2.6.6 毒性試験の概要文

目次

2.6.6.1 まとめ 5

2.6.6.2 単回投与毒性試験 7
2.6.6.2.1 マウス単回静脈内投与毒性試験［添付資料 4.2.3.1-1］ 7
2.6.6.2.2 マウス単回皮下投与毒性試験［添付資料 4.2.3.1-2］ 7
2.6.6.2.3 ラット単回静脈内投与毒性試験［添付資料 4.2.3.1-3］ 7
2.6.6.2.4 ラット単回皮下投与毒性試験［添付資料 4.2.3.1-4］ 8

2.6.6.3 反復投与毒性試験（補佐的なトキシコキネティクス評価を含む） 8
2.6.6.3.1 ラット14日間反復皮下投与用量設定試験［添付資料 4.2.3.2-1］ 9
2.6.6.3.2 ラット4週間反復皮下投与毒性試験及び4週間回復性試験［添付資料 4.2.3.2-2］ 10
2.6.6.3.3 カニクイザル皮下投与最大耐量試験［添付資料 4.2.3.2-3］ 11
2.6.6.3.4 カニクイザル4週間皮下投与毒性試験及び4週間回復性試験［添付資料 4.2.3.2-4］ 12

2.6.6.4 遺伝毒性試験 13

2.6.6.5 がん原性試験 13

2.6.6.6 生殖発生毒性試験（用量設定試験及び補佐的なトキシコキネティクス評価を含む） 13
2.6.6.6.1 ラット受胎能及び初期胚発生に関する皮下投与用量設定試験［添付資料4.2.3.5.1-1］ 13
2.6.6.6.2 ラット雌受胎能及び初期胚発生に関する皮下投与毒性試験［添付資料 4.2.3.5.1-2］ 14

2.6.6.7 局所刺激性試験 14
2.6.6.7.1 ウサギ亜急性及び亜慢性局所刺激性試験［添付資料 4.2.3.6-1］ 14

2.6.6.8 その他の毒性試験 15
2.6.6.8.1 ラットFSH中和抗体産生試験［添付資料 4.2.3.7.7-1］ 15
2.6.6.8.2 不純物のリスク評価 15
2.6.6.8.2.1 宿主細胞タンパク質不純物 15
2.6.6.8.2.2 有機不純物 16
2.6.6.8.2.3 抽出物／浸出物 16
2.6.6.8.3 新添加物硫酸ナトリウムの毒性試験 17
2.6.6.8.3.1 硫酸ナトリウムの単回投与毒性試験 17
2.6.6.8.3.2 硫酸ナトリウムの反復投与毒性試験 18
2.6.6.8.3.3 硫酸ナトリウムの遺伝毒性試験 20
2.6.6.8.3.4 硫酸ナトリウムのがん原性試験 22
2.6.6.8.3.5 硫酸ナトリウムの生殖発生毒性試験 23
2.6.6.8.3.6 硫酸ナトリウムの局所刺激性試験 25
2.6.6.8.3.7 硫酸ナトリウムのその他の毒性試験 26

2.6.6.9 考察及び結論 27
2.6.6.9.1 新添加物硫酸ナトリウムの毒性 28
2.6.6.9.1.1 経口投与試験を使用することの妥当性 30
2.6.6.9.1.2 投与された硫酸ナトリウムの内因性硫酸ナトリウムへの影響 30
2.6.6.9.1.3 新添加物硫酸ナトリウムの結論 30

