in Male Sprague Dawley Rats	Explora Biolabs	No	EB10-039-016C/MC13b-0228	Final
Study of Carboxylate IRDye 700DX by Intravenous Injection in Sprague Dawley Rats with a 2-Week Recovery Period	Charles River Laboratories	Yes	20065734/ASPY-0927A	Final
General Single-Dose Toxicity and Pharmacokinetic Study of Cetuximab-IRDye 700DX in Cynomolgus Monkeys	Xenometrics	No	11108	Final
A Single Dose Toxicology and Toxicokinetic Study of RM-1929 Administered by Intravenous Infusion to Cynomolgus Monkeys ¹	Xenometrics	Yes	11286	Audited Draft
IR700-DX-CO ₂ Bacterial Reverse Mutation Assay	Charles River Laboratories	Yes	01302001	Final
IRDYE 700 DX-CO ₂ <i>In Vitro</i> Micronucleus Assay in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes	Charles River Laboratories	Yes	01302002	Final
An <i>In Vivo</i> Micronucleus Assay of IR700-DX-CO ₂ by Intravenous (Bolus) Injection in Sprague Dawley Rats	Charles River Laboratories	Yes	01302003	Final
A Single Dose Intravenous Infusion Study to Determine Non-Tumor Effects of the Combination Treatment of ASP-1929 with Light Activation in Cynomolgus Monkeys	Charles River Laboratories (formerly Citoxlab)	Yes	1119-5883	Final

2.6.6 毒性試験の概要文

¹ Includes biodistribution study evaluating the tissue distribution of RM-1929 administered to cynomolgus monkeys; this component of the study was non-GLP. GLP = Good Laboratory Practices; CRO = Contract Research Organization

2. 単回投与毒性

2.1 SD 雄ラットにおける IR 700 カルボン酸体の薬物動態及び忍容性評価

IR 700 のカルボン酸体 (IR 700-CO₂) を SD ラットに単回投与する予備試験を GLP 非適用下で実施し、薬物動態 (PK) 及び忍容性を評価した。IR 700-CO₂ は、*in vivo* で非特異的なプロテアーゼによる切断により放出される色素の遊離体であり、実質的に色素及びリンカーの全ての化学的中核を含有する (試験番号 [EB10-039-016C/MC13B-0228](#))。本試験では、IR 700-CO₂ を 2.6、7.8 及び 26 mg/kg の用量で雄性ラットに単回静脈内投与した。尿は投与後 3 時間に採取し、PK 解析のために種々のタイムポイントに採血した。試験デザインを [表 2](#) に示す。RM-1929 の製剤は、抗体 1 分子に対して 2.9 分子の IR 700 を含有し、これは RM-1929 の 1 g 当たり約 33 mg の結合色素に相当する。この抗体に対する IR 700 の比率に基づき、IR 700-CO₂ の低用量 (2.6 mg/kg) は、RM-1929 79 mg/kg の用量における IR 700 の相当量、IR 700-CO₂ の高用量 (26 mg/kg) は、RM-1929 788 mg/kg の用量における IR 700 の相当量に匹敵する。したがって、本試験で投与された IR 700 の全用量は、臨床試験で患者が曝露された IR 700 の最大量をはるかに超えている。本試験では、一般状態観察、臨床病理学的検査、剖検所見、並びに肝臓及び腎臓の光顕検査などの多くの安全性評価パラメータを検討した。全動物を投与後 72 時間に安楽死させた。

表 2：ラットにおける単回投与薬物動態試験及び忍容性試験

Group No.	IR 700-CO ₂ (mg/kg) ¹	No. Males ²	Dose of RM-1929 Equivalent to the Same Amount of Dye Dosed in Rats (mg/kg)
0	Vehicle (PBS)	2	NA
1	2.6	6	79
2	7.8	6	236
3	26	6	788

¹ The dose volume for all groups was 4.0 mL/kg

² All animals were terminated 72 hours post-dose

PBS = phosphate buffered saline; NA = not applicable

IR 700-CO₂ を単回投与した結果、全用量で雄ラットの忍容性は良好であり、毒性徴候及び途中死亡は認められなかった。IR 700-CO₂ の投与終了後 10 分以内に、中・高用量群 (7.8 及び 26 mg/kg 群) の全動物で四肢、耳及びその他の被毛の少ない皮膚が事実上で中等度 (中用量) から重度 (高用量) の青緑色又は灰色を呈した (この色調の変化は 2.6 mg/kg 群のいずれの動物でも観察されなかった)。皮膚の青緑色の変色は、薄緑又は

2.6.6 毒性試験の概要文

黄色の IR 700-CO₂ が急速に全身に分布したことに関連があると考えられた。皮膚の色調に変化がみられた全ての動物は試験終了時まで（試験開始前の）正常な色調に戻り、毒性徴候がいずれの動物にも観察されなかったことから、一過性の皮膚変色（青緑色）は毒性と考えられなかった。投与後 2・3 時間に尿及び便の緑色も全用量群の全動物に観察され、着色の程度は、低用量で軽度、中用量で中等度、高用量で重度であった。尿及び便の緑色は、投与後 24 時間以内あるいは試験終了時までには観察されなかったことから、この着色は一過性であり、毒性とは考えられなかった。IR 700-CO₂ が薄緑から青色の色調を有するため、尿及び便の緑色は色素のそれぞれ尿中及び胆汁排泄に関連している可能性があった。

全体として、3 日目の血液学的検査及び血液生化学的検査において投与前値との比較、あるいは IR 700-CO₂ 投与群（第 1、2 及び 3 群）と溶媒対照群（第 0 群）との間で顕著な変化はみられなかった。腎臓及び肝臓の病理組織学的所見として、腎臓の尿細管変性及び集合管の円柱、並びに肝細胞の水腫性変性及び肝臓の胆管過形成が観察されたが、これらの所見は実質的に軽微ないし軽度であり、溶媒対照群（第 0 群）を含む全群に認められた。しかし、腎臓及び肝臓に観察されたこれらの病理組織学的所見は若齢ラットにみられた典型的な所見と一致しており、留置カテーテルとの関連がみられた。加えて、溶媒対照群の 2 例にこれらの所見が認められており、腎臓及び肝臓の所見の程度に対照群と IR 700-CO₂ 投与群の動物との間で明らかな違いは観察されなかった。したがって、腎臓及び肝臓でのこれらの病理所見は、IR 700-CO₂ の投与に直接起因する所見とは考えられなかった。

PK 解析より、IR 700-CO₂ の血清中濃度は投与後に急速に減少し、半減期（T_{1/2}）は短く 1.5 時間以下であった。AUC_{inf} は用量に比例して増加した。定常状態における分布容積は 0.253～0.273 L/kg であり、全身クリアランス（CL）は 0.178～0.196 L/h/kg であった。IR 700-CO₂ は全用量（2.6、7.8 及び 26 mg/kg）で尿中に検出され、用量増加に伴い尿中排泄量が増加した（表 3）。

表 3：IR 700-CO₂ を雄ラットに単回投与したときの尿中濃度の平均

	Control (vehicle)	Group 1 (2.6 mg/kg)	Group 2 (7.8 mg/kg)	Group 3 (26 mg/kg)
Urine Concentration (µg/mL)	0	323.40	659.17	1978.60

要約すると、遊離色素（IR 700-CO₂）を 26 mg/kg までの用量で雄ラットに単回静脈内投与した結果、忍容性は臨床的に良好であり、色素に直接関連すると考えられる毒性所見はみられなかった。灰色又は青緑色がかった皮膚の変色は一過性であり、毒性とは考えられなかった。尿及び糞便の緑色はこの色素の色調（緑色）に関連した可能性があっ

