ジョイクル関節注 30mg

2.6.6 毒性試験の概要文

生化学工業株式会社

目次

2.6.6 毒性試験の概要文 4
2.6.6.1 まとめ 4
2.6.6.2 単回投与毒性試験 11
2.6.6.3 反復投与毒性試験 12
2.6.6.4 遺伝毒性試験 18
2.6.6.5 がん原性試験 19
2.6.6.6 生殖発生毒性試験 19
2.6.6.7 局所刺激性試験 22
2.6.6.8 その他の毒性試験 24
2.6.6.9 添加剤の安全性評価 27
2.6.6.10 ヒト及び各動物種の膝関節体積の測定試験 28
2.6.6.11 考察及び結論 29
2.6.6.12 図表 39
2.6.6.13 参考文献 40

表

表 2.6.6.1-1. SI-613 製剤の組成（3 mL あたり） 4
表 2.6.6.1-2. 毒性試験プログラム 5
表 2.6.6.1-3. SI-613 製剤の添加剤量 10
表 2.6.6.8-1. In silico 変異原性予測の被験不純物 27
表 2.6.6.11-1. SI-613 の毒性試験で認められた主な変化 30
表 2.6.6.11-2. 各動物種における投与用量と申請用量との比 30
表 2.6.6.11-3. ラットにおける小核試験とヒトにおける申請用量投与時の血漿中 SI-613 曝露比較 33
表 2.6.6.11-4. 生殖発生毒性試験とヒトにおける申請用量投与時の血漿中 SI-613 曝露比較 34
表 2.6.6.11-5. 日本人健康成人男性に申請用量の SI-613 単回膝関節腔内投与時の総曝露量に対する代謝物の割合 36
表 2.6.6.11-6. SI-613 毒性試験とヒトにおける申請用量投与時の血漿中 DF 曝露比較 36
表 2.6.6.11-7. SI-613 毒性試験とヒトにおける申請用量投与時の血漿中 DF-ラクタム曝露比較 37
表 2.6.6.11-8. SI-613 毒性試験とヒトにおける申請用量投与時の血漿中 DF-HA4mer 曝露比較 37
表 2.6.6.11-9. DF-ラクタムのラットを用いた小核試験とヒトにおける申請用量投与時の血漿中 DF-ラクタム曝露比較 38

略号一覧

略号	省略していない表現（英語）	省略していない表現（日本語）
不純物C*	不純物C*	不純物C*
ALT	Alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AUC	Area under the plasma concentration-time curve	血漿中濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-last}}$	Area under the plasma concentration-time curve from zero to last	0 から最終測定可能時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
AUC_{τ}	Area under the plasma concentration-time curve over a dosing interval	1 投与間隔の血漿中濃度－時間曲線下面積
Balb/c 3T3 細胞	Balb/3T3 clone A31	マウス胎児由来線維芽細胞
不純物A*	不純物A*	不純物A*
BLQ	Below the lower limit of quantification	定量下限未満
不純物B*	不純物B*	不純物B*
CHL/IU 細胞	CHL/IU	チャイニーズハムスター肺由来細胞
C_{max}	Maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
DF	Diclofenac	ジクロフェナク
DF-ラクタム又は lactam	Diclofenac-lactam	ジクロフェナクラクタム
DF-HA4mer	Diclofenac-hyaluronate 4mer	ジクロフェナク結合ヒアルロン酸 4 糖
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	ジメチルスルホキシド
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
HA	Sodium hyaluronate	ヒアルロン酸ナトリウム
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
IC_{50}	50% inhibition concentration	50%阻害濃度
NZW	New Zealand White	－
PBS	Phosphate buffered saline	リン酸緩衝塩化ナトリウム液
SD	Sprague Dawley	－
SI-613	Development code of Diclofenac Etalhyaluronate Sodium	一般的名称 ジクロフェナクエタルヒアルロン酸ナトリウムの開発コード
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
V79 細胞	V79	チャイニーズハムスター肺線維芽細胞

＊ 新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6.1 まとめ

SI-613 の非臨床安全性は、日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）が策定したガイドラインに基づきラット及びイヌを用いた単回投与毒性試験、カニクイザル、イヌ及びラットを用いた反復投与毒性試験、in vitro 及び in vivo 遺伝毒性試験、ラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験、並びに in vitro 光毒性試験を実施し評価した。これに加え、国際標準化機構が策定した医療機器の生物学的評価規格に基づきカニクイザル及びウサギを用いた局所刺激性試験並びに in vitro 細胞毒性試験を実施し評価した。

代謝物の非臨床安全性は、上述の SI-613 のカニクイザルを用いた反復投与毒性試験、ラットを用いた胚・胎児試験及び in vivo 遺伝毒性試験の結果に加え、代謝物であるジクロフェナクラクタム（DF-ラクタム）の in vitro 及び in vivo 遺伝毒性試験を実施し評価した。不純物の非臨床安全性は、in silico 変異原性予測より評価した。添加剤の非臨床安全性は、臨床製剤による SI-613 のカニクイザルを用いた反復投与毒性試験において評価した。いずれも ICH ガイドラインに基づき実施した。がん原性試験は実施しなかった。

カニクイザル、イヌ及びウサギを用いた反復投与毒性試験又は局所刺激性試験の投与経路は、SI-613 の臨床投与経路である膝関節腔内とした。その他の毒性試験の投与経路は、SI-613 を確実に全身曝露させるため静脈内とした。

カニクイザル及びウサギを用いた反復投与毒性試験又は局所刺激性試験、並びに in vitro 細胞毒性試験は、SI-613 製剤を用いた。SI-613 製剤の組成を表 2.6.6.1-1 に示す。その他の毒性試験は、SI-613 をリン酸緩衝塩化ナトリウム液（PBS）に溶解した液（SI-613PBS 溶液）を用いた。

上記の毒性試験は、不純物の in silico 変異原性予測を除き、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）を遵守した。

実施した毒性試験の一覧を表 2.6.6.1-2 に示す。

表 2.6.6.1-1. SI-613 製剤の組成（3 mL あたり）

成分	組成 A（mg）	組成 B（mg）
SI-613	30	30
マクロゴール 400	189	186
クエン酸水和物	[redacted]	2.1
クエン酸ナトリウム水和物	[redacted]	5.3

組成 A：カニクイザルを用いた反復投与毒性試験及び局所刺激性試験で使用した。臨床製剤と同組成。
組成 B：ウサギを用いた局所刺激性試験及び細胞毒性試験で使用した。
SI-613 を含有しないこと以外は SI-613 製剤と同じ組成をプラセボ製剤とした。

表 2.6.6.1-2. 毒性試験プログラム

試験の種類及び投与期間	投与経路	動物種及び試験系	被験物質	GLP 適用
単回投与毒性試験	静脈内	ラット、イヌ	SI-613	適用
反復投与毒性試験				
53 週間	膝関節腔内	カニクイザル	SI-613 製剤	適用
4 週間、13 週間	膝関節腔内	イヌ	SI-613	適用
4 週間、26 週間	静脈内	ラット	SI-613	適用
遺伝毒性試験				
復帰突然変異試験	in vitro	ネズミチフス菌、大腸菌	SI-613	適用
染色体異常試験	in vitro	CHL/IU 細胞	SI-613	適用
小核試験	静脈内	ラット	SI-613	適用
生殖発生毒性試験				
受胎能試験	静脈内	ラット	SI-613	適用
胚・胎児試験	静脈内	ラット、ウサギ	SI-613	適用
出生前後試験	静脈内	ラット	SI-613	適用
局所刺激性試験				
13 週間	膝関節腔内	カニクイザル	SI-613 製剤	適用
単回	膝関節腔内	ウサギ	SI-613 製剤	適用
その他の毒性試験				
光毒性試験	in vitro	Balb/c 3T3 細胞	SI-613	適用
細胞毒性試験	in vitro	V79 細胞	SI-613 製剤	適用
代謝物の毒性試験				
復帰突然変異試験	in vitro	ネズミチフス菌、大腸菌	DF-ラクタム	適用
染色体異常試験	in vitro	CHL/IU 細胞	DF-ラクタム	適用
小核試験	皮下	ラット	DF-ラクタム	適用
不純物の変異原性評価	in silico	Derek、CASE Ultra、Sarah	12 不純物	非適用
ヒト及び各動物種の膝関節体積の測定試験	-	ヒト、カニクイザル、イヌ、ウサギ、ラット	-	非適用

-：該当なし

2.6.6.1.1 SI-613 の安全性評価概括

SI-613 は、ヒアルロン酸ナトリウム（HA）にジクロフェナク（DF）を化学的に結合させた HA 誘導体である。SI-613 をイヌ及びカニクイザルに膝関節腔内投与したときの本質的な変化は、HA を含む SI-613 を異物と認識した生体反応、すなわちマクロファージ系細胞による貪食及び適応性変化を含む膝関節腔内での異物処理を反映した変化で、これには滑膜における泡沫状マクロファージ、多核巨細胞、集簇したマクロファージの限局性壊死、単核細胞浸潤並びに滑膜の乳頭状増生が含まれた。これらと同質の変化は、臨床使用実績が豊富で安全性が確認されている膝関節腔内投与 HA 製剤の毒性試験においても認められていることから、臨床において問題となる変化ではなく、毒性変化ではないと判断した。臨床製剤と同組成の製剤をカニクイザルに膝関節腔内投与したときには、上記の SI-613 に対する異物処理を反映した変化以外に影響は認められなかったが、臨床製剤と組成が異なる高粘弾性の SI-613PBS 溶液をイヌに膝関節腔内投与したときには、異物処理を反映した変化に加え、滑膜の水腫やフィブリン様物質を伴う炎症及びそれに関連すると考えられる滑膜の線維化が認められた。高粘弾性の投与液は関節腔内への投与により炎症を惹起することが報告されていることから、イヌで認められた炎症及び線維化は粘弾性の高い投与液に特有の変化と考えられ、粘弾性の低い臨床製剤では生じない毒性変化と判断した。なお、SI-613 の膝関節腔内投与による全身に対する毒性変化は認められなかった。

SI-613 をラットに静脈内投与したとき、SI-613 の全身への高曝露に伴い、脾臓における泡沫状マクロファージ、肝臓における泡沫状クッパー細胞並びに肺における多核巨細胞を伴う肉芽腫が認められた。これらは、上述した膝関節腔内投与時における異物処理を反映した変化と同様、SI-613 に対するマクロファージ系細胞の異物処理を反映した変化と考えられ、組織障害を伴わなかったことから、毒性変化ではないと判断した。また、静脈内投与直後の運動性の低下や不規則呼吸などの一般状態変化、血圧低下及び肝逸脱酵素の高値が一過性に認められたが、粘弾性の高い投与液を静脈内に投与したときに認められる変化であり、当該試験に用いた投与液の粘弾性の高さに起因する毒性変化と考えられた。SI-613 は静脈内に直接投与されないことを踏まえると、この変化が臨床使用で生じる可能性は低いと考えられた。なお、SI-613 の静脈内投与による膝関節に対する毒性変化は認められなかった。

以上、SI-613 を膝関節腔内及び静脈内投与したとき、SI-613 に対する異物処理を反映した変化が認められたが、これらは毒性変化ではないと判断した。一方、いずれの投与経路においても、投与液の高い粘弾性（物性）に起因する毒性変化が認められた。前者は膝関節への臨床使用で問題となるものではなく、後者は臨床使用では生じないと考えられた。

SI-613 の遺伝毒性、生殖発生毒性及び光毒性などの特殊毒性試験においては、臨床使用において問題となる変化は認められなかった。

2.6.6.1.2 単回投与毒性試験

ラットに SI-613 を単回静脈内投与（投与用量：10 mg/kg）したとき、投与直後に一過性の運動性低下、不規則呼吸及び腹臥位が認められた。概略の致死量は、10 mg/kg を超えると判断した。

イヌに SI-613 を単回静脈内投与（投与用量：5 mg/kg）したとき、投与直後又は投与後 1 日に一過性の口腔粘膜、眼瞼結膜及び耳介の蒼白、運動性低下及び血圧低下、並びに血清中アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）の高値が認められた。概略の致死量は、5 mg/kg を超えると判断した。

2.6.6.1.3 反復投与毒性試験

カニクイザルに SI-613 製剤を 53 週間間歇膝関節腔内投与（投与用量：0.4、1.2 及び 4 mg/kg、投与頻度：4 週 1 回）したとき、いずれの用量においても投与局所（膝関節滑膜）及び周辺組織（所属リンパ節）に SI-613 を異物と認識した処理反応が認められた。これと同質の変化は、臨床使用実績が豊富で安全性が確認されている膝関節腔内投与 HA 製剤の毒性試験においても認められていること、水腫やフィブリン様物質などの炎症を示唆する変化や滑膜の壊死を伴わなかったことから、毒性変化ではないと判断した。これより無毒性量は 4 mg/kg/4 weeks と判断した。

イヌに SI-613 を 4 週間間歇膝関節腔内投与（投与用量：1、2 及び 6 mg/kg、投与頻度：週 1 回）及び 13 週間間歇膝関節腔内投与（投与用量：2 又は 6 mg/kg、投与頻度：週 1 回、又は 4 週 1 回）したとき、いずれの用量においても投与局所（膝関節滑膜）及び周辺組織（下腿部及び/又は所属リンパ節）に SI-613 を異物と認識した処理反応が認められた。これと同質の変化は、臨床使用実績が豊富で安全性が確認されている膝関節腔内投与 HA 製剤の毒性試験においても認められていることから、毒性変化ではないと判断した。4 週間投与では、いずれの用量においても下腿部の水腫及び線維化が認められたため、無毒性量は 1 mg/kg/week 未満と判断した。これらの変化は休薬により回復性又は回復傾向を示した。13 週間投与では、4 週間投与の変化に加え、いずれの用量においても膝関節滑膜に SI-613PBS 溶液の粘弾性の高さに起因したと考えられる水腫及びフィブリン様物質を伴う炎症が認められたため、無毒性量は 2 mg/kg/4 weeks 未満と判断した。これらの変化は休薬により回復傾向を示した。

ラットに SI-613 を 4 週間静脈内投与（投与用量：1、3 及び 10 mg/kg）及び 26 週間静脈内投与（投与用量：0.3、1 及び 3 mg/kg）したとき、いずれの用量においても投与局所（尾静脈）及び/又は全身（肺、肝臓及び/又は脾臓）に異物処理を反映した変化が認められた。これらの変化は組織障害を伴わなかったことから、毒性変化ではないと判断した。4 週間投与では、3 mg/kg 以上で投与直後に一過性のよろめき歩行が認められたことから、無毒性量は 1 mg/kg/day と判断した。26 週間投与では、異物処理を反映した変化のみが認められたため、無毒性量は 3 mg/kg/day と判断した。

2.6.6.1.4 遺伝毒性試験

細菌を用いた復帰突然変異試験、ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験及びラットを用いた小核試験は、いずれも陰性であった。SI-613 は遺伝毒性を有しないと判断した。

2.6.6.1.5 がん原性試験

SI-613 及び代謝物に遺伝毒性の懸念がないこと、反復投与毒性試験にて膝関節及び全身に前がん病変並びに腫瘍形成を示唆する変化が認められていないこと、並びに SI-613 の構成成分である HA 及び DF の臨床使用においてがん原性を示唆する有害事象が報告されていないことから、SI-613 及び代謝物の膝関節及び全身に対するがん原性懸念は低いと判断した。そのため、がん原性試験は実施しなかった（[redacted]相談（[redacted]）[redacted]（[redacted]、[redacted]年[redacted]月[redacted]日）〔1.13.2-02〕、[redacted]相談[redacted]（[redacted]、[redacted]年[redacted]月[redacted]日）〔1.13.2-04〕）。

2.6.6.1.6 生殖発生毒性試験

ラットに SI-613 を静脈内投与（投与用量：1、3 及び 10 mg/kg）したとき、受胎能及び初期胚発生に影響は認められなかった。受胎能及び初期胚発生に関する無毒性量は 10 mg/kg/day と判断した。

ラット及びウサギに SI-613 を静脈内投与（投与用量：1、3 及び 10 mg/kg（ラット）、0.4、1.2 及び 4 mg/kg（ウサギ））したとき、胚・胎児発生に影響は認められなかった。胚・胎児発生に関する無毒性量は、ラットでは 10 mg/kg/day、ウサギでは 4 mg/kg/day と判断した。

ラットに SI-613 を静脈内投与（投与用量：1、3 及び 10 mg/kg）したとき、母動物の生殖機能及び次世代の発生に影響は認められなかった。母動物の生殖機能に関する無毒性量及び次世代の発生に関する無毒性量は、いずれも 10 mg/kg/day と判断した。

2.6.6.1.7 局所刺激性試験

カニクイザルに SI-613 製剤を 13 週間間歇膝関節腔内投与（投与用量：0.2、0.6 及び 2 mg/kg/joint、投与頻度：4 週 1 回）したとき、最終投与後 4 週まで、投与局所（膝関節滑膜）及び周辺組織（所属リンパ節）に SI-613 を異物と認識した処理反応が認められた。これと同質の変化は、臨床使用実績が豊富で安全性が確認されている膝関節腔内投与 HA 製剤の毒性試験においても認められていること、水腫やフィブリン様物質などの炎症を示唆する変化や滑膜の壊死を伴わなかったことから刺激性を示す変化ではないと判断した。

ウサギに SI-613 製剤を単回膝関節腔内投与（投与用量：0.2、0.5 又は 2 mg/kg/joint）したとき、投与後 18 箇月まで、局所刺激性を示唆する変化は認められなかった。

これらの試験において、SI-613 製剤は膝関節への刺激性を有しないと判断した。

2.6.6.1.8 光毒性試験

マウス胎児由来線維芽細胞（Balb/c 3T3 細胞）を用いたニュートラルレッド取り込み法による光毒性試験で、SI-613 は非光毒性物質と判定された。SI-613 は光毒性作用を有しないと判断した。

2.6.6.1.9 細胞毒性試験

チャイニーズハムスター肺線維芽細胞（V79 細胞）を用いたコロニー形成法による細胞毒性試験で、SI-613 は 280 μg/mL 以上で細胞毒性を示した。SI-613 は細胞毒性を有すると判断した。

2.6.6.1.10 代謝物の安全性評価

ヒト血漿中において SI-613 関連物質の総曝露量の 10%を超える代謝物は DF、DF-ラクタム及びジクロフェナク結合ヒアルロン酸 4 糖（DF-HA4mer）であった。「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の実施についてのガイダンスについて（薬食審査発 0219 第 4 号、平成 22 年 2 月 19 日）」（ICH M3（R2）ガイドライン）に基づき、これらの代謝物の安全性について SI-613 のカニクイザルを用いた 53 週間反復投与毒性試験、ラットを用いた胚・胎児試験及びラットを用いた小核試験の結果より評価した。DF、DF-ラクタム及び DF-HA4mer の一般毒性及び生殖発生毒性については、SI-613 のカニクイザルを用いた 53 週間反復投与毒性試験及びラットを用いた胚・胎児試験の無毒性量においてヒトの曝露量を上回る曝露が認められていたことから、SI-613 の毒性試験において安全性が担保されていると判断した。また、DF 及び DF-HA4mer の遺伝毒性については、SI-613 のラットを用いた小核試験においてヒトの曝露量を上回る曝露が認められていたことから、SI-613 の毒性試験において安全性が担保されていると判断した。一方、DF-ラクタムについては、ラットを用いた小核試験においてヒトの曝露量を上回る曝露が認められなかったことから、DF-ラクタムの in vitro 及び in vivo 遺伝毒性試験を実施した。染色体異常試験において数的異常誘発性（倍数性）が認められたが、構造異常誘発性は認められず、細菌を用いた復帰突然変異試験及びラットを用いた小核試験はいずれも陰性であったことから、DF-ラクタムは遺伝毒性を有しないと判断した。

2.6.6.1.11 不純物の安全性評価

SI-613 原薬及び製剤に含まれる可能性のある不純物は、「新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドラインの改定について（医薬審発第 1216001 号、平成 14 年 12 月 16 日）」（ICH Q3A ガイドライン）及び「新有効成分含有医薬品のうち製剤の不純物に関するガイドラインの改定について（医薬審発第 0624001 号、平成 15 年 6 月 24 日）」（ICH Q3B ガイドライン）の安全性確認の閾値を超えないことを確認した。そのため、ICH Q3A 及び ICH Q3B ガイドラインに基づいた安全性評価は実施しなかった。

「潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中 DNA 反応性（変異原性）不純物の評価及び管理ガイドラインについて（薬生審査発 1110 第 3 号、平成 27 年 11 月 10 日）」（ICH M7 ガイドライン）に基づき、SI-613 原薬及び製剤に含まれる可能性のある 12 不純物について in silico ツールを用いて変異原性を予測し評価した。3 不純物（ 不純物A* 、 不純物B* 及び 不純物C* ）は変異原性を有すると予測された。

2.6.6.1.12 添加剤の安全性評価

SI-613 製剤に含まれる添加剤はマクロゴール 400、クエン酸水和物及びクエン酸ナトリウム水和物であり、各添加剤の量を表 2.6.6.1-3 に示した。いずれの添加剤も、医薬品添加物事典 2016 における静脈内投与の使用実績量を下回ることから、全身曝露による安全性はヒトで確認されていると判断した。一方、これら添加剤の膝関節腔内投与での使用実績については医薬品添加物事典 2016 に記載されていないことから、膝関節腔内投与による膝関節への安全性について、カニクイザルを用いた膝関節腔内投与による反復投与毒性試験の結果より評価した。カニクイザルにプラセボ製剤を 53 週間間歇膝関節腔内投与（投与用量：マクロゴール 400 は 12.6 mg/kg/joint、クエン酸水和物は [redacted] mg/kg/joint、クエン酸ナトリウム水和物は [redacted] mg/kg/joint、投与頻度：4 週 1 回）した結果、刺激性を示唆する変化は認められなかったことから、SI-613 製剤に含まれる添加剤は膝関節への刺激性を有しないと判断した。

表 2.6.6.1-3. SI-613 製剤の添加剤量

成分	臨床投与用量（SI-613 製剤 3 mL あたりの用量）	
	mg/joint	mg/kg/joint[a]
マクロゴール 400	189	3.15
クエン酸水和物	[redacted]	[redacted]
クエン酸ナトリウム水和物	[redacted]	[redacted]

a：60 kg のヒトに投与

＊ 新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.6.2 単回投与毒性試験

SI-613 の単回投与毒性は雌雄のラット及びイヌを用いて評価した。臨床投与経路である膝関節腔内投与では SI-613 の全身曝露が得られないため、投与経路は、SI-613 の確実な全身曝露を目的に静脈内投与とした。

2.6.6.2.1 ラットにおける単回静脈内投与毒性試験

〔4.2.3.1-1 参照〕

Sprague Dawley（SD）ラット（雌雄各 5 匹）に SI-613 を 10 mg/kg の用量で単回静脈内投与した。投与容量は 5 mL/kg とし、SI-613PBS 溶液を投与した。投与後 14 日間の観察期間を設け、一般状態観察、体重測定及び剖検を実施した。また、トキシコキネティクス（TK）サテライト動物（雌雄各 4 匹/時点）を設け、SI-613、DF 及び DF-ラクタムの血漿中濃度を測定した。

試験期間を通して死亡は認められなかった。体重及び剖検所見に SI-613 投与に関連した変化は認められなかった。

一般状態観察では、雄で投与直後に運動性の低下、不規則呼吸及び腹臥位が認められ、投与後 4 分までに消失した。

TK 測定では、雌雄ともに、SI-613、DF 及び DF-ラクタムの全身曝露を確認した。

以上より、ラットの静脈内投与による概略の致死量は 10 mg/kg を超えると判断した。

2.6.6.2.2 イヌにおける単回静脈内投与毒性試験

〔4.2.3.1-2 参照〕

ビーグル犬（雌雄各 2 匹）に SI-613 を 5 mg/kg の用量で単回静脈内投与した。投与容量は 2.5 mL/kg とし、SI-613PBS 溶液を投与した。投与後 14 日間の観察期間を設け、一般状態観察、体重測定、生理機能検査（心電図、血圧及び体温）、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検及び病理組織学的検査（肝臓及び胆嚢）を実施した。SI-613 の投与前 14 日に、媒体（PBS）を投与し、剖検及び病理組織学的検査を除き、同様に観察及び検査を行った。また、SI-613、DF 及び DF-ラクタムの血漿中濃度を測定した。

試験期間を通して死亡は認められなかった。体重、心電図、体温、並びに眼科学的検査、血液学的検査、剖検及び病理組織学的検査（肝臓及び胆嚢）の結果に SI-613 投与に関連した変化は認められなかった。

一般状態観察では、雄で口腔粘膜、眼瞼結膜及び耳介の蒼白、並びに雌雄で運動性の低下が投与後数分より認められ、投与後 30 分までに消失した。また、全例で舌なめずりが投与直後に認められ、投与後 15 分までに消失した。雌 1 例で嘔吐が投与直後に認められた。舌なめずり及び嘔吐は、一過性であった。

血圧測定では、雌で血圧の低下が SI-613 投与後 45 分時点に認められ、投与後 1 日に回復性を示した。

血液生化学的検査では、血圧の低下が認められた雌において ALT の高値が SI-613 投与後 1 日に認められ、投与後 6 日で低下に転じ、投与後 13 日に正常範囲内に戻った。投与後 14 日の病理組織学的検査において肝臓及び胆嚢に変化は認められなかった。

TK 測定では、雌雄ともに SI-613、DF 及び DF-ラクタムの全身曝露を確認した。

以上より、イヌの静脈内投与による概略の致死量は 5 mg/kg を超えると判断した。

2.6.6.3 反復投与毒性試験

SI-613 の反復投与毒性は雌雄のカニクイザル、イヌ及びラットを用いて評価した。投与経路は、カニクイザル及びイヌは臨床投与経路である膝関節腔内投与、ラットは SI-613 の確実な全身曝露を目的に静脈内投与とした。膝関節腔内投与試験のうち、イヌを用いた試験は SI-613PBS 溶液を使用した。当該投与液は、SI-613 製剤と比較して高粘弾性を有していた [(1)]。イヌを用いた試験で認められた毒性変化は、投与液の粘弾性の高さに起因したと考えられたことから、投与液の粘弾性の高さによる影響を排除した上で、膝関節滑膜に対する SI-613 の影響を評価する必要があると判断し、カニクイザルを用いた膝関節腔内投与試験では、SI-613PBS 溶液より粘弾性の低い臨床製剤と同組成である SI-613 製剤を使用した。

2.6.6.3.1 カニクイザルにおける 53 週間反復膝関節腔内投与毒性試験

〔4.2.3.2-1 参照〕

カニクイザル（雌雄各 5、7 又は 9 匹/群）に SI-613 を 0.4、1.2 及び 4 mg/kg（0.2、0.6 及び 2 mg/kg/joint、両膝投与）の用量で、53 週間（4 週 1 回、計 14 回）又は 21 週間（4 週 1 回、計 6 回）膝関節腔内投与した。投与容量は 0.02、0.06 及び 0.2 mL/kg/joint とし、SI-613 製剤を投与した。対照群及びプラセボ群には、それぞれ生理食塩液及びプラセボ製剤を両膝に 0.2 mL/kg/joint の容量で投与した。雌雄各 3 匹/群を 14 回目投与後 1 週に剖検した。回復性評価のため、1.2 mg/kg を除く雌雄各 2 匹/群を 14 回目投与後 13 週に剖検した。さらに、経時変化を確認するため、雌雄各 2 匹/群を 6 回目投与後 1 週に剖検した。回復性評価のため、プラセボ及び 4 mg/kg の雌雄各 2 匹/群を 6 回目投与後 4 週に剖検した。一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、摂水量測定、膝関節幅測定、生理機能検査（心電図、呼吸数、血圧及び体温）、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検、器官重量測定、膝関節液検査及び病理組織学的検査を実施した。また、SI-613、DF、DF-ラクタム及び DF-HA4mer の血漿中濃度を測定した。

試験期間を通して死亡は認められなかった。一般状態、体重、摂餌量、摂水量、膝関節幅、心電図、呼吸数、血圧、体温、並びに眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査及び器官重量測定の結果に SI-613 投与に関連した変化は認められなかった。

膝関節液検査では、6 及び 14 回目投与後に 0.4 mg/kg 以上で、プラセボに比べて白血球数の高値を示す例が認められ、休薬により回復傾向を示した。膝関節液の白血球数は 6 回目投与後と比較し、14 回目投与後でより高値を示した。また、0.4 mg/kg 以上で浮遊物、粘性、混濁、あるいは淡黄色を示す例が認められ、休薬により回復傾向を示した。