2.6.6.10 図表 30

2.6.6.11　参考文献.....31

表の目次

表 2.6.6- 1　単回投与毒性試験の概略 7
表 2.6.6- 2　反復投与毒性試験の概略 8
表 2.6.6- 3　ラット 14 日間反復皮下投与用量設定試験のトキシコキネティクス.....9
表 2.6.6- 4　ラット 4 週間投与期間中及び 4 週間休薬後のトラフ値（ng/mL） 11
表 2.6.6- 5　カニクイザル皮下投与 MTD 試験の固定用量投与相（290 µg/kg/day、7 日間反復投与）のトキシコキネティクス.....12
表 2.6.6- 6　カニクイザル 4 週間反復皮下投与毒性試験のトキシコキネティクス.....13
表 2.6.6- 7　硫酸ナトリウムの単回投与試験のまとめ.....18
表 2.6.6- 8　硫酸ナトリウムの反復投与毒性試験のまとめ.....20
表 2.6.6- 9　硫酸ナトリウムの *in vitro* 遺伝毒性試験のまとめ.....21
表 2.6.6- 10　硫酸ナトリウムの *in vivo* 遺伝毒性試験のまとめ.....22
表 2.6.6- 11　硫酸ナトリウムのがん原性試験のまとめ.....23
表 2.6.6- 12　硫酸ナトリウムの生殖発生毒性試験のまとめ.....25
表 2.6.6- 13　硫酸ナトリウムの局所刺激性試験のまとめ.....26

略号一覧

略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
ADA	anti-drug antibody	抗薬物抗体
AUC_{0-24}	Area under the curve from time=0 to time =24 hours	薬剤投与から 24 時間までの血清中濃度時間曲線下面積
C_{max}	Maximum serum concentration	最高血清中薬物濃度
CHL	Chinese hamster lung	チャイニーズ・ハムスター肺
[redacted]	[redacted]	[redacted]
FSH	Follicle-stimulating hormone	卵胞刺激ホルモン
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
LD_{50}	50% lethal dose	半数致死量
LOAEL	low-observed adverse effect level	最小毒性量
[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]
MTD	Maximum tolerated dose	最大耐量
NOAEL	No-observed-adverse-effect level	無毒性量
NOEL	non-observed effect level	無影響量
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development	経済協力開発機構
rFSH	recombinant human FSH	遺伝子組換えヒト卵巣刺激ホルモン
T_{max}	Time of maximum serum concentration	最高血清中濃度到達時間
TTC	Threshold for toxicological concern	毒物学的懸念閾値
$t_{1/2}$	elimination half-life	消失半減期

2.6.6.1　　まとめ

FE 999049 は、ヒト細胞株（ヒト胚性網膜芽細胞）で発現させた遺伝子組換えヒト卵胞刺激ホルモン（rFSH）であり、生殖補助医療における調節卵巣刺激を目的としてフェリング･ファーマ株式会社で開発されている。単回投与毒性試験はマウス及びラットを用い、両動物種共に静脈内及び皮下投与により実施した。FE 999049 投与に起因した変化は認められず、全ての試験において概略の致死量は 290 µg/kg より大と考えられた。

ラット及びカニクイザル 4 週間反復投与毒性試験は予定臨床投与経路である皮下投与で実施した。本試験実施に先駆けて、ラット 14 日間用量設定試験及びカニクイザル最大耐量（MTD）試験を実施した。両動物種で、卵巣の絶対及び相対重量増加を含む過剰な薬理作用以外に有害作用やオフターゲット作用は見られなかった。ラット用量設定試験での無毒性量（NOAEL）は高用量である 145 µg/kg/day、カニクイザルの MTD 試験での NOAEL は最高用量である 290 µg/kg/day であった。いずれの 4 週間反復投与毒性試験でも、オフターゲット毒性は見られなかった。全ての所見は、FE 999049 の薬理又は過剰な薬理作用に起因していた。NOAEL は、いずれの試験においても、ヒトでの予定投与量（0.2 µg/kg、体重 60 kg で FE 999049 を 12 µg/day 投与した場合）の 261 倍に匹敵する最高用量の 52.2 µg/kg/day と考えられた。変化の多くは、回復期間の終了時に完全又は部分的に回復した。4 週間反復投与毒性試験で観察された抗薬物抗体（ADA）反応は、ラット及びカニクイザルで 4 週間を超える曝露がコントロールできないと考えられた。そのため、4 週間を超える長期の反復投与毒性試験は実施していない。