2.6.6 毒性試験の概要文

た。この変化は一過性であり、投与後 24 時間までにはもはや観察されず、毒性とは考えられなかった。

2.2 SD ラットにおける IR 700-CO₂ の単回静脈内投与毒性試験及び 2 週間回復性試験

本試験（GLP 適用試験）では、SD 雌雄ラットに IR 700 のカルボン酸体（IR 700-CO₂）として投与した際の遊離色素の毒性及びトキシコキネティクスを評価した（試験番号 20065734/ASPY-0927A）。本試験では、IR 700-CO₂ を 0（PBS；溶媒対照）、10、30 又は 100 mg/kg の用量でラットに静脈内急速投与し、2 週間の休薬期間を設定した。予定された臨床試験で IR 700-CO₂ の最高用量における曝露量の数倍が得られるように高用量（100 mg/kg）を選択した。全動物の一般状態観察、体重測定、摂餌量（定性的判定）、臨床病理学的パラメータ（血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査）、器官重量測定、剖検所見及び病理組織学的検査を実施し、変化を評価した。加えて、動物の皮膚を毎日観察し、投与に関連した皮膚刺激性のいずれの徴候も評価した（動物を飼育ケージから取り出し、動物室内光にさらされる剃毛皮膚の観察）。さらに、光照射の皮膚への影響を評価するため、動物室の光強度も測光露出計で測定した。光測定（ルクスレベル）はケージラックの左右の垂直位置（ケージラックの最上位及び最下位）で 1、3 及び 15 日目に実施した（測定値は試験報告書に記載）。主試験用動物は 3 日目で安楽死させ、回復性試験及びトキシコキネティクス（TK）用のサテライト動物は 15 日目に安楽死させた。試験デザインは表 4 に示すとおりである。

表 4：IR 700-CO₂ の単回投与毒性試験

Group No.	Test Material	Dose Level (mg/kg) ¹	No. of Animals ²			
			Main Study Termination Day 3		Recovery Study Termination Day 15	
			Males	Females	Males	Females
1	Control	0	5	5	5	5
2	IR 700 Carboxylate	10	5	5	5	5
3		30	5	5	5	5
4		100	5	5	5	5
No. of Animals						
Toxicokinetics			Male		Female	
5	Control	0	3		3	
6	IR 700 Carboxylate	10	8		8	
7		30	8		8	
8		100	8		8	

¹ Dose volume = 10 mL/kg

² Main Study animals were euthanized on Day 3; recovery and TK animals were euthanized on Day 15.

高用量群（100 mg/kg 群）の 3 例（雄 2 例、雌 1 例）が 1 日目（投与後約 1.5 時間）及び 2 日目に死亡した。3 例のうち雌雄各 1 例は主試験用動物であり、残り雄 1 例は TK 用サテライト動物であった。主試験用死亡例（1 例は 1 日目、他 1 例は 2 日目に死亡発見）

2.6.6 毒性試験の概要文

の一般状態の変化として、活動性低下、非協調運動、全身皮膚及び尾の青／緑色、青白い耳が観察された。これらの動物の皮膚の青色変色は組織学的変化を伴わず、死亡の原因（いずれの動物も投与後の臨床病理学的パラメータのデータなし）となるような剖検所見及び病理組織学的変化は観察されなかった。TK 用の雄 1 例（1 日目に死亡発見）には歩行異常、活動性低下、非協調性運動が観察された（この動物の安全性に関するその他のデータなし）。回復性試験用の高用量群の雌 1 例は活動性低下、冷感及び全身皮膚の青色変色のような一般状態の変化のため、2 日目に安楽死させた。この動物の安楽死直前に、ストレスや瀕死状態を示唆する臨床病理学的パラメータ（好中球数、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ [AST]、アラニンアミノトランスフェラーゼ [ALT]、総ビリルビン、クレアチンキナーゼ、尿素窒素などの増加、リンパ球数及び好酸球数の減少）に変化が認められたが、早期の安楽死に至る一般状態の悪化の原因を特定できるような剖検所見や病理組織学的所見は認められなかった。高用量群の動物に途中死亡や一般状態の変化が観察されたが、IR 700 の 100 mg/kg は、計画された臨床試験で遊離色素に曝露される患者の高用量をはるかに超えている。実際に、ラット及びサルの GLP 試験（詳細は Module 2.6.4 に記載）で測定した遊離色素の曝露データに基づき、ラットにおける IR 700 の高用量 100 mg/kg で血清中 AUC は、サルにおける高用量 80 mg/kg での曝露量の 2,000 倍以上高く、また、IR 700 の患者における推定最大曝露量の 6,800 倍以上であった。

その他の全ての動物は、15 日目の試験終了時まで生存した。青緑色の皮膚及び青色の尿は全処置群の動物に観察され、活動性低下及び非協調性運動は高用量群（100 mg/kg 群）の動物に認められた。低用量群（10 mg/kg 群）の全動物における皮膚の青／緑色の変色は 15 日目までに回復し、中及び高用量群の動物では部分的な回復がみられた。その他の一般状態の変化（100 mg/kg 群における活動性低下、非協調性運動）は完全に回復した。重要なことは、本薬の皮膚への影響を示唆するエビデンスは、一般状態観察、剖検所見及び病理組織学的検査ではいずれの動物にも認められなかったことである。

臨床病理学的パラメータの本薬投与に関連する変化として、3 日目の 100 mg/kg 群の ALT 及び AST の上昇が認められた（投与前値の 2.4～3.5 倍）。ALT 及び AST の値は共に、15 日目までに投与前値あるいは投与前値付近まで戻り、これらの上昇は可逆的であったことが示唆された。3 日目に剖検した主試験の投与群動物にみられた剖検所見として、腎臓、投与部位及び／又は全身皮膚の青色が観察された。青色／緑色の変色は青緑色調の IR 700-CO₂ の分布に関連しているが、剖検時に青色変色がみられたいずれの部位／組織にも病理組織学的所見との関連はみられなかった。高用量群の主試験用動物の病理組織学的変化として、軽度から重度のハーダー腺の炎症及び壊死（雄 3/4 例、雌 2/4 例）、軽微から軽度の褐色脂肪組織の変性（雄 2/4 例、雌 1/4 例）、並びに中等度の肺静

2.6.6 毒性試験の概要文

脈炎症（雄 3/4 例、雌 1/4 例）が観察された。加えて、高用量群の雄 3/4 例に軽微ないし軽度の眼球後方筋肉の炎症及び変性、高用量群の雌 2/4 例で軽度の副腎の壊死及び組織構造の損失を補うエオシン好性細胞残屑、並びに高用量群の雄 2/4 例のみに軽微ないし軽度の心筋の炎症及び変性が観察された。回復性試験動物（15 日目）にみられた病理所見として、雄 3/5 例で腺好塩基性及び軽微な線維化を特徴とするハーダー腺の中等度の再生のみが認められ、主試験動物に観察されたハーダー腺の変化からの回復性が示唆された。回復性試験動物にその他の病理組織学的変化が観察されなかったため、本薬投与に関連した病理所見は可逆的であったことが示された。

TK 解析より、10 mg/kg と 100 mg/kg の間では IR700-CO₂ の曝露量（AUC_{0-t}）は概して用量に比例した増加が認められたが、同一投与量間の最高血清中濃度（C_{max}）は用量比以下の増加であった。IR700-CO₂ の血清中濃度は、最高値到達後 1.30～1.70 時間の T_{1/2} では双指数関数的に減少し、CL は 117～169 mL/h/kg、分布容積は 283～356 mL/kg であった。C_{max} 及び AUC_{0-t} に性差はみられなかった。TK 結果は Module 2.6.4 に詳細に記載した。