剖検では、6 回目投与後に 4 mg/kg で、膝関節滑膜の淡黄色化及び膝蓋骨下脂肪体の黄色化が認められ、休薬により回復性を示した。14 回目投与後に 1.2 mg/kg 以上で、膝関節滑膜の褐色化、膝蓋骨下脂肪体の褐色巣、膝関節腔内にゼリー状物質の貯留が散見された。これらの変化のうち、ゼリー状物質の貯留は休薬により回復性を示した。

膝関節の病理組織学的検査では、6 及び 14 回目投与後に 0.4 mg/kg 以上で、滑膜に泡沫状マクロファージ、一部に濾胞形成を伴う単核細胞浸潤及び乳頭状増生が認められた。これらの変化は、6 及び 14 回目投与後でその程度に顕著な差がなく、休薬により回復傾向を示した。6 回目投与後に 1.2 mg/kg 以上で、14 回目投与後に 0.4 mg/kg 以上で、滑膜に多核巨細胞及び滑膜表層に集簇したマクロファージの限局性壊死が認められた。これらの変化は、6 及び 14 回目投与後でその程度に顕著な差がなかった。また、多核巨細胞及び限局性壊死は休薬により回復性を示した。これらは SI-613 に対する異物処理を反映した変化と考えられ、同質の変化は臨床使用実績が豊富で安全性が確認されている膝関節腔内投与 HA 製剤の毒性試験においても認められていること、水腫やフィブリン様物質などの炎症を示唆する変化や滑膜の壊死を伴わないことから毒性変化ではないと判断した。14 回目投与後に 1.2 mg/kg 以上で、滑膜に好酸性物質が認められ、この変化は休薬により回復性を示した。好酸性物質は、SI-613 の構成成分である HA を染色するコロイド鉄染色で陰性であり、好酸性物質の由来の特定には至らなかったが、細胞成分を含まない構造物であったことから、SI-613 由来の物質であると推察された。この変化は SI-613 由来の物質と考えられ、加えて炎症細胞浸潤や周囲に組織の変性などの生体反応が認められていないことから、毒性変化ではないと判断した。膝関節液検査及び剖検でみられた変化は、いずれも滑膜における病理組織学的変化に関連する変化と考えられた。

膝関節以外の病理組織学的検査では、6 回目投与後に 4 mg/kg で、14 回目投与後に 0.4 mg/kg 以上で、外側腸骨あるいは膝窩リンパ節の髄質に泡沫状マクロファージが認められ、いずれの変化も休薬により回復性を示した。これらは、膝関節腔から所属リンパ節に移行した SI-613 又はその関連物質に対する異物処理を反映した変化と考えられた。

TK 測定では、SI-613 の全身曝露は確認されなかった。一方、DF、DF-ラクタム及び DF-HA4mer の全身曝露は 0.4 mg/kg 以上で認められ、一部を除いて投与量の増加に伴う最高血漿中濃度（C_{max}）及び 1 投与間隔の血漿中濃度－時間曲線下面積（AUC_{τ}）の増加を確認した。DF、DF-ラクタム及び DF-HA4mer のほぼ全ての C_{max} 及び AUC_{τ} に明らかな性差及び反復投与による影響は認められなかった。

以上より、最高用量である 4 mg/kg においても毒性変化は認められず、無毒性量は雌雄ともに 4 mg/kg/4 weeks（2 mg/kg/joint/4 weeks）と判断した。

2.6.6.3.2 イヌにおける 4 週間反復膝関節腔内投与毒性試験

〔4.2.3.2-2 参照〕

ビーグル犬（雌雄各 3 又は 5 匹/群）に SI-613 を 1、2 及び 6 mg/kg（0.5、1 及び 3 mg/kg/joint、両膝投与）の用量で、4 週間（週 1 回、計 4 回）膝関節腔内投与した。投与容量は 0.05、0.1 及び 0.3 mL/kg/joint とし、SI-613PBS 溶液を投与した。対照群には、媒体（PBS）を両膝に 0.3 mL/kg/joint の容量で投与した。雌雄各 3 匹/群を最終投与後 1 週に剖検した。回復性評価のため、対照及び 6 mg/kg の雌雄各 2 匹を最終投与後 5 週に剖検した。一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、摂水量測定、生理機能検査（心電図、血圧及び体温）、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検、器官重量測定、膝関節液検査及び病理組織学的検査を実施した。また、SI-613、DF 及び DF-ラクタムの血漿中濃度を測定した。

試験期間を通して死亡は認められなかった。一般状態、体重、摂餌量、摂水量、心電図、血圧、体温、並びに眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検及び器官重量測定の結果に SI-613 投与に関連した変化は認められなかった。

膝関節液検査では、1 mg/kg 以上で、白血球数の高値傾向が認められ、休薬により回復性を示した。左右膝関節間及び個体間のばらつきが大きく、投与量との明らかな相関は認められなかった。

病理組織学的検査では、1 mg/kg 以上で、膝関節滑膜及び下腿部の筋間質に泡沫状マクロファージが認められた。また、1 mg/kg 以上で、膝関節滑膜に単核細胞浸潤及び乳頭状増生が、下腿部の筋間質に単核細胞浸潤が認められ、休薬により回復性又は回復傾向を示した。これらの変化は SI-613 に対する異物処理を反映した変化と考えられ、同質の変化は臨床使用実績が豊富で安全性が確認されている膝関節腔内投与 HA 製剤の毒性試験においても認められていることから、毒性変化ではないと判断した。一方、6 mg/kg で 1 例の膝関節滑膜及び 1 mg/kg 以上で下腿部の筋間質に線維化が、2 mg/kg 以上で下腿部の筋間質に水腫が認められた。これらの変化は休薬による回復性が認められたが、イヌにおける 13 週間反復膝関節腔内投与毒性試験において膝関節滑膜の炎症に伴う変化として認められたことから、炎症に関連した毒性変化と判断した。膝関節液検査でみられた膝関節液中の白血球数の高値は、滑膜の炎症に関連した変化もしくは異物処理を反映した変化と考えられた。

TK 測定では、SI-613 及び DF-ラクタムの全身曝露は確認されなかった。一方、DF の全身曝露は 1 mg/kg 以上で認められ、投与量の増加に伴う C_{max} 及び AUC_{τ} の増加を確認した。DF の C_{max} 及び AUC_{τ} に明らかな性差及び反復投与による影響は認められなかった。

以上より、下腿部の筋間質に線維化が、1 mg/kg/week（0.5 mg/kg/joint/week）以上で認められたことから、無毒性量は雌雄ともに 1 mg/kg/week（0.5 mg/kg/joint/week）未満と判断した。

2.6.6.3.3 イヌにおける 13 週間反復膝関節腔内投与毒性試験

〔4.2.3.2-3 参照〕

ビーグル犬（雌雄各 3 又は 5 匹/群）に SI-613 を 2 及び 6 mg/kg（1 及び 3 mg/kg/joint、両膝投与）の用量で 13 週間（4 週 1 回、計 4 回）、又は 6 mg/kg の用量で 13 週間（週 1 回、計 13 回）膝関節腔内投与した。投与容量は 0.1 及び 0.3 mL/kg/joint とし、SI-613PBS 溶液を投与した。対照群には、媒体（PBS）を両膝に 0.3 mL/kg/joint の容量で 13 週間（4 週 1 回、計 4 回）投与した。全ての用量の雌雄各 3 匹/群を最終投与後 1 週に剖検した。回復性評価のため、対照及び 6 mg/kg の雌雄各 2 匹を、最終投与後 4 週に剖検した。一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、摂水量測定、生理機能検査（心電図）、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検、器官重量測定、膝関節液検査及び病理組織学的検査を実施した。また、SI-613、DF 及び DF-ラクタムの血漿中濃度を測定した。

試験期間を通して死亡は認められなかった。一般状態、体重、摂餌量、摂水量、心電図、並びに眼科学的検査、尿検査、剖検及び器官重量測定の結果に SI-613 投与に関連した変化は認められなかった。

血液学的検査では、週 1 回投与の 6 mg/kg の雄で赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値が対照と比べ有意な低値を示し、休薬により回復傾向を示した。これらの変化の程度は対照と比べ 15%程度の軽度な変動であり、一般状態、尿検査、剖検及び病理組織学的検査において、これらの変化に関連すると考えられる貧血、出血及び造血系への影響は認められなかったことから、これらは毒性変化ではないと判断した。

血液生化学的検査では、週 1 回投与の 6 mg/kg の雄でアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼが対照と比べ有意な高値、並びにアルブミン及びクレアチニンが対照と比べ有意な低値を示し、休薬により回復性を示した。一般状態及び体重において、低栄養と考えられる変化は認められず、さらに、病理組織学的検査において、肝臓、腎臓及び心筋に SI-613 投与に関連する変化は認められなかったことから、これらは毒性変化ではないと判断した。

膝関節液検査では、4 週 1 回及び週 1 回投与の 6 mg/kg でリンパ球比の高値が、週 1 回投与の 6 mg/kg の雄で白血球数の高値傾向が認められ、休薬により回復性を示した。

病理組織学的検査では、2 mg/kg 以上で、膝関節滑膜に水腫及びフィブリン様物質を伴うマクロファージ及びリンパ球主体の炎症が認められた。炎症に伴う変化として、2 mg/kg 以上で膝関節滑膜に線維化が、下腿部の筋間質に水腫が散見された。週 1 回投与の 6 mg/kg では下腿部の筋間質に出血及び線維化が散見された。これらの変化はいずれも休薬により回復傾向を示した。膝関節滑膜の炎症及びこれに伴う上記の変化は投与液の粘弾性の高さに起因した変化と考えられ、毒性変化と判断した。このほかに、2 mg/kg 以上で膝関節滑膜に泡沫状マクロファージ及び乳頭状増生が、2 mg/kg 以上で下腿部の筋間質に泡沫状マクロファージが認められ、筋間質における単核細胞浸潤が散見された。さらに、2 mg/kg 以上で腰リンパ節の髄質に泡沫状マクロファージが認められた。これらの変化はいずれも休薬により回復傾向を示した。これらは SI-613 に対する異物処理を反映した変化と考えられ、同質の変化は臨床使用実績が豊富で安全性が確認されている膝関節腔内投与

HA 製剤の毒性試験においても認められていることから、毒性変化ではないと判断した。また、膝関節液中のリンパ球比の高値は、滑膜の炎症もしくは異物処理を反映した変化と考えられた。

TK 測定では、SI-613 の全身曝露は確認されなかった。一方、DF の全身曝露は 2 mg/kg 以上で認められ、投与量の増加に伴う C_{max} 及び AUC_{τ} の増加を確認した。DF の C_{max} 及び AUC_{τ} に明らかな性差及び反復投与による影響は認められなかった。DF-ラクタムの全身曝露は週 1 回投与の 6 mg/kg の投与 85 日にわずかに認められたのみであった。

以上より、膝関節滑膜における炎症が 4 週 1 回投与の 2 mg/kg 以上で認められたことから、無毒性量は雌雄ともに 2 mg/kg/4 weeks（1 mg/kg/joint/4 weeks）未満と判断した。

2.6.6.3.4 ラットにおける 4 週間反復静脈内投与毒性試験

〔4.2.3.2-4 参照〕

SD ラット（雌雄各 12 又は 18 匹/群）に SI-613 を 1、3 及び 10 mg/kg の用量で 1 日 1 回、4 週間連日静脈内投与した。投与容量は 5 mL/kg とし、SI-613PBS 溶液を投与した。対照群には媒体（PBS）を 5 mL/kg 投与した。雌雄各 12 匹/群を最終投与後 1 日に剖検した。回復性評価のため、対照及び 10 mg/kg の雌雄各 6 匹を、最終投与後 4 週に剖検した。一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、摂水量測定、生理機能検査（機能観察総合評価及び呼吸器系検査）、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。また、TK サテライト動物（雌雄各 4 匹/時点/群）を設け、SI-613、DF 及び DF-ラクタムの血漿中濃度を測定した。

試験期間を通して死亡は認められなかった。体重、摂餌量、摂水量、並びに機能観察総合評価、呼吸器系検査、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査及び剖検の結果に SI-613 投与に関連した変化は認められなかった。

一般状態観察では、3 mg/kg 及び 10 mg/kg で投与直後に一過性のよろめき歩行が認められた。この変化は、SI-613 を PBS に溶解した投与液の粘弾性の高さに起因した変化と考えられた。

病理組織学的検査では、最終投与後 1 日に、1 mg/kg 以上で、肺に多核巨細胞からなる小肉芽腫、3 mg/kg 以上で肝臓に泡沫状のクッパー細胞、10 mg/kg で脾臓の赤脾髄及び投与部位である尾静脈周囲に泡沫状マクロファージが認められた。肺の小肉芽腫、並びに脾臓及び尾静脈周囲の泡沫状マクロファージは、休薬により回復性又は回復傾向を示した。これらは SI-613 に対する異物処理を反映した変化と考えられ、組織障害を伴わなかったことから毒性変化ではないと判断した。

器官重量測定では、最終投与後 1 日に 10 mg/kg で、対照に比べ、肝臓の実重量及び体重比重量が統計学的に有意に増加した。この変化は、肝臓におけるクッパー細胞による異物処理を反映したものと考えられた。

TK 測定では、SI-613 及び DF の全身曝露は 1 mg/kg 以上で、DF-ラクタムの全身曝露は 3 mg/kg 以上で認められ、投与量の増加に伴う C_{max} 及び AUC_{τ} の増加を確認した。SI-613 及び DF-ラクタム

の C_{max} 及び AUC_{τ} に明らかな性差や反復投与による影響は認められなかった。DF の C_{max} 及び AUC_{τ} には反復投与による増加傾向が認められ、その傾向は雌でより顕著であった。

以上より、一過性のよろめき歩行が 3 mg/kg 以上で認められたことから、無毒性量は雌雄ともに 1 mg/kg/day と判断した。

2.6.6.3.5 ラットにおける 26 週間反復静脈内投与毒性試験

〔4.2.3.2-5 参照〕

SD ラット（雌雄各 10 又は 15 匹/群）に SI-613 を 0.3、1 及び 3 mg/kg の用量で 1 日 1 回、26 週間連日静脈内投与した。投与容量は 1.5 又は 5 mL/kg とし、SI-613PBS 溶液を投与した。対照群には媒体（PBS）を 5 mL/kg 投与した。雌雄各 9 又は 10 匹/群を、最終投与後 1 日に剖検した。回復性評価のため、対照及び 3 mg/kg の雌雄各 5 匹を、最終投与後 13 週に剖検した。一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、摂水量測定、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。また、TK サテライト動物（雌雄各 4 匹/時点/群）を設け、SI-613、DF 及び DF-ラクタムの血漿中濃度を測定した。

0.3 mg/kg の雄 1 例で投与 31 日の投与前に死亡が認められた。剖検で胸腺の暗赤色巣が、病理組織学的検査で胸腺の出血巣が認められたが、死因に結びつく変化ではなかった。病理組織学的検査で自然発生性にげっ歯類に認められる心筋症及び肺のうっ血が認められたが、心筋症は対照群にも認められる自然発生性の変化、肺のうっ血は死後変化であり、SI-613 投与に関連しない変化と考えられた。また、TK サテライト動物の 1 mg/kg の雄 1 例に死亡が認められた。3 mg/kg で死亡が認められなかったこと、TK サテライト動物の対照群にも死亡が認められたことから、0.3 mg/kg 及び TK サテライト動物の 1 mg/kg の各 1 例で認められた死亡は SI-613 投与との関連性はないと判断した。

一般状態、体重、摂餌量、摂水量、並びに眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査及び剖検の結果に SI-613 投与に関連した変化は認められなかった。

病理組織学的検査では、最終投与後 1 日に、0.3 mg/kg 以上で肺の多核巨細胞からなる小肉芽腫、3 mg/kg で肝臓に泡沫状のクッパー細胞、並びに脾臓の赤脾髄及び投与部位である尾静脈周囲に泡沫状マクロファージが認められた。肝臓の泡沫状のクッパー細胞、並びに脾臓及び尾静脈周囲の泡沫状マクロファージは休薬による回復性を示した。これらは、SI-613 に対する異物処理を反映した変化と考えられ、組織障害を伴わなかったことから毒性変化ではないと判断した。

器官重量測定では、最終投与後 1 日に、3 mg/kg の雌で、対照に比べ、肝臓の体重比重量が統計学的に有意に増加した。この変化は肝臓におけるクッパー細胞による異物処理を反映したものと考えられた。

TK 測定では、SI-613 及び DF の全身曝露は 0.3 mg/kg 以上で認められ、投与量の増加に伴う C_{max} 及び AUC_{τ} の増加を確認した。SI-613 及び DF の C_{max} 及び AUC_{τ} には反復投与による増加傾向が認められ、SI-613 では明らかな性差は認められなかったが、DF ではその傾向は雌でより顕著であっ

た。DF-ラクタムの全身曝露は 1 mg/kg 以上の投与 91 及び 182 日にわずかに認められたのみであった。

以上より、最高用量である 3 mg/kg においても毒性変化は認められず、無毒性量は雌雄ともに 3 mg/kg/day と判断した。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

SI-613 の遺伝毒性は、細菌を用いた復帰突然変異試験、ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験及びラットを用いた小核試験より評価した。

2.6.6.4.1 細菌を用いた復帰突然変異試験

〔4.2.3.3.1-1 参照〕

SI-613 の細菌での遺伝子突然変異誘発性の有無を、ネズミチフス菌 TA100、TA1535、TA98、TA1537 及び大腸菌 WP2*uvrA* を用いたプレインキュベーション法により、代謝活性化系（S9 mix）の非存在下及び存在下で評価した。SI-613 は PBS に溶解させ、培地に添加した。用量は 313～5000 µg/plate とした。

S9 mix の有無に関わらず、いずれの試験菌株及び用量においても、復帰変異コロニーの増加は認められなかった。

以上より、SI-613 は本試験菌株に対する遺伝子突然変異誘発性を有しないと判断した。

2.6.6.4.2 ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験

〔4.2.3.3.1-2 参照〕

SI-613 のほ乳類培養細胞での染色体異常誘発性の有無を、チャイニーズハムスター肺由来細胞（CHL/IU 細胞）を用いて、短時間処理法（S9 mix 非存在下及び存在下）及び連続処理法（S9 mix 非存在下）で評価した。SI-613 は PBS に溶解させ、培養液に添加した。用量は、短時間処理法の S9 mix 非存在下では 625～5000 µg/mL、S9 mix 存在下では 1250～5000 µg/mL、連続処理法の S9 mix 非存在下では 313～2500 µg/mL とした。

短時間処理法及び連続処理法ともに、S9 mix の有無に関わらず、いずれの用量においても、染色体の構造異常細胞及び数的異常細胞の増加は認められなかった。

以上より、SI-613 はほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性を有しないと判断した。

2.6.6.4.3 ラットにおける小核試験

〔4.2.3.3.2-1 参照〕

SD ラット（雌雄各 6 匹/群）に SI-613 を 1、3 及び 10 mg/kg の用量で 1 日 1 回、2 日間連日静脈内投与し、小核誘発性の有無を評価した。投与容量は 5 mL/kg とし、SI-613PBS 溶液を投与した。対照群には媒体（PBS）を 5 mL/kg 投与した。最終投与後 24 時間に骨髄塗抹標本を作製し、幼若赤血球を観察した。

いずれの用量においても、小核を有する幼若赤血球の増加は認められなかった。

以上より、SI-613 はラットに対する小核誘発性を有しないと判断した。

2.6.6.5 がん原性試験

SI-613 及び代謝物に遺伝毒性の懸念がないこと、反復投与毒性試験にて膝関節及び全身に前がん病変並びに腫瘍形成を示唆する変化が認められていないこと、並びに SI-613 の構成成分である HA 及び DF の臨床使用において、がん原性を示唆する有害事象が報告されていないことから、SI-613 及び代謝物の膝関節及び全身に対するがん原性懸念は低いと判断した。そのため、がん原性試験は実施しなかった（[redacted]相談（[redacted]）[redacted]（[redacted]、[redacted]年[redacted]月[redacted]日）〔1.13.2-02〕、[redacted]相談[redacted]（[redacted]、[redacted]年[redacted]月[redacted]日）〔1.13.2-04〕）。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

SI-613 の生殖発生毒性は、ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、ラット及びウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験、並びにラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験より評価した。臨床投与経路である膝関節腔内投与では SI-613 の全身曝露が得られないため、投与経路は、SI-613 の確実な全身曝露を目的に静脈内投与とした。

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

〔4.2.3.5.1-1 参照〕

SD ラット（雌雄各 20 匹/群）に SI-613 を 1、3 及び 10 mg/kg の用量で 1 日 1 回、雄は交配前 14 日から剖検前日まで、雌は交配前 14 日から妊娠 7 日まで連日静脈内投与した。投与容量は 5 mL/kg とし、SI-613PBS 溶液を投与した。対照群には媒体（PBS）を 5 mL/kg 投与した。雄は一般状態を観察し、体重、摂餌量及び器官重量の測定、並びに剖検を実施した。雌は一般状態を観察し、体重及び摂餌量を測定し、性周期を観察した。妊娠 13 日に剖検し、着床の有無、黄体数、胚の着床数、生存胚数及び死亡胚数を確認した。

試験期間を通して親動物に SI-613 投与に関連した死亡及び不妊は認められなかった。摂餌量、剖検所見、器官重量、性周期、交尾率、受胎率、交尾成立日数、黄体数、着床数、生存胚数、着床前死亡率及び着床後死亡率に SI-613 投与に関連した変化は認められなかった。

一般状態観察では、10 mg/kg で投与直後に一過性のよろめき歩行、運動性の低下又は不規則呼吸が認められた。

体重測定では、10 mg/kg で妊娠 2 日及び 4 日に体重増加抑制が認められた。この変化は、一時的な変動であり毒性変化ではないと判断した。

以上より、一過性のよろめき歩行、運動性の低下又は不規則呼吸が 10 mg/kg で認められたことから親動物の一般毒性学的無毒性量は雌雄ともに 3 mg/kg/day、受胎能及び初期胚発生に関する無毒性量は 10 mg/kg/day と判断した。

2.6.6.6.2 ラットにおける胚・胎児発生に関する試験

〔4.2.3.5.2-1 参照〕

SD 妊娠ラット（20 匹/群）に SI-613 を 1、3 及び 10 mg/kg の用量で 1 日 1 回、妊娠 7 日から 17 日まで連日静脈内投与した。投与容量は 5 mL/kg とし、SI-613PBS 溶液を投与した。対照群には媒体（PBS）を 5 mL/kg 投与した。母動物は一般状態を観察し、体重及び摂餌量を測定した。妊娠 20 日に剖検し、黄体数、胚・胎児着床数、生存胎児数及び死亡胎児数を確認した。生存胎児については、外表及び性別を確認し、体重及び胎盤重量を測定すると共に、内臓及び骨格を観察した。また、TK サテライト動物（妊娠ラット 5 匹/時点/群）を設け、SI-613、DF 及び DF-ラクタムの血漿中濃度を測定した。

試験期間を通して母動物の死亡及び流産は認められなかった。母動物の体重、摂餌量、剖検所見及び黄体数に SI-613 投与に関連した変化は認められなかった。胚・胎児の着床数、着床前死亡率、着床後死亡率、生存胎児数、死亡胎児数、並びに生存胎児の体重、性比、胎盤重量、外表、内臓及び骨格に SI-613 投与に関連した変化は認められなかった。

母動物の一般状態観察では、10 mg/kg で投与直後に一過性のよろめき歩行及び運動性の低下が認められた。

TK 測定では、1 mg/kg の最終投与日における DF-ラクタムを除き、SI-613、DF 及び DF-ラクタムの全身曝露が認められ、投与量の増加に伴う C_{max} 及び AUC_{τ} の増加を確認した。10 mg/kg の SI-613 の AUC_{τ} 及び 1 mg/kg 以上の DF の C_{max} 及び AUC_{τ} については反復投与による増加が認められ、その他については反復投与による明らかな影響は認められなかった。

以上より、一過性のよろめき歩行及び運動性の低下が 10 mg/kg の母動物で認められたことから、母動物の一般毒性学的無毒性量は 3 mg/kg/day と判断した。母動物の生殖機能及び胚・胎児発生については毒性変化が認められず、無毒性量は 10 mg/kg/day と判断した。

2.6.6.6.3 ウサギにおける胚・胎児発生に関する試験

〔4.2.3.5.2-2 参照〕

New Zealand White（NZW）妊娠ウサギ（20～21 匹/群）に SI-613 を 0.4、1.2 及び 4 mg/kg の用量で 1 日 1 回、妊娠 6 日から 18 日まで連日静脈内投与した。投与容量は 2 mL/kg とし、SI-613PBS 溶液を投与した。対照群には媒体（PBS）を 2 mL/kg 投与した。母動物は一般状態を観察し、体重及び摂餌量を測定した。妊娠 29 日に剖検し、黄体数、胚・胎児着床数、生存胎児数及び死亡胎児数を確認した。生存胎児については外表及び性別を確認し、体重及び胎盤重量を測定すると共に、内臓及び骨格を検査した。また、SI-613、DF 及び DF-ラクタムの血漿中濃度を測定した。

SI-613 投与に関連した母動物の死亡及び流産は認められなかった。母動物の体重、摂餌量、剖検所見、黄体数、胚・胎児着床数及び着床前死亡率に SI-613 投与に関連した変化は認められなかった。着床後死亡率、生存胎児数、死亡胎児数、並びに生存胎児の体重、性比、胎盤重量、外表、内臓及び骨格に SI-613 投与に関連した変化は認められなかった。

母動物の一般状態観察では、4 mg/kg の 1 例で初回投与日の投与直後に一過性の呼吸促迫が認められた。

TK 測定では、0.4 mg/kg の初回投与日を除き、SI-613 及び DF の全身曝露が認められ、投与量の増加に伴う C_{max} 及び AUC_{τ} の増加を確認した。SI-613 の AUC_{τ} 並びに DF の C_{max} 及び AUC_{τ} については反復投与による増加が認められ、SI-613 の C_{max} については反復投与による明らかな影響は認められなかった。DF-ラクタムの全身曝露は 4 mg/kg で確認され、C_{max} 及び AUC_{τ} に反復投与による明らかな影響は認められなかった。

以上より、一過性の呼吸促迫が 4 mg/kg の母動物で認められたことから、母動物の一般毒性学的無毒性量は 1.2 mg/kg/day と判断した。母動物の生殖機能及び胚・胎児発生については毒性変化が認められず、無毒性量は 4 mg/kg/day と判断した。

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

〔4.2.3.5.3-1 参照〕

SD 妊娠ラット（22 匹/群）に SI-613 を 1、3 及び 10 mg/kg の用量で 1 日 1 回、妊娠 7 日から分娩後 20 日まで静脈内投与した。投与容量は 5 mL/kg とし、SI-613PBS 溶液を投与した。対照群には媒体（PBS）を 5 mL/kg 投与した。母動物（F_0）は一般状態を観察し、体重及び摂餌量を測定すると共に、分娩及び哺育能を観察した。母動物は自然分娩させ、分娩が認められなかった母動物は妊娠 25 日に、全ての出生児が死亡した母動物は全出生児が死亡した日に剖検した。自然分娩が認められた母動物は、生後 21 日に出生児を離乳させ剖検した。出生児（F_1）は分娩時の状態及び一般状態を観察し、体重を測定した。さらに、出生 4 日生存率、離乳率、剖検、発育分化、初期行動、感覚機能、オープンフィールドテスト、Biel 型水迷路学習能、生殖器の発育分化、交尾能、受胎能並びに胚（F_2）の着床及び生存を調べた。

試験期間を通して母動物（F_0）の死亡は認められなかった。母動物の体重、摂餌量、剖検所見、分娩及び哺育能に SI-613 投与に関連した変化は認められなかった。出生児（F_1）の分娩時の状態、一般状態、体重、出生 4 日生存率、離乳率、剖検所見、発育分化、初期行動、感覚機能、オープンフィールドテスト、生殖器の発育分化、交尾能、受胎能並びに胚（F_2）の着床及び生存において、SI-613 投与に関連した変化は認められなかった。

母動物（F_0）の一般状態観察では、3 及び 10 mg/kg で、投与直後に一過性のよろめき歩行及び運動性の低下が認められた。

出生児（F_1）の Biel 型水迷路学習能検査では、10 mg/kg の雄で遊泳時間の短縮が認められた。この変化は SI-613 投与の影響の可能性は否定できないが、遊泳時間の短縮であることから毒性変化ではないと判断した。