FE 999049 は内因性タンパクホルモンと同一の一次構造を有することから［添付資料 3.2.S.3.1］、遺伝毒性及びがん原性試験は実施しなかった。

FE 999049 の生殖発生毒性試験として、ラット受胎能及び初期胚発生試験の用量設定試験及び本試験を実施した。FE 999049 の 0.261 µg/kg/day を超える投与は、ラットの受胎能及び初期胚発生に悪影響を及ぼした。ホルモン的に過量である FE 999049 の 0.835 µg/kg/day を超える投与では、単純に薬理又は過剰な薬理作用が有害作用として働いたと考えられた。FE 999049 は妊娠中のホルモンバランスを障害することから、臨床的に妊娠、産婦、及び授乳婦には使用されないため、胚胎児発生試験並びに出生前及び出生後の発育試験は実施しなかった。

上記の安全性試験の結果より、製剤の局所刺激性は低いと判定した。また、ウサギ皮下投与局所刺激性試験では、投与部位に予定臨床投与スケジュールでの潜在的な刺激性を示す所見は見られなかった。すなわち、FE 999049 を 37 µg/mL 含む 5 種類の異なる処方を一部位につき 0.75 mL 皮下投与したウサギ局所刺激性試験で、生理食塩液投与群と比較して投与 2 及び 5 日後には局所反応や肉眼及び病理組織学的に明らかな違いは見られなかった。

ラット及びカニクイザルで、少なくとも投与後 24 時間まで FE 999049 の曝露が認められた。このことは、動物が反復投与毒性試験を通じて FE 999049 に常態的に曝露されていたことを示している。ラットの半減期は 6.3～9.7 時間であったが、雄カニクイザルでは 14.8～29.2 時間、雌カニクイザルでは 21.4～47.6 時間であった。ラットでは、28 日間の反復投与後に蓄積はほとんど又は全く見られなかった。一方、ほとんどのカニクイザルでは、FE 999049 の著しい蓄積が認められた。このことは、カニクイザルの半減期がラットと比べて 2～8 倍長いことと一致する。用量比以上の曝露の増加傾向がラット及びカニクイザルの高用量で見られ、その程度はカニクイザルよりラットで著明であった。

ADA 産生は反復投与毒性試験及び予備生殖試験で調べた。カニクイザルでは、投与 2 週間後に循環血液中に抗体が見られた。一方、ラット試験では、ADA は検出されなかった。ラットの成績は、分析法の感度不足に起因していることが推測されたため、その後、細胞を用いた *in vitro* 試験で中和抗体を分析した。その結果、4 週間反復投与毒性試験の 4 週間休薬期間後に採取されたサンプルから中和抗体が確認された。独立して実施したラット中和抗体産生試験では、投与 2～4 週間後にほとんどの動物に中和抗体が産生されることが示された。この中和抗体量は、8 週間後に全ての投与薬物を中和すると考えられる量であった。

原薬に含まれる優性宿主細胞タンパク質（HCP）不純物は、非臨床試験で最大[redacted] ng/µg FSH（[redacted]%）の濃度で確認されている。さらに、宿主細胞タンパク質不純物は、免疫原性の可能性が非常に低いと考えられる。コンテナ閉鎖系からの抽出物／浸出物、並びに原薬又は製剤に存在する有機不純物又は分解生成物は、いずれも安全性の懸念はなかった。

実施された毒性試験で、薬理又は過剰な薬理作用、並びにこれら作用に起因する作用しか見られなかったことから、FE 999049 は 290 µg/kg/day まで毒性の懸念がないと結論づけられた。また、FE 999049 の rFSH としての薬力学的プロファイルが確認された。

非臨床毒性プログラムに基づき、FE 999049 はヒト臨床開発及び予定用法・用量で、安全、かつ有効であると考えられた。唯一のリスクは、ホルモンの過量投与に関連した薬理又は過剰な薬理作用に起因するものである。