要約すると、IR700-CO₂ を 100 mg/kg の用量でラットに単回静脈内急速投与した結果、4 例の途中死亡がみられたが（3 例死亡、1 例切迫屠殺）、高用量群の動物 4 例の死因又は早期安楽死の理由は病理組織学的に特定されなかった。薬物投与に関連した変化として、蒼白、青緑色の皮膚及び青色尿が観察されたが、15 日目までに部分的又は完全に正常に回復した。一般状態の変化として、活動性低下及び非協調性運動が高用量群の動物に観察されたが、回復性試験動物には認められず、完全に回復したことが示唆された。臨床病理学的変化として ALT 及び AST 上昇のみが認められたが、15 日目までに回復した。高用量群（100 mg/kg 群）の動物のみに観察された病理組織学的変化は、ハーダー腺の炎症及び壊死、眼球後方筋肉の炎症及び変性、褐色脂肪組織の変性、肺静脈炎症及び心筋の炎症及び変性であった。回復性試験動物に観察された病理組織学的変化（15 日目）はハーダー腺の再生のみであり、この変化は回復過程又はほぼ回復状態であったと考えられたため、本薬投与に関連した全ての病理組織学的変化は可逆的又は回復傾向であったと判断した。これらの結果より、無毒性量（NOAEL）は中間用量（30 mg/kg）と考えられた。高用量群の動物に途中死亡及び本薬投与に関連する毒性が認められたが、100 mg/kg の用量は、計画した臨床試験で患者に曝露される IR 700 の用量をはるかに超えている。実際に、ラットの 100 mg/kg での AUC は、計画した臨床試験における RM-1929 の初回用量 12.4 mg/kg（1.73 m² の体表面積からの推定用量の 500 mg/m² に相当）での推定最大曝露量より 6,800 倍高いと推測される。したがって、ラットに認められた途中死亡及び毒性変化は、患者の初回用量における IR 700 の推定最大曝露量よりもはるかに高い曝露量で認められた。

2.6.6 毒性試験の概要文

2.3 カニクイザルにおける RM-1929 の単回投与毒性試験及び薬物動態試験

GLP 非適用下で実施した予備試験では、カニクイザルに RM-1929（試験報告書では Cetuximab-IR700 と記載）を単回で 1.8 時間静脈内持続投与したときの PK 及び毒性を評価した（試験番号 11108）。試験デザインを表 5 に示す。試験では、雄カニクイザルにリン酸緩衝生理食塩液（PBS）（溶媒対照）又は RM-1929 を投与量 32 mg/kg（投与液の分析結果より実際の投与量は 35 mg/kg であった）で投与した。遊離色素の血液中の存在形態に合わせるため、投与前に 4.1%遊離色素（IR 700）を RM-1929 の最終投与量に加え、RM-1929 における遊離色素（カルボン酸体）の毒性を評価した。加えて、比較対照群としてセツキシマブを投与量 32 mg/kg で単回投与し、RM-1929 の毒性プロファイルをセツキシマブと比較検討した。

表 5：雄カニクイザルにおける RM-1929 の単回投与毒性試験

Group No.	Test Article	Dose (mg/kg)	No. of Males	Dose Volume (mL/kg/h)	Termination
1	Vehicle Control (PBS)	0	2	8.9	Day 9
2	Cetuximab	32	2	8.9	Day 9
3	RM-1929	32 (35) ^{1,2}	2	7.2	Day 9

¹ Dose in parenthesis indicates the actual dose administered based on the results of the dose formulation analysis completed after dose administration

² RM-1929 used in the study contained about 4% of free dye (carboxylate) that was added to the sample prior to dose administration so any potential toxicity of free dye (carboxylate) in RM-1929 could be evaluated.

薬物投与群については、セツキシマブを 250 mg/m² の維持用量で週 1 回投与したときのヒト曝露量と比較した相対的な推定曝露量に基づき、投与量を選択した。セツキシマブを 250 mg/m² の用量で患者に単回投与したときの平均曝露量（AUC_{inf}）は 11,812 µg·h/mL であり、セツキシマブを 24 mg/kg の用量でカニクイザルに投与したときの AUC_{last} は 61,113 µg·h/mL であり、250 mg/m² でのヒト曝露量よりも 5.2 倍高い¹⁾。そのため、250 mg/m² のセツキシマブ投与で得られたヒト曝露量よりも 6 倍高い RM-1929 のセツキシマブ部分の推定曝露量（AUC）を得るため、セツキシマブの参考データに基づき、RM-1929 の投与量は 32 mg/kg を設定した。試験に使用した被験物質 RM-1929 は、重量パーセントベースで RM-1929 の中の色素 3.0%に相当する、DAR の平均が 2.7 であった。したがって、RM-1929 32 mg/kg の用量は、抗体に結合する色素（IR 700）の用量として 0.96 mg/kg を含むことになる。

全動物の一般状態の変化及び神経学的影響に関する症状（例：立毛、不随意運動、常同運動）、体重・摂餌量及び臨床病理パラメータ（例：血液学的検査、凝固系検査、血液生化学的検査）について評価した。全動物の検査・観察を 9 日目に終了し、剖検を完全に実施した。特定の器官重量を測定し、病理組織学的検査のために組織切片を作製し

2.6.6 毒性試験の概要文

た（肝臓、腎臓、心臓、脾臓、大腸、眼球及び視神経、並びに胸部及び内股の皮膚）。総セツキシマブ（酵素結合免疫吸着測定法〔ELISA 法〕で遊離セツキシマブ量及び RM-1929 量を測定）、総 RM-1929（サイズ排除高速液体クロマトグラフィー〔HPLC-SEC〕で測定）、並びに遊離色素（逆相高速液体クロマトグラフィー〔HPLC-RP〕で IR 700 の測定）の PK 解析のために、投与後数時点で血液を採取した。

全動物は試験終了時まで生存した。投与に関連した一般状態の変化として投与後 1 時間まで薄緑色尿のみが認められたが、これは RM-1929 に加えられた遊離色素（IR 700）の尿中排泄に関連したことから、毒性変化とは考えられなかった。RM-1929 又はセツキシマブ投与群において、体重、摂餌量、臨床病理、剖検所見、器官重量及び病理組織学的検査などの評価パラメータに投与に関連すると考えられる変化はみられなかった。

要約すると、RM-1929 を 35 mg/kg の用量でカニクイザルに単回投与した結果、良好な忍容性が認められた。投与に関連した一般状態の変化として、投与後 1 時間まで薄緑色の尿のみが観察されたが、RM-1929 に加えられた遊離色素（IR 700）の尿中排泄に関連したことから、毒性とみなさなかった。加えて、RM-1929 又はセツキシマブ投与群に、投与に関連するその他の所見は認められなかった。

2.4 カニクイザルにおける RM-1929 の単回静脈内持続投与毒性試験及びトキシコキネティクス試験

GLP 適用下で実施した本試験では、カニクイザルに RM-1929 を単回で静脈内に 2 時間持続投与したときの毒性及び TK を評価した（試験番号 [11286](#)）。本試験における RM-1929 の DAR は 2.9 であった。本試験では、雌雄カニクイザルに PBS（溶媒対照）あるいは RM-1929 を投与量 40 又は 80 mg/kg で単回投与した。投与量 80 mg/kg は、カニクイザルに静脈内持続投与する際に試験施設の動物実験委員会（IACUC）で許容された最大液量（8 mL/kg/h）に基づき設定された投与可能な最高用量である。その他の群にはセツキシマブを 16 mg/kg の用量で単回投与し、RM-1929 の毒性プロファイルを（非結合）セツキシマブと比較した。主試験用動物は投与後 15 日目に剖検し、回復性試験用動物（溶媒対照群及び RM-1929 80 mg/kg 群のみ）は 28 日目に剖検した。標準的な毒性及び PK の評価項目に加えて、RM-1929 の生体内分布を評価するための GLP 非適用部分を含めた（Module 2.6.4 参照）。試験デザインを [表 6](#) に示す。

2.6.6 毒性試験の概要文

表 6：カニクイザルにおける単回投与毒性試験

Group No.	Treatment	Dose (mg/kg)	Approximate Infusion Rate (mL/kg/h)	Animals/Sex Terminated Day 3	Animals/Sex Terminated Day 15	Animals/Sex Terminated Day 28
1	Vehicle Control (PBS)	0	8	— ¹	3M/3F	2M/2F
2	RM-1929	40	4	2M/2F ²	3M/3F	— ¹
3	RM-1929	80	8	— ¹	3M/3F ³	2M/2F
4	Cetuximab Alone	16	4	— ¹	3M/3F ³	— ¹

¹ Dash indicates no animals in this group.