以上より、一過性のよろめき歩行及び運動性の低下が 3 mg/kg 以上の母動物で認められたことから、母動物（F_0）の一般毒性学的無毒性量は 1 mg/kg/day と判断した。母動物（F_0）の生殖機能及び次世代（F_1）の発生については毒性変化が認められず、無毒性量は 10 mg/kg/day と判断した。

2.6.6.7 局所刺激性試験

SI-613 の局所刺激性は、カニクイザル及びウサギを用いた膝関節腔内投与局所刺激性試験より評価した。投与経路は、臨床投与経路である膝関節腔内投与とした。カニクイザルを用いた試験は臨床製剤と同組成である組成 A の SI-613 製剤を、ウサギを用いた試験は組成 B の SI-613 製剤を使用した（表 2.6.6.1-1）。

2.6.6.7.1 カニクイザルにおける 13 週間反復膝関節腔内投与局所刺激性試験

〔4.2.3.6-1 参照〕

カニクイザル（雌 2 又は 3 匹/群）に SI-613 を 0.2、0.6 及び 2 mg/kg/joint（両膝投与）の用量で 13 週間（4 週 1 回、計 4 回）膝関節腔内投与した。投与容量は 0.02、0.06 及び 0.2 mL/kg/joint とし、SI-613 製剤を用いた。対照群には、生理食塩液を両膝に 0.2 mL/kg/joint の容量で投与した。最終投与後 1 週に各用量 3 匹、最終投与後 4 週に 2 匹を剖検した。膝関節の腫脹及び発熱の有無の観察、一般状態観察、体重測定、膝関節幅の測定、膝関節液検査、並びに膝関節周囲組織の肉眼的観察及び病理組織学的検査を実施した。

膝関節の腫脹及び発熱の有無の観察結果、一般状態、体重並びに膝関節幅に SI-613 投与に関連する変化は認められなかった。

膝関節液検査では、最終投与後 1 週に 0.6 mg/kg 以上で、対照と比較し白血球数が有意な高値を示した。最終投与後 4 週においても 0.6 mg/kg の 1 例の両側膝関節で、対照と比較し白血球数が高値を示した。また、最終投与後 1 週に 2 mg/kg の膝関節液は粘性を有し、一部の個体では淡黄色を呈し、無色透明のゼリー状物又は白色物の浮遊が認められた。最終投与後 4 週では、白血球数の高

値が認められた 0.6 mg/kg の 1 例の膝関節液は淡黄色又は淡赤色を呈し、ゼリー状物質の浮遊が認められた。

膝関節周囲組織の肉眼的観察では、最終投与後 1 週は変化が認められなかった。最終投与後 4 週では、上述の 0.6 mg/kg の 1 例の両側膝関節において、膝蓋骨周囲の滑膜及び膝蓋下脂肪体の淡黄色化、並びに滑膜に散在性の赤色巣が認められた。

病理組織学的検査では、0.2 mg/kg 以上で最終投与後 1 週に、膝関節滑膜における泡沫状マクロファージ、一部に濾胞形成を伴う単核細胞浸潤及び乳頭状増生が認められた。最終投与後 4 週では、上述の 0.6 mg/kg の 1 例の両側膝関節で、乳頭状増生及び単核細胞浸潤が認められ、その他の動物では、いずれの変化も休薬により回復性又は回復傾向を示した。これらは SI-613 に対する異物処理を反映した変化と考えられ、同質の変化は臨床使用実績が豊富で安全性が確認されている膝関節腔内投与 HA 製剤の毒性試験においても認められていること、水腫やフィブリン様物質などの炎症を示唆する変化や滑膜の壊死を伴わないことから毒性変化ではないと判断した。また、上述の 0.6 mg/kg の 1 例の両側膝関節滑膜で、限局性かつ極めて軽度の出血が認められた。この変化は投与用量との関連性がなかったことから、SI-613 投与に関連した変化の可能性は低いと考えられた。投与局所の出血は、投与用量と相関がなく、限局性かつ極めて軽度であったこと、一般状態観察における関節腫脹及び跛行等の機能性障害も認められなかったことから、毒性変化ではないと判断した。回復が遅れたと推察された上述の 0.6 mg/kg の 1 例を除き、いずれの変化も 2 mg/kg で休薬により回復傾向を示した。膝関節液中の白血球数増加、膝関節液の性状変化及び滑膜に認められた肉眼的変化は、滑膜における病理組織学的変化に関連するものと考えられた。

以上より、カニクイザルの膝関節腔内へ SI-613 製剤を 13 週間反復投与したとき、SI-613 は 2 mg/kg/joint/4 weeks まで膝関節への刺激性を有しないと判断した。

2.6.6.7.2 ウサギにおける単回膝関節腔内投与局所刺激性試験（1）

〔4.2.3.6-2 参照〕

NZW ウサギ（雄 6 匹/群）に SI-613 を 0.2、0.5 及び 2 mg/kg/joint（片膝投与）の用量で単回膝関節腔内投与した。投与容量は 0.02、0.05 及び 0.2 mL/kg/joint とし、SI-613 製剤を投与した。対照として、各動物の対側の膝に生理食塩液を 0.02、0.05 及び 0.2 mL/kg/joint の容量で投与した。投与後 1 及び 14 日に各用量 6 匹を剖検した。一般状態観察、体重測定、剖検、膝関節液検査（白血球数）、並びに膝関節周囲組織の肉眼的観察及び病理組織学的検査を実施した。

一般状態、体重、並びに膝周囲組織の肉眼的観察及び病理組織学的検査の結果に SI-613 投与に関連する変化は認められなかった。

膝関節液検査では、白血球数が、投与後 1 日は 0.2 mg/kg/joint 以上で、投与後 14 日は 0.5 mg/kg/joint 以上で、対照と比べ有意な高値を示した。投与後 14 日では、投与後 1 日と比較し、いずれの投与用量においても白血球数が低下し、休薬により回復傾向を示した。膝関節の病理組織

学的検査において刺激性変化が認められなかったことから、膝関節液中の白血球数の高値は刺激性を示す変化ではないと判断した。

以上より、ウサギの膝関節腔内へ SI-613 製剤を単回投与したとき、SI-613 は 2 mg/kg/joint まで膝関節への刺激性を有しないと判断した。

2.6.6.7.3 ウサギにおける単回膝関節腔内投与局所刺激性試験（2）

〔4.2.3.6-3 参照〕

NZW ウサギ（雄 2 又は 3 匹/群）に SI-613 を 2 mg/kg/joint（両膝投与）の用量で単回膝関節腔内投与した。投与容量は 0.2 mL/kg/joint とし、SI-613 製剤を投与した。対照群には、生理食塩液を 0.2 mL/kg/joint の容量で投与した。投与後 2、6 及び 18 箇月に 3 匹、投与後 12 箇月に 2 匹を剖検した。一般状態観察、体重測定、膝関節液検査（白血球数）、並びに膝周囲組織の肉眼的観察及び病理組織学的検査を実施した。さらに、ラットの全身オートラジオグラフィー試験〔2.6.4.4.1.1〕において、投与後 12 週まで放射能が検出された腰リンパ節及び副腎の肉眼的観察及び病理組織学的検査を実施した。

一般状態、体重、膝関節液検査（白血球数）、並びに膝周囲組織の肉眼的観察及び病理組織学的検査の結果に SI-613 投与に関連する変化は認められなかった。

以上より、ウサギの膝関節腔内へ SI-613 製剤を単回投与したとき、SI-613 は 2 mg/kg/joint で膝関節への刺激性を有しないと判断した。また、腰リンパ節及び副腎にも影響を及ぼさないと判断した。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 光毒性試験

〔4.2.3.7.7-1 参照〕

SI-613 の光毒性の有無を、Balb/c 3T3 細胞を用いたニュートラルレッド取り込み法により評価した。SI-613PBS 溶液を培養液に添加した。用量は、太陽光照射及び非照射ともに 0.781～100 μg/mL とした。

太陽光照射の有無に関わらず、いずれの用量においても、細胞毒性作用は認められなかった。SI-613 の光毒性係数は算出不可、平均光作用は 0.008 を示し、SI-613 は非光毒性物質と判定された。

以上より、SI-613 は Balb/c 3T3 細胞に対する光毒性を有しないと判断した。

2.6.6.8.2 細胞毒性試験

〔4.2.3.7.7-2 参照〕

SI-613 の細胞毒性の有無を、V79 細胞を用いたコロニー形成法により評価した。SI-613 製剤を培地に添加した。用量は、SI-613 濃度で 47～350 µg/mL とした。

280 µg/mL 以上で細胞増殖抑制作用が認められ、50%阻害濃度（IC_{50}）は 263 µg/mL と算出された。

以上より、SI-613 は 280 µg/mL 以上で V79 細胞に対する細胞毒性を有すると判断した。

2.6.6.8.3 代謝物の安全性評価

ヒト血漿中において SI-613 関連物質の総曝露量の 10%を超える代謝物は DF、DF-ラクタム及び DF-HA4mer であった。ICH M3（R2）ガイドラインに基づき、これらの代謝物の一般毒性、生殖発生毒性及び遺伝毒性を評価した。代謝物について、SI-613 のカニクイザルを用いた 53 週間反復投与毒性試験、ラットを用いた胚・胎児試験及びラットを用いた小核試験における曝露量及びヒトにおける曝露量を比較した結果、DF 及び DF-HA4mer はいずれの毒性試験も曝露量がヒトにおける曝露量を超えていた。DF-HA4mer の曝露量は、毒性試験又は別途実施した薬物動態試験の結果から確認した〔2.6.4.8.3〕。DF-ラクタムは、SI-613 のラットを用いた小核試験における曝露量のみがヒトの曝露量を下回っていた。そのため、DF-ラクタムの in vitro 及び in vivo 遺伝毒性試験を実施し、遺伝毒性を評価した。

2.6.6.8.3.1 ジクロフェナクラクタムの細菌を用いた復帰突然変異試験

〔4.2.3.7.5-1 参照〕

DF-ラクタムの細菌での遺伝子突然変異誘発性の有無を、ネズミチフス菌 TA100、TA1535、TA98、TA1537 及び大腸菌 WP2*uvrA* を用いたプレインキュベーション法により、S9 mix の非存在下及び存在下で評価した。DF-ラクタムはジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解させ、培地に添加した。用量は、S9 mix 非存在下の TA1535、TA98 及び TA1537、並びに S9 mix 存在下の TA1537 では 9.77～625 µg/plate、S9 mix 非存在下の TA100 並びに S9 mix 存在下の TA1535 及び TA98 では 19.5～625 µg/plate、S9 mix 非存在下の WP2*uvrA* 並びに S9 mix 存在下の TA100 及び WP2*uvrA* では 313～5000 µg/plate とした。

S9 mix の有無に関わらず、いずれの試験菌株及び用量においても、復帰変異コロニーの増加は認められなかった。

以上より、DF-ラクタムは本試験菌株に対する遺伝子突然変異誘発性を有しないと判断した。

2.6.6.8.3.2 ジクロフェナクラクタムのほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験

〔4.2.3.7.5-2 参照〕

DF-ラクタムのほ乳類培養細胞での染色体異常誘発性の有無を、CHL/IU 細胞を用いて、短時間処理法（S9 mix 非存在下及び存在下）及び連続処理法（S9 mix 非存在下）で評価した。DF-ラクタムは DMSO に溶解させ、培養液に添加した。観察用量は、短時間処理法の S9 mix 非存在下及び存在下では 30～140 μg/mL、及び連続処理法の S9 mix 非存在下では 5～40 μg/mL とした。

短時間処理法及び連続処理法ともに、S9 mix の有無に関わらず、いずれの用量においても、染色体の構造異常細胞の増加は認められなかった。一方、短時間処理法の S9 mix 非存在下及び存在下において、80～140 μg/mL の用量で倍数体を有する数的異常細胞の増加が認められ、用量依存性も認められた。

以上より、DF-ラクタムは、ほ乳類培養細胞に対する染色体の構造異常誘発性を有しないが、数的異常誘発性（倍数性）を有すると判断した。

2.6.6.8.3.3 ジクロフェナクラクタムのラットにおける小核試験

〔4.2.3.7.5-3 参照〕

SD ラット（雄 6 匹/群）に DF-ラクタムを 2、6 及び 18 mg/kg の用量で 1 日 1 回、2 日間連日皮下投与し、小核誘発性の有無を評価した。投与容量は 10 mL/kg とした。対照群には、媒体（0.5%メチルセルロース）を 10 mL/kg 投与した。最終投与後 24 時間に骨髄塗抹標本を作製し、雄 5 匹/群の幼若赤血球を観察した。TK サテライト動物（雄 3 匹/時点/群）を設け、DF-ラクタムの血漿中濃度を測定した。

いずれの用量においても、小核を有する幼若赤血球の増加は認められなかった。

TK 測定では、2 mg/kg 以上で DF-ラクタムの全身曝露が認められ、投与量の増加に伴う C_{max} 及び 0 から最終測定可能時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-last}}$）の増加を確認した。

以上より、DF-ラクタムは、ラットに対する小核誘発性を有しないと判断した。

2.6.6.8.4 不純物の安全性評価

SI-613 原薬及び製剤に含まれる可能性がある不純物のうち、規格として ICH Q3A ガイドライン及び ICH Q3B ガイドラインの安全性確認の閾値を超える不純物は認められなかった〔3.2.S.3.2〕。そのため、ICH Q3A 及び ICH Q3B ガイドラインに基づいた安全性評価は行わなかった。

SI-613 原薬及び製剤に含まれる可能性のある 12 不純物〔3.2.S.3.2〕について、ICH M7 ガイドラインに基づき、in silico ツールを用いて変異原性を評価した。

2.6.6.8.4.1 不純物の In silico 変異原性評価

〔4.2.3.7.6-1 参照（参考資料）〕

表 2.6.6.8-1 に示す 12 不純物について、2 種類の in silico ツールを用いて変異原性の有無を評価した。in silico ツールは、知識ベースの Derek（Lhasa Ltd.製 Derek Nexus: 5.0.2、Nexus: 2.1.1）及び統計ベースの CASE Ultra（MultiCASE Inc.製 CASE Ultra Version: 1.6.2.1）又は Sarah（Lhasa Ltd.製 Sarah Nexus: 2.0.1）を使用した。

2 不純物（不純物A*及び不純物B*）は知識ベース及び統計ベースともに「警告構造あり」、1 不純物（不純物C*）は知識ベースでは「警告構造なし」、統計ベースでは「警告構造あり」、他 9 不純物は知識ベース及び統計ベースともに「警告構造なし」と判定された。

以上より、「警告構造あり」と判定された 3 不純物（不純物A*、不純物B* 及び 不純物C*）は変異原性を有し、他 9 不純物は変異原性を有しないと予測された。

表 2.6.6.8-1. In silico 変異原性予測の被験不純物

物質番号	不純物名	化学名
1	不純物A*	不純物A*
2	不純物D*	不純物D*
3	不純物B*	不純物B*
4	不純物E*	不純物E*
5	不純物F*	不純物F*
6	不純物C*	不純物C*
7	不純物G*	不純物G*
8	不純物H*	不純物H*
9	不純物I*	不純物I*
10	不純物J*	不純物J*
11	不純物K*	不純物K*
12	不純物L*	不純物L*

2.6.6.9 添加剤の安全性評価

〔4.2.3.2-1 参照〕

SI-613 製剤に含まれる添加剤はマクロゴール 400、クエン酸水和物及びクエン酸ナトリウム水和物である。SI-613 製剤に含まれる各添加剤の量は、静脈内投与の使用実績量を下回ることから、全身曝露によるヒトで確認されていると判断した。SI-613 の臨床投与経路である膝関節腔内投与による、添加剤の膝関節に対する刺激性を評価した。

＊ 新薬承認情報提供時に置き換え

プラセボ製剤を用いて添加剤の膝関節における刺激性を評価した。独立した試験は実施せず、カニクイザルを用いた 4 週 1 回投与による 53 週間反復膝関節腔内投与毒性試験にプラセボ製剤を投与した群を組み込み評価した（2.6.6.3.1）。投与容量は 0.2 mL/kg/joint とした。投与した添加剤量は、マクロゴール 400 は 12.6 mg/kg/joint、クエン酸水和物は[redacted]mg/kg/joint、クエン酸ナトリウム水和物は[redacted]mg/kg/joint とした。

試験期間を通して死亡は認められなかった。一般状態、体重、摂餌量、摂水量、膝関節幅、心電図、呼吸数、血圧、体温、並びに眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検、器官重量測定、病理組織学的検査及び膝関節液検査の結果にプラセボ製剤投与に関連した変化は認められなかった。

以上より、カニクイザルの膝関節腔内へ添加剤を 53 週間反復投与したとき、マクロゴール 400 は 12.6 mg/kg/joint/4 weeks、クエン酸水和物は[redacted]mg/kg/joint/4 weeks、クエン酸ナトリウム水和物は[redacted]mg/kg/joint/4 weeks まで、膝関節への刺激性を有しないと判断した。

2.6.6.10 ヒト及び各動物種の膝関節体積の測定試験

〔4.2.3.7.7-3 参照（参考資料）〕

毒性試験における投与用量をヒトに外挿するため、各種動物の膝関節体積をヒトと比較した。

健康成人（56 歳～69 歳の日本人女性 5 名）並びにカニクイザル、ビーグル犬、NZW ウサギ及び SD ラット（各雌 5 匹）の左膝関節のエックス線画像を撮影し、画像解析により膝関節（大腿骨遠位部）体積を算出した。

エックス線画像から算出した膝関節体積の平均値は、ヒトが[redacted]cm^3、カニクイザルが[redacted]cm^3、イヌが[redacted]cm^3、ウサギが[redacted]cm^3、ラットが[redacted]cm^3 であった。

ヒトの膝関節体積を各動物の膝関節体積で除した相対比率から、ヒトの膝関節体積はカニクイザルの 53.6 倍、イヌの 23.5 倍、ウサギの 76.9 倍、ラットの 854.1 倍と算定された。

2.6.6.11 考察及び結論

2.6.6.11.1 SI-613 の安全性評価概括

SI-613 の安全性評価のため、各種動物を用いて膝関節腔内及び静脈内投与毒性試験を実施した結果、SI-613 に対する異物処理を反映した変化及び SI-613PBS 溶液の粘弾性に起因した変化が認められた。表 2.6.6.11-1 に主な変化を示す。

SI-613 をイヌ及びカニクイザルに膝関節腔内投与したときの本質的な変化は、HA を含む SI-613 を異物と認識した生体反応、すなわちマクロファージ系細胞による貪食及び適応性変化を含む膝関節腔内での異物処理を反映した変化で、これには滑膜における泡沫状マクロファージ、多核巨細胞、集簇したマクロファージの限局性壊死、単核細胞浸潤並びに滑膜の乳頭状増生が含まれた。これらと同質の変化は、臨床使用実績が豊富で安全性が確認されている膝関節腔内投与 HA 製剤の毒性試験においても認められている [2] [3] [4] ことから、臨床において問題となる変化ではなく、毒性変化ではないと判断した。臨床製剤と同組成の製剤をカニクイザルに膝関節腔内投与したときには、上記の SI-613 に対する異物処理を反映した変化以外に影響は認められなかったが、臨床製剤と組成が異なる高粘弾性の SI-613PBS 溶液をイヌに膝関節腔内投与したときには、異物処理を反映した変化に加え、滑膜の水腫やフィブリン様物質を伴う炎症及びそれに関連すると考えられる滑膜の線維化が認められた。高粘弾性の投与液は関節腔内への投与により炎症を惹起することが報告されている [5] ことから、イヌで認められた炎症及び線維化は粘弾性の高い投与液に特有の変化と考えられ、粘弾性の低い臨床製剤では生じない毒性変化と判断した。なお、SI-613 の膝関節腔内投与による全身に対する毒性変化は認められなかった。

SI-613 をラットに静脈内投与したとき、SI-613 の全身への高曝露に伴い、脾臓における泡沫状マクロファージ、肝臓における泡沫状クッパー細胞並びに肺における多核巨細胞を伴う肉芽腫が認められた。これらは、上述した膝関節腔内投与時における異物処理を反映した変化と同様、SI-613 に対するマクロファージ系細胞の異物処理を反映した変化と考えられ、組織障害を伴わなかったことから、毒性変化ではないと判断した。また、静脈内投与直後の運動性の低下や不規則呼吸などの一般状態変化、血圧低下及び肝逸脱酵素の高値が一過性に認められたが、粘弾性の高い投与液を静脈内に投与したときに認められる変化 [6] [7] であり、当該試験に用いた投与液の粘弾性の高さに起因する毒性変化と考えられた。SI-613 は静脈内に直接投与されないことを踏まえると、この変化が臨床使用で生じる可能性は低いと考えられた。なお、SI-613 の静脈内投与による膝関節に対する毒性変化は認められなかった。

以上、SI-613 を膝関節腔内及び静脈内投与したとき、SI-613 に対する異物処理を反映した変化が認められたが、これらは毒性変化ではないと判断した。一方、いずれの投与経路においても、投与液の高い粘弾性（物性）に起因する毒性変化が認められた。前者は膝関節への臨床使用で問題となるものではなく、後者は臨床使用では生じないと考えられた。

SI-613 の遺伝毒性、生殖発生毒性及び光毒性などの特殊毒性試験においては、臨床使用において問題となる変化は認められなかった。

表 2.6.6.11-1. SI-613 の毒性試験で認められた主な変化

投与経路	膝関節腔内		静脈内
投与液	SI-613 製剤	SI-613PBS 溶液	SI-613PBS 溶液
毒性ではない変化（SI-613 に対する異物処理を反映した変化）	病理組織学的検査 膝関節滑膜： 泡沫状マクロファージ、多核巨細胞、マクロファージの限局性壊死、単核細胞浸潤、乳頭状増生		病理組織学的検査 脾臓：泡沫状マクロファージ 肝臓：泡沫状クッパー細胞 肺：多核巨細胞を伴う肉芽腫
毒性変化（SI-613PBS 溶液の高粘弾性に起因した変化[a]）	-	病理組織学的検査 膝関節滑膜： 水腫及びフィブリン様物質を伴う炎症、線維化	一般状態観察：一過性のよろめき歩行、運動性の低下、不規則呼吸、呼吸促迫、口腔粘膜、眼瞼結膜、耳介の蒼白、腹臥位 生理機能検査：一過性の血圧低下 血液生化学的検査：一過性の ALT 高値

- 該当する変化なし

a SI-613PBS 溶液に比べ粘弾性の低い臨床製剤を用いる臨床使用において問題とならない変化

2.6.6.11.2 各種動物の投与用量のヒトへの外挿値

各種動物の投与用量のヒトへの外挿値は、ヒト及び各種動物の膝関節体積の測定試験の結果（2.6.6.10）から算出した。膝関節体積比より算出した膝関節腔内投与試験における SI-613 の投与用量と申請用量との比を表 2.6.6.11-2 に示した。

表 2.6.6.11-2. 各動物種における投与用量と申請用量との比

種	膝関節体積（cm^3）	投与用量		膝関節体積あたりの投与用量[e]（mg/cm^3）	申請用量との比[f]
		mg/kg/joint	mg/joint		
ヒト	[redacted]		30	[redacted]	
カニクイザル	[redacted]	2[a]	6.056[d]	[redacted]	11
ウサギ	[redacted]	2[b]	5.288[d]	[redacted]	14
イヌ	[redacted]	3[c]	23.04[d]	[redacted]	18

a カニクイザルを用いた 53 週間反復膝関節腔内投与毒性試験の無毒性量

b ウサギを用いた単回膝関節腔内投与局所刺激性試験で刺激性が認められなかった用量

c イヌを用いた 13 週間反復膝関節腔内投与毒性試験で毒性が認められた用量

d X 線画像解析を実施した動物の平均体重から算出

e 各動物種における投与用量（mg/joint）÷膝関節体積（cm^3）

f 各動物種の膝関節体積あたりの投与用量（mg/cm^3）÷ヒトの膝関節あたりの投与用量（mg/cm^3）

2.6.6.11.3 膝関節に対する安全性について

SI-613 の膝関節に対する安全性は、膝関節腔内投与によるカニクイザル、ウサギ及びイヌを用いた試験（2.6.6.3.1、2.6.6.3.2、2.6.6.3.3、2.6.6.7.1、2.6.6.7.2、2.6.6.7.3）の結果より考察した。カニクイザル及びウサギを用いた試験は SI-613 製剤を、イヌを用いた試験は SI-613PBS 溶液を使用した。

カニクイザルを用いた試験では、申請用量の 11 倍相当量（表 2.6.6.11-2）までの SI-613 製剤を 4 週に 1 回の頻度で 13、21 又は 53 週間反復膝関節腔内投与した。13 週間反復投与により、膝関節滑膜に泡沫状マクロファージ、単核細胞浸潤及び乳頭状増生が認められた。21 週間及び 53 週間反復投与では、上記変化に加え、膝関節滑膜に多核巨細胞及びマクロファージの限局性壊死が認められた。53 週間反復投与では、上記変化に加え、膝関節滑膜に好酸性物質が認められた。いずれの変化も休薬により回復性又は回復傾向を示した。泡沫状マクロファージは、HA が組織中に残留した際に認められる変化として知られており [4] 、異物処理のためにマクロファージが SI-613 を貪食した像と考えられた。多核巨細胞は、泡沫状マクロファージによる異物処理の長期化に伴い続発する変化と考えられた [8] 。限局性壊死は、好酸性で凝固壊死様の組織像を呈し、周囲に細胞質が好酸性化したマクロファージが多数集簇していた。この変化はマクロファージマーカーである抗 CD68 抗体に陽性を示した [9] ことから、異物処理のために集簇したマクロファージが異物処理能力に対する過剰負荷により壊死した像と判断した。好酸性物質は、細胞成分を含まない構造体であり、SI-613 の構成成分である HA を染色するコロイド鉄染色で陰性であった。好酸性物質の由来の特定には至らなかったが、病理像より、SI-613 由来の物質と推察された。この変化は 53 週間反復投与でのみ認められたことから、長期投与によりマクロファージの異物処理能力を超えた SI-613 由来物質が可視化した像と考えられた。また、単核細胞浸潤及び乳頭状増生は、膝関節腔内投与 HA 製剤の毒性試験において認められる変化 [2] [3] であり、膝関節に残留する SI-613 に対する適応性の変化と考えられた。以上より、膝関節滑膜にみられた病理組織学的変化はいずれも SI-613 を異物認識した生体による生理的反応の範疇の変化と考えられ、さらに、滑膜に水腫やフィブリン様物質などの炎症を示唆する変化や滑膜の壊死は認められなかったことから、刺激性を示す変化つまり毒性変化ではないと判断した。

ウサギを用いた試験では、申請用量の 14 倍相当量（表 2.6.6.11-2）までの SI-613 製剤を単回膝関節腔内投与した。単回投与後 18 箇月まで刺激性を示す変化は認められなかった。

イヌを用いた試験では、申請用量の 18 倍相当量（表 2.6.6.11-2）までの SI-613 を PBS に溶解した投与液を 1 週に 1 回又は 4 週に 1 回の頻度で、4 週又は 13 週間反復膝関節腔内投与した。4 週間及び 13 週間反復投与において、カニクイザルを用いた試験同様、異物処理を反映した変化として膝関節滑膜に泡沫状マクロファージ、単核細胞浸潤及び乳頭状増生が認められた。上記変化の他、4 週間反復投与では、膝関節滑膜の線維化並びに下腿部の線維化及び水腫が、13 週間反復投与では、これらの変化に加え、膝関節滑膜に水腫及びフィブリン様物質を伴うマクロファージ及びリンパ球主体の炎症が認められたが、一般状態観察において膝関節の腫脹、発熱及び機能障害性変化は認められなかった。そのため、膝関節滑膜の炎症は毒性変化であるが重篤な変化ではないと考えられた。さらに、イヌを用いた試験で使用した SI-613PBS 溶液は、SI-613 製剤と比較し高粘弾性である [1] 。高粘弾性物質の関節腔内投与では、関節に炎症が誘発されることが報告されている [5] ことか

ら、膝関節滑膜の炎症は、投与液の粘弾性の高さに起因した変化と考えられ、臨床使用では生じない変化であると判断した。SI-613 の膝関節に対する安全性のヒトへの外挿は、投与液の粘弾性の高さによる影響を排除した上で行う必要があると考え、SI-613 製剤を用いた試験結果から考察することが適切と判断した。