今回、製造販売承認申請を行うレコベル皮下注ペン製剤には添加物として硫酸ナトリウム十水和物が含まれており、硫酸ナトリウムは日本では経口剤の医薬品の添加物として使用実績があるものの（無水和物として一日最大 51.2 mg）（医薬品添加物事典）、レコベル皮下注ペン製剤の投与経路である皮下注を含む注射剤の添加物としての実績はない。そこで皮下投与における硫酸ナトリウムの安全性評価を文献あるいは公的機関からの報告などの毒性情報に基づき行った。ただし、皮下投与による毒性試験情報は限られていることから、静脈内投与試験情報及び必要に応じて経口投与を含む他の投与経路の毒性試験の情報も参照した。本申請資料に使用した毒性試験を［2.4 非臨床試験の概括評価 表 2.4-7］に示す。

レコベル皮下注ペン製剤中の硫酸ナトリウムは十水和物（分子量 322.19）であるが、本製剤は溶液の注射剤で、またほとんどの試験は無水和物（硫酸ナトリウム、分子量 142.04）として表記されていることから、この申請資料でも特に断りのない場合は試験成績は無水和物の投与量、濃度として表記した。また、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）準拠で実施された試験は GLP 試験として表示したが、不明な場合は表示していない。

文献あるいは公表資料の情報は限られており、特に検査値などの数値はほとんど情報がない。そのため、Module 2.6.7 毒性試験概要表は作成せず、必要な情報は本毒性試験概要文に記載した。

経口投与を含めた硫酸ナトリウムの毒性試験の成績から、反復経口投与したラットの軽度下痢、並びに経皮投与及び点眼投与のウサギでの局所刺激性が見られた。しかし、重篤な全身性の毒性は認められなかった。単回投与時の半数致死量（LD_{50}）値はいずれの投与経路でも 2000 mg/kg より大きく、反復投与毒性試験、がん原性試験、及び生殖発生毒性の無影響量（NOEL）あるいは無毒性量

（NOAEL）はいずれも最大投与量で、遺伝毒性は陰性であった。レコベル皮下注ペンの一日最大使用量 12 µg 中の硫酸ナトリウムは 11.4 mg で体重 60 kg で 0.19 mg/kg である。毒性試験の成績を考慮すると、レコベル皮下注ペンの添加剤である硫酸ナトリウムは十分な安全域を有し、安全性の懸念はないと考えられる。

2.6.6.2　単回投与毒性試験

FE 999049 の単回投与毒性試験はマウス及びラットを用い、両種ともに静脈内及び皮下投与により実施した。これら単回投与毒性試験の目的は、死亡又は重篤な臨床徴候を引き起こすことなく投与できる最高用量として定義される MTD を決定することであった。最高用量の 290 µg/kg は、予想されるヒトの臨床用量（0.2 µg/kg、体重 60 kg で FE 999049 を 12 µg 投与した場合）の約 1450 倍で、この目的を十分満たすと考えられる。4 試験共に 290 µg/kg で死亡は見られず、概略の致死量は 290 µg/kg より大であった。単回投与毒性試験の概略及び主な結果を表 2.6.6- 1 に示す。

表 2.6.6- 1　単回投与毒性試験の概略

受託試験施設及び添付資料	動物種	投与経路	概略の致死量（µg/kg）
[redacted] ［4.2.3.1-1］	マウス	静脈内	>290
[redacted] ［4.2.3.1-2］	マウス	皮下	>290
[redacted] ［4.2.3.1-3］	ラット	静脈内	>290
[redacted] ［4.2.3.1-4］	ラット	皮下	>290

2.6.6.2.1　マウス単回静脈内投与毒性試験［添付資料 4.2.3.1-1］

1 群雌雄各 5 例のマウスに 290 µg/kg を単回静脈内投与した（投与時間 7～10 秒）。15 日間の観察期間終了後、マウスを屠殺・剖検した。一般状態、体重、体重増加量、及び剖検には投与による影響はなかった。概略の致死量は 290 µg/kg より大であった。