² Two animal/sex in Group 2 were designated for biodistribution analysis only and terminated on Day 3 (no safety endpoints were collected from these animals).

³ Two animals/sex in each Groups 3 and 4 terminated on Day 15 had tissue samples collected for biodistribution analysis and histopathological evaluation. The remaining animals/sex in each group had only tissues for histopathological evaluation taken.

3 日目に剖検した第 2 群の動物を除く全例については、一般状態観察、体重及び摂餌量測定、眼科学検査、臨床病理学的パラメータ（血液学的検査、凝固系検査、血液生化学的検査、尿検査）、器官重量、剖検所見及び病理組織学的検査で変化を評価した。3 日目に安楽死させた第 2 群の動物を除く全例の動物の皮膚を観察し、試験期間中に皮膚刺激性の症状をモニターした。動物前肢の遠位内側約 5 インチの皮膚パッチを観察し（皮膚は必要に応じて剃毛を繰り返した）、皮膚刺激性の徴候（例：紅斑、乾燥又はひび割れた皮膚、膿疱）を記録した。加えて、蛍光灯への曝露の影響を評価するため、動物が飼育されている動物室の中央で、薬物を投与した動物が収容されている上部及び下部ケージの光強度について校正付き照度計でルクス値を測定した。動物室の明暗サイクルは、蛍光灯の明期が 12 時間、暗期が 12 時間であった。

本試験に安全性薬理の検査項目を組み込み、呼吸機能（呼吸数）、心血管系機能（心電図検査：ECG）、中枢神経系機能への影響を示唆する一般状態の観察（例：動物の行動、運動などをケージ周辺で観察）を行った。試験期間中に動物から採血し、総セツキシマブ（ELISA 法による遊離セツキシマブ及び RM-1929 測定）、総 RM-1929（HPLC-SEC による測定）、並びに遊離 IR 700（HPLC-SEC による測定）の TK 解析を実施した。セツキシマブを 16 mg/kg で投与した動物からサンプルを採取し、ELISA 法で測定した。

RM-1929 を単回投与した結果、忍容性は良好であり、全動物が剖検予定時まで生存した。皮膚の観察（一般状態観察、剖検所見、病理組織学的検査）を含むいずれの観察・検査でも投与に関連した変化は認められなかった。心臓の絶対及び相対重量の高値は 15 日目に剖検した RM-1929 の高用量群の雌でのみ認められたが（溶媒対照群と比較してそれぞれ 25%及び 15%の高値）、低用量群（40 mg/kg 群）の雌雄及び高用量群の雄、28 日目に剖検した回復性試験群の動物については、心臓の絶対及び相対重量が溶媒対照群と

2.6.6 毒性試験の概要文

同等であった。セツキシマブ投与群の雌でも心臓の絶対及び相対重量の高値が認められたが（溶媒対照群と比較してそれぞれ 11%及び 10%の高値）、同群の雄ではみられなかった。心臓の絶対及び相対重量の高値は高用量群の雌でのみ認められたが、回復性試験の動物ではみられず、関連する病理組織学的所見及び心電図検査に基づく心血管系機能にいずれの動物にも影響がみられなかったことから、心臓の絶対及び相対重量の変化は、RM-1929 又はセツキシマブの単回投与による直接的な影響というよりも偶発的影響の可能性があった。

TK 解析及び生体内分布は Module 2.6.4 に詳述した。

要約すると、RM-1929 を雌雄カニクイザルに単回投与した結果、80 mg/kg の用量まで良好な忍容性が認められた。加えて、RM-1929 とセツキシマブ群の間で投与に関連した影響に差異はみられなかった。重要なことは、いずれの動物にも皮膚毒性は観察されず、RM-1929 投与とセツキシマブ投与との間で皮膚の変化に違いがみられなかったことである。RM-1929 の 80 mg/kg 及びセツキシマブの 16 mg/kg を投与した雌に心臓の絶対及び相対重量の高値が観察されたが、この変化は偶発的であり、RM-1929 及びセツキシマブ投与に関連する直接的な影響ではなかった。関連する病理組織学的変化が認められなかったことから、心臓重量の高値は毒性と考えられなかった。RM-1929 とセツキシマブとの間で投与に関連した影響に違いはみられなかった。したがって、投与に関連すると考えられる毒性変化がなかったことから、本試験における NOAEL は 80 mg/kg であった。

3. 反復投与毒性試験

本剤の臨床投与スケジュールは 1 回投与であり、ヒト及び動物での PK プロファイルより蓄積性のないことが示唆されており（Module 2.6.4 参照）、ヒトの安全性を担保するためには、非臨床毒性試験の投与期間は単回でも毒性予測が可能と考えられる。抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン（ICH S9 ガイドライン、薬食審査発 0604 第 1 号 [平成 22 年 6 月 4 日]）によると、臨床投与スケジュールが 3～4 週間に 1 回投与の抗悪性腫瘍薬の場合、非臨床投与期間は 1 回投与で初回臨床試験を実施できることが示されており、承認申請時でも反復投与毒性試験が必要とは考えられない。このような理由より、本剤の反復投与毒性試験は実施していない。

4. 遺伝毒性

4.1 IR 700-CO₂の細菌を用いる復帰突然変異試験

復帰突然変異試験において IR 700-CO₂（ロット番号 ████████）の変異原性を検討した（試験番号 01302001）。変異原性試験では4つのネズミチフス菌株（TA1537、TA98、TA100 及び TA1535）並びに1つの大腸菌株（WP2 *uvrA*）を使用した。変異原性試験及び用量設定試験には Ca/Mg を含まないダルベッコ・PBS に溶解した濃度 12.5 mg/mL の IR 700-CO₂ 溶液、確認試験には濃度 1.25 mg/mL の IR 700-CO₂ 溶液をストック用として使用した。変異原性試験は、Aroclor™ 1254 で誘導したラット肝臓の S9 代謝活性化系の存在下及び非存在下で各用量 3 回実施した。

用量設定試験では、TA100 及び WP2 *uvrA* の菌株を用いたプレート法により、IR 700-CO₂ の 1.0、5.0、10、50、100、500、1000 及び 5000 µg/plate の用量で 1 回実施した。同一用量のプレートに約 37,000 ルクスの光を 30 分間照射した群も追加した。光による励起（患者が光に一日中曝露した条件を想定し、LED 照明を 30 分間照射した場合に 5000 K の色温度から約 37,000 ルクスの光照射）に関わりなく、代謝活性化系存在下及び非存在下で沈殿物は認められなかった。光による励起状態でない場合、いずれの菌株でも細胞毒性（例：Background lawn 及び／又は復帰変異平均コロニー数の減少）は観察されなかった。光曝露による励起状態の場合、WP2 *uvrA* の代謝活性化系非存在下で 50 µg/plate 以上の用量及び代謝活性化系存在下で 100 µg/plate 以上の用量、TA100 の代謝活性化系存在下及び非存在下における 500 µg/plate 以上の用量で細胞毒性が観察された。

光による励起状態でない場合の変異原性試験は、IR 700-CO₂ の 100、250、500、1000、2500 及び 5000 µg/plate の用量でプレート法により実施した。代謝活性化系存在下及び非存在下のいずれの菌株でも沈殿物又は細胞毒性は認められなかった。陰性結果の判定基準は、代謝活性化系存在下及び非存在下の全ての試験菌株で陰性結果が得られた場合とした。

光による励起状態での変異原性試験は、IR 700-CO₂ の 2.5、5.0、10、25、50、100、250 及び 500 µg/plate の用量でプレート法により実施した。代謝活性化系存在下及び非存在下のいずれの菌株でも沈殿物は認められなかった。細胞毒性は、代謝活性化系存在下で試験菌株 TA1537 の 25 µg/plate 以上の用量、代謝活性化系非存在下で試験菌株 TA1537 及び TA100 の 50 µg/plate 以上の用量、代謝活性化系存在下及び非存在下で試験菌株 WP2 *uvrA* の 50 µg/plate 以上の用量、代謝活性化系非存在下で試験菌株 TA1535 及び TA98 の 100 µg/plate 以上、代謝活性化系存在下で試験菌株 TA98 の 250 µg/plate 以上の用量、並びに代謝活性化系存在下で試験菌株 TA100 及び TA1535 の 500 µg/plate の用量でも観察された。光に曝露された溶媒対照の復帰変異コロニー数は、光に曝露されない溶媒対照の復