以上より、SI-613PBS 溶液を用いた試験で炎症が認められたが、SI-613 製剤を用いた試験では、SI-613 に対する異物処理を反映した変化のみが認められ、毒性変化は認められなかった。SI-613 製剤を用いた試験で認められた変化と同質の変化は、臨床使用実績が豊富で安全性が確認されている膝関節腔内投与 HA 製剤の毒性試験において認められる変化 [(2)] [(3)] [(4)] であり、滑膜に水腫やフィブリン様物質などの炎症を示唆する変化や滑膜の壊死は認められなかった。さらに、SI-613 の臨床試験において膝の重篤な副作用発現は認められていないことから、SI-613 の膝関節に対する安全性の懸念はないと判断した。

2.6.6.11.4 全身に対する安全性について

SI-613 の全身に対する安全性は、臨床投与経路である膝関節腔内投与によるカニクイザル及びイヌを用いた反復投与毒性試験（2.6.6.3.1、2.6.6.3.2、2.6.6.3.3）並びに代替投与経路である静脈内投与によるラット及びイヌを用いた単回投与毒性試験（2.6.6.2.1、2.6.6.2.2）及びラットを用いた反復投与毒性試験（2.6.6.3.4、2.6.6.3.5）の結果より考察した。SI-613 をヒトに単回膝関節腔内投与したとき、SI-613 の全身曝露は確認されなかった〔2.7.6.1.6〕ことから、膝関節腔内投与による毒性試験における全身に対する影響の安全域は、毒性試験における投与用量と申請用量による比較から考察した。SI-613 が全身曝露されたときの影響は、静脈内投与による毒性試験の結果から考察した。

臨床投与経路である膝関節腔内投与では、イヌを用いた 4 及び 13 週間、並びにカニクイザルを用いた 53 週間反復試験において、投与可能な最大用量においても全身に SI-613 投与に関連した変化は認められなかった。上述の用量は、申請用量（0.5 mg/kg：30 mg の SI-613 を 60 kg のヒトに投与）と比較して、イヌで 12 倍、カニクイザルで 8 倍相当である。

代替投与経路である静脈内投与では、ラットを用いた 4 週間及び 26 週間反復試験において、肝臓に泡沫状のクッパー細胞、脾臓に泡沫状マクロファージ及び肺に多核巨細胞からなる小肉芽腫が認められた。肝臓における泡沫状のクッパー細胞及び脾臓における泡沫状マクロファージは、休薬により回復性を示し、周囲組織の傷害性を伴わなかった。肺における小肉芽腫は、休薬により回復性を示さなかったが、4 週間及び 26 週間投与で変化の程度に差はなかったことから、進行する変化ではないと考えられた。また、呼吸機能への影響は認められなかった。これらは、いずれもマクロファージ系細胞の変化であり、SI-613 の全身曝露が確認されていることから、各臓器へ分布した SI-613 に対する異物処理を反映した変化と考えられた。また、上述の変化は、SI-613 の全身曝露が確認されなかった膝関節腔内投与では認められていないことから、SI-613 の高曝露に起因する変化と考えられた。

さらに静脈内投与では、ラットを用いた試験において、投与直後に一過性のよろめき歩行、運動性の低下、不規則呼吸及び腹臥位が、イヌを用いた試験において、一過性の運動性の低下、血圧低下、ALT の高値、並びに口腔粘膜、眼瞼結膜及び耳介の蒼白が認められた。これらの試験では、粘弾性の高い SI-613PBS 溶液を使用した。粘弾性の高い投与液を静脈内投与したとき、血圧低下、呼吸抑制、自発運動減少及び尾の白色化が認められた [6] [7] との報告がある。また、血圧低下が認められた 1 例において ALT の高値が認められたが、血圧低下に伴う肝血流量低下により、ALT が高値を示すことが知られている [10] ことから、ALT の高値は血圧低下に伴う変化と考えられた。上述の変化は、いずれも膝関節腔内投与では認められていないことから、粘弾性の高い投与液を静脈内投与したことに起因して生じる、一過性の変化と考えられた。

以上より、SI-613 の静脈内投与では、全身に、SI-613 の高曝露に起因する変化及び粘弾性の高い投与液を静脈内投与したことに起因する変化が認められたが、いずれの変化も膝関節腔内投与による毒性試験では認められなかった。また、SI-613 は膝関節腔内投与時に全身曝露されない〔2.7.6.1.6〕こと、静脈内に直接投与されないことを踏まえると、これらの変化が SI-613 の臨床使用で生じる可能性は低いと考えられ、SI-613 の全身に対する安全性の懸念はないと判断した。

2.6.6.11.5 遺伝毒性について

SI-613 の遺伝毒性は、細菌を用いた復帰突然変異試験（2.6.6.4.1）、ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験（2.6.6.4.2）及びラットを用いた小核試験（2.6.6.4.3）の結果より評価した。

いずれの試験も陰性であった。また、ラットを用いた小核試験の最高用量（10 mg/kg）における SI-613 の C_{max} は、申請用量の SI-613 をヒトに単回膝関節腔内投与したときの全身曝露に対し、143.8 倍高値であった（表 2.6.6.11-3）。

以上より、SI-613 の遺伝毒性を有しないと判断した。

表 2.6.6.11-3. ラットにおける小核試験とヒトにおける申請用量投与時の血漿中 SI-613 曝露比較

種	投与量	SI-613 の全身曝露量 C_{max}（μg/mL）	曝露比較 [d]
ヒト [a]	30 mg	BLQ（<0.2 μg/mL）	
ラット [b]	10 mg/kg[c]	28.76	143.8

a 日本人の健康成人男性に SI-613 を 30 mg を単回膝関節腔内投与したときの C_{max}

b ラットを用いた 4 週間反復投与毒性試験の初回投与における C_{max}

c ラットを用いた小核試験における陰性用量

d （小核試験の最高用量における C_{max}）／（ヒトにおける定量下限値）

2.6.6.11.6 生殖発生毒性について

SI-613 の生殖発生毒性は、ラットを用いた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）、ラット及びウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験（2.6.6.6.2、2.6.6.6.3）、並びにラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験（2.6.6.6.4）の結果より評価した。SI-613 の臨床投与経路である膝関節腔内投与では、生殖発生毒性の評価に十分な SI-613 の全身曝露が得られないため、SI-613 を全身に確実に曝露させることが可能な静脈内投与により評価した。

いずれの試験も、最高用量まで生殖発生毒性は認められなかった。また、生殖発生毒性試験の最高用量（ラット：10 mg/kg、ウサギ：4 mg/kg）における SI-613 の C_{max} は、申請用量の SI-613 をヒトに単回膝関節腔内投与したときの全身曝露に対し、197.90 倍及び 127.15 倍高値であった（表 2.6.6.11-4）。

以上より、SI-613 の生殖発生毒性に対する安全性の懸念はないと判断した。

表 2.6.6.11-4. 生殖発生毒性試験とヒトにおける申請用量投与時の血漿中 SI-613 曝露比較

種	投与量	SI-613 の全身曝露量	曝露比較 [f]
		C_{max}（μg/mL）	
ヒト [a]	30 mg	BLQ（<0.2 μg/mL）	
ラット [b]	10 mg/kg[d]	39.58	197.90
ウサギ [c]	4 mg/kg[e]	25.43	127.15

a 日本人の健康成人男性に SI-613 を 30 mg を単回膝関節腔内投与したときの C_{max}

b ラットを用いた胚・胎児試験における妊娠 7 日の C_{max}

c ウサギを用いた胚・胎児試験における妊娠 6 日の C_{max}

d ラットの受胎能、母動物の生殖機能、初期胚発生、胚・胎児発生及び次世代発生に関する無毒性量

e ウサギの母動物の生殖機能及び胚・胎児発生に関する無毒性量

f （生殖発生毒性に関する無毒性量における C_{max}）／（ヒトにおける定量下限値）

2.6.6.11.7 光毒性について

SI-613 の光毒性は、Balb/c 3T3 細胞を用いたニュートラルレッド取り込み法による光毒性試験（2.6.6.8.1）の結果より評価した。SI-613 は非光毒性物質と判定された。

以上より、SI-613 の光毒性作用を有しないと判断した。

2.6.6.11.8 細胞毒性について

SI-613 の細胞毒性は、V79 細胞を用いたコロニー形成法による細胞毒性試験（2.6.6.8.2）の結果より評価した。280 μg/mL 以上の用量で細胞増殖抑制作用が認められた。

細胞増殖抑制は、細胞障害作用又は細胞周期の停止作用を反映した変化と考えられたが、いずれの膝関節腔内投与毒性試験においても、膝関節に壊死及びアポトーシスは認められず、いずれの膝関節腔内及び静脈内投与毒性試験においても、細胞分裂が活発な骨髄、消化管及び免疫系組織に細胞増殖抑制を示唆する変化は認められなかった。

以上より、SI-613 の細胞毒性に対する安全性の懸念はないと判断した。

2.6.6.11.9 代謝物の安全性について

代謝物の安全性は、ICH M3（R2）ガイドラインに基づき評価した。申請用量の SI-613 をヒトに単回膝関節腔内投与したときの薬物動態から、代謝物の全身曝露の割合を算出した結果、DF、DF-ラクタム及び DF-HA4mer が総曝露量の 10%を上回っていた（表 2.6.6.11-5）。そのため、DF、DF-ラクタム及び DF-HA4mer の安全性を評価した。

SI-613 の一般毒性試験、胚・胎児試験及びラットを用いた小核試験の無毒性量又は陰性用量における各代謝物の曝露量と、申請用量の SI-613 をヒトに単回膝関節腔内投与したときの曝露量を比較した（表 2.6.6.11-6～表 2.6.6.11-8）。SI-613 を用いた毒性試験の無毒性量又は陰性用量における DF 及び DF-HA4mer の曝露量は、ヒトにおける曝露量を上回ることを確認した。そのため、DF 及び DF-HA4mer の安全性は、SI-613 を用いた毒性試験にて担保可能と判断した。SI-613 を用いた一般毒性試験及び胚・胎児試験の無毒性量における DF-ラクタムの曝露量は、ヒトにおける曝露量を上回ることを確認した。そのため、DF-ラクタムの安全性は、一般毒性及び生殖発生については、SI-613 を用いた毒性試験にて担保可能と判断した。しかし、遺伝毒性については、SI-613 の小核試験における DF-ラクタムの曝露量がヒトの 0.2 倍であった。そのため、DF-ラクタムの細菌を用いた復帰突然変異試験、ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験及びラットを用いた小核試験を実施し、その安全性を確認した（2.6.6.8.3.1、2.6.6.8.3.2、2.6.6.8.3.3）。染色体異常試験において数的異常誘発性（倍数性）が認められたが、構造異常誘発性は認められず、復帰突然変異試験及び小核試験はいずれも陰性であった。小核試験の最高用量（18 mg/kg）における DF-ラクタムの血漿中濃度-時間曲線下面積（AUC）は、申請用量の SI-613 をヒトに単回膝関節腔内投与したときの全身曝露に対し、69.2 倍高値であった（表 2.6.6.11-9）。これらのことから、DF-ラクタムは染色体異常試験において数的異常誘発性を示したものの、臨床上の安全性懸念はないと判断した。

以上より、代謝物の安全性に懸念はないと判断した。

表 2.6.6.11-5. 日本人健康成人男性に申請用量の SI-613 単回膝関節腔内投与時の総曝露量に対する代謝物の割合

SI-613 又は代謝物	$AUC_{0\text{-last}}$ (ng·h/mL)	総曝露量に対する割合 [b] (%)
SI-613	算出不可 [a]	0
DF	64.46	28
DF-ラクタム	38.06	16
DF-HA4mer	129.71	56

a SI-613 は血漿中濃度が、全時点で定量下限未満であったため、$AUC_{0\text{-last}}$ は算出できなかった。

b 総曝露量に対する割合は、SI-613 の $AUC_{0\text{-last}}$ を 0 として計算した。

（各代謝物の $AUC_{0\text{-last}}$）/（SI-613 と各代謝物の $AUC_{0\text{-last}}$ の和）×100

表 2.6.6.11-6. SI-613 毒性試験とヒトにおける申請用量投与時の血漿中 DF 曝露比較

種（毒性試験の種類）	投与量	DF の全身曝露		曝露比較 [j]
		C_{max}（ng/mL）	AUC（ng·h/mL）	
ヒト [a]	30 mg	0.808	64.46	
カニクイザル [b]（一般毒性）	4 mg/kg[e]	19.57[f]	481.6[g]	7.5
ラット [c]（胚・胎児）	10 mg/kg[e]	11.03[f]	2263.8[h]	35.1
ラット [d]（小核）	10 mg/kg[e]	7.196[f]	261.2[i]	4.1

a 日本人の健康成人男性に SI-613 を 30 mg を単回膝関節腔内投与したときの全身曝露量

b カニクイザルを用いた 53 週間反復投与毒性試験の全身曝露量

c ラットを用いた胚・胎児試験の全身曝露量

d ラットを用いた 4 週間反復投与毒性試験の全身曝露量

e 無毒性量又は陰性用量

f 初回投与における雄又は妊娠雌の C_{max}

g 初回投与における雄の AUC_{τ}（τ : 28 日）

h 初回投与における妊娠雌の AUC_{τ}（205.8 ng·h/mL、τ : 24 時間）に基づく 11 日間の累積換算

i 初回投与における雄の AUC_{τ}（130.6 ng·h/mL、τ : 24 時間）に基づく 2 日間の累積換算

j （毒性試験における AUC）／（ヒトにおける AUC）

表 2.6.6.11-7. SI-613 毒性試験とヒトにおける申請用量投与時の血漿中 DF-ラクタム曝露比較

種 （毒性試験の種類）	投与量	DF-ラクタムの全身曝露		曝露比較 [j]
		C_{max}（ng/mL）	AUC（ng·h/mL）	
ヒト [a]	30 mg	0.358	38.06	
カニクイザル [b]（一般毒性）	4 mg/kg[e]	11.29[f]	357.5[g]	9.4
ラット [c]（胚・胎児）	10 mg/kg[e]	4.647[f]	55.044[h]	1.4
ラット [d]（小核）	10 mg/kg[e]	2.598[f]	8.792[i]	0.2

a 日本人の健康成人男性に SI-613 を 30 mg を単回膝関節腔内投与したときの全身曝露量

b カニクイザルを用いた 53 週間反復投与毒性試験の全身曝露量

c ラットを用いた胚・胎児試験の全身曝露量

d ラットを用いた 4 週間反復投与毒性試験の全身曝露量

e 無毒性量又は陰性用量

f 初回投与における雄又は妊娠雌の C_{max}

g 初回投与における雄の AUC_{τ}（τ : 28 日）

h 最終投与における妊娠雌の AUC_{τ}（5.004 ng·h/mL、τ : 24 時間）に基づく 11 日間の累積換算

i 初回投与における雄の AUC_{τ}（4.396 ng·h/mL、τ : 24 時間）に基づく 2 日間の累積換算

j （毒性試験における AUC）／（ヒトにおける AUC）

表 2.6.6.11-8. SI-613 毒性試験とヒトにおける申請用量投与時の血漿中 DF-HA4mer 曝露比較

種 （毒性試験の種類）	投与量	DF-HA4mer の全身曝露		曝露比較 [h]
		C_{max}（ng/mL）	AUC（ng·h/mL）	
ヒト [a]	30 mg	0.278	129.71	
カニクイザル [b]（一般毒性）	4 mg/kg[e]	2.653[f]	690.6[g]	5.3
ラット [c]（胚・胎児）	10 mg/kg[e]	120.6	3038	23.4
ラット [d]（小核）	10 mg/kg[e]	12.40	317.3	2.4

a 日本人の健康成人男性に SI-613 を 30 mg を単回膝関節腔内投与したときの全身曝露量

b カニクイザルを用いた 53 週間反復投与毒性試験の全身曝露量

c 妊娠ラットを用いた薬物動態評価〔2.6.4.8.3〕の全身曝露量

d ラットを用いた薬物動態評価〔2.6.4.8.3〕の全身曝露量

e 無毒性量又は陰性用量

f 初回投与における雄の C_{max}

g 初回投与における雄の AUC_{τ}（τ : 28 日）

h （毒性試験における AUC）／（ヒトにおける AUC）

表 2.6.6.11-9. DF-ラクタムのラットを用いた小核試験とヒトにおける申請用量投与時の血漿中DF-ラクタム曝露比較

種	投与量	DF-ラクタムの全身的曝露量		曝露比較 [f]
		C_{max}（ng/mL）	AUC（ng·h/mL）	
ヒト [a]	30 mg	0.358	38.06	
ラット [b]	18 mg/kg[c]	96.43[d]	2633[e]	69.2

a 日本人の健康成人男性に SI-613 を 30 mg を単回膝関節腔内投与したときの全身曝露量

b DF-ラクタムのラットを用いた小核試験における全身曝露量

c 陰性用量

d 初回投与における雄の C_{max}

e 初回投与及び 2 回目投与における AUC_{τ}（τ : 24 時間）の累積値

f （小核試験の最高用量における AUC）／（ヒトにおける AUC）

2.6.6.11.10 不純物の安全性について

SI-613 原薬及び製剤に含まれる不純物は、ICH Q3A ガイドライン及び ICH Q3B ガイドラインの安全性確認の閾値を超えないことを確認した〔3.2.S.3.2〕。ICH Q3A 及び ICH Q3B ガイドラインに基づいた安全性評価は行わなかった。

一方、製剤及び原薬中に含まれる可能性がある 12 不純物は、ICH M7 ガイドラインに基づき、in silico ツールを用いて変異原性を評価した（2.6.6.8.4.1）。12 不純物のうち、3 不純物（不純物A*、不純物B* 及び 不純物C*）は in silico 評価により変異原性を有すると予測された。しかし、不純物C* は 不純物Cの遊離塩基* のラット及びマウスの 2 年間のがん原性試験の結果[(11) (12)]から、発がん性を有しないと考えられた。発がんリスクが懸念された不純物A* 及び 不純物B* について、パージファクターを考慮した除去効果を算出した結果、いずれも不純物管理は不要であると判断した〔3.2.S.3.2〕。

2.6.6.11.11 添加剤の安全性について

SI-613 製剤に含まれる添加剤はマクロゴール 400、クエン酸水和物及びクエン酸ナトリウム水和物である。いずれの添加剤も、医薬品添加物事典 2016 における静脈内投与の使用実績を下回ることから、全身曝露による安全性はヒトで確認されていると判断した。一方、これらの添加剤の膝関節
腔内投与での使用実績については医薬品添加物事典 2016 に記載されていない[(13)]ことから、膝関節腔内投与による膝関節への安全性について、カニクイザルを用いた 53 週間反復膝関節腔内投与試験（2.6.6.3.1）に組み込み実施したプラセボ製剤投与群の結果より評価した。

プラセボ製剤を、カニクイザルの膝関節腔内へ 53 週間反復投与したとき、膝関節への刺激性を示す変化は認められなかった。

＊ 新薬承認情報提供時に置き換え

以上より、申請用量の添加剤を膝関節腔内投与しても、添加剤の安全性に懸念はないと判断した。

2.6.6.11.12 結論

臨床投与経路である膝関節腔内投与では、滑膜における泡沫状マクロファージ、多核巨細胞、集簇したマクロファージの限局性壊死、単核細胞浸潤並びに滑膜の乳頭状増生などの SI-613 に対する異物処理を反映した変化が認められた。これらと同質の変化は、臨床使用実績が豊富で安全性が確認されている膝関節腔内投与 HA 製剤の毒性試験においても認められていることから、臨床において問題となる変化ではなく、毒性変化ではないと判断した。臨床製剤と同組成の製剤をカニクイザルに膝関節腔内投与したときには、上記の SI-613 に対する異物処理を反映した変化以外に影響は認められなかったが、臨床製剤と組成が異なる高粘弾性の SI-613PBS 溶液をイヌに膝関節腔内投与したときには、異物処理を反映した変化に加え、滑膜の水腫やフィブリン様物質を伴う炎症及びそれに関連すると考えられる滑膜の線維化が認められた。高粘弾性の投与液は関節腔内への投与により炎症を惹起することが報告されていることから、イヌで認められた炎症及び線維化は粘弾性の高い投与液に特有の変化と考えられ、粘弾性の低い臨床製剤では生じない毒性変化と判断した。

静脈内投与では、SI-613 の全身への高曝露に伴い、脾臓における泡沫状マクロファージ、肝臓における泡沫状クッパー細胞並びに肺における多核巨細胞を伴う肉芽腫が認められた。これらは、上述した膝関節腔内投与時における異物処理を反映した変化と同様、SI-613 に対するマクロファージ系細胞の異物処理を反映した変化と考えられ、組織障害を伴わなかったことから、毒性変化ではないと判断した。また、静脈内投与直後の運動性の低下や不規則呼吸などの一般状態変化、血圧低下及び肝逸脱酵素の高値が一過性に認められたが、粘弾性の高い投与液を静脈内に投与したときに認められる変化であり、当該試験に用いた投与液の粘弾性の高さに起因する毒性変化と考えられた。SI-613 は静脈内に直接投与されないことを踏まえると、この変化が臨床使用で生じる可能性は低いと考えられた。

これに加え、SI-613 の生殖発生毒性、遺伝毒性、光毒性及び細胞毒性に対する安全性、並びに代謝物及び添加剤に安全性の懸念はないと考えられた。

以上より、SI-613 は臨床において、安全に使用可能と判断した。

2.6.6.12 図表

図及び表は、本文中に適宜記載した。

2.6.6.13 参考文献

(1) [redacted] SI-613 製剤と SI-613PBS 溶液の粘性の比較 (試験番号：TR-QC[redacted]048). 生化学工業株式会社 社内資料.[redacted]

(2) 鈴木 啓太郎, 長野 聖, 後藤 幸子, 山口 敏次郎, 野村 章, 秋山 一夫, ほか. Sodium Hyaluronate (SPH) のビーグル犬における 6 ヶ月間膝関節腔内投与による慢性毒性試験および回復試験 (2) 膝関節所見. 応用薬理. 1985;29:83-93.

(3) 鈴木 啓太郎, 長野 聖, 後藤 幸子, 山口 敏次郎, 野村 章, 秋山 一夫, ほか. Sodium Hyaluronate (SPH) のウサギにおける 3 ヶ月間膝関節腔内投与による亜急性毒性試験および回復試験 (2) 膝関節所見. 応用薬理. 1984;28:1059-1069.

(4) 堀切和哉, 前田博, 栗尾和佐子, 尾崎清和, 上地俊徳, 平松保造, ほか. 高分子ヒアルロン酸ナトリウム (NRD101) のビーグル犬における皮下投与による急性毒性試験. 薬理と治療. 1994:22:17-29.

(5) Emami A, Tepper J, Short B, Yaksh TL, Bendele AM, Ramani T, et al. Toxicology Evaluation of Drugs Administered via Uncommon Routes: Intranasal, Intraocular, Intrathecal/Intraspinal, and Intra-Articular. Int J Toxicol. 2018;37:4-27.

(6) 松田 宏三, 松永 寛幸, 高木 邦格, 増田 幹生, 村田 学治, 池田 裕子, ほか. ヒアルロン酸ナトリウム (SL-1010) の一般薬理作用 (第 2 編). 薬理と治療. 1991;19:273-281.

(7) 斉藤 洋, 松木 則夫, 西山 信好, 小野 千鶴子, 鈴木 義裕, 福嶋 千春, ほか. 高分子ヒアルロン酸ナトリウム (NRD101) の一般薬理作用 (第 1 報). 薬理と治療. 1994;22:283-292.

(8) Anderson JM, Rodriguez A, Chang TD. FOREIGN BODY REACTION TO BIOMATERIALS. Semin Immunol. 2008;20:86-100.

(9) Satake S. Immunohistchemical Study of CD68 using Specimens from "A 53-Week Intra-articular Knee Joint Repeated-Dose Toxicity Study of SI-613 Formulation in Cynomolgus Monkeys" (Study Number: SBL194-075). Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd.. 2018.

(10) マーク・H・ビアーズ 編集. メルクマニュアル. 第 18 版. 日本語版: 日経 BP 社; 2006: 243.

(11) Summary of Drinking Water Carcinogenicity Study of不純物Cの遊離塩基* in F344 Rats (Study Number: 0641).[redacted]

(12) Summary of Drinking Water Carcinogenicity Study of 不純物Cの遊離塩基* in B6D2F1 Mice (Study Number: 0642).[redacted]

(13) 日本医薬品添加剤協会 編集. 医薬品添加物事典 2016. 第 1 版: 薬事日報社; 2016: 148-152, 525-526.

＊ 新薬承認情報提供時に置き換え

ジョイクル関節注 30mg

2.6.7 毒性試験概要表

生化学工業株式会社

目次

2.6.7 毒性試験概要表 5
2.6.7.1 毒性試験：一覧表 5
2.6.7.2 トキシコキネティクス：試験の一覧表 9
2.6.7.3 トキシコキネティクス：試験成績の一覧 10
2.6.7.4 毒性試験：被験物質一覧 14
2.6.7.5 単回投与毒性試験 16
2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 17
2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験 18
2.6.7.8 In vitro 遺伝毒性試験 48
2.6.7.9 In vivo 遺伝毒性試験 56
2.6.7.10 がん原性試験 57
2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 58
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 59
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体機能に関する試験 71
2.6.7.15 新生児を用いた試験 76
2.6.7.16 局所刺激性試験 77
2.6.7.17 その他の毒性試験 78

略号一覧

略号	省略していない表現（英語）	省略していない表現（日本語）
不純物C*	不純物C*	不純物C*
不純物F*	不純物F*	不純物F*
不純物G*	不純物G*	不純物G*
ALT	Alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AUC	Area under the plasma concentration-time curve	血漿中濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-last}}$	Area under the plasma concentration-time curve from zero to last	0 から血漿中濃度測定可能時点までの血漿中濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}\infty}$	Area under the plasma concentration-time curve from zero to infinity	0 から∞時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
AUC_{τ}	Area under the plasma concentration-time curve over a dosing interval	投与間隔における血漿中濃度－時間曲線下面積
Balb/c 3T3 細胞	Balb/3T3 clone A31	マウス胎児由来線維芽細胞
不純物A*	不純物A*	不純物A*
BLQ	Below the lower limit of quantification	定量下限未満
不純物E*	不純物E*	不純物E*
不純物B*	不純物B*	不純物B*
CHL/IU 細胞	CHL/IU	チャイニーズハムスター肺由来細胞
C_{max}	Maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
不純物D*	不純物D*	不純物D*
不純物H*	不純物H*	不純物H*
不純物I*	不純物I*	不純物I*
DF	Diclofenac	ジクロフェナク
DF-ラクタム又は lactam	Diclofenac-lactam	ジクロフェナクラクタム
DF-HA4mer	Diclofenac-hyaluronate 4mer	ジクロフェナク結合ヒアルロン酸 4 糖
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	ジメチルスルホキシド
不純物J*	不純物J*	不純物J*
E. coli	*Escherichia coli*	大腸菌
FOB	Function observation battery	機能観察総合評価
HA	Sodium hyaluronate	ヒアルロン酸ナトリウム

＊ 新薬承認情報提供時に置き換え

略号	省略していない表現（英語）	省略していない表現（日本語）
不純物K*	不純物K*	不純物K*
i.a.	Intra-articular or intra-articulary	膝関節腔内投与
IC_{50}	50% inhibition concentration	50%阻害濃度
i.v.	Intravenous or intravenously	静脈内投与
LLOQ	Lower limit of quantification	定量下限
不純物L*	不純物L*	不純物L*
NZW	New Zealand White	－
PBS	Phosphate buffered saline	リン酸緩衝塩化ナトリウム液
s.c.	Subcutaneous	皮下
S. typhimurium	*Salmonella typhimurium*	ネズミチフス菌
SD	Sprague Dawley	－
S9	Rat liver homogenate	ラット肝臓ホモジネート
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
V79 細胞	V79	チャイニーズハムスター肺線維芽細胞