2.6.6.2.2　マウス単回皮下投与毒性試験［添付資料 4.2.3.1-2］

1 群雌雄各 5 例のマウスに 290 µg/kg を単回皮下投与した。15 日間の観察期間終了後、マウスを屠殺・剖検した。一般状態、体重、及び体重増加量には投与による影響は見られなかった。剖検では雌 1 例で子宮の拡張が見られた。概略の致死量は 290 µg/kg より大であった。

2.6.6.2.3　ラット単回静脈内投与毒性試験［添付資料 4.2.3.1-3］

1 群雌雄各 5 例のラットに 290 µg/kg を単回静脈内投与した（投与時間 15 秒）。15 日間の観察期間終了後、ラットを屠殺・剖検した。一般状態、体重、及び体重増加量には投与による影響はなかった。剖検では雌 1 例で子宮の拡張が、雄 1 例で顎下リンパ節の腫大が見られた。概略の致死量は 290 µg/kg より大であった。

2.6.6.2.4　　ラット単回皮下投与毒性試験［添付資料 4.2.3.1-4］

1 群雌雄各 5 例のラットに 290 µg/kg を単回皮下投与した。15 日間の観察期間終了後、ラットを屠殺・剖検した。一般状態、体重、及び体重増加量には投与よる影響は見られなかった。剖検では雄 1 例で右腎臓に腎盂の拡張が見られた。概略の致死量は 290 µg/kg より大であった。

2.6.6.3　　反復投与毒性試験（補佐的なトキシコキネティクス評価を含む）

FE 999049 の反復投与毒性試験はラット及びカニクイザルの 4 週間試験で評価した。本試験の投与量を設定するため、ラット 14 日間用量設定試験とカニクイザル最大耐量試験を行った。全試験とも投与経路は皮下投与で行った。反復投与毒性試験の概略及び主な結果を表 2.6.6- 2 に示す。

表 2.6.6- 2　　反復投与毒性試験の概略

受託試験施設及び添付資料	動物種	投与経路	投与期間、週（休薬期間）	無毒性量 µg/kg/day	曝露 [a] C_{max} / AUC_{0-24}	最小治療係数*
[redacted] [4.2.3.2-1]	ラット	皮下	2	145	196 ng/mL[b] 2164 ng·h/mL[c]	245 104
[redacted] [4.2.3.2-2]	ラット	皮下	4 (4)	52.2	34 ng/mL[d]	48
[redacted] [4.2.3.2-3]	カニクイザル	皮下	1	290	1595 ng/mL[b] 29218 ng·h/mL[c]	1994 1398
[redacted] [4.2.3.2-4]	カニクイザル	皮下	4 (4)	52.2	412 ng/mL[b] 7726 ng·h/mL[c]	515 370

* 臨床用量は個別化されるため、最大用量 12 µg/patient/day での平均曝露量（AUC = 20.9 ng·hour/mL、C_{max} = 0.8 ng/mL、臨床試験番号 00009 でのデータ）を治療係数算出に用いた。これは結果として最小治療係数である。

a：投与期間終了時の雌雄平均曝露、b：C_{max}、c：AUC_{0-24}、d：トラフ値

FE 999049 はヒトタンパク質由来のバイオ医薬品であることから、試験動物における ADA と中和抗体の産生は全ての反復投与毒性試験において重要な問題になると予想された。したがって、全ての試験に抗体検査用のサンプルを含めた。