2.6.6 毒性試験の概要文

帰変異コロニー数と同等であった。しかし、代謝活性化系存在下で試験菌株 TA100 の溶媒対照プレートのうち 2 プレートには試験菌株が添加されなかったため、再度処置を行った。光による励起状態での試験菌株 TA100 の確認試験では、沈殿物は観察されなかったが、50 µg/plate 以上の用量で細胞毒性が認められた。観察された細胞毒性（光による励起状態と共に被験物質に曝露されたときの Background lawn 及び／又は復帰変異平均コロニー数の減少）により、曝露に限界があることが示された。

いずれの処理でも被験物質曝露による復帰変異コロニー数の平均は、溶媒対照と比較して増加しなかった。陰性結果の判定基準は、光曝露及び非曝露の条件で代謝活性化系存在下及び非存在下の全ての試験菌株に陰性結果が得られた場合とした。

溶媒対照群及び陽性対照群のデータより、代謝活性化系存在下及び非存在下で化学物質の変異原性を検出する本試験系の妥当性と感度が適切であることが示された。

以上のデータより、本試験条件下において IR 700-CO₂ は代謝活性化系存在下及び非存在下でネズミチフス菌株 TA1537、TA98、TA100 及び TA1535、並びに大腸菌株 WP2 *uvrA* に変異原性を示さないとの結論に至った。

4.2 ヒト末梢血培養リンパ球を用いる *in vitro* 小核試験

IR 700-CO₂ (ロット番号 XXXXXXXXXX) を外来性代謝活性化系存在下及び非存在下でヒト末梢血リンパ球と短時間（4 時間）及び長時間（24 時間）インキュベートしたときの小核誘発性について検討した（試験番号 01302002）。Ca/Mg を含まないダルベッコ・PBS に溶解した濃度 12.5 mg/mL の IR 700-CO₂ 溶液をストック用として使用した。ヒト末梢血リンパ球を Aroclor™ 1254 で誘導したラット肝臓の S9 代謝活性化系の存在下及び非存在下で、被験物質、陽性対照物質又は溶媒対照と処置した。培地中のジメチルスルホキシド濃度は 1% (v/v) であった。用量設定試験における IR 700-CO₂ の濃度は、0.977～500 µg/mL であり、最高濃度は ICH ガイダンスに推奨されていた。各処置条件下で培地 1 セットに対して約 37,000 ルクスの光を 30 分間照射した群も追加した。光による励起の有無に関わらず（患者が光に一日中曝露した条件を想定し、LED 照明を 30 分間照射した場合に 5000 K の色温度から約 37,000 ルクスの光照射）、いずれの処置でも被験物質の最終処置で沈殿物は観察されなかった。用量設定試験での観察に基づき、小核試験で使われた標的濃度は、各処理で 62.5～500 µg/mL の濃度範囲であった。

光による励起の有無に関わらず、代謝活性化系の存在下及び非存在下でいずれの処置でも細胞毒性及び沈殿物は観察されなかった。したがって、小核の評価には、試験された 3 つの高濃度の 125、256 及び 500 µg/mL (ICH ガイダンスで推奨されている最高濃度) が選択された。各処置条件での溶媒（光による励起の有無の両条件）又は 1 濃度での陽性対照（光による励起なし）を添加して培養した場合での、小核誘発性の有無につ

2.6.6 毒性試験の概要文

いて解析した。小核は、実施可能であれば各濃度当たり 2000 個の 2 核細胞を観察して評価した。

いずれの試験条件下でも、被験物質で処置された培養液と溶媒対照の培養液の間で小核を有する細胞数（パーセント）に統計学的有意な上昇は認められなかった。溶媒対照群及び陽性対照群の結果より、代謝活性化系存在下及び非存在下で染色体異常誘発原及び染色体数的異常誘発原を検出する試験系の妥当性と感度が証明された。

本試験条件下において、IR 700-CO₂ は代謝活性化系の存在下及び非存在下でヒト末梢血リンパ球に小核を誘発しないと考えられた。

4.3 IR 700-CO₂ の SD ラットへの静脈内（急速）投与による *in vivo* 遺伝毒性試験

IR 700-CO₂ をラットに 2 日間静脈内（急速緩徐）投与し、ラット骨髄中の多染性赤血球に小核を誘発する遺伝毒性について評価した。小核試験（評価試験）の投与条件を決めるために用量設定試験を最初に実施した（試験番号 01302003）。以前に実施したラットの GLP 適用毒性試験（2.2 項参照、試験番号 20065734/ASPY-0927A）では、100 mg/kg の用量で毒性が発現して死亡がみられたため、用量設定試験では IR 700-CO₂ の投与量を 20、40 及び 80 mg/kg に設定した。

表 7：試験デザインー用量設定試験ー

Group Number	Test Material	Dose Level (mg/kg/day)	Dose Volume ¹ (mL/kg)	Dose Concentration (mg/mL)	Number of Doses	Number of Animals ²	
						Males	Females
1	IR 700-CO ₂	20	5	4	2 (Days 1 and 2)	3	3
2	IR 700-CO ₂	40	5	8	2 (Days 1 and 2)	3	3
3	IR 700-CO ₂	80	5	16	2 (Days 1 and 2)	3	3

¹ No correction factor was used.

² Surviving animals were euthanized at approximately 18–24 hours following the last dose via carbon dioxide inhalation and discarded without necropsy.

表 8：試験デザインー評価試験ー主試験動物ー

Group Number	Test Material	Dose Level (mg/kg/day)	Dose Volume ¹ (mL/kg)	Dose Concentration (mg/mL)	Number of Doses	Number of Animals ^{2,3}	
						Males	Females
4	Vehicle	0	5	0	2 (Days 1 and 2)	6	6
5	IR 700-CO ₂	20	5	4	2 (Days 1 and 2)	6	6
6	IR 700-CO ₂	40	5	8	2 (Days 1 and 2)	6	6
7	IR 700-CO ₂	80	5	16	2 (Days 1 and 2)	6	6
8	Positive Control ⁴	-	-	-	-	-	-

2.6.6 毒性試験の概要文

- ¹ No correction factor was used.
- ² Surviving animals were euthanized at approximately 18–24 hours following the last dose via carbon dioxide inhalation for bone marrow collection.
- ³ The first 5 surviving animals were utilized for bone marrow collection. The sixth animal was euthanized via carbon dioxide inhalation without bone marrow collection and discarded.
- ⁴ Positive control article reference slides, obtained from a separate experiment with cyclophosphamide monohydrate administered once approximately 24 hours prior to harvest, were included in the slide set to verify scorer proficiency¹⁷⁾.

表 9：試験デザインー評価試験ーTK 試験動物ー

Group Number	Test Material	Dose Level (mg/kg/day)	Dose Volume ¹ (mL/kg)	Dose Concentration (mg/mL)	Number of Animals ²	
					Males	Females
4	Vehicle	0	5	0	2	2
5	IR 700-CO ₂	20	5	4	2	2
6	IR 700-CO ₂	40	5	8	2	2
7	IR 700-CO ₂	80	5	16	2	2

¹ No correction factor was used.

² Toxicokinetic animals were dosed on Day 1 only and then euthanized after the final blood collection.