＊ 新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.7　毒性試験概要表

2.6.7.1　毒性試験：一覧表

被験物質：SI-613 又は SI-613 製剤

試験の種類	動物種/系統	投与方法	投与期間	投与量（SI-613 濃度）	GLP 適用	実施施設	試験番号	記載箇所
単回投与毒性試験	ラット/SD	i.v.	単回	10 mg/kg	適用	[redacted]	[redacted]368	4.2.3.1-1
	イヌ/ビーグル犬	i.v.	単回	0、5 mg/kg	適用	[redacted]	[redacted]271	4.2.3.1-2
反復投与[a]毒性試験	カニクイザル	i.a.	21 週間、53 週間	0、0.4、1.2、4 mg/kg/4 weeks	適用	[redacted]	[redacted]-071	4.2.3.2-1
	イヌ/ビーグル犬	i.a.	4 週間	0、1、2、6 mg/kg/week	適用	[redacted]	[redacted]369	4.2.3.2-2
	イヌ/ビーグル犬	i.a.	13 週間	0、2、6 mg/kg/4 weeks 6 mg/kg/week	適用	[redacted]	[redacted]274	4.2.3.2-3
	ラット/SD	i.v.	4 週間	0、1、3、10 mg/kg/day	適用	[redacted]	[redacted]042	4.2.3.2-4
	ラット/SD	i.v.	26 週間	0、0.3、1、3 mg/kg/day	適用	[redacted]	[redacted]273	4.2.3.2-5

a：無毒性量が求められた場合は該当する用量に下線

2.6.7.1 毒性試験：一覧表（続き）　　被験物質：SI-613

試験の種類		動物種/系統	投与方法	投与期間	投与量	GLP適用	実施施設	試験番号	記載箇所
遺伝毒性試験	復帰突然変異試験	*S. typhimurium* *E. coli*	in vitro	-	313、625、1250、2500、5000 µg/plate （S9＋/－）	適用	[redacted]	[redacted]099	4.2.3.3.1-1
	染色体異常試験	CHL/IU 細胞	in vitro	-	短時間処理法 1250、2500、5000 µg/mL（S9＋） 625、1250、2500、5000 µg/mL（S9－） 連続処理法 313、625、1250、2500 µg/mL（S9－）	適用	[redacted]	[redacted]100	4.2.3.3.1-2
	小核試験	ラット/SD	i.v.	2 日間	0、1、3、10 mg/kg/day	適用	[redacted]	[redacted]164	4.2.3.3.2-1
生殖発生毒性試験	受胎能試験	ラット/SD	i.v.	M：交配前 14 日～剖検前日 F：交配前 14 日～妊娠 7 日	0、1、3、10 mg/kg/day	適用	[redacted]	[redacted]055	4.2.3.5.1-1
	胚・胎児試験	ラット/SD	i.v.	F：妊娠 7～17 日	0、1、3、10 mg/kg/day	適用	[redacted]	[redacted]241	4.2.3.5.2-1
		ウサギ/NZW	i.v.	F：妊娠 6～18 日	0、0.4、1.2、4 mg/kg/day	適用	[redacted]	[redacted]242	4.2.3.5.2-2
	出生前後試験	ラット/SD	i.v.	F：妊娠 7～分娩後 20 日	0、1、3、10 mg/kg/day	適用	[redacted]	[redacted]380	4.2.3.5.3-1

-：該当なし　M：雄　F：雌

2.6.7.1 毒性試験：一覧表（続き）　　被験物質：SI-613 又は SI-613 製剤

試験の種類	動物種/系統	投与方法	投与期間（観察期間）	投与量（SI-613 濃度）	GLP 適用	実施施設	試験番号	記載箇所
局所刺激性試験	カニクイザル	i.a.	13 週間（最終投与後 1、4 週間）	0、0.2、0.6、2 mg/kg/joint	適用	[redacted]	[redacted]027	4.2.3.6-1
	ウサギ/NZW	i.a.	単回（1、14 日間）	0、0.2、0.5、2 mg/kg/joint	適用	[redacted]	[redacted]058	4.2.3.6-2
	ウサギ/NZW	i.a.	単回（2、6、12、18 箇月間）	0、2 mg/kg/joint	適用	[redacted]	[redacted]140	4.2.3.6-3
その他の毒性試験								
光毒性試験	Balb/c 3T3 細胞	in vitro	-	0.781、1.56、3.13、6.25、12.5、25、50、100 µg/mL	適用	[redacted]	[redacted]379	4.2.3.7.7-1
細胞毒性試験	V79 細胞	in vitro	-	0、47.0、58.7、73.4、91.8、115、143、179、224、280、350 µg/mL	適用	[redacted]	[redacted]093	4.2.3.7.7-2

-：該当なし

2.6.7.1 毒性試験：一覧表（続き）　　被験物質：DF-ラクタム

試験の種類		動物種/系統	投与方法	投与期間	投与量	GLP適用	実施施設	試験番号	記載箇所
その他の毒性試験									
代謝物の毒性試験	DF-ラクタムの復帰突然変異試験	*S. typhimurium* *E. coli*	in vitro	-	9.77、19.5、39.1、78.1、156、313、625、1250、2500、5000 µg/plate （S9＋/－）	適用	[redacted]	[redacted]-068	4.2.3.7.5-1
	DF-ラクタムの染色体異常試験	CHL/IU 細胞	in vitro	-	短時間処理法 30、80、100、140 µg/mL[a]（S9＋/－） 連続処理法 5、10、30、40 µg/mL[a]（S9－）	適用	[redacted]	[redacted]-070	4.2.3.7.5-2
	DF-ラクタムの小核試験	ラット/SD	s.c.	2 日間	0、2、6、18 mg/kg/day	適用	[redacted]	[redacted]-064	4.2.3.7.5-3
不純物の変異原性評価		Derek、CASE ultra、Sarah	in silico	-	-	非適用	[redacted]	[redacted]-0284	4.2.3.7.6-1
ヒト及び各動物種の膝関節体積の測定試験		ヒト、カニクイザル、イヌ/ビーグル、ウサギ/NZW、ラット/SD	-	-	-	非適用	[redacted]	[redacted]-058	4.2.3.7.7-3

－：該当なし　a：観察用量

2.6.7.2　トキシコキネティクス：試験の一覧表

被験物質：SI-613 又は SI-613 製剤

試験の種類	試験系	投与方法	投与量 （SI-613 濃度）	GLP 適用	試験番号	記載箇所
単回投与毒性試験	ラット/SD	i.v.	10 mg/kg	適用	[redacted]368	4.2.3.1-1
単回投与毒性試験	イヌ/ビーグル犬	i.v.	5 mg/kg	適用	[redacted]271	4.2.3.1-2
反復投与毒性試験（53 週間）	カニクイザル	i.a.	0.4、1.2、4 mg/kg/4 weeks	適用	[redacted]-071	4.2.3.2-1
反復投与毒性試験（4 週間）	イヌ/ビーグル犬	i.a.	1、2、6 mg/kg/week	適用	[redacted]369	4.2.3.2-2
反復投与毒性試験（13 週間）	イヌ/ビーグル犬	i.a.	2、6 mg/kg/4 weeks 6 mg/kg/week	適用	[redacted]274	4.2.3.2-3
反復投与毒性試験（4 週間）	ラット/SD	i.v.	1、3、10 mg/kg/day	適用	[redacted]042	4.2.3.2-4
反復投与毒性試験（26 週間）	ラット/SD	i.v.	0.3、1、3 mg/kg/day	適用	[redacted]273	4.2.3.2-5
生殖発生毒性試験（胚・胎児試験）	ラット/SD	i.v.	1、3、10 mg/kg/day	適用	[redacted]241	4.2.3.5.2-1
生殖発生毒性試験（胚・胎児試験）	ウサギ/NZW	i.v.	0.4、1.2、4 mg/kg/day	適用	[redacted]242	4.2.3.5.2-2

被験物質：DF-ラクタム

試験の種類	試験系	投与方法	投与量	GLP 適用	試験番号	記載箇所
遺伝毒性試験（小核試験）	ラット/SD	s.c.	2、6、18 mg/kg/day	適用	[redacted]-064	4.2.3.7.5-3

2.6.7.3　トキシコキネティクス：試験成績の一覧

被験物質：SI-613 又は SI-613 製剤

SI-613 の最高血漿中濃度（C_{max}）及び全身曝露量（AUC）

試験の種類（投与期間）	投与間隔	動物種	投与経路	投与量[a]（mg/kg）	C_{max}（μg eq./mL）		AUC[e]（μg eq.・h/mL）		試験番号
					雄	雌	雄	雌	
単回投与毒性試験	単回	ラット	i.v.	10[b]	34.35	40.83	119.7	142.9	[redacted]368
	単回	イヌ	i.v.	5[b]	18.87	16.59	11.85	11.68	[redacted]271
反復投与毒性試験（53 週間）	4 週間	カニクイザル	i.a.	4	NC	NC	NC	NC	[redacted]-071
反復投与毒性試験（4 週間）	1 週間	イヌ	i.a.	6	NC	NC	NC	NC	[redacted]369
反復投与毒性試験（13 週間）	1 週間	イヌ	i.a.	6	NC	NC	NC	NC	[redacted]274
反復投与毒性試験（4 週間）	連日	ラット	i.v.	1[cd]	6.592	6.064	0.2747	0.2527	[redacted]042
				10[bc]	29.17	41.25	53.41	67.80	
反復投与毒性試験（26 週間）	連日	ラット	i.v.	0.3[cd]	1.845	2.350	0.07689	0.09794	[redacted]273
				3[c]	26.91	26.18	41.88	43.63	
生殖発生毒性試験（胚・胎児）	11 日間連日	妊娠ラット	i.v.	10[b]	-	23.65	-	314.9	[redacted]241
	13 日間連日	妊娠ウサギ	i.v.	4[b]	-	26.02	-	167.1	[redacted]242
第 I 相試験	単回	ヒト（日本人）	i.a.	0.5（申請用量）	NC	-	NC	-	613/1111

a：被験物質投与に関連した安全性評価上重要な全身性の変化（投与液の高粘弾性に起因した変化及び異物処理を反映した変化は除く）が認められない用量

b：粘弾性の高い投与液を静脈内投与したことに起因した変化あり　c：肝臓、脾臓及び肺に異物処理を反映した変化あり　d：最低用量

e：単回投与試験及び第 I 相試験は $AUC_{0\text{-last}}$、その他の試験は AUC_{τ}

-：データなし　NC：算出不可　LLOQ：イヌにおける反復投与試験は 1 μg eq./mL、カニクイザルにおける反復投与試験及び第 I 相試験は 0.2 μg eq./mL

2.6.7.3　トキシコキネティクス：試験成績の一覧（続き）　被験物質：SI-613 又は SI-613 製剤

DF の最高血漿中濃度（C_{max}）及び全身曝露量（AUC）

試験の種類（投与期間）	投与間隔	動物種	投与経路	投与量[a]（mg/kg）	C_{max}（ng/mL）		AUC[e]（ng･h/mL）		試験番号
					雄	雌	雄	雌	
単回投与毒性試験	単回	ラット	i.v.	10[b]	8.718	9.051	377.3	476.8	[redacted]368
	単回	イヌ	i.v.	5[b]	14.34	15.00	1925	2226	[redacted]271
反復投与毒性試験（53 週間）	4 週間	カニクイザル	i.a.	4	18.67	21.16	519.7	448.1	[redacted]071
反復投与毒性試験（4 週間）	1 週間	イヌ	i.a.	6	23.00	24.27	1558	1876	[redacted]369
反復投与毒性試験（13 週間）	1 週間	イヌ	i.a.	6	22.02	24.39	2728	4085	[redacted]274
反復投与毒性試験（4 週間）	連日	ラット	i.v.	1[cd]	2.736	4.230	43.27	89.00	[redacted]042
				10[bc]	18.96	29.49	295.0	562.7	
反復投与毒性試験（26 週間）	連日	ラット	i.v.	0.3[cd]	1.435	2.477	25.83	51.22	[redacted]273
				3[c]	10.61	21.71	202.0	467.7	
生殖発生毒性試験（胚・胎児）	11 日間連日	妊娠ラット	i.v.	10[b]	-	31.91	-	682.6	[redacted]241
	13 日間連日	妊娠ウサギ	i.v.	4[b]	-	16.14	-	228.8	[redacted]242
第 I 相試験	単回	ヒト（日本人）	i.a.	0.5（申請用量）	0.808	-	64.46	-	613/1111

a：被験物質投与に関連した安全性評価上重要な全身性の変化（投与液の高粘弾性に起因した変化及び異物処理を反映した変化は除く）が認められない用量

b：粘弾性の高い投与液を静脈内投与したことに起因した変化あり　c：肝臓、脾臓及び肺に異物処理を反映した変化あり　d：最低用量

e：単回投与試験及び第 I 相試験は $AUC_{0\text{-last}}$、その他の試験は AUC_{τ}

-：データなし

2.6.7.3　トキシコキネティクス：試験成績の一覧（続き）　被験物質：SI-613、SI-613 製剤又は DF-ラクタム

DF-ラクタムの最高血漿中濃度（C_{max}）及び全身曝露量（AUC）

試験の種類（投与期間）	投与間隔	動物種	投与経路	投与量[a]（mg/kg）	C_{max}（ng/mL）		AUC[e]（ng·h/mL）		試験番号
					雄	雌	雄	雌	
単回投与毒性試験	単回	ラット	i.v.	10[b]	1.776	1.331	5.555	4.336	[redacted]368
	単回	イヌ	i.v.	5[b]	0.6680	0.5512	NC	NC	[redacted]271
反復投与毒性試験（53 週間）	4 週間	カニクイザル	i.a.	4	16.55	9.072	362.4	277.7	[redacted]071
反復投与毒性試験（4 週間）	1 週間	イヌ	i.a.	6	NC	NC	NC	NC	[redacted]369
反復投与毒性試験（13 週間）	1 週間	イヌ	i.a.	6	0.3610	0.3534	7.310	10.13	[redacted]274
反復投与毒性試験（4 週間）	連日	ラット	i.v.	1[cd]	NC	NC	NC	NC	[redacted]042
				10[bc]	2.942	2.967	4.943	5.605	
反復投与毒性試験（26 週間）	連日	ラット	i.v.	0.3[cd]	NC	NC	NC	NC	[redacted]273
				3[c]	2.500	1.349	3.739	1.327	
DF-ラクタムの小核試験	2 日間連日	ラット	s.c	18	93.01	-	1380	-	[redacted]064
生殖発生毒性試験（胚・胎児）	11 日間連日	妊娠ラット	i.v.	10[b]	-	3.015	-	5.004	[redacted]241
	13 日間連日	妊娠ウサギ	i.v.	4[b]	-	1.462	-	0.06090	[redacted]242
第 I 相試験	単回	ヒト（日本人）	i.a.	0.5（申請用量）	0.358	-	38.06	-	613/1111

a：被験物質投与に関連した安全性評価上重要な全身性の変化（投与液の高粘弾性に起因した変化及び異物処理を反映した変化は除く）が認められない用量

b：粘弾性の高い投与液を静脈内投与したことに起因した変化あり　c：肝臓、脾臓及び肺に異物処理を反映した変化あり　d：最低用量

e：単回投与試験、DF-ラクタムの小核試験及び第 I 相試験は $AUC_{0\text{-last}}$、その他の試験は AUC_{τ}

-：データなし　NC：算出不可　LLOQ：C_{max} 及び AUC が NC の試験は 0.5 ng/mL

2.6.7.3　トキシコキネティクス：試験成績の一覧（続き）　被験物質：SI-613 製剤

DF-HA4mer の最高血漿中濃度（C_{max}）及び全身曝露量（AUC）

試験の種類（投与期間）	投与間隔	動物種	投与経路	投与量[a]（mg/kg）	C_{max}（ng/mL）		AUC[b]（ng･h/mL）		試験番号
					雄	雌	雄	雌	
反復投与毒性試験（53 週間）	4 週間	カニクイザル	i.a.	4	2.183	1.808	409.7	460.4	[redacted]-071
第 I 相試験	単回	ヒト（日本人）	i.a.	0.5（申請用量）	0.278	-	129.71	-	613/1111

a：被験物質投与に関連した安全性評価上重要な全身性の変化（投与液の高粘弾性に起因した変化及び異物処理を反映した変化は除く）が認められない用量

b：カニクイザルの反復投与毒性試験は AUC_{τ}、第 I 相試験は $AUC_{0\text{-last}}$

-：データなし

2.6.7.4　　毒性試験：被験物質一覧　　被験物質：SI-613

バッチ番号	定量（%）	規格設定された不純物（%）		試験番号	試験の種類
		DicNa	Lactam		
申請規格	90%～110%	0.15%以下	0.15%以下		
[redacted]	105	0.02	<0.01	[redacted]368	ラット単回静脈内投与毒性試験
	104	<0.01	<0.01	[redacted]271	イヌ単回静脈内投与毒性試験
	102	0.01	<0.01	[redacted]042	ラット 4 週間反復静脈内投与毒性試験
	102	<0.04	<0.04	[redacted]273	ラット 26 週間反復静脈内投与毒性試験
	105	0.02	<0.01	[redacted]369	イヌ 4 週間反復膝関節腔内投与毒性試験
	102	<0.04	<0.04	[redacted]274	イヌ 13 週間反復膝関節腔内投与毒性試験
	104	<0.01	<0.01	[redacted]164	in vivo ラット小核試験
	104	<0.05	<0.05	[redacted]055	ラット受胎能試験
	104	<0.01	<0.01	[redacted]241	ラット胚・胎児試験
	104	<0.01	<0.01	[redacted]242	ウサギ胚・胎児試験
[redacted]	103	0.04	0.02	[redacted]099	in vitro 細菌復帰突然変異試験
	103	0.04	0.02	[redacted]100	in vitro ほ乳類培養細胞染色体異常試験
[redacted][a]	103	<0.04	<0.04	[redacted]380	ラット出生前後試験
	103	<0.04	<0.04	[redacted]379	in vitro 光毒性試験

a：バッチ番号[redacted]については、不純物G* を測定し、不純物G* は<0.02%であった

＊ 新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.7.4　毒性試験：被験物質一覧（続き）

被験物質：SI-613 製剤

バッチ番号	定量（%）	規格設定された不純物（%）	試験番号	試験の種類
		Lactam		
申請規格：	90%～110%	0.50%以下		
[redacted]	103	0.0	[redacted]-071	カニクイザル 53 週間反復膝関節腔内投与毒性試験
[redacted]	101	0.0	[redacted]058	ウサギ単回膝関節腔内投与局所刺激性（1）
	101	0.0	[redacted]140	ウサギ単回膝関節腔内投与局所刺激性（2）
	103	0.0	[redacted]093	in vitro 細胞毒性試験
[redacted]	97	0.1	[redacted]027	カニクイザル 13 週間反復膝関節腔内投与局所刺激性試験

被験物質：DF-ラクタム

バッチ番号	純度（%）	規格設定された不純物（%）	試験番号	試験の種類
[redacted]	99.7	-	[redacted]-068	in vitro 細菌復帰突然変異試験
			[redacted]-070	in vitro ほ乳類培養細胞染色体異常試験
			[redacted]-064	in vivo ラット小核試験

-：該当なし

2.6.7.5　単回投与毒性試験　　被験物質：SI-613

動物種/系統	投与方法（溶媒/投与形態）	投与量（mg/kg）	性別及び動物数/群	最大非致死量（mg/kg）	概略の致死量（mg/kg）	特記すべき所見	試験番号
ラット/SD	静脈内（PBS/溶液）	10	雌雄各 5 例/群	10	>10	死亡は認められなかった。体重及び剖検に SI-613 投与に関連した変化は認められなかった。一般状態観察では、投与直後に運動性の低下、不規則呼吸及び腹臥位が認められ、投与後 4 分までに消失した。TK 測定では、SI-613、DF 及び DF-ラクタムの全身曝露を確認した。	[redacted]368
イヌ/ビーグル犬	静脈内（PBS/溶液）	0、5	雌雄各 2 例	5	>5	死亡は認められなかった。体重、心電図、体温、眼科学的検査、血液学的検査、剖検及び病理組織学的検査（肝臓及び胆嚢）に SI-613 投与に関連した変化は認められなかった。一般状態観察では、口腔粘膜、眼瞼結膜及び耳介の蒼白、並びに運動性の低下が投与後数分より認められ、投与後 30 分までに消失した。血圧測定では、血圧の低下が SI-613 投与後 45 分時点に認められ、投与後 1 日に回復が確認された。血液生化学的検査では、血圧の低下が認められた動物において ALT の高値が SI-613 投与後 1 日に認められ、投与後 6 日で低下に転じ、投与後 13 日に正常範囲内に戻った。TK 測定では、SI-613、DF 及び DF-ラクタムの全身曝露を確認した。	[redacted]271

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

該当する試験は実施しなかった。

2.6.7.7　反復投与毒性試験：重要な試験

2.6.7.7.1　カニクイザルにおける 53 週間反復膝関節腔内投与毒性試験　被験物質：SI-613 製剤

報告書の題名：SI-613 製剤のサルにおける 53 週間反復膝関節腔内投与毒性試験

動物種/系統：カニクイザル　投与期間：21 週間又は 53 週間（4 週 1 回、計 6 回又は 14 回投与）　試験番号：[redacted]-071

試験開始年齢：2～5 才　休薬期間：4 週間又は 13 週間　CTD における記載箇所：4.2.3.2-1

初回投与年月日：雌：20[redacted]年[redacted]月[redacted]日　投与方法：膝関節腔内（両膝関節腔内）　GLP 適用：適用

雄：20[redacted]年[redacted]月[redacted]日　溶媒/投与形態：SI-613 製剤

特記事項：主群；21 週投与（4 週 1 回、計 6 回）の最終投与後 1 週剖検（雌雄各 2 例/群）、53 週投与（4 週 1 回、計 14 回）の最終投与後 1 週剖検（雌雄各 3 例/群）、回復群；21 週投与の最終投与後 4 週剖検（プラセボ製剤及び 4 mg/kg の雌雄各 2 例/群）、53 週投与の最終投与後 13 週剖検（生理食塩液、プラセボ製剤、0.4 及び 4 mg/kg の雌雄各 2 例/群）

無毒性量：雌雄 4 mg/kg/4 weeks（2 mg/kg/joint/4 weeks）

投与量（mg/kg）	0（生理食塩液）		0（プラセボ製剤）		0.4		1.2		4	
例数：主群（回復群）[a]	雄：2/3 (0/2)	雌：2/3 (0/2)	雄：2/3 (2/2)	雌：2/3 (2/2)	雄：2/3 (0/2)	雌：2/3 (0/2)	雄：2/3 (0/0)	雌：2/3 (0/0)	雄：2/3 (2/2)	雌：2/3 (2/2)
TK：SI-613										
投与 1 日[b]										
C_{max}（μg/mL）	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NC	NC
AUC_{τ}（μg･h/mL）	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NC	NC
投与 141 日[c]										
C_{max}（μg/mL）	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NC	NC
AUC_{τ}（μg･h/mL）	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NC	NC
投与 365 日[d]										
C_{max}（μg/mL）	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NC	NC
AUC_{τ}（μg･h/mL）	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NC	NC

a：21 週投与/53 週投与　b：1 回投与後　c：6 回投与後　d：14 回投与後　NA：測定対象外　NC：算出不可　LLOQ：0.2 μg eq./mL

2.6.7.7.1　　カニクイザルにおける 53 週間反復膝関節腔内投与毒性試験（続き）　　試験番号：[redacted]-071

投与量（mg/kg）	0（生理食塩液）		0（プラセボ製剤）		0.4		1.2		4	
例数：主群（回復群）[a]	雄：2/3 (0/2)	雌：2/3 (0/2)	雄：2/3 (2/2)	雌：2/3 (2/2)	雄：2/3 (0/2)	雌：2/3 (0/2)	雄：2/3 (0/0)	雌：2/3 (0/0)	雄：2/3 (2/2)	雌：2/3 (2/2)
TK：DF										
投与 1 日[b]										
C_{max}（ng/mL）	NE	NE	NE	NE	1.044	2.698	3.878	4.677	19.57	19.44
AUC_{τ}（ng･h/mL）	NE	NE	NE	NE	20.00	34.04	100.5	90.34	481.6	445.1
投与 141 日[c]										
C_{max}（ng/mL）	NE	NE	NE	NE	1.702	1.931	3.603	3.345	25.86	19.41
AUC_{τ}（ng･h/mL）	NE	NE	NE	NE	36.32	36.46	101.4	97.29	502.0	450.7
投与 365 日[d]										
C_{max}（ng/mL）	NE	NE	NE	NE	1.759	2.226	3.580	6.070	18.67	21.16
AUC_{τ}（ng･h/mL）	NE	NE	NE	NE	32.98	46.26	102.4	143.4	519.7	448.1
TK：DF-ラクタム										
投与 1 日[b]										
C_{max}（ng/mL）	NA	NA	NA	NA	0.5597	0.9873	2.136	1.939	11.29	15.46
AUC_{τ}（ng･h/mL）	NA	NA	NA	NA	12.43	19.37	62.52	43.86	357.5	356.2
投与 141 日[c]										
C_{max}（ng/mL）	NA	NA	NA	NA	0.8668	0.9616	3.009	2.581	12.55	9.218
AUC_{τ}（ng･h/mL）	NA	NA	NA	NA	18.95	25.24	56.02	61.63	377.7	366.1
投与 365 日[d]										
C_{max}（ng/mL）	NA	NA	NA	NA	1.094	1.479	3.871	3.042	16.55	9.072
AUC_{τ}（ng･h/mL）	NA	NA	NA	NA	15.21	35.57	58.22	89.56	362.4	277.7

a：21 週投与/53 週投与　b：1 回投与後　c：6 回投与後　d：14 回投与後　NE：BLQ かつ算出対象外　NA：測定対象外　LLOQ：DF　0.1 ng/mL