動物での長期投与では ADA の産生が認められたことから、反復投与試験の投与期間は 4 週間で十分と判断し、4 週間を超える期間の反復投与毒性試験は実施しなかった。52.2 µg/kg/day という高い用量を用いた 4 週間試験では、オフターゲットの毒性反応は見られなかった。これは FE 999049 は組換え DNA 技術により得られた承認済みの他の FSH 製剤と同様な作用であった(1)。より長期間の試験は ADA と中和抗体の産生により評価が阻まれる可能性が高い。ADA と中和抗体の産生は、それ自体の制御されない作用と薬物の曝露低下の可能性により試験の価値を下げる傾向がある。ADA と中和抗体による作用はヒトに対して予測的でもなく関連性もない。ラット中和抗体産生試験の結果は抗体反応が非常に強く、FE 999049 の 6～8 週間の投与後にラットの大部分で全用量が中和されることを示している（2.6.6.8.1）。ヒトの予定治療期間は最大 20 日間で、両動物種の 4 週間反復投与毒性試験で得られた曝露はヒト予定治療期間を適切にサポートすると考えられる。なお、反復投与毒性試験の投与期間

を最大４週間とすることは、医薬品医療機器総合機構との対面助言（医薬品第 I 相試験開始前相談：P1563、平成 21 年 11 月 24 日実施）で合意されている。

2.6.6.3.1　　ラット 14 日間反復皮下投与用量設定試験［添付資料 4.2.3.2-1］

各群雌雄各 5 例のラットに FE 999049 の 0（媒体対照としてクエン酸ナトリウム緩衝液）、1.45、14.5、及び 145 µg/kg/day を 2 週間皮下投与し、主試験動物とした。2 週間の投与期間終了後、ラットを屠殺・剖検した。また、2 週間の投与による FE 999049 への曝露及び抗体産生を評価するため、対照群及び各被験物質群にそれぞれ雌雄各 3 例及び雌雄各 12 例のサテライト群を設定した。さらに、FE 999049 の単回投与による影響を評価するため、対照群及び各被験物質群にはそれぞれ雌雄各 3 例及び雌雄各 12 例のサテライト群を設定した。

1.45 µg/kg/day の皮下投与では測定可能な FE 999049 は検出されず、TK パラメータは算出できなかった。14.5 及び 145 µg/kg/day 群では、少なくとも投与後 24 時間まで FE 999049 が検出され、これらの投与量では動物が持続的に FE 999049 に曝露されていることが示された。単回及び反復皮下投与による最高血清中濃度到達時間（T_{max}）は投与後 4～12 時間、消失半減期（$t_{1/2}$）は 6.3～9.7 時間であった。単回及び反復投与による最高血清中薬物濃度（C_{max}）及び薬剤投与から 24 時間までの血清中濃度時間曲線下面積（AUC_{0-24}）を表 2.6.6- 3 に示す。反復投与による蓄積性は見られなかった。投与 1 日目の雄の C_{max} 及び AUC_{0-24} は用量比ほどの増加は見られなかったが、雌の投与 1 日目及び雌雄の投与 14 日目は用量比を超える増加が見られた。

死亡率、一般状態、体重、体重増加量、及び摂餌量では投与に関連した変化は見られなかった。全ての FE 999049 群で卵巣の絶対重量及び相対重量の著しい増加が見られ、肉眼的には卵巣の腫大、病理組織学的には卵巣嚢胞及び黄体の突出を伴っていた。その他、病理組織学的には子宮内膜の増殖／褶曲が高用量群で、膣及び子宮頸部における上皮粘液分泌亢進が中及び高用量群で、雄の乳腺雌性化及び雌の腺房増殖が全投与群で見られた。インヒビン B は 145 µg/kg/day 群の雌及び 14.5 µg/kg/day 群の雌 1 例で見られたが、雄では見られなかった。これらの全ての変化は FSH の薬理又は過剰な薬理作用と考えられ、FE 999049 が卵胞刺激ホルモンの薬理学的プロファイルを有することが示された。オフターゲットの毒性は見られなかった。投与 2 週後のラットでは ADA は検出されなかった。これは検出に用いた分析法の感度不足によるものと考えられた。