用量設定試験（表 7）及び評価試験（表 8）では、1 日目及び 2 日目に動物に静脈内（急速緩徐）投与したが、TK 試験動物には 1 日目のみ投与した。

試験では次のパラメータ又はエンドポイントで評価した：一般状態観察、体重、体重増加量、摂餌量、TK 測定（評価試験のみ）及び小核検査（評価試験のみ）

用量設定試験では、全動物が安楽死予定日まで生存した。IR 700-CO₂ の 20 mg/kg 投与群の雄、並びに 40 及び 80 mg/kg 投与群の雌雄動物の体の様々な部分及び／又は体表面の組織に緑色の変色が認められた。被験物質は緑色色素であるため、着色がみられたということは色素が組織にかなり蓄積していたことが示唆された。体重及び摂餌量に被験物質に関連する注目すべき変化は認められなかった。

最初に実施した用量設定試験に基づき、雌雄ラットにおける小核試験（評価試験）における高用量を 80 mg/kg に選択した。骨髓穿刺液を採取し、多染性赤血球での IR 700-CO₂ の小核誘発性を検討した。評価試験では TK 評価群を追加した（表 9）。

評価試験では、80 mg/kg/day 投与群の雌 1 例が死亡した。この動物は投与前の保定中に死亡したため、被験物質に関連したものとは考えられず、偶発的であった。それ以外の動物は安楽死予定日まで生存した。被験物質に関連した摂餌量の変化はみられなかった。被験物質投与群の雌雄動物の体の様々な部分及び／又は体表面の組織に緑色の変色が認められた。40 及び 80 mg/kg 投与群の雌雄で尿の変色（緑色）が観察された。被験物質に関連する体重の明らかな変動はみられなかった。

2.6.6 毒性試験の概要文

小核試験では、第4～7群のそれぞれ初めの5例の骨髄を最終投与後18～24時間に採取した。骨髄懸濁液の一滴をスライドに滴下し塗抹標本を作製して、小核の出現を解析した。同時に1視野を連続的に鏡検し、動物当たり赤血球数（総赤血球数；正染性赤血球数+多染性赤血球数）が合計500個になるまで、多染性赤血球数及び正染性赤血球数を各視野で同時に集計した。正染性赤血球は暗緑色又は灰緑色に染色される細胞質の無核細胞として見える。多染性赤血球も無核細胞であるが、概して正染性赤血球よりも大きく、細胞質が明るい橙色に染色される。多染性赤血球数と正染性赤血球数の総数を記録し、総赤血球数に対する多染性赤血球数を求めた。小核出現を確認するため、可能であれば、動物当たり少なくとも4000個の多染性赤血球数を数え、小核を有する多染性赤血球数のパーセント（%MN-PCEs）を求めた。IR 700-CO₂の小核誘発性を評価した結果、IR 700-CO₂は溶媒対照と比較して、いずれの用量群の雌雄でも、%MN-PCEsの統計学的有意な用量依存的上昇を示さなかった。いずれの用量でも雌雄ラットの骨髄に細胞毒性（総赤血球数に対する多染性赤血球の減少）は認められなかった。溶媒及び陽性対照群における小核を有する多染性赤血球数及び総赤血球数に対する多染性赤血球数の群平均値は、試験施設のCharles River Skokieにおける背景データの95%信頼区間の範囲内であり、アッセイの許容性が証明された。

結論として、CrI:CD(SD)ラットにIR 700-CO₂を20、40及び80 mg/kgの用量で1日1回2日間、急速緩徐投与した結果、当該試験条件下で染色体異常誘発性や分裂装置の崩壊が観察されず、全用量群で骨髄小核の誘発性は認められなかった。

5. がん原性

RM-1929のがん原性試験は実施していない。ICH S9ガイドラインに従い、がん原性試験は承認申請のために必要とされない。

6. 生殖発生毒性

RM-1929及びASP-1929の生殖発生毒性試験は実施していない。しかし、GLP適用毒性試験で雌雄の生殖器の病理組織学的検査を実施しており（Module 2.4；試験番号11286）、雌雄の生殖器に投与に関する変化は観察されなかった。対象患者集団が進行がん患者の場合、ASP-1929の登録に生殖発生毒性試験は計画されない。しかし、RM-1929の催奇形性は、実験動物でたとえあったとしても知られていないので、RM-1929は妊婦に投与すべきでない。妊娠回避のため、本剤の添付文書には妊娠可能な女性及び妊娠させる可能性のある男性には適切な注意喚起をする予定である。

本薬を構成する抗体であるセツキシマブ（商品名アービタックス®注射液 100 mg）は生殖発生毒性試験が実施されており、試験成績が開示されているので以下に記載する。な

2.6.6 毒性試験の概要文

お、生殖発生毒性試験での投与は RM-1929 及び ASP-1929 とは異なっている。すなわち、生殖発生毒性試験では、セツキシマブを週 1 回で 5 回まで投与した。これに対し、ASP-1929 の投与は 4 週毎 1 回以下である。

6.1 Erbitux の生殖発生毒性試験

6.1.1 胚への影響

セツキシマブの生殖発生毒性の胎児発生への影響に関する試験（アービタックス®注射液 100 mg 2008 年 7 月 16 日承認 CTD 4.2.3.5.2-1）では、セツキシマブ（PBS に溶解）を 12/7.5、38/24 及び 120/75 mg/kg の用量で妊娠カニクイザルに妊娠 20、27、34、41 及び 48 日に静脈内持続投与した。セツキシマブ投与による母動物の毒性徴候は、皮膚及び眼瞼の変化、体重増加抑制、摂餌量減少、下痢、並びに行動変化であった。本試験で影響のみられた主要な毒性標的器官は皮膚であり、皮膚への影響は時間及び用量依存的な変化であった。

しかし、全ての母動物は週 1 回で 5 回投与、及び引き続き 52 日までのウォッシュアウト期間まで生存した。母動物の一般毒性に対する NOAEL は 12/7.5 mg/kg 未満、受胎能に対する NOAEL は 12/7.5 mg/kg と推定された。

セツキシマブ投与に関連した唯一の胚・胎児毒性は、中・高投与量群で用量相関的な流産の増加であった（対照群で 18.2%、低投与量群で 13.5%、中投与量群で 27.3%、高投与量群で 31.8%）。流産の増加は統計学的有意ではなかったが、胎盤に EGFR が高密度に存在しており、セツキシマブはサルの胎盤上皮（アービタックス®注射液 100 mg 2008 年 7 月 16 日承認 CTD 2.4.2.6、4.2.1.1-3、4.2.1.1-6、4.2.1.1-13）及び胚に特異的かつ強固に結合する。胎児発生及び子宮内発育における EGFR の役割は明らかにされている^{2),3),4),5),6),7)}。生存胎児は正常であった。胚・胎児に対する NOAEL は 12/7.5 mg/kg と推定された。

IgG 抗体は能動的に胎盤を通過し⁸⁾、セツキシマブのような IgG1 型抗体は胎盤関門を通過すると考えられる。羊水及び胎児血清での曝露データは限定的であったが、受胎産物における意味のあるセツキシマブ濃度が測定された（母動物の曝露量の 15%まで）。

セツキシマブ抗体の陽性検出率は、低投与量群で 26.7%、中投与量群で 36.4%、及び高投与量群で 40.0%であり、毒性及びトキシコキネティクスへの影響はないことが示された。

サルの 39 週間反復投与毒性試験（アービタックス®注射液 100 mg 2008 年 7 月 16 日承認 CTD 4.2.3.2-3）では、精子検査、テストステロン測定及び発情周期のような生殖機能

2.6.6 毒性試験の概要文

検査結果が得られた。セツキシマブを投与した雌で対照群の動物と比較して不規則な月経周期、無月経の発現頻度上昇が認められたが、発情周期の異常傾向のみであり、生殖毒性に対する明らかな懸念は認められなかった。

セツキシマブがヒト乳汁中に分泌されるかどうかは不明である。一般に、免疫グロブリンの母親から子供への移行は、抗体を産生する全ての動物種で起こることが知られている。サルでは免疫グロブリンの胎児循環血液への移行は、IgG アイソタイプの胎盤通過にほぼ限定されるが、正常なヒト乳汁中にも低濃度の IgG が検出される^{9), 10)}。

IgG の経口摂取後に牛の IgG がヒト乳汁中に存在することから、異種動物の IgG はヒト乳汁中に分泌されることが示唆される¹¹⁾。したがって、セツキシマブが乳汁移行する可能性は、胎盤通過と同様に否定できない。