2.6.7.7.1　カニクイザルにおける 53 週間反復膝関節腔内投与毒性試験（続き）　試験番号：[redacted]-071

投与量（mg/kg）	0（生理食塩液）		0（プラセボ製剤）		0.4		1.2		4	
例数：主群（回復群）[a]	雄：2/3 (0/2)	雌：2/3 (0/2)	雄：2/3 (2/2)	雌：2/3 (2/2)	雄：2/3 (0/2)	雌：2/3 (0/2)	雄：2/3 (0/0)	雌：2/3 (0/0)	雄：2/3 (2/2)	雌：2/3 (2/2)
TK：DF-HA4mer										
投与 1 日[b]										
C_{max}（ng/mL）	NA	NA	NA	NA	0.4735	0.9897	1.191	1.689	2.653	4.394
AUC_{τ}（ng･h/mL）	NA	NA	NA	NA	129.2	168.1	286.5	398.3	690.6	850.9
投与 141 日[c]										
C_{max}（ng/mL）	NA	NA	NA	NA	0.5738	0.8117	2.087	1.145	1.940	2.917
AUC_{τ}（ng･h/mL）	NA	NA	NA	NA	137.0	153.5	416.1	272.5	559.8	746.0
投与 365 日[d]										
C_{max}（ng/mL）	NA	NA	NA	NA	0.6646	0.4984	2.529	0.8949	2.183	1.808
AUC_{τ}（ng･h/mL）	NA	NA	NA	NA	93.28	92.37	290.2	90.71	409.7	460.4
特記すべき所見										
死亡及び切迫剖検例数	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
一般状態	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
体重	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
摂餌量	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
摂水量	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
膝関節幅	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
生理機能検査[e]	-	-	-	-	NA	NA	NA	NA	-	-

a：21 週投与/53 週投与　b：1 回投与後　c：6 回投与後　d：14 回投与後　e：心電図、呼吸数、血圧、体温　-：特記すべき所見なし　NA：測定対象外

2.6.7.7.1　カニクイザルにおける 53 週間反復膝関節腔内投与毒性試験（続き）　試験番号：[redacted]-071

投与量（mg/kg）	0（生理食塩液）		0（プラセボ製剤）		0.4		1.2		4	
例数：主群（回復群）[a]	雄：2/3 (0/2)	雌：2/3 (0/2)	雄：2/3 (2/2)	雌：2/3 (2/2)	雄：2/3 (0/2)	雌：2/3 (0/2)	雄：2/3 (0/0)	雌：2/3 (0/0)	雄：2/3 (2/2)	雌：2/3 (2/2)
眼科学的検査	-	-	-	-	NA	NA	NA	NA	-	-
尿検査	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
血液学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
血液生化学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
器官重量	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
剖検[b]										
21 週投与群（回復群）										
膝関節滑膜の淡黄色化	0	0	0 (0)	0 (0)	0	0	0	0	0 (0)	1 (0)
膝蓋骨下脂肪体の黄色化	0	0	0 (0)	0 (0)	0	0	0	0	0 (0)	1 (0)
53 週投与群（回復群）										
膝関節滑膜の褐色化	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2	0	0 (1)	0 (0)
膝蓋骨下脂肪体の褐色巣	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2	0	1 (1)	1 (0)
膝関節腔内ゼリー状物質貯留	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1	0	1 (0)	0 (0)
膝関節液検査[b]										
21 週投与群（回復群）										
色の異常（淡黄色）	0	0	0 (0)	0 (0)	0	0	0	1	1 (1)	1 (0)
浮遊物	0	1	0 (1)	1 (0)	0	1	1	2	2 (2)	2 (2)
混濁	0	0	0 (0)	0 (0)	0	0	0	0	0 (0)	2 (0)

a：21 週投与/53 週投与　b：発現動物数　-：特記すべき所見なし　NA：測定対象外

2.6.7.7.1　カニクイザルにおける 53 週間反復膝関節腔内投与毒性試験（続き）　試験番号：[redacted]-071

投与量（mg/kg）	0（生理食塩液）		0（プラセボ製剤）		0.4		1.2		4	
例数：主群（回復群）[a]	雄：2/3	雌：2/3	雄：2/3	雌：2/3	雄：2/3	雌：2/3	雄：2/3	雌：2/3	雄：2/3	雌：2/3
	(0/2)	(0/2)	(2/2)	(2/2)	(0/2)	(0/2)	(0/0)	(0/0)	(2/2)	(2/2)
膝関節液検査[b]（続き）										
21 週投与群（回復群）										
粘性	0	0	0 (0)	0 (0)	0	0	1	2	1 (0)	2 (0)
関節洗浄液量（mL）	2.4	2.3	2.4	2.3	2.3	2.4	2.4	2.3	2.7	2.4
			(2.3)	(2.5)					(2.5)	(2.4)
白血球数（× 10^4/joint）	2.3	3.1	2.1	1.4	1.7	29.0	61.9	119.6	283.3	199.0
			(0.9)	(3.5)					(17.5)	(0.8)
リンパ球比率（%）	6.0	18.0	5.5	16.5	10.0	18.5	10.5	17.0	14.0	17.5
			(11.5)	(26.0)					(29.5)	(16.0)
53 週投与群（回復群）										
色の異常（淡黄色）	0 (0)	1 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0)	0 (0)	3	1	2 (0)	2 (0)
浮遊物	1 (0)	1 (1)	2 (0)	1 (1)	3 (1)	1 (2)	3	2	3 (1)	3 (2)
混濁	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2	0	0 (0)	0 (0)
粘性	0 (0)	0 (0)	1 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2	0	2 (0)	1 (0)
関節洗浄液量（mL）	2.5	2.3	2.5	2.4	2.4	2.5	2.7	2.6	2.6	2.6
	(2.3)	(2.7)	(2.3)	(2.3)	(2.4)	(2.5)			(2.4)	(2.7)
白血球数（× 10^4/joint）	0.6	2.2	1.5	2.5	29.4	22.2	262.2	3.5	61.2	69.8
	(2.2)	(1.2)	(2.0)	(0.7)	(9.7)	(0.5)			(3.0)	(2.0)
リンパ球比率（%）	25.3	19.3	14.0	22.7	24.7	26.7	16.3	17.0	13.3	21.3
	(11.5)	(13.5)	(7.0)	(27.5)	(4.5)	(26.0)			(5.0)	(16.5)

a：21 週投与/53 週投与　b：関節洗浄液量、白血球数、リンパ球比率を除いた項目は発現動物数　-：特記すべき所見なし

2.6.7.7.1　　カニクイザルにおける 53 週間反復膝関節腔内投与毒性試験（続き）　　試験番号：[redacted]071

投与量（mg/kg）	0（生理食塩液）		0（プラセボ製剤）		0.4		1.2		4	
例数：主群（回復群）[a]	雄：2/3 (0/2)	雌：2/3 (0/2)	雄：2/3 (2/2)	雌：2/3 (2/2)	雄：2/3 (0/2)	雌：2/3 (0/2)	雄：2/3 (0/0)	雌：2/3 (0/0)	雄：2/3 (2/2)	雌：2/3 (2/2)
病理組織学的検査[b]（続き）										
21 週投与群（回復群）										
膝関節滑膜										
泡沫状マクロファージ										
ごく軽度	0	0	0 (0)	0 (0)	2	0	0	0	0 (0)	0 (0)
軽度	0	0	0 (0)	0 (0)	0	2	1	1	0 (1)	0 (1)
中等度	0	0	0 (0)	0 (0)	0	0	1	1	2 (1)	2 (1)
単核細胞浸潤										
ごく軽度	0	0	0 (0)	0 (0)	0	0	0	0	1 (1)	0 (1)
軽度	0	0	0 (0)	0 (0)	0	0	1	0	0 (0)	1 (1)
中等度	0	0	0 (0)	0 (0)	0	1	0	0	0 (1)	0 (0)
高度	0	0	0 (0)	0 (0)	0	0	1	2	1 (0)	1 (0)
乳頭状増生										
ごく軽度	0	0	0 (0)	0 (0)	0	0	0	1	0 (0)	0 (0)
軽度	0	0	0 (0)	0 (0)	0	2	1	1	0 (1)	0 (0)
中等度	0	0	0 (0)	0 (0)	0	0	1	0	2 (1)	2 (2)
多核巨細胞										
ごく軽度	0	0	0 (0)	0 (0)	0	0	0	1	1 (0)	1 (0)
軽度	0	0	0 (0)	0 (0)	0	0	0	0	0 (0)	0 (0)
中等度	0	0	0 (0)	0 (0)	0	0	0	0	0 (0)	1 (0)

a：21 週投与/53 週投与　b：発現個体数

2.6.7.7.1　　カニクイザルにおける 53 週間反復膝関節腔内投与毒性試験（続き）　　試験番号：[redacted]-071

投与量（mg/kg）	0（生理食塩液）		0（プラセボ製剤）		0.4		1.2		4	
例数：主群（回復群）[a]	雄：2/3 (0/2)	雌：2/3 (0/2)	雄：2/3 (2/2)	雌：2/3 (2/2)	雄：2/3 (0/2)	雌：2/3 (0/2)	雄：2/3 (0/0)	雌：2/3 (0/0)	雄：2/3 (2/2)	雌：2/3 (2/2)
病理組織学的検査[b]（続き）										
21 週投与群（回復群）										
膝関節滑膜										
表層限局性壊死										
ごく軽度	0	0	0 (0)	0 (0)	0	0	0	1	1 (0)	0 (0)
軽度	0	0	0 (0)	0 (0)	0	0	0	1	0 (0)	1 (0)
外側腸骨リンパ節：										
髄質リンパ洞										
泡沫状マクロファージ										
ごく軽度	0	0	0 (0)	0 (0)	0	0	0	0	0 (0)	1 (0)
53 週投与群（回復群）										
膝関節滑膜										
泡沫状マクロファージ										
ごく軽度	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (0)	0 (0)	0	0	0 (1)	0 (0)
軽度	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0)	2 (0)	1	3	1 (0)	0 (1)
中等度	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0)	1	0	2 (0)	3 (0)
単核細胞浸潤										
ごく軽度	0 (0)	1 (0)	0 (0)	1 (0)	1 (2)	1 (1)	1	0	0 (2)	0 (2)
軽度	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0)	0 (0)	0	0	2 (0)	1 (0)
中等度	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0)	1 (0)	2	0	0 (0)	2 (0)

a：21 週投与/53 週投与　b：発現個体数

2.6.7.7.1　　カニクイザルにおける 53 週間反復膝関節腔内投与毒性試験（続き）　　試験番号：[redacted]-071

投与量（mg/kg）	0（生理食塩液）		0（プラセボ製剤）		0.4		1.2		4	
例数：主群（回復群）[a]	雄：2/3	雌：2/3	雄：2/3	雌：2/3	雄：2/3	雌：2/3	雄：2/3	雌：2/3	雄：2/3	雌：2/3
	(0/2)	(0/2)	(2/2)	(2/2)	(0/2)	(0/2)	(0/0)	(0/0)	(2/2)	(2/2)
病理組織学的検査[b]（続き）										
53 週投与群（回復群）										
膝関節滑膜										
乳頭状増生										
ごく軽度	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0)	0	0	0 (0)	0 (1)
軽度	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (0)	2 (0)	0	2	0 (0)	0 (1)
中等度	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0)	0 (0)	3	1	3 (0)	3 (0)
多核巨細胞										
ごく軽度	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (0)	0 (0)	0	0	1 (0)	2 (0)
軽度	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0	0	0 (0)	0 (0)
中等度	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2	0	0 (0)	0 (0)
表層限局性壊死										
ごく軽度	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (0)	2 (0)	1	0	0 (0)	3 (0)
軽度	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0	0	0 (0)	0 (0)
中等度	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2	0	0 (0)	0 (0)
好酸性物質										
ごく軽度	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1	0	0 (0)	1 (0)
軽度	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1[c]	0	0 (0)	0 (0)

a：21 週投与/53 週投与　b：発現個体数　c:コロイド鉄染色を実施（陰性）

2.6.7.7.1　　カニクイザルにおける 53 週間反復膝関節腔内投与毒性試験（続き）　　試験番号：[redacted]-071

投与量（mg/kg）	0（生理食塩液）		0（プラセボ製剤）		0.4		1.2		4	
例数：主群（回復群）[a]	雄：2/3 (0/2)	雌：2/3 (0/2)	雄：2/3 (2/2)	雌：2/3 (2/2)	雄：2/3 (0/2)	雌：2/3 (0/2)	雄：2/3 (0/0)	雌：2/3 (0/0)	雄：2/3 (2/2)	雌：2/3 (2/2)
病理組織学的検査[b]（続き）										
53 週投与群（回復群）										
外側腸骨リンパ節：										
髄質リンパ洞										
泡沫状マクロファージ										
ごく軽度	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0)	1 (0)	1	1	2 (0)	2 (0)
軽度	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0)	0 (0)	1	0	0 (0)	0 (0)
膝窩リンパ節：										
髄質リンパ洞										
泡沫状マクロファージ										
ごく軽度	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0	0	1 (0)	1 (0)

a：21 週投与/53 週投与　b：発現個体数

2.6.7.7.2　イヌにおける 4 週間反復膝関節腔内投与毒性試験

被験物質：SI-613

報告書の題名：SI-613 のイヌにおける 4 週間反復膝関節腔内投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

動物種/系統：ビーグル犬　　投与期間：4 週間（週 1 回、計 4 回投与）　　試験番号：[redacted]369

試験開始月齢：7～8 箇月　　休薬期間：4 週間　　CTD における記載箇所：4.2.3.2-2

初回投与年月日：雄：20[redacted]年[redacted]月[redacted]日　　投与方法：膝関節腔内（両膝関節腔内）　　GLP 適用：適用

雌：20[redacted]年[redacted]月[redacted]日　　溶媒/投与形態：PBS/溶液

特記事項：主群；週 1 回、計 4 回の最終投与後 1 週剖検（雌雄各 3 例/群）、回復群；週 1 回、計 4 回の最終投与後 5 週剖検（対照及び 6 mg/kg の雌雄各 2 例/群）

無毒性量：雌雄 1 mg/kg/week 未満（0.5 mg/kg/joint/week 未満）

投与量（mg/kg）	0（PBS）		1		2		6	
例数：主群（回復群）	雄：3（2）	雌：3（2）	雄：3（0）	雌：3（0）	雄：3（0）	雌：3（0）	雄：3（2）	雌：3（2）
TK：SI-613								
投与 1 日 [a]								
C_{max}（μg eq./mL）	NE	NE	NA	NA	NA	NA	NC	NC
AUC_{τ}（μg eq.・h/mL）	NE	NE	NA	NA	NA	NA	NC	NC
投与 22 日 [b]								
C_{max}（μg eq./mL）	NE	NE	NA	NA	NA	NA	NC	NC
AUC_{τ}（μg eq.・h/mL）	NE	NE	NA	NA	NA	NA	NC	NC
TK：DF								
投与 1 日 [a]								
C_{max}（ng/mL）	NE	NE	3.731	3.901	9.186	10.66	23.67	26.56
AUC_{τ}（ng・h/mL）	NE	NE	177.3	205.4	438.4	652.4	1677	1973

a：1 回投与後　b：4 回投与後　NE：BLQ かつ算出対象外　NA：測定対象外　NC：算出不可　LLOQ：SI-613　1 μg eq./mL、DF　0.5 ng/mL

2.6.7.7.2　　イヌにおける４週間反復膝関節腔内投与毒性試験（続き）　　試験番号：[redacted]369

投与量（mg/kg）	0（PBS）		1		2		6	
例数：主群（回復群）	雄：3（2）	雌：3（2）	雄：3（0）	雌：3（0）	雄：3（0）	雌：3（0）	雄：3（2）	雌：3（2）
TK：DF（続き）								
投与 22 日 [a]								
C_{max}（ng/mL）	NE	NE	4.595	4.890	7.678	10.48	23.00	24.27
AUC_{τ}（ng･h/mL）	NE	NE	200.3	242.7	351.0	606.9	1558	1876
TK：DF-ラクタム								
投与 1 日 [b]								
C_{max}（ng/mL）	NE	NE	NC	NC	NC	NC	NC	NC
AUC_{τ}（ng･h/mL）	NE	NE	NC	NC	NC	NC	NC	NC
投与 22 日 [a]								
C_{max}（ng/mL）	NE	NE	NC	NC	NC	NC	NC	NC
AUC_{τ}（ng･h/mL）	NE	NE	NC	NC	NC	NC	NC	NC
特記すべき所見								
死亡及び切迫剖検例数	0	0	0	0	0	0	0	0
一般状態	-	-	-	-	-	-	-	-
体重	-	-	-	-	-	-	-	-
摂餌量	-	-	-	-	-	-	-	-
摂水量	-	-	-	-	-	-	-	-
生理機能検査 [c]	-	-	-	-	-	-	-	-
眼科学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-
血液学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-
血液生化学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-

a：4 回投与後　b：1 回投与後　c：心電図、血圧、体温　NE：BLQ かつ算出対象外　NC：算出不可　-：特記すべき所見なし　LLOQ：いずれも 0.5 ng/mL

2.6.7.7.2　　イヌにおける４週間反復膝関節腔内投与毒性試験（続き）　　試験番号：[redacted]369

投与量（mg/kg）	0（PBS）		1		2		6	
例数：主群（回復群）	雄：3（2）	雌：3（2）	雄：3（0）	雌：3（0）	雄：3（0）	雌：3（0）	雄：3（2）	雌：3（2）
尿検査	-	-	-	-	-	-	-	-
剖検所見	-	-	-	-	-	-	-	-
器官重量	-	-	-	-	-	-	-	-
病理組織学的検査[a]								
膝関節滑膜								
泡沫状マクロファージ								
軽度	0（0）	0（0）	3	3	1	3	1（0）	2（0）
中等度	0（0）	0（0）	0	0	2	0	2（2）	1（2）
単核細胞浸潤								
軽度	1（0）	1（1）	2	2	3	3	3（0）	3（2）
中等度	0（0）	0（0）	0	1	0	0	0（0）	0（0）
乳頭状増生								
軽度	3（2）	2（1）	2	2	2	3	1（1）	2（1）
中等度	0（0）	1（0）	1	1	1	0	1（1）	0（1）
高度	0（0）	0（0）	0	0	0	0	1（0）	1（0）
線維化								
中等度	0（0）	0（0）	0	0	0	0	0（0）	1（0）
下腿（前脛骨筋及び長趾伸筋）：間質								
泡沫状マクロファージ								
軽度	0（0）	2（0）	0	1	0	3	1（0）	2（1）
中等度	0（0）	0（0）	0	0	0	0	2（0）	1（0）

a：発現個体数　-：特記すべき所見なし

2.6.7.7.2　　イヌにおける４週間反復膝関節腔内投与毒性試験（続き）　　試験番号：[redacted]369

投与量（mg/kg）	0（PBS）		1		2		6	
例数：主群（回復群）	雄：3（2）	雌：3（2）	雄：3（0）	雌：3（0）	雄：3（0）	雌：3（0）	雄：3（2）	雌：3（2）
病理組織学的検査（続き）[a]								
下腿（前脛骨筋及び長趾伸筋）：間質								
単核細胞浸潤								
軽度	0（0）	1（0）	0	2	0	0	2（0）	1（0）
水腫								
軽度	1（0）	2（0）	0	0	0	1	0（0）	1（0）
線維化								
軽度	0（0）	0（0）	0	1	0	0	0（0）	2（0）
下腿（前脛骨筋及び長趾伸筋）：腱								
線維化								
中等度	0（0）	0（0）	0	0	0	0	1（0）	0（0）
下腿下部（前脛骨・腓骨周囲筋肉）：筋間結合織								
泡沫状マクロファージ								
軽度	0（0）	0（0）	0	0	0	0	0（0）	2（0）
中等度	0（0）	0（0）	0	0	0	1	2（0）	0（0）
単核細胞浸潤								
軽度	0（0）	0（0）	0	0	0	1	1（0）	0（0）

a：発現個体数

2.6.7.7.2　　イヌにおける４週間反復膝関節腔内投与毒性試験（続き）　　試験番号：[redacted]369

投与量（mg/kg）	0（PBS）		1		2		6	
例数：主群（回復群）	雄：3（2）	雌：3（2）	雄：3（0）	雌：3（0）	雄：3（0）	雌：3（0）	雄：3（2）	雌：3（2）
病理組織学的検査（続き）[a]								
下腿下部（前脛骨・腓骨周囲筋肉）								
：筋間結合織								
出血								
軽度	0（0）	0（0）	0	1	0	0	0（0）	0（0）
線維化								
軽度	0（0）	0（0）	0	0	0	0	2（0）	0（0）
水腫								
軽度	0（0）	0（0）	0	0	0	0	0（0）	1（0）
中等度	0（0）	0（0）	0	0	0	0	0（0）	1（0）
膝関節液検査								
白血球数（$\times 10^4$ cells/joint）	21.5	14.6	42.4	48.3	67.2	22.6	51.8	79.3
	(38.2)	(21.5)					(44.8)	(29.7)

a：発現個体数

2.6.7.7.3　イヌにおける 13 週間反復膝関節腔内投与毒性試験　被験物質：SI-613

報告書の題名：SI-613 のイヌにおける 1 週間間隔（13 回投与）又は 4 週間間隔（4 回投与）膝関節腔内投与毒性試験

動物種/系統：ビーグル犬　投与期間：85 日間（週 1 回、計 13 回；4 週 1 回、計 4 回）　試験番号：[redacted]274

試験開始月齢：7～8 箇月　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：雄：20[redacted]年[redacted]月[redacted]日　投与方法：膝関節腔内（両膝関節腔内）　GLP 適用：適用

雌：20[redacted]年[redacted]月[redacted]日　溶媒/投与形態：PBS/溶液

特記事項：主群；最終投与後 1 週剖検（雌雄各 3 例/群）、回復群；最終投与後 4 週剖検（対照、6 mg/kg/4 weeks 及び 6 mg/kg/week の雌雄各 2 例/群）

無毒性量：雌雄 2 mg/kg/4 weeks 未満（1 mg/kg/joint/4weeks 未満）

投与量（mg/kg）/投与間隔	0（PBS）/4 週		2/4 週		6/4 週		6/1 週	
例数：主群（回復群）	雄：3（2）	雌：3（2）	雄：3（0）	雌：3（0）	雄：3（2）	雌：3（2）	雄：3（2）	雌：3（2）
TK：SI-613								
投与 43 日 [a]								
C_{max}（μg eq./mL）	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NC	NC
AUC（μg eq.･h/mL）	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NC	NC
投与 85 日 [b]								
C_{max}（μg eq./mL）	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NC	NC
AUC（μg eq.･h/mL）	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NC	NC
TK：DF								
投与 29 日 [c]								
C_{max}（ng/mL）	NE	NE	NC	NC	17.85	23.76	NA	NA
AUC_{τ}（ng･h/mL）	NE	NE	NC	NC	320.6	360.4	NA	NA

a：週 1 回投与は 7 回投与後　b：週 1 回投与は 13 回投与後　c：4 週 1 回投与は 2 回投与後　NA：評価対象なし

NE：BLQ かつ算出対象外　NC：算出不可　LLOQ：SI-613　1 μg eq./mL、DF　0.5 ng/mL

2.6.7.7.3　イヌにおける 13 週間反復膝関節腔内投与毒性試験（続き）　試験番号：[redacted]274

投与量（mg/kg）/投与間隔	0（PBS）/4 週		2/4 週		6/4 週		6/1 週	
例数：主群（回復群）	雄：3（2）	雌：3（2）	雄：3（0）	雌：3（0）	雄：3（2）	雌：3（2）	雄：3（2）	雌：3（2）
TK：DF（続き）								
投与 43 日 [a]								
C_{max}（ng/mL）	NA	NA	NA	NA	NA	NA	23.51	28.34
AUC_{τ}（ng･h/mL）	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1884	2088
投与 85 日 [b]								
C_{max}（ng/mL）	NE	NE	7.146	6.151	20.90	17.54	22.02	24.39
AUC_{τ}（ng･h/mL）	NE	NE	NC	NC	2030	1158	2728	4085
TK：DF-ラクタム								
投与 29 日 [c]								
C_{max}（ng/mL）	NA	NA	NA	NA	NC	NC	NA	NA
AUC_{τ}（ng･h/mL）	NA	NA	NA	NA	NC	NC	NA	NA
投与 43 日 [a]								
C_{max}（ng/mL）	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NC	NC
AUC_{τ}（ng･h/mL）	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NC	NC
投与 85 日 [b]								
C_{max}（ng/mL）	NA	NA	NA	NA	NC	NC	0.3610	0.3534
AUC_{τ}（ng･h/mL）	NA	NA	NA	NA	NC	NC	7.310	10.13
特記すべき所見								
死亡及び切迫剖検例数	0	0	0	0	0	0	0	0
一般状態	-	-	-	-	-	-	-	-

a：週 1 回投与は 7 回投与後　b：4 週 1 回投与は 4 回投与後、週 1 回投与は 13 回投与後　c：4 週 1 回投与は 2 回投与後
NA：評価対象なし　NE：BLQ かつ算出対象外　NC：算出不可　-：特記すべき所見なし　LLOQ：いずれも 0.5 ng/mL

2.6.7.7.3　イヌにおける 13 週間反復膝関節腔内投与毒性試験（続き）　試験番号：[redacted]274

投与量（mg/kg）/投与間隔	0（PBS）/4 週		2/4 週		6/4 週		6/1 週	
例数：主群（回復群）	雄：3（2）	雌：3（2）	雄：3（0）	雌：3（0）	雄：3（2）	雌：3（2）	雄：3（2）	雌：3（2）
体重	-	-	-	-	-	-	-	-
摂餌量	-	-	-	-	-	-	-	-
摂水量	-	-	-	-	-	-	-	-
眼科学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-
心電図検査	-	-	NA	NA	NA	NA	-	-
血液学的検査：主群								
赤血球数（$10^6/\mu L$）	7.19	6.62	6.36	6.31	6.77	6.34	6.30#	6.41
ヘモグロビン濃度（g/dL）	16.1	14.7	14.3	14.3	15.1	14.6	13.9##	14.8
ヘマトクリット値（%）	49.1	44.6	43.8	44.3	46.3	43.9	42.5##	44.7
血液学的検査：回復群								
ヘモグロビン濃度（g/dL）	14.8	16.0	NA	NA	14.2	14.6	14.0[a]	14.8
血液生化学的検査：主群								
AST（U/L）	29	30	29	33	35	31	41+	31
ALB（g/dL）	2.65	2.60	2.62	2.39	2.52	2.52	2.46##	2.61
CRE（mg/dL）	0.65	0.59	0.67	0.64	0.65	0.60	0.52##	0.61
血液生化学的検査：回復群	-	-	NA	NA	-	-	-	-
尿検査	-	-	-	-	-	-	-	-
剖検所見	-	-	-	-	-	-	-	-

NA：評価対象なし　AST：アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ　ALB：アルブミン　CRE：クレアチニン

#：$p<0.05$ PBS に対する Dunnett 検定　##：$p<0.01$ PBS に対する Dunnett 検定　+：$p<0.05$ PBS に対する Steel 検定

-：特記すべき所見なし　a：1 例では 13.0 g/dL

2.6.7.7.3　　イヌにおける 13 週間反復膝関節腔内投与毒性試験（続き）　試験番号：[redacted]274

投与量（mg/kg）/投与間隔	0（PBS）/4 週		2/4 週		6/4 週		6/1 週	
例数：主群（回復群）	雄：3（2）	雌：3（2）	雄：3（0）	雌：3（0）	雄：3（2）	雌：3（2）	雄：3（2）	雌：3（2）
器官重量：主群								
卵巣　実重量（%）[a]	NA	739 mg	NA	+11	NA	+24	NA	+143
相対重量（%）[a]	NA	9.81%	NA	+1	NA	+11	NA	+133#
子宮　実重量（%）[a]	NA	3.95 g	NA	+12	NA	+95	NA	+268
相対重量（%）[a]	NA	0.0524%	NA	0	NA	+70	NA	+256#
器官重量：回復群	-	-	NA	NA	-	-	-	-
病理組織学的検査[b]								
膝関節膝蓋骨側：滑膜								
泡沫状マクロファージ								
軽度	0（0）	0（0）	0	3	1（1）	1（0）	0（0）	1（0）
中等度	0（0）	0（0）	3	0	2（0）	1（0）	3（2）	2（2）
高度	0（0）	0（0）	0	0	0（0）	0（0）	0（0）	0（0）
乳頭状増生								
軽度	0（0）	1（0）	2	2	1（1）	3（1）	1（0）	2（0）
中等度	0（0）	0（0）	0	1	2（0）	0（0）	2（2）	1（2）
高度	0（0）	0（0）	0	0	0（0）	0（0）	0（0）	0（0）
炎症[c]								
軽度	0（0）	0（0）	0	2	0（0）	2（0）	0（0）	1（0）
中等度	0（0）	0（0）	0	0	0（0）	0（0）	1（0）	0（0）

a：PBS は平均値、SI-613 は PBS との差を%で示す　b：発現個体数　c：水腫及びフィブリン様物質を伴う

NA：評価対象なし　-：特記すべき所見なし　#：$p<0.05$ PBS に対する Dunnett 検定

2.6.7.7.3　　イヌにおける 13 週間反復膝関節腔内投与毒性試験（続き）　　試験番号：[redacted]274

投与量（mg/kg）/投与間隔	0（PBS）/4 週		2/4 週		6/4 週		6/1 週	
例数：主群（回復群）	雄：3（2）	雌：3（2）	雄：3（0）	雌：3（0）	雄：3（2）	雌：3（2）	雄：3（2）	雌：3（2）
病理組織学的検査[a]（続き）								
膝関節種子骨側大腿骨付着部：滑膜								
炎症[b]								
軽度	0（0）	0（0）	0	2	1（0）	1（0）	0（2）	0（0）
中等度	0（0）	0（0）	1	1	2（0）	2（0）	1（0）	3（0）
高度	0（0）	0（0）	0	0	0（0）	0（0）	1（0）	0（0）
線維化								
軽度	0（0）	0（0）	0	1	1（0）	0（1）	0（0）	1（0）
中等度	0（0）	0（0）	0	0	0（0）	0（0）	0（0）	0（2）
膝関節脛骨付着部滑膜：滑膜								
炎症[b]								
軽度	0（0）	0（0）	0	0	0（0）	0（0）	0（0）	0（0）
中等度	0（0）	0（0）	0	0	0（0）	0（0）	1（0）	0（0）
高度	0（0）	0（0）	0	0	0（0）	0（0）	1（0）	0（0）
下腿上部（前脛骨筋及び長趾伸筋）：間質								
泡沫状マクロファージ								
軽度	0（0）	0（0）	0	1	1（1）	0（2）	0（2）	0（2）
中等度	0（0）	0（0）	1	0	2（0）	2（0）	1（0）	1（0）
高度	0（0）	0（0）	0	0	0（0）	1（0）	2（0）	2（0）

a：発現個体数　b：水腫及びフィブリン様物質を伴う

2.6.7.7.3　　イヌにおける 13 週間反復膝関節腔内投与毒性試験（続き）　　試験番号：[redacted]274

投与量（mg/kg）/投与間隔	0（PBS）/4 週		2/4 週		6/4 週		6/1 週	
例数：主群（回復群）	雄：3（2）	雌：3（2）	雄：3（0）	雌：3（0）	雄：3（2）	雌：3（2）	雄：3（2）	雌：3（2）
病理組織学的検査[a]（続き）								
下腿上部（前脛骨筋及び長趾伸筋）								
：間質								
出血								
軽度	0（0）	0（0）	0	0	0（0）	0（0）	1（0）	0（0）
水腫								
軽度	0（0）	0（0）	1	0	0（0）	2（0）	1（0）	0（0）
中等度	0（0）	0（0）	0	0	0（0）	0（0）	1（0）	0（0）
単核細胞浸潤								
軽度	0（0）	0（0）	1	0	0（1）	1（0）	1（0）	0（0）
線維化								
軽度	0（0）	0（0）	0	0	0（0）	0（0）	0（0）	0（0）
中等度	0（0）	0（0）	0	0	0（0）	0（0）	1（0）	0（0）
下腿下部（前脛骨筋の筋腱移行部）								
腱周囲組織								
泡沫状マクロファージ								
軽度	0（0）	0（0）	0	1	0（0）	1（1）	1（0）	1（1）
中等度	0（0）	0（0）	0	0	0（0）	2（0）	2（0）	1（0）
高度	0（0）	0（0）	0	0	0（0）	0（0）	0（0）	1（0）

a：発現動物数

2.6.7.7.3　　イヌにおける 13 週間反復膝関節腔内投与毒性試験（続き）　　試験番号：[redacted]274

投与量（mg/kg）/投与間隔	0（PBS）/4 週		2/4 週		6/4 週		6/1 週	
例数：主群（回復群）	雄：3（2）	雌：3（2）	雄：3（0）	雌：3（0）	雄：3（2）	雌：3（2）	雄：3（2）	雌：3（2）
病理組織学的検査[a]（続き）								
下腿下部（前脛骨筋の筋腱移行部）								
腱周囲組織：間質								
水腫								
軽度	0（0）	0（0）	0	0	0（0）	0（0）	1（0）	0（0）
単核細胞浸潤								
軽度	0（0）	0（0）	0	0	0（0）	0（0）	1（0）	0（0）
内側腸骨リンパ節								
髄質、髄洞								
泡沫状マクロファージ								
軽度	0（0）	0（0）	3	3	2（1）	0（2）	0（2）	0（1）
中等度	0（0）	0（0）	0	0	1（0）	3（0）	2（0）	3（1）
高度	0（0）	0（0）	0	0	0（0）	0（0）	1（0）	0（0）
髄質、髄索								
空胞化泡沫状マクロファージ								
軽度	0（0）	0（0）	0	1	1（0）	1（1）	1（1）	0（0）
中等度	0（0）	0（0）	0	0	0（0）	1（0）	2（1）	3（2）
膝関節液検査：主群								
細胞数（10^4 cells/joint）	34.0	40.6	133.5	106.5	84.2	96.3	326.1	114.9
リンパ球比率（%）	26.2	37.6	32.5	34.1	51.9#	54.5#	55.4#	61.1##

a：発現動物数　#：p<0.05 PBS に対する Dunnett 検定　##：p<0.01 PBS に対する Dunnett 検定

2.6.7.7.4　ラットにおける 4 週間反復静脈内投与毒性試験　被験物質：SI-613

報告書の題名：SI-613 のラットにおける 4 週間反復静脈内投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