また、ヒト化 IgG1 モノクローナル抗体のトラスツズマブは妊娠カニクイザルの胎盤を通過し、授乳中のサルの乳汁中に分泌することが示されている¹²⁾。

したがって、セツキシマブは妊娠の可能性のある女性に投与すべきでないか、又はセツキシマブ投与が避けられない場合は適切な避妊処置を行い投与すべきであることが推奨される。もし母親の投薬による利益が胎児へのリスクを上回ると考えられない場合は、妊婦にセツキシマブを投与すべきでなく、あるいはセツキシマブの投与中及び最終投与後 2 ヶ月間は授乳すべきでない。セツキシマブを成熟前の動物に投与したデータはない。

7. 局所刺激性

単独の局所刺激性試験は実施していないが、バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価（ICH S6(R1)ガイドライン、薬食審査発 0323 第 1 号〔平成 24 年 3 月 23 日〕）に準じて、RM-1929 の局所刺激性評価は（例：投与部位の一般状態観察、肉眼病理及び組織切片の病理組織学的検査）GLP 適用毒性試験の一部として行った（2.2 項及び 2.4 項参照）。その結果、RM-1929 を投与した動物には投与部位に投与に関連した影響は認められなかった。

8. その他の毒性試験

8.1 ASP-1929 をカニクイザルに単回で静脈内持続投与した後の光による励起状態にした場合の非腫瘍性変化の検討

本試験は、ASP-1929 をカニクイザルに 120 分間静脈内持続投与を 1 回行った後に毒性及び TK プロファイルを検討するために実施した（試験番号 1119-5883）。投与初日を

2.6.6 毒性試験の概要文

Day 1 とし、投与後 24 時間目に光線曝露を行い、線量を測定した。用いたレーザー光源は、現在実施中の ASP-1929-301 試験に使用しているものと同じモデル（Omicron Lasera: PIT690.4-2500）であり、690 nm における放射照度出力は 150 mW/cm² である。動物試験は Day 29 に生検のために皮膚を採取して終了した。

雄カニクイザル（実験に使用前例あり）4 例を試験に使用した。被験物質は 120 分間かけて 1 回投与した。

表 10：試験デザイン

Dose Day	n	Route of Administration	Test Substance Administered	Dose Volume (mL/kg)	Nominal Concentration (mg/mL)	Nominal Dose (mg/kg)
1	4	IV Infusion	ASP-1929	8	5	40

観察及び検査項目として、TK、臨床徴候の観察、光線量測定、動物の生死観察、切迫屠殺の確認、体重、摂餌量、眼科検査、血清生化学的検査、血液学的検査、凝固系検査、尿検査、及び皮膚生検の病理組織学的検査を実施した。TK サンプルは Day 1 から採取を開始し、投与前、投与 5 分、2、6、24、48、72、168 及び 192 時間後に採取した。全時点の血漿サンプルを分析して ASP-1929 濃度を求めた。

全ての動物が計画した最終観察及びサンプル採取まで生存した。

体重、摂餌量、眼科学的検査、尿検査、凝固系検査に被験物質に関連した影響はみられなかった。血液学的検査（好酸球数、好中球数、好塩基球数、リンパ球数、白血球数及び単球数）並びに臨床病理学的検査（AST、クレアチンキナーゼ、グロブリン及び A/G 比）に軽微から中等度の変化が認められたが、これらは背景データの範囲内又は背景データに比較的近い値であったため、毒性とみなさなかった。

IR 700 の濃度は測定可能なレベルではなかった。ASP-1929 については、曝露量（AUCs）、CL 及び T_{1/2} は、試験番号 11286 での TK 評価に全て匹敵したデータであった。例えば、ASP-1929 を 40 mg/kg で静脈内投与したときの曝露量は両試験で同様な曝露量であった。

皮膚で生検したいずれの部位も肉眼的に病変は認められなかった（光線曝露部位及び光線非曝露部位）。光線曝露された皮膚の生検部位での ASP-1929 に関連した病理組織学的変化として、光に曝露されたサル 1 例の生検部位に認められた痂皮と一致している可能性のある軽度な表皮の過形成と共に、表皮及び／又は毛包上皮の軽微な単細胞壊死が観察された。

2.6.6 毒性試験の概要文

以上をまとめると、ASP-1929 を 40 mg/kg の用量で雄カニクイザルに単回投与（120 分間静脈内持続投与）したところ、全身毒性は認められなかった。

8.2 添加物の安全性評価

トレハロース水和物は RM-1929 の製剤に含まれる添加物であり、RM-1929 の臨床推奨用量（640 mg/m²）におけるトレハロース水和物（1 回投与量：317 mg/kg [19,008 mg/day]）は医薬品添加物としての使用前例（トレハロース水和物の 1 日最大使用量：3.6 mg/kg；216 mg/day）を上回るため、新添加物に該当することから安全性評価を行った。

トレハロース水和物の毒性試験として、マウス及びラットの単回投与毒性試験^{13),14)}、マウスの 2 週間投与毒性試験¹⁵⁾、カニクイザルの 26 週間投与毒性試験、遺伝毒性試験^{13),14)}（復帰突然変異試験、染色体異常試験及び小核試験）、カニクイザルの胚・胎児発生並びに出生前及び出生後の発生（ePPND）に関する試験が実施されている。

単回投与毒性試験における概略の致死量は 1000 mg/kg を超えており、遺伝毒性試験の結果は陰性であった。トレハロース水和物の静脈内反復投与毒性試験では、投与可能な最大量を高用量として 1000 mg/kg までマウスに 2 週間連日投与した結果、全身性の毒性は認められなかった。カニクイザルを用いた 26 週間静脈内投与試験ではトレハロース水和物として 181.6 mg/kg の用量で週 1 回、26 週間まで投与されたが、死亡例はみられず、一般症状、体重、摂餌量、臨床検査、剖検所見、病理組織学的検査に投与に関連した毒性は認められなかった。また、雌雄生殖器及び生殖パラメータに影響は認められなかった。トレハロース水和物を 181.6 mg/kg の用量で週 1 回、妊娠 20 日から出産までカニクイザルに投与した ePPND 試験において、胚・胎児発生、出産、出生後の生存、出生児の成長及び発達に影響は認められなかった。

一方、トレハロースを眼咽頭筋ジストロフィー患者に高用量（30,000 mg/day）で反復投与した臨床試験では¹⁶⁾、血漿中グルコース濃度の僅かな上昇、及び尿糖が短期間に検出されたが、トレハロース投与に関連した有害事象は認められず、高用量のトレハロースをヒトに投与しても安全であると考えられた。

これらの結果及び静脈内投与においてはトレハロース水和物の生体内での蓄積性が低いと予想されることに基づいて考察すると、臨床において、トレハロース水和物を 19,008 mg/day の用量で静脈内投与した時の安全性に問題はないと考えられた。

9. 考察及び結論

RM-1929 は現時点では頭頸部癌（HNC）の治療薬として評価されている。一連の毒性試験は提案されている臨床試験で RM-1929 の投与をサポートするために実施した

（Module 2.5 参照）。実施した試験は、RM-1929 又は遊離色素（IR 700-CO₂）のカニクイザル又はラットにおける GLP 適用・非適用下での単回投与毒性試験であった。

遊離色素（IR 700-CO₂）を評価したラットの試験では、IR 700-CO₂を単回急速投与した結果、高用量群（GLP 非適用試験では 26 mg/kg、GLP 適用試験では 100 mg/kg）の数例で途中死亡又は早期に安楽死させた。これらの動物の死因又は早期安楽死の理由は組織学的に特定されなかったが、途中死亡は高用量群でのみ認められた。両試験における投与に関連する変化として、皮膚、尿及び便の一過性の青緑色がみられ、この変色は青緑色の色素に関連する変化と考えられた。皮膚の青緑色は肉眼病理所見又は病理組織学的所見との関連がみられず、試験終了までに部分的又は完全に回復したことから、皮膚の青緑色は毒性と考えられなかった。尿及び便の青緑色も一過性の変化であり、色素の尿中又は胆汁排泄の可能性が高かった。GLP 適用試験では、臨床病理学的変化及び病理組織学的変化は高用量（100 mg/kg）でのみ認められた。臨床病理学的変化として ALT 及び AST の一過性上昇がみられ、病理組織学的変化としてハーダー腺の炎症及び壊死、眼球後部筋肉の炎症及び変性、褐色脂肪組織の変性、肺静脈炎症及び心筋の炎症及び変性が認められた。重要なことは、観察された全ての組織学的所見は可逆的であったということである。GLP 非適用試験における高用量群（100 mg/kg 群）の数例に途中死亡及び投与に関連した毒性が観察されたが、ラットの試験における 100 mg/kg の用量は、臨床試験で患者が曝露される IR 700 の用量レベルをはるかに超えていた。事実、ラットの 100 mg/kg における IR 700 カルボン酸体（IR 700-CO₂）の AUC は、臨床試験で RM-1929 の初回用量 15 mg/kg（600 mg/m²）における遊離色素の推定曝露量の 6,800 倍高かった。したがって、ラットで毒性が認められる曝露量と比較すると、患者における遊離 IR 700 の推定曝露量は無視できる程度であった。

カニクイザルの試験では、RM-1929 を単回で 1.8 又は 2 時間かけて静脈内持続投与した結果、忍容性は良好であり、いずれの試験でも途中死亡は認められなかった。重要なことは、一般状態観察、肉眼的病理検査及び病理組織学的検査において皮膚毒性がみられず、遊離色素がセツキシマブによる皮膚毒性を悪化しないことが示唆された。GLP 非適用試験における投与に関連する変化は、薄緑色尿が投与後 1 時間まで観察されたのみであり、緑色尿は RM-1929 投与で意図的に加えた遊離色素の排泄に関連しており、毒性変化とは考えられなかった。GLP 適用試験で投与に関連すると考えられる毒性はなかった。したがって、本試験における NOAEL は最高用量の 80 mg/kg と考えられた。抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン（ICH S9 ガイドライン、薬食審査発 0604 第 1

2.6.6 毒性試験の概要文

号〔平成 22 年 6 月 4 日〕）に従い、がん患者への初回用量は、非げっ歯類を用いる毒性試験で重篤な毒性が発現しない最大投与量（HNSTD）の 1/6 量に基づき設定した。しかし、サルの GLP 適用試験では投与に関連すると考えられる毒性は認められなかったことから、80 mg/kg の最高用量が NOAEL かつ HNSTD であると考えられた。それにも関わらず、ICH S9 に従い、80 mg/kg の用量（HNSTD よりもむしろ NOAEL）の 1/6 量は 13.3 mg/kg（体重 70 kg で体表面積 1.73 m² のヒト用量は 538 mg/m²）になるので、この用量を臨床試験の初回投与量とした。

用量漸増による単回投与第 I 相臨床試験では、RM-1929 により腫瘍組織の標的受容体（EGFR）を飽和し治療効果が得られる初回投与量として 12.4 mg/kg（500 mg/m²）を提案した。アロメトリックスケーリングの使用及びサルに RM-1929 を 80 mg/kg で投与したときの CL からヒトの CL の推定により（Module 2.6.4.9 参照）、ヒト曝露量は 12,180 µg·h/mL と推定した。RM-1929 のこの曝露量は、ヒトの EGFR を飽和させると報告されているセツキシマブの曝露量（例：ヒトにおけるセツキシマブの 250 mg/m² の用量）に相当すると予期されることから、ヒト組織（例：腫瘍組織）の EGFR を完全に占有することが期待される。

サルの RM-1929 の 80 mg/kg における曝露量は、ヒトの 12.4 mg/kg（500 mg/m²）における推定曝露量よりも 3.4 倍高い（表 11）。サルの GLP 適用試験では投与に関連する毒性が観察されなかったことから、投与量 80 mg/kg は、進行がんの患者集団に治療上のベネフィットを特に与える場合、臨床試験の初回用量 12.4 mg/kg に対しては妥当な安全域が得られる。

表 11：サルの GLP 適用試験と臨床試験における曝露量比

Proposed Human Clinical Dose (mg/kg)	Proposed Human Clinical Dose (mg/m ²)	Anticipated Human AUC _{inf} (µg·h/mL) ¹	Safety Margin Based on AUC _{inf} at the Monkey 80 mg/kg Dose
12.4	500	12,180	3.4
22	900	21,873	1.9
30	1200	29,164	1.4

¹ Human exposures of RM-1929 are the predicted exposures for a 70-kg human assuming a single dose. Body surface area used in 1.73 m².

光毒性に関する追加試験では、皮膚の光線曝露部位及び光線非曝露部位の生検したいずれでも肉眼的に病変は認められず、病理組織学的検査では、基底細胞層又はその近辺の極く僅かな数の上皮細胞に影響が認められた。

In vitro 及び *in vivo* 遺伝毒性試験では、IR 700-CO₂ は染色体異常誘発性や分裂装置の崩壊を示さず、小核を誘発しなかった。

RM-1929 の毒性プロファイルは HNC 患者の安全性を担保するのに十分と考えられる。

10. 参考文献

1. FDA. Erbitux, FDA Summary Basis of Approval. 2004.
2. Eales-Reynolds LJ, Laver H, Mojtahedi H. Evidence for the expression of the EGF receptor on human monocytic cells. *Cytokine* 2001;16(5):169-72.
3. Tebbs CA, Cumberland PFT, Pratten MK. The role of maternally derived epidermal growth factor and the epidermal growth factor receptor during organogenesis in the rat embryo. *J Anat* 1997; 190:491-503.
4. Adamson ED, Meek J. The ontogeny of epidermal growth factor receptors during mouse development. *Dev Biol* 1984; 103:62-70.
5. Alsat E, Marcotty C, Gabriel R, et al. Molecular approach to intrauterine growth retardation: an overview of recent data. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7:1457-64.
6. Gargiulo AR, Khan-Dawood FS, Dawood MY. Epidermal growth factor receptors in uteroplacental tissues in term pregnancy before and after the onset of labor. *J Clin Endo Metab* 1997; 82:113-7.
7. Garnica AD, Chan WY. The role of the placenta in fetal nutrition and growth. *J Amer Coll Nutr* 1996;15(3):206-22.
8. Sadler TW. Fetal membranes and placenta. In: Langman's medical embryology, 7th edition. Baltimore: Williams and Wilkins, Chapter 7. 1995:101-21.
9. Semenov DV, Kanyshkova TG; Kit YY, et al. Human breast milk immunoglobulins G hydrolyze nucleotides. *Biochemistry (Moscow)* 1998;63(8):935-43.
10. Telemo E, Hanson LA. Antibodies in milk. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 1996;1(3):243-9.
11. Maeda S, Morikawa A, Tokuyama K, et al. The concentration of bovine IgG in human breast milk measured using different methods. *Acta Paediatr* 1993;82:1012-6.
12. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA) - Committee for proprietary medicinal products - European public assessment report (EPAR) - Herceptin 2002.
13. Bär A. Trehalose produced by a novel enzymatic process. UK Advisory Committee on Novel Foods and Processes, 2000.

2.6.6 毒性試験の概要文

14. Richards AB, Krakowka S, Dexter LB, Schmid H, Wolterbeek APM, Waalkens-Berendsen DH, et al. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. Food Chem Toxicol 2002; 40: 871-98.
15. Abbott PJ., Chen J. WHO FOOD ADDITIVES SERIES 46
16. Argov Z. et al: First Human Use of High Dose IV Trehalose: Safety, Tolerability and Pharmacokinetic Results from the Oculopharyngeal Muscular Dystrophy (OPMD) Therapy Trial (P7.068) ; 2015 ; 84 (14 Supplement)
17. Weinberg JT. An In Vivo Micronucleus Study in Sprague Dawley Rats and CD-1 Mice (Study No. WIL-99737). Charles River, Ashland, OH, 2016.