動物種/系統：ラット/SD　投与期間：4 週間（28 日間）　試験番号：[redacted]042

試験開始週齢：6 週齢　休薬期間：4 週間（28 日間）　CTD における記載箇所：4.2.3.2-4

初回投与年月日：雄：20[redacted]年[redacted]月[redacted]日　投与方法：静脈内　GLP 適用：適用

雌：20[redacted]年[redacted]月[redacted]日　溶媒/投与形態：PBS/溶液

特記事項：主群；4 週間反復投与後剖検（雌雄各 12 例/群）、回復群；4 週間休薬後剖検（対照及び 10 mg/kg の雌雄各 6 例/群）

無毒性量：雌雄 1 mg/kg/day

投与量（mg/kg）	0（PBS）		1		3		10	
例数：サテライト動物（時点毎）	雄：4	雌：4	雄：4	雌：4	雄：4	雌：4	雄：4	雌：4
TK：SI-613								
投与 1 日								
C_{max}（μg eq./mL）	NE	NE	6.221	5.550	12.24	13.74	28.76	33.32
AUC_{τ}（μg eq.･h/mL）	NE	NE	0.2592	0.2313	14.56	15.77	49.79	53.99
投与 28 日								
C_{max}（μg eq./mL）	NE	NE	6.592	6.064	13.66	18.23	29.17	41.25
AUC_{τ}（μg eq.･h/mL）	NE	NE	0.2747	0.2527	26.63	32.77	53.41	67.80

NE：BLQ かつ算出対象外　LLOQ：1 μg eq./mL

2.6.7.7.4　　ラットにおける 4 週間反復静脈内投与毒性試験（続き）　　試験番号：[redacted]042

投与量（mg/kg）	0（PBS）		1		3		10	
例数：サテライト動物（時点毎）	雄：4	雌：4	雄：4	雌：4	雄：4	雌：4	雄：4	雌：4
TK：DF								
投与 1 日								
C_{max}（ng/mL）	NE	NE	0.8518	0.9403	2.247	2.809	7.196	7.462
AUC_{τ}（ng･h/mL）	NE	NE	10.41	11.66	43.41	50.27	130.6	160.0
投与 28 日								
C_{max}（ng/mL）	NE	NE	2.736	4.230	7.004	12.28	18.96	29.49
AUC_{τ}（ng･h/mL）	NE	NE	43.27	89.00	110.1	222.1	295.0	562.7
TK：DF-ラクタム								
投与 1 日								
C_{max}（ng/mL）	NE	NE	NC	NC	0.7262	0.7329	2.598	2.994
AUC_{τ}（ng･h/mL）	NE	NE	NC	NC	0.03026	0.03054	4.396	4.630
投与 28 日								
C_{max}（ng/mL）	NE	NE	NC	NC	0.9891	1.170	2.942	2.967
AUC_{τ}（ng･h/mL）	NE	NE	NC	NC	1.409	2.112	4.943	5.605

NE：BLQ かつ算出対象外　NC：算出不可　LLOQ：DF 及び DF-ラクタム共に 0.5 ng/mL

2.6.7.7.4　　ラットにおける４週間反復静脈内投与毒性試験（続き）　　試験番号：[redacted]042

投与量（mg/kg）	0（PBS）		1		3		10	
例数：主群（回復群）	雄：12（6）	雌：12（6）	雄：12	雌：12	雄：12	雌：12	雄：12（6）	雌：12（6）
特記すべき所見								
死亡及び切迫剖検例数	0	0	0	0	0	0	0	0
一般状態：主群								
よろめき歩行[a]	0	0	0	0	0	3	18	18
一般状態：回復群	-	-	-	-	-	-	-	-
体重	-	-	-	-	-	-	-	-
摂餌量	-	-	-	-	-	-	-	-
摂水量	-	-	-	-	-	-	-	-
生理機能検査：評価例数	雄：6	雌：6	雄：6	雌：6	雄：0	雌：0	雄：0	雌：0
機能観察総合評価	-	-	-	-	NA	NA	NA	NA
呼吸系検査	-	-	-	-	NA	NA	NA	NA
眼科学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-
血液学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-
血液生化学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-
尿検査	-	-	-	-	-	-	-	-
剖検	-	-	-	-	-	-	-	-

a：投与直後のみに発現　-：特記すべき所見なし　NA：評価対象外

2.6.7.7.4　　ラットにおける 4 週間反復静脈内投与毒性試験（続き）　　試験番号：[redacted]042

投与量（mg/kg）	0（PBS）		1		3		10	
例数：主群（回復群）	雄：12（6）	雌：12（6）	雄：12	雌：12	雄：12	雌：12	雄：12（6）	雌：12（6）
器官重量：主群								
肝臓								
実重量（%）[a]	9.9 g	6.2 g	+2	-2	+6	0	+13##	+10
相対重量（%）[a]	2.862%	2.962%	+2	+0	+4	+5	+12##	+14##
器官重量：回復群								
肝臓								
実重量（%）[a]	12.4 g	6.4 g	NA	NA	NA	NA	+3	+8
相対重量（%）[a]	2.745%	2.626%	NA	NA	NA	NA	-0	+8$

a：PBS は平均値、SI-613 は PBS との差を%で示す

##：p<0.01 PBS に対する Dunnett 検定　$：p<0.05 PBS に対する Student の t 検定　NA：評価対象なし

2.6.7.7.4　　ラットにおける４週間反復静脈内投与毒性試験（続き）　　試験番号：[redacted]042

投与量（mg/kg）	0（PBS）		1		3		10	
例数：主群（回復群）	雄：12（6）	雌：12（6）	雄：12	雌：12	雄：12	雌：12	雄：12（6）	雌：12（6）
病理組織学的検査：主群（回復群）								
肺								
多核巨細胞からなる小肉芽腫								
軽度	0（0）	2（0）	11	12	9	10	0（3）	1（6）
中程度	0（0）	0（0）	1	0	3	2	12（3）	11（0）
肝臓								
泡沫状のクッパー細胞								
軽度	0（0）	0（0）	0	0	12	10	0（0）	0（0）
中程度	0（0）	0（0）	0	0	0	2	12（6）	12（6）
脾臓：赤脾髄								
泡沫状マクロファージ								
軽度	0（0）	0（0）	0	0	0	0	10（1）	9（0）
中程度	0（0）	0（0）	0	0	0	0	2（0）	3（0）
投与部位（尾）：血管周囲								
泡沫状マクロファージ								
軽度	0（0）	0（0）	0	0	0	0	5（0）	8（0）

2.6.7.7.5　ラットにおける 26 週間反復静脈内投与毒性試験　　被験物質：SI-613

報告書の題名：　SI-613 のラットにおける 26 週間反復静脈内投与毒性試験及び 13 週間回復性試験

動物種/系統：ラット/SD　　投与期間：26 週間（182 日間）　　試験番号：[redacted]273

試験開始週齢：7 週齢　　休薬期間：13 週間（91 日間）　　CTD における記載箇所：4.2.3.2-5

初回投与年月日：雄：20[redacted]年[redacted]月[redacted]日　　投与方法：静脈内　　GLP 適用：適用

雌：20[redacted]年[redacted]月[redacted]日　　溶媒/投与形態：PBS/溶液

特記事項：主群；26 週間反復投与後剖検（雌雄各 10 例/群）、回復群；13 週間休薬後剖検（対照及び 3 mg/kg の雌雄各 5 例/群）

SI-613 投与に関連しない変化として、サテライト動物の対照の雄 1 例が投与 94 日に、1 mg/kg の雄 1 例が投与 74 日に、並びに主群の 0.3 mg/kg の雄 1 例が投与 31 日の投与前に死亡。

無毒性量：雌雄 3 mg/kg/day

投与量（mg/kg）	0（PBS）		0.3		1		3	
例数：サテライト動物	雄：4[a]	雌：4	雄：4	雌：4	雄：4[b]	雄：4	雄：4	雌：4
TK：SI-613								
投与 1 日								
C_{max}（μg eq./mL）	NE	NE	1.312	1.250	NA	NA	NA	NA
AUC_{τ}（μg eq.・h/mL）	NE	NE	0.05467	0.05208	NA	NA	NA	NA
投与 91 日								
C_{max}（μg eq./mL）	NE	NE	1.972	2.887	7.739	10.49	19.41	22.49
AUC_{τ}（μg eq.・h/mL）	NE	NE	0.08216	0.1203	3.232	6.334	34.81	40.86
投与 182 日								
C_{max}（μg eq./mL）	NE	NE	1.845	2.350	7.703	10.75	26.91	26.18
AUC_{τ}（μg eq.・h/mL）	NE	NE	0.07689	0.09794	9.995	9.698	41.88	43.63

NE：BLQ かつ算出対象外　NA：測定対象外　LLOQ：1 μg eq./mL　a：1 例が投与 94 日に死亡　b：1 例が投与 74 日に死亡

2.6.7.7.5　　ラットにおける 26 週間反復静脈内投与毒性試験（続き）　　試験番号：[redacted]273

投与量（mg/kg）	0（PBS）		0.3		1		3	
例数：サテライト動物（続き）	雄：4[a]	雌：4	雄：4	雌：4	雄：4[b]	雄：4	雄：4	雌：4
TK：DF								
投与 1 日								
C_{max}（ng/mL）	NA	NA	NC	NC	NA	NA	NA	NA
AUC_{τ}（ng･h/mL）	NA	NA	NC	NC	NA	NA	NA	NA
投与 91 日								
C_{max}（ng/mL）	NA	NA	1.085	1.902	3.847	7.847	8.738	18.71
AUC_{τ}（ng･h/mL）	NA	NA	20.86	36.42	67.56	141.8	156.7	345.8
投与 182 日								
C_{max}（ng/mL）	NA	NA	1.435	2.477	4.494	8.418	10.61	21.71
AUC_{τ}（ng･h/mL）	NA	NA	25.83	51.22	79.48	173.5	202.0	467.7
TK：DF-ラクタム								
投与 1 日								
C_{max}（ng/mL）	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AUC_{τ}（ng･h/mL）	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
投与 91 日								
C_{max}（ng/mL）	NA	NA	NC	NC	NC	NC	1.050	0.9855
AUC_{τ}（ng･h/mL）	NA	NA	NC	NC	NC	NC	0.9050	1.622
投与 182 日								
C_{max}（ng/mL）	NA	NA	NC	NC	0.4942	NC	2.500	1.349
AUC_{τ}（ng･h/mL）	NA	NA	NC	NC	0.02059	NC	3.739	1.327

NA：測定対象外　NC：算出不可　LLOQ：DF 及び DF-ラクタム共に 0.5 ng/mL　a：1 例が投与 94 日に死亡　b：1 例が投与 74 日に死亡

2.6.7.7.5　　ラットにおける 26 週間反復静脈内投与毒性試験（続き）　　試験番号：[redacted]273

投与量（mg/kg）	0（PBS）		0.3		1		3	
例数：主群（回復群）	雄：10（5）	雌：10（5）	雄：10	雌：10	雄：10	雌：10	雄：10（5）	雌：10（5）
特記すべき所見								
死亡及び切迫剖検例数	0	0	1[b]	0	0	0	0	0
一般状態	-	-	-	-	-	-	-	-
体重	-	-	-	-	-	-	-	-
摂餌量	-	-	-	-	-	-	-	-
摂水量	-	-	-	-	-	-	-	-
眼科学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-
血液学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-
血液生化学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-
尿検査	-	-	-	-	-	-	-	-
剖検	-	-	-	-	-	-	-	-
器官重量（主群）								
肝臓　実重量（%）[a]	14.8 g	8.4 g	+3	+2	-6	+2	+12	+10
相対重量（%）[a]	2.451%	2.442%	+4	+3	-1	+5	+8	+15##
器官重量（回復群）								
肝臓　実重量（%）[a]	18.1 g	11.1 g	NA	NA	NA	NA	-13	-2
相対重量（%）[a]	2.469%	2.576%	NA	NA	NA	NA	-3	-2

-：特記すべき所見なし　NA：評価対象なし　##：p<0.01 PBS に対する Dunnett 検定

a：PBS は平均値、SI-613 は PBS との差を%で示す　b：投与 31 日に死亡

2.6.7.7.5　　ラットにおける 26 週間反復静脈内投与毒性試験　　試験番号：[redacted]273（続き）

投与量（mg/kg）	0（PBS）		0.3		1		3	
例数：主群（回復群）	雄：10（5）	雌：10（5）	雄：10	雌：10	雄：10	雌：10	雄：10（5）	雌：10（5）
病理組織学的検査：主群（回復群）								
肺								
多核巨細胞からなる小肉芽腫								
軽度	0（0）	0（0）	7	9	10	10	10（5）	10（5）
肝臓								
泡沫状のクッパー細胞								
軽度	0（0）	0（0）	0	0	0	0	1（0）	3（0）
中程度	0（0）	0（0）	0	0	0	0	9（0）	7（0）
脾臓：赤脾髄								
泡沫状マクロファージ								
軽度	0（0）	0（0）	0[a]	0	0	0	4（0）	5（0）
投与部位（尾）：血管周囲								
泡沫状マクロファージ								
軽度	0（0）	0（0）	0	0	0	0	3（0）	3（0）

NA：評価対象なし

a：投与 31 日に死亡した 1 例については、自己融解のため観察を行わなかった

2.6.7.8 In vitro 遺伝毒性試験

2.6.7.8.1 細菌を用いた復帰突然変異試験

被験物質：SI-613

報告書の題名： SI-613 の細菌を用いた復帰突然変異試験

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

試験番号：[redacted]099

菌株：*S.typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 及び *E.coli* WP2*uvr*A

プレート数：3

CTD における記載箇所：4.2.3.3.1-1

代謝活性系：フェノバルビタール及び
5,6-ベンゾフラボン酵素誘導したラット肝 S9mix

分析細胞/培養：-

GLP 適用：適用

溶媒：SI-613；PBS、陽性対照；日本薬局方注射用水又はジメチルスルホキシド

処理年月：20[redacted]年[redacted]月

処理：プレインキュベーション法

細胞毒性：なし

遺伝毒性：遺伝子突然変異誘発性なし

2.6.7.8.1　細菌を用いた復帰突然変異試験（続き）　試験番号：[redacted]099

代謝活性化	被験物質	濃度 (μg/plate)	用量設定試験：復帰変異コロニー数（平均値±標準偏差）				
			TA100	TA1535	TA98	TA1537	WP2*uvr*A
代謝活性化なし	WFI	0.1 mL/plate	104 ± 6	11 ± 2	15 ± 3	8 ± 1	24 ± 6
	PBS	0.5 mL/plate	109 ± 6	9 ± 3	14 ± 6	10 ± 2	28 ± 3
	SI-613	50	102 ± 7	15 ± 4	19 ± 4	8 ± 3	19 ± 1
		150	113 ± 6	8 ± 2	16 ± 4	11 ± 8	15 ± 1
		500	101 ± 9	13 ± 4	14 ± 5	13 ± 1	19 ± 5
		1500	98 ± 14	12 ± 5	10 ± 2	10 ± 5	24 ± 7
		5000	86 ± 5	7 ± 2	16 ± 3	11 ± 5	19 ± 6
	AF-2	0.01	629 ± 53	-	-	-	98 ± 4
		0.1	-	-	315 ± 15	-	-
	NaN_3	0.5	-	205 ± 25	-	-	-
	9-AA	80	-	-	-	227 ± 88	-
	AF-2 and PBS[a]	0.01	649 ± 34	-	-	-	92 ± 12
		0.1	-	-	458 ± 41	-	-
	NaN_3 and PBS[a]	0.5	-	182 ± 36	-	-	-
	9-AA and PBS[a]	80	-	-	-	162 ± 32	-

-：該当なし

WFI：日本薬局方注射用水　AF-2：2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド　NaN_3：アジ化ナトリウム　9-AA：9-アミノアクリジン塩酸塩水和物

a：PBS 0.4 mL/plate

2.6.7.8.1　　細菌を用いた復帰突然変異試験（続き）　　試験番号：[redacted]099

代謝活性化	被験物質	濃度 (μg/plate)	用量設定試験：復帰変異コロニー数（平均値±標準偏差）				
			TA100	TA1535	TA98	TA1537	WP2*uvr*A
代謝活性化あり	WFI	0.1 mL/plate	122 ± 12	11 ± 2	25 ± 4	17 ± 4	29 ± 4
	PBS	0.5 mL/plate	131 ± 15	8 ± 1	22 ± 1	14 ± 4	28 ± 4
	SI-613	50	130 ± 13	11 ± 1	30 ± 7	13 ± 3	27 ± 4
		150	137 ± 13	11 ± 2	23 ± 4	10 ± 4	23 ± 5
		500	123 ± 15	10 ± 3	27 ± 6	11 ± 3	19 ± 2
		1500	129 ± 12	11 ± 4	23 ± 8	11 ± 4	26 ± 1
		5000	129 ± 21	14 ± 3	29 ± 7	11 ± 1	23 ± 2
	2-AA	0.5	-	-	297 ± 32	-	-
		1	1712 ± 230	-	-	-	-
		2	-	365 ± 31	-	433 ± 56	-
		10	-	-	-	-	1042 ± 97
	2-AA and PBS[a]	0.5	-	-	220 ± 41	-	-
		1	1333 ± 245	-	-	-	-
		2	-	280 ± 7	-	234 ± 12	-
		10	-	-	-	-	530 ± 85

-：該当なし

WFI：日本薬局方注射用水　2-AA：2-アミノアントラセン

a：PBS 0.4 mL/plate

2.6.7.8.1　細菌を用いた復帰突然変異試験（続き）　　試験番号：[redacted]099

代謝活性化	被験物質	濃度 (μg/plate)	本試験：復帰変異コロニー数（平均値±標準偏差）				
			TA100	TA1535	TA98	TA1537	WP2*uvr*A
代謝活性化なし	WFI	0.1 mL/plate	103 ± 3	13 ± 1	22 ± 3	16 ± 1	15 ± 6
	PBS	0.5 mL/plate	106 ± 4	12 ± 2	21 ± 6	13 ± 3	20 ± 7
	SI-613	313	118 ± 22	12 ± 2	27 ± 4	16 ± 5	16 ± 6
		625	102 ± 8	10 ± 2	20 ± 5	12 ± 1	14 ± 1
		1250	120 ± 9	12 ± 2	21 ± 4	14 ± 5	21 ± 2
		2500	117 ± 12	11 ± 3	27 ± 2	11 ± 1	18 ± 3
		5000	111 ± 5	10 ± 3	22 ± 1	12 ± 6	23 ± 6
	AF-2	0.01	633 ± 49	-	-	-	88 ± 4
		0.1	-	-	318 ± 19	-	-
	NaN_3	0.5	-	310 ± 9	-	-	-
	9-AA	80	-	-	-	172 ± 62	-
	AF-2 and PBS[a]	0.01	613 ± 12	-	-	-	99 ± 3
		0.1	-	-	352 ± 16	-	-
	NaN_3 and PBS[a]	0.5	-	291 ± 16	-	-	-
	9-AA and PBS[a]	80	-	-	-	125 ± 25	-

-：該当なし

WFI：日本薬局方注射用水　AF-2：2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド　NaN_3：アジ化ナトリウム　9-AA：9-アミノアクリジン塩酸塩水和物

a：PBS 0.4 mL/plate

2.6.7.8.1 細菌を用いた復帰突然変異試験（続き）　　試験番号：[redacted]099

代謝活性化	被験物質	濃度 (μg/plate)	本試験：復帰変異コロニー数（平均値±標準偏差）				
			TA100	TA1535	TA98	TA1537	WP2*uvr*A
代謝活性化あり	WFI	0.1 mL/plate	132 ± 14	13 ± 2	33 ± 8	20 ± 2	21 ± 5
	PBS	0.5 mL/plate	139 ± 7	13 ± 1	34 ± 3	16 ± 7	18 ± 5
	SI-613	313	146 ± 16	12 ± 4	34 ± 6	13 ± 5	25 ± 2
		625	141 ± 14	11 ± 2	32 ± 2	21 ± 9	19 ± 2
		1250	116 ± 13	12 ± 2	24 ± 2	16 ± 1	17 ± 3
		2500	136 ± 4	11 ± 1	25 ± 5	10 ± 4	15 ± 6
		5000	143 ± 8	11 ± 1	24 ± 7	12 ± 1	19 ± 5
	2-AA	0.5	-	-	349 ± 18	-	-
		1	1610 ± 172	-	-	-	-
		2	-	288 ± 10	-	265 ± 30	-
		10	-	-	-	-	1147 ± 50
	2-AA and PBS[a]	0.5	-	-	277 ± 25	-	-
		1	1346 ± 68	-	-	-	-
		2	-	230 ± 69	-	191 ± 9	-
		10	-	-	-	-	853 ± 110

-：該当なし

WFI：日本薬局方注射用水　2-AA：2-アミノアントラセン

a：PBS 0.4 mL/plate

2.6.7.8.2　ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験

被験物質：SI-613

報告書の題名：SI-613 のほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験

試験の種類：染色体異常試験　独立して実施した試験数：1　試験番号：[redacted]100

系統：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

代謝活性系：フェノバルビタール及び 5,6-ベンゾフラボン酵素誘導したラット肝　S9mix　分析細胞/培養：100　GLP 適用：適用

溶媒：SI-613；PBS、陽性対照：日本薬局方注射用水又はジメチルスルホキシド　処理年月：20[redacted]年[redacted]月

処理：短時間処理法（6 時間処理＋18 時間回復）、連続処理法（24 時間処理＋0 時間回復）

細胞毒性：あり

遺伝毒性：染色体異常誘発性なし

2.6.7.8.2　　ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験（続き）　　試験番号：[redacted]100

代謝活性化	被験物質	濃度（μg/mL）		予備試験：細胞増殖抑制試験				
			処理	細胞増殖率（%）	IC_{50}（μg/mL）	処理	細胞増殖率（%）	IC_{50}（μg/mL）
代謝活性化なし	WFI	0	短時間処理	100.0		連続処理	100.0	
	PBS	0		89.5			83.5	
	SI-613	313		94.0	3770		89.5	1695
		625		91.5			84.5	
		1250		89.5			61.5	
		2500		74.0			38.5	
		5000		33.5			9.5	
代謝活性化あり	WFI	0	短時間処理	100.0				
	PBS	0		109.0				
	SI-613	313		99.0	NC			
		625		103.5				
		1250		109.5				
		2500		109.5				
		5000		68.0				

WFI：日本薬局方注射用水　NC：算出不可

2.6.7.8.2　　ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験（続き）　　試験番号：[redacted]100

代謝活性化	被験物質	濃度（μg/mL）	本試験：染色体異常試験							
			処理	細胞増殖率（%）	構造異常出現率（%）	数的異常出現率（%）	処理	細胞増殖率（%）	構造異常出現率（%）	数的異常出現率（%）
代謝活性化なし	WFI	0	短時間処理	100.0	0.0	0.5	連続処理	100.0	0.0	0.0
	PBS	0		91.0	0.0	1.0		81.0	1.0	0.0
	SI-613	313		-	-	-		86.5	0.0	0.5
		625		91.0	0.0	0.0		79.0	1.0	0.0
		1250		90.5	0.0	1.0		45.0	0.0	1.5
		2500		67.5	0.0	0.0		32.0	0.0	1.0
		5000		34.0	0.0	2.1		-	-	-
	マイトマイシン C	0.1[a]		-	54.5	0.5		-	56.5	0.0
代謝活性化あり	WFI	0	短時間処理	100.0	0.5	1.0				
	PBS	0		115.0	0.5	1.0				
	SI-613	1250		104.5	0.5	0.5				
		2500		104.5	0.5	1.5				
		5000		76.0	0.5	1.0				
	ベンゾ[a]ピレン	10		-	38.0	0.0				

-：該当なし　WFI：日本薬局方注射用水　a：連続処理の濃度は 0.05 μg/mL

2.6.7.9 In vivo 遺伝毒性試験

2.6.7.9.1 ラットにおける小核試験

被験物質：SI-613

報告書の題名： SI-613 のラットにおける静脈内投与による小核試験

試験方法：骨髄細胞の小核試験　処理計画：2 日間連日投与　試験番号：[redacted]164

動物種/系統：ラット/SD　計測時間：2 回目投与後 23～24 時間　CTD における記載箇所：4.2.3.3.2-1

週齢：8 週齢（投与時）　投与方法：静脈内　GLP 適用：適用

評価した細胞：幼若赤血球、全赤血球　溶媒/投与形態：PBS　投与年月：20[redacted]年[redacted]月

分析細胞数：小核を有する幼若赤血球出現率は 2000 個の幼若赤血球、全赤血球中に占める幼若赤血球の割合は 1000 個の全赤血球を観察し算出

毒性/細胞毒性：雌雄ともに 10 mg/kg で投与 1 又は 2 日の投与直後によろめき歩行が認められた。TK は実施しなかった。

遺伝毒性：小核誘発性なし

暴露証明：なし

被験物質	投与量 (mg/kg)	例数	小核を有する幼弱赤血球出現率 (%、平均値±標準偏差)	全赤血球中に占める幼弱赤血球の割合 (%、平均値±標準偏差)
PBS	0	雄：6	0.09 ± 0.07	42.7 ± 13.9
		雌：6	0.11 ± 0.13	35.8 ± 4.7
SI-613	1	雄：6	0.12 ± 0.10	44.6 ± 11.5
		雌：6	0.10 ± 0.07	46.8 ± 6.7#
	3	雄：6	0.08 ± 0.05	40.2 ± 10.7
		雌：6	0.14 ± 0.07	50.3 ± 10.2##
	10	雄：6	0.10 ± 0.06	40.1 ± 8.4
		雌：6	0.09 ± 0.07	55.3 ± 5.7##
シクロフォスファミド	15	雄：6	2.03 ± 0.53**	35.7 ± 3.6
		雌：6	1.53 ± 0.30**	30.9 ± 5.2

**：p<0.01 PBS に対する Fisher の直接確率検定　#：p<0.05 PBS に対する Dunnett 検定、##：p<0.01 PBS に対する Dunnett 検定

2.6.7.10　　がん原性試験

該当する試験は実施しなかった。

2.6.7.11　　生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

該当する試験は実施しなかった。

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　被験物質：SI-613

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

報告書の題名：SI-613 のラットにおける静脈内投与による受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

試験計画：ICH S5（R2）準拠
動物種/系統：ラット/SD
試験開始週齢：雄：10 週齢、雌：9 週齢
初回投与年月日：20[redacted]年[redacted]月[redacted]日
溶媒/投与形態：PBS/溶液
特記事項：TK は実施しなかった。
無毒性量：F_0 雌雄の一般毒性；3 mg/kg/day
　　F_0 雌雄の生殖機能及び初期胚発生；10 mg/kg/day

投与期間：雄：交配前 14 日～剖検前日
　　雌：交配前 14 日～妊娠 7 日
交尾成立日：妊娠 0 日
帝王切開日：妊娠 13 日
投与方法：静脈内

試験番号：[redacted]055
CTD における記載箇所：4.2.3.5.1-1
GLP 適用：適用

2.6.7.12.1　ラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（続き）　試験番号[redacted]055

投与量（mg/kg）		0（PBS）	1	3	10
F_0 雄	評価例数	20	20	20	20
	死亡及び切迫剖検例数	0	0	0	0
	剖検	-	-	-	-
	一般状態				
	よろめき歩行 [a]	0	0	0	19
	運動性の低下 [a]	0	0	0	13
	不規則呼吸 [a]	0	0	0	8
	体重	-	-	-	-
	摂餌量	-	-	-	-
	生殖器官（精巣、精巣上体、前立腺及び精嚢）重量	-	-	-	-
F_0 雌	評価例数	20	20	20	20
	死亡及び切迫剖検例数	0	0	0	0
	一般状態：交配前				
	よろめき歩行 [a]	0	0	0	10
	運動性の低下 [a]	0	0	0	6
	一般状態：妊娠期間				
	よろめき歩行 [a]	0	0	0	2
	運動性の低下 [a]	0	0	0	2

-：特記すべき所見なし　a：投与直後のみに発現

2.6.7.12.1　ラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（続き）　試験番号[redacted]055

投与量（mg/kg）		0（PBS）	1	3	10
F_0 雌（続き）	評価例数 [a]	20	20	20	20
	妊娠例数	20	19	20	19
	剖検	-	-	-	-
	交配前体重	-	-	-	-
	妊娠時体重（%）[b]				
	妊娠 2 日	274 g	- 2	- 1	- 1
	妊娠 4 日	282 g	- 2	- 2	- 1
	妊娠 13 日	323 g	0	- 1	0
	妊娠時体重増加量（%）[b]				
	妊娠 2 日	13 g	- 15	0	- 31#
	妊娠 4 日	20 g	- 5	0	- 20#
	妊娠 13 日	61 g	+ 5	+ 3	0
	交配前摂餌量	-	-	-	-
	妊娠時摂餌量（%）[b]				
	妊娠 1-2 日	22.3 g	- 8++	- 4	- 8
	妊娠 2-3 日	22.7 g	- 9##	- 5	- 5
	妊娠 6-7 日	23.7 g	- 7#	- 6	- 3
	妊娠 11-13 日	25.7 g	0	0	+ 2

-：特記すべき所見なし　#：p<0.05 PBS に対する Dunnett 検定、##：p<0.01 PBS に対する Dunnett 検定　++：p<0.01 PBS に対する Steel 検定

a：交配前の評価は全例、妊娠期間の評価は妊娠動物を対象とした　b：PBS は平均値、SI-613 は PBS との差を%で示す

2.6.7.12.1　ラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（続き）　試験番号[redacted]055

投与量（mg/kg）		0（PBS）	1	3	10
F_0雌（続き）	評価例数[a]	20	20	20	20
	平均性周期（日）	4.3	4.1	4.3	4.4
	交尾成立例数	20	20	20	20
	妊娠例数	20	19	20	19
	交尾率（%）	100.0	100.0	100.0	100.0
	受胎率（%）	100.0	95.0	100.0	95.0
	平均交尾成立日数	3.4	2.7	3.0	2.9
	平均黄体数/腹	16.8	16.8	16.7	16.6
	平均着床数/腹	15.7	15.6	16.0	15.3
	平均生存胚数/腹	15.2	14.9	15.3	14.4
	平均着床前死亡率（%）	6.3	6.0	3.8	7.3
	平均着床後死亡率（%）	3.4	4.7	4.3	6.5

a：交配前の評価は全例、妊娠期間の評価は妊娠動物を対象とした。

2.6.7.13　生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

2.6.7.13.1　ラットにおける胚・胎児発生に関する試験

被験物質：SI-613

報告書の題名：SI-613 のラットにおける静脈内投与による胚・胎児発生に関する試験

試験計画：ICH S5（R2）準拠
投与期間：妊娠 7～17 日
試験番号：[redacted]241
動物種/系統：ラット/SD
交尾成立日：妊娠 0 日
CTD における記載箇所：4.2.3.5.2-1
試験開始週齢：雄 11～12 週齢、雌 10～11 週齢（交尾成立時）
帝王切開日：妊娠 20 日
GLP 適用：適用
初回投与年月日：20[redacted]年[redacted]月[redacted]日
投与方法：静脈内
特記事項：なし
溶媒/投与形態：PBS/溶液
無毒性量：母動物の一般毒性；3 mg/kg/day
母動物の生殖機能及び胚・胎児発生；10 mg/kg/day

投与量（mg/kg）		0（PBS）	1	3	10
雌/母動物	評価例数（時点毎）	5	5	5	5
	TK：SI-613				
	妊娠 7 日				
	C_{max}（μg eq./mL）	NE	10.51	18.16	39.58
	AUC_{τ}（μg eq.･h/mL）	NE	0.4379	27.54	68.27
	妊娠 17 日				
	C_{max}（μg eq./mL）	NE	3.336	8.392	23.65
	AUC_{τ}（μg eq.･h/mL）	NE	0.1390	14.69	314.9

NE：BLQ かつ算出対象外　LLOQ：1 μg eq./mL

2.6.7.13.1　　ラットにおける胚・胎児発生に関する試験（続き）　　試験番号：[redacted]241

投与量（mg/kg）		0（PBS）	1	3	10
雌/母動物（続き）	評価例数（時点毎）	5	5	5	5
	TK：DF				
	妊娠 7 日				
	C_{max}（ng/mL）	NE	1.545	4.026	11.03
	AUC_{τ}（ng·h/mL）	NE	23.93	77.53	205.8
	妊娠 17 日				
	C_{max}（ng/mL）	NE	4.343	15.45	31.91
	AUC_{τ}（ng·h/mL）	NE	90.85	279.7	682.6
	TK：DF-ラクタム				
	妊娠 7 日				
	C_{max}（ng/mL）	NE	0.7634	1.535	4.647
	AUC_{τ}（ng·h/mL）	NE	0.03181	2.188	7.950
	妊娠 17 日				
	C_{max}（ng/mL）	NE	NC	0.6760	3.015
	AUC_{τ}（ng·h/mL）	NE	NC	1.094	5.004

NE：BLQ かつ算出対象外　NC：算出不可　LLOQ：DF 及び DF-ラクタム共に 0.5 ng/mL

2.6.7.13.1　　ラットにおける胚・胎児発生に関する試験（続き）　　試験番号：[redacted]241

投与量（mg/kg）		0（PBS）	1	3	10
雌/母動物（続き）	交尾成立例数	20	20	20	20
	妊娠例数	20	20	20	20
	死亡又は切迫剖検例数	0	0	0	0
	流産又は全胚吸収例数	0	0	0	0
	一般状態				
	よろめき歩行[a]	0	0	0	19
	運動性の低下[a]	0	0	0	2
	剖検	-	-	-	-
	体重	-	-	-	-
	摂餌量	-	-	-	-
	母動物評価例数	20	20	20	20
	平均黄体数/腹	16.9	16.4	17.0	16.2
	平均着床数/腹	15.2	15.7	14.8	14.3
	平均着床前死亡率（%）	8.4	4.2	12.1	12.3

-：特記すべき所見なし

a：投与後 5 分までに発現、投与後 1 時間までに消失

2.6.7.13.1　　ラットにおける胚・胎児発生に関する試験（続き）　　試験番号：[redacted]241

投与量（mg/kg）		0（PBS）	1	3	10
胚胎児	母動物評価例数	20	20	20	20
	平均生存胎児数/腹	14.6	15.3	14.1	13.7
	平均着床痕率（%）	0	0	0	0
	平均吸収胚率（%）	3.8	2.7	4.7	3.9
	平均死亡胎児率（%）	0	0	0	0
	平均着床後死亡率（%）	3.8	2.7	4.7	3.9
	平均胎児体重（%）[a]				
	雄	4.26 g	- 1	0	- 1
	雌	4.07 g	- 2	- 1	- 2
	胎児の性比（%　雄）	46	48	54	53
	胎盤重量（%）[a]				
	雄[b]	0.476 g	- 0	+ 10[#]	+ 1
	雌	0.461 g	+ 2	+ 10	+ 1
	胎児の異常				
	外表異常	-	-	-	-
	内臓異常	-	-	-	-
	骨格異常	-	-	-	-
	骨化進行度	-	-	-	-

-：特記すべき所見なし　#：$p<0.05$ PBS に対する Dunnett 検定

a：PBS は平均値、SI-613 は PBS との差を%で示す。

b：3 mg/kg で雄胎児の胎盤重量が PBS と比較して有意な高値を示したが、10 mg/kg で有意な変動はなかったため、偶発的な変動であると判断した。

2.6.7.13.2　ウサギにおける胚・胎児発生に関する試験　被験物質：SI-613

報告書の題名：SI-613 のウサギにおける静脈内投与による胚・胎児発生に関する試験

試験計画：ICH S5（R2）準拠
投与期間：妊娠 6～18 日
試験番号：[redacted]242
動物種/系統：ウサギ/NZW
交尾成立日：妊娠 0 日
CTD における記載箇所：4.2.3.5.2-2
試験開始週齢：18 週齢（交尾成立時）
帝王切開日：妊娠 29 日
GLP 適用：適用
初回投与年月日：20[redacted]年[redacted]月[redacted]日
投与方法：静脈内
特記事項：なし
溶媒/投与形態：PBS/溶液
無毒性量：母動物の一般毒性；1.2 mg/kg/day
母動物の生殖機能；4 mg/kg/day
胚・胎児発生；4 mg/kg/day

投与量（mg/kg）		0（PBS）	0.4	1.2	4
雌/母動物	例数	4	4	4	4
	TK：SI-613				
	妊娠 6 日				
	C_{max}（μg eq./mL）	NE	NC	10.73	25.43
	AUC_{τ}（μg eq.・h/mL）	NE	NC	0.4471	55.39
	妊娠 18 日				
	C_{max}（μg eq./mL）	NE	4.652	8.272	26.02
	AUC_{τ}（μg eq.・h/mL）	NE	0.1938	3.240	167.1

NE：BLQ かつ算出対象外　NC：算出不可　LLOQ：4 μg eq./mL

2.6.7.13.2　　ウサギにおける胚・胎児発生に関する試験（続き）　　試験番号：[redacted]242

投与量（mg/kg）		0（PBS）	0.4	1.2	4
雌/母動物（続き）	例数	4	4	4	4
	TK：DF				
	妊娠 6 日				
	C_{max}（ng/mL）	NE	NC	1.967	7.109
	AUC_{τ}（ng･h/mL）	NE	NC	0.08195	56.98
	妊娠 18 日				
	C_{max}（ng/mL）	NE	1.835	4.964	16.14
	AUC_{τ}（ng･h/mL）	NE	16.88	67.44	228.8
	TK：DF-ラクタム				
	妊娠 6 日				
	C_{max}（ng/mL）	NE	NC	NC	0.9768
	AUC_{τ}（ng･h/mL）	NE	NC	NC	0.04070
	妊娠 18 日				
	C_{max}（ng/mL）	NE	NC	NC	1.462
	AUC_{τ}（ng･h/mL）	NE	NC	NC	0.06090

NE：BLQ かつ算出対象外　NC：算出不可　LLOQ：DF 及び DF-ラクタム共に 1 ng/mL

2.6.7.13.2　ウサギにおける胚・胎児発生に関する試験（続き）　試験番号：[redacted]242

投与量（mg/kg）		0（PBS）	0.4	1.2	4
雌/母動物（続き）	交尾成立例数	20	21	20	21
	妊娠例数	20	18	20	19
	死亡又は切迫剖検例数[a]	0	1	0	0
	流産又は全胚吸収例数[b]	1	0	1	0
	一般状態				
	呼吸促迫[c]	0	0	0	1
	剖検	-	-	-	-
	体重	-	-	-	-
	摂餌量	-	-	-	-
	母動物評価例数	19	17	19	19
	平均黄体数/腹	9.8	10.5	10.1	9.5
	平均着床数/腹	8.9	8.8	8.7	8.6
	平均着床前死亡率（%）	8.5	15.1	12.6	10.0

-：特記すべき所見なし

a：妊娠 15 日以降に摂餌量の顕著な低値又は摂餌の廃絶を呈し、妊娠 25 日に膣口周囲の被毛が汚れ、娩出児が認められた状態で死亡していた。栄養不良により状態が悪化し、流産が誘発され死亡に至ったと推測され、4 mg/kg で死亡が認められなかったことから、被験物質投与との関連はないと判断した。

b：1.2 mg/kg の 1 例は妊娠 28 日に、PBS の 1 例は妊娠 25 日に流産した。1.2 mg/kg の 1 例は、妊娠 15 日以降に摂餌量の顕著な低値又は摂餌の廃絶を呈した。栄養不良により状態が悪化し、流産に至ったものと推測され、4 mg/kg で流産が認められなかったことから、被験物質投与との関連はないと判断した。

c：投与後 5 分までに発現、投与後 1 時間までに消失

2.6.7.13.2　ウサギにおける胚・胎児発生に関する試験（続き）　試験番号：[redacted]242

投与量（mg/kg）		0（PBS）	0.4	1.2	4
胚胎児	母動物評価例数	19	17	19	19
	平均生存胎児数/腹	7.6	8.4	8.2	8.1
	平均着床痕率（%）	0	0	0	0
	平均吸収胚率（%）	9.6	3.7	3.8	2.9
	平均死亡胎児率（%）	2.8	0.7	1.5	3.2
	平均着床後死亡率（%）	12.4	4.4	5.4	6.1
	平均胎児体重（%）[a]				
	雄	40.0 g	+5	-4	+4
	雌	39.3 g	+4	-2	+1
	胎児の性比（%　雄）	48	51	49	54
	胎盤重量（%）[a]				
	雄	3.42 g	+3	-2	-1
	雌	3.34 g	-1	-2	-5
	胎児の異常				
	外表異常	-	-	-	-
	内臓異常	-	-	-	-
	骨格異常	-	-	-	-
	骨化進行度	-	-	-	-

-：特記すべき所見なし

a：PBS は平均値、SI-613 は PBS との差を%で示す。

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

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

被験物質：SI-613

報告書の題名：SI-613 のラットにおける静脈内投与による出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験

試験計画：ICH S5 準拠
投与期間：妊娠 7 日～分娩後 20 日
試験番号：[redacted]380
動物種/系統：ラット/SD
交尾成立日：妊娠 0 日
CTD における記載箇所：4.2.3.5.3-1
試験開始週齢：雄；11～13 週齢、雌；10～12 週齢（交尾成立時）
投与方法：静脈内
GLP 適用：適用
初回投与年月日：20[redacted]年[redacted]月[redacted]日
溶媒/投与形態：PBS/溶液
特記事項：TK は実施しなかった。
同腹児数の調整/非調整：4 例/性/腹
無毒性量：F_0 母動物の一般毒性；1 mg/kg/day
F_0 母動物の生殖機能；10 mg/kg/day
F_1 雌雄の発生；10 mg/kg/day

投与量（mg/kg）		0（PBS）	1	3	10
F_0 雌/母動物	妊娠例数	22	21	22	22
	死亡又は切迫剖検例数	0	0	0	0
	一般状態：妊娠期間				
	よろめき歩行[a]	0	0	1	7
	運動性の低下[a]	0	0	1	7
	一般状態：授乳期間	-	-	-	-
	体重	-	-	-	-
	摂餌量	-	-	-	-
	剖検	-	-	-	-
	異常分娩	-	-	-	-
	平均妊娠期間（日）	21.5	21.6	21.9^{+}	22.0^{++}

-：特記すべき所見なし　a：投与直後のみに発現　+：$p<0.05$ PBS に対する Steel 検定、++：$p<0.01$ PBS に対する Steel 検定

2.6.7.14.1　ラットにおける出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験（続き）　試験番号：[redacted]380

投与量（mg/kg）		0（PBS）	1	3	10
F_1 出生児	F_0 母動物評価例数	22	21	22	22
（離乳前）	平均着床痕数	15.4	15.2	16.1	15.4
	平均出生児数	14.8	14.0	14.7	14.5
	平均生存出生児数	14.6	13.7	14.5	13.7
	分娩率（%）	95.9	92.0	91.5	94.0
	出生率（%）	94.8	90.0	90.4	88.9
	出生児性比（%　雄）	51	50	47	49
	出生児外表異常	-	-	-	-
	一般状態	-	-	-	-
	死亡産児を有する母体例数	3	2	5	3
	全同腹児死亡母体例数	0	0	1	1
	出生児体重	-	-	-	-
	出生4日生存率（%）	98.7	99.3	91.7	97.7
	離乳率（%）	100.0	100.0	95.5	95.5
	発育分化 [a]	-	-	-	-
	初期行動 [b]	-	-	-	-
	剖検：21日齢	-	-	-	-

-：特記すべき所見なし　a：耳介展開、毛生、切歯萌出、眼瞼開裂　b：背面立ち直り反射、負の走地性

2.6.7.14.1　ラットにおける出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験（続き）　試験番号：[redacted]380

投与量（mg/kg）		0（PBS）	1	3	10
F_1 雄	一般状態	-	-	-	-
（離乳後）	体重	-	-	-	-
	行動検査				
	評価例数	22	21	20	20
	感覚機能[a]	-	-	-	-
	オープンフィールドテスト	-	-	-	-
	Biel 型水迷路学習能（直水路、迷路）				
	迷路：遊泳時間（秒）				
	2 日目、2 試行	47.0	42.0	35.9	21.8#
	2 日目、3 試行	50.5	41.0	38.9	27.7#
	迷路：エラー数　1 日目、1 試行	9.6	8.4	9.0	11.8+
	剖検：10 週齢	-	-	-	-
	生殖機能検査				
	評価例数	22	21	20	21
	包皮の分離（平均発現日、生後）	40	41	41	40
	交尾成立例数（交尾率%）	22（100.0）	20（95.2）	19（95.0）	21（100.0）
	妊娠成立例数（授胎率%）	21（95.5）	20（100.0）	18（94.7）	21（100.0）
	剖検：交尾能観察終了後の雄	-	-	-	-

-：特記すべき所見なし　#：p<0.05 PBS に対する Dunnett 検定　+：p<0.05 PBS に対する Steel 検定

a：視覚性置き直し反応、瞳孔反射、耳介反射及び疼痛反応

2.6.7.14.1　ラットにおける出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験（続き）　試験番号：[redacted]380

投与量（mg/kg）		0（PBS）	1	3	10
F_1 雌	一般状態	-	-	-	-
（離乳後）	体重	-	-	-	-
	行動検査				
	評価例数	22	21	20	21
	感覚機能 [a]	-	-	-	-
	オープンフィールドテスト	-	-	-	-
	Biel 型水迷路学習能（直水路、迷路）	-	-	-	-
	剖検：10 週齢	-	-	-	-
	生殖機能検査				
	評価例数	22	21	21	21
	膣開口（平均発現日、生後）	33	34	33	33
	交尾成立例数（交尾率%）	22（100.0）	20（95.2）	20（95.2）	21（100.0）
	妊娠成立例数（受胎率%）	21（95.5）	20（100.0）	19（95.0）	21（100.0）
	交尾成立日数	3.4	4.7	3.8	3.0

-：特記すべき所見なし　a：視覚性置き直し反応、瞳孔反射、耳介反射及び疼痛反応

2.6.7.14.1　ラットにおける出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験（続き）　試験番号：[redacted]380

投与量（mg/kg）		0（PBS）	1	3	10
F_1 雌	妊娠例数	21	20	19	21
	一般状態：妊娠期間	-	-	-	-
	体重：妊娠期間	-	-	-	-
	帝王切開時の剖検：妊娠 13 日	-	-	-	-
	平均黄体数	16.5	17.2	16.0	17.4
	平均着床数	15.5	15.6	14.3	15.0
	平均生存胚数（F_2）	15.0	14.3	13.4	14.4
	平均着床前死亡率（%）	5.5	8.6	11.1	12.6
	平均着床後死亡率（%）	3.3	8.2	9.9	4.3

-：特記すべき所見なし

2.6.7.15 新生児を用いた試験

該当する試験なし。

2.6.7.16　局所刺激性試験　　被験物質： SI-613 製剤

動物種/系統	投与方法	投与量（mg/kg/joint、SI-613 濃度）	性別及び例数	特記すべき所見	試験番号
カニクイザル	i.a.（両側）4 回（投与間隔 4 週間）	生理食塩液：0（容量：0.2 mL/kg/joint） SI-613 製剤：0.2、0.6、2（容量：0.02、0.06、0.2 mL/kg/joint）	雌 2 又は 3 例/時点	最終投与後 1 週では、膝関節液検査で、0.6 mg/kg 以上で、白血球数が対照と比較して統計学的に有意な高値を示し、2 mg/kg で色の異常（淡黄色）、浮遊物（無色透明のゼリー状物または白色物）及び粘性が認められた。病理組織学的検査では、0.2 mg/kg 以上で膝関節滑膜に軽度から中等度の泡沫状マクロファージ、単核細胞浸潤及び乳頭状増生が認められた。 最終投与後 4 週では、0.6 mg/kg の 1 例で以下の変化が認められた。膝関節液検査で白血球数が対照と比較して高値を示し、色の異常（淡黄色又は淡赤色）及び浮遊物（ゼリー状物）が認められた。剖検では、膝蓋骨周囲の滑膜及び膝蓋下脂肪体の淡黄色化、並びに滑膜に散在性の赤色巣が認められた。病理組織学的検査では、膝関節滑膜に中等度の乳頭状増生及び単核細胞浸潤並びに、限局性かつ極めて軽度の出血が認められた。 その他の群では、泡沫状マクロファージ及び乳頭状増生に回復傾向が認められ、単核細胞浸潤は回復した。	[redacted]027
ウサギ/NZW	i.a.（片側）単回	生理食塩液：0 SI-613 製剤：0.2、0.5、2（容量：0.02、0.05、0.2 mL/kg/joint）	雄 6 例/群	膝関節液検査では、白血球数が、投与後 1 日は 0.2 mg/kg/joint 以上で、投与後 14 日は 0.5 mg/kg/joint 以上で、対照と比較して統計学的に有意な高値を示した。投与後 14 日では、投与後 1 日と比較し、いずれの投与用量においても白血球数が低下し、回復傾向が確認された。	[redacted]058
ウサギ/NZW	i.a.（両側）単回	生理食塩液：0 SI-613 製剤：2（容量：0.2 mL/kg/joint）	雄 2 又は 3 例/時点	単回投与後 2、6、12 又は 18 箇月まで、膝関節周囲組織に特記すべき所見は認められなかった。	[redacted]140

2.6.7.17　その他の毒性試験

2.6.7.17.1　SI-613 の毒性試験

被験物質：SI-613 又は SI-613 製剤

試験の種類	試験系	投与方法 （被験物質/媒体）	投与量 （μg/mL、SI-613 濃度）	特記すべき所見	試験 番号
光毒性試験	Balb/c 3T3 細胞	in vitro （SI-613/PBS）	0.781、1.56、3.13、6.25、12.5、25、50、100　（太陽光照射/非照射）	SI-613 は非光毒性物質と判定された。	[redacted]379
細胞毒性試験	V79 細胞	in vitro （SI-613 製剤）	0、47.0、58.7、73.4、91.8、115、143、179、224、280、350	280 μg/mL 以上で細胞増殖抑制作用が認められ、IC_{50} は 263 μg/mL と算出された。	[redacted]093

2.6.7.17.2　　代謝物の毒性試験　　被験物質：DF-ラクタム

試験の種類		試験系	投与方法（媒体）	投与量	性別及び評価例数	特記すべき所見	試験番号
遺伝毒性試験	復帰突然変異試験	*S.typhimurium* *TA98*、*TA100*、*TA1535*、*TA1537* 及び *E.coli WP2uvrA*	in vitro（DMSO）	S9 mix-の TA1535、TA98、TA1537、S9 mix+の TA1537：9.77～625 μg/plate S9 mix-の TA100、 S9 mix+の TA1535、TA98：19.5～625 μg/plate S9 mix-の WP2uvrA、 S9 mix+の TA100、WP2uvrA：313～5000 μg/plate	-	本試験菌株に対する遺伝子突然変異誘発性を有しないと判断した。	[redacted]-068
	染色体異常試験	CHL/IU 細胞	in vitro（DMSO）	短時間処理法の S9 mix+/-：30～140 μg/mL[a] 連続処理法の S9 mix-：5～40 μg/mL[a]	-	ほ乳類培養細胞に対する染色体の構造異常誘発性を有しないが、数的異常誘発性（倍数性）を有すると判断した。	[redacted]-070
	小核試験	ラット/SD	s.c.（0.5%MC）	2、6、18 mg/kg/day、（1 日 1 回、2 日間連日）	雄 5 例/群	小核誘発性を有しないと判断した。	[redacted]-064

S9 mix-：S9mix 非存在下　S9 mix+：S9 mix 存在下　-：該当なし　MC：メチルセルロース　a：観察用量

2.6.7.17.3　　不純物の in silico 変異原性評価　　被験物質：12 不純物、試験番号：[redacted]-0284

物質番号	不純物名	Derek（知識）		CASE Ultra（統計）					Sarah（統計）		in silico 総合評価 [c]	変異原性総合評価 [d]
		判定表示	評価結果	GT1_A7B[a]	GT1_AT_ECOLI[a]	Konsolidatorによる再評価 [b]	PHARM_SALM[a]	PHARM_ECOLI[a]	判定表示	評価結果		
1	不純物A*	Plausible	Positive	Positive	Negative	Positive	Positive	Inconclusive	NA	NA	あり	あり
2	不純物D*	Inactive[e]	Negative	Out of Domain	Out of Domain	No Call	Negative	Negative	NA	NA	なし	なし
3	不純物B*	Plausible	Positive	Positive	Negative	Negative	Positive	Inconclusive	NA	NA	あり	あり
4	不純物E*	Inactive	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	NA	NA	なし	なし
5	不純物F*	Inactive	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	NA	NA	なし	なし
6	不純物C*	Inactive	Negative	Negative (known)	Positive (known)	Positive	Negative (known)	Positive (known)	NA	NA	あり	あり
7	不純物G*	Inactive	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	NA	NA	なし	なし
8	不純物H*	Inactive	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	NA	NA	なし	なし
9	不純物I*	Inactive	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	NA	NA	なし	なし
10	不純物J*	Inactive	Negative	Out of Domain	Out of Domain	No Call	Out of Domain	Out of Domain	Negative	Negative	なし	なし
11	不純物K*	Inactive	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	NA	NA	なし	なし
12	不純物L*	Inactive	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative (known)	Negative	NA	NA	なし	なし

a：CASE Ultra で上位に位置づけられている基本モジュールである GT1_A7B 及び GT1_AT_ECOLI の予測結果があいまい、Konsolidator 機能による再評価結果が判定不能などの場合に、参考モジュールである PHARM_SALM 及び PHARM_ECOLI の予測結果を加味して総合的に評価を行った　b：Konsolidator による再評価は GT1_A7B 及び GT1_AT_ECOLI の結果について行った　c：警告構造の有無　d：変異原性の有無　e：Unclassified Features を含む

NA：該当なし

＊ 新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.7.17.4　　ヒト及び各動物種の膝関節体積の測定試験　　被験物質：なし

試験の種類	試験系	測定方法	結果	試験番号
ヒト及び各動物種の膝関節体積の測定試験	ヒト（56 歳～69 歳の日本人女性 5 名）、 カニクイザル（雌 5 匹） イヌ/ビーグル（雌 5 匹） ウサギ/NZW（雌 5 匹） ラット/SD（雌 5 匹）	左膝関節のエックス線画像を撮影し、画像解析により膝関節（大腿骨遠位部）体積を算出した。	膝関節体積の平均値は、ヒトが[redacted]cm^3、カニクイザルが[redacted]cm^3、イヌが[redacted]cm^3、ウサギが[redacted]cm^3、ラットが[redacted]cm^3であった。 ヒトの膝関節体積を各動物の膝関節体積で除した相対比率から、ヒトの膝関節体積はカニクイザルの 53.6 倍、イヌの 23.5 倍、ウサギの 76.9 倍、ラットの 854.1 倍と算定された。	[redacted]-058