以上の結果より、NOAEL は最高用量の 145 µg/kg/day と考えられた。

表 2.6.6- 3　　ラット 14 日間反復皮下投与用量設定試験のトキシコキネティクス

用量（µg/kg/day)		1.45*		14.5		145	
投与日	パラメータ	雄	雌	雄	雌	雄	雌
1	C_{max} (ng/mL)	0	0	46.3	9.3	165.3	175.5
	AUC_{0-24} (ng·h/mL)	0	0	456.0	145.0	2494.0	2494.0
14	C_{max} (ng/mL)	0	0	7.8	9.3	222.6	169.7
	AUC_{0-24} (ng·h/mL)	0	0	120.4	130.5	2581.0	1747.3

* 全て検出下限以下

2.6.6.3.2　　ラット 4 週間反復皮下投与毒性試験及び 4 週間回復性試験［添付資料 4.2.3.2-2］

各群雌雄各 10 例のラットに FE 999049 の 0（媒体対照としてクエン酸ナトリウム緩衝液）、1.04、7.31、及び 52.2 µg/kg/day を 4 週間皮下投与し、屠殺・剖検した。対照群及び高用量群には両群とも雌雄各 5 例を割り当て、4 週間の休薬期間終了後に屠殺・剖検した。また、各投与群には雌雄各 12 例を割り当て、トキシコキネティクス評価のためのサテライト群とした。さらに各投与群には雌雄各 6 例を割り当て、ADA 産生評価のためのサテライト群とした。

対照群、1.04 µg/kg/day 群、及び休薬群の血清サンプルからは FE 999049 は検出されなかった。平均トラフ値はおおむね用量の増加に伴って増加した。7.31 及び 52.2 µg/kg/day 群では、血清中 FE 999049 濃度の個別値は群内及び 2 週間の投与期間終了時までおおむね同様な値であった。しかし、3 週目以降は個々の血清中濃度に大きな変動が見られた。これは特に雌で顕著で、52.2 µg/kg/day 群では更に顕著であり、おそらく中和抗体に起因するものであった。低用量群では FE 999049 は検出できなかった。しかし、卵巣重量は対照群と比較して約 2.5 倍に増加していたことから、これはこの群が曝露されたことを意味する（表 2.6.6- 4）。

雌低用量群（1.04 µg/kg/day）の 1 例が投与 4 週目の臨床病理試験用の採血中に麻酔下で死亡した。これは FE 999049 投与に関連ないと考えられた。これ以外に、一般状態、死亡率、眼科的検査、及び尿検査では FE 999049 投与に関連した影響は見られなかった。統計学的に有意な摂餌量の増加が高用量群（52.2 µg/kg/day）の雌雄で見られた。これは同じ動物における体重増加量の増加と一致しており、雌のみで統計学的有意差が見られた。赤血球系パラメータ、すなわち赤血球数、ヘモグロビン濃度、及びヘマトクリット値、は高用量群の雌で軽度に減少した。活性化部分トロンボプラスチン時間が高用量群の雌雄で短縮したが、試験施設の背景値以内の変化であった。これらの血液学的変化はいずれも毒性反応ではないと考えられた。血液生化学的検査では全群の雄でグルコース濃度の増加、全群の雌でアラニントランスアミナーゼ活性の増加、高用量群の雌でアルカリフォスファターゼ活性の低下が見られた。これら血液学的検査及び血液生化学的検査での変動は、用量依存性が見られず、毒性学的意義が低い変化と考えられた。エストラジオール測定の結果は評価できなかった。インヒビン B レベルは雄では影響はなかったが、FE 999049 群の雌では対照群の約 15 倍に増加した。

副腎及び下垂体の絶対及び相対重量の増加が高用量群（52.2 µg/kg/day）の雌で、卵巣の絶対及び相対重量の増加が全群の雌で見られた。卵巣重量の増加は卵巣の腫大、肉眼的な嚢胞及び病理組織学的な卵胞嚢胞の増加、黄体の突出とその数の増加が一致した。病理組織学的には膣及び子宮頸部における上皮粘液分泌亢進、子宮内膜の増殖／褶曲、子宮の上皮の空胞化、及び肥大が見られた。投与群の雌の乳腺組織では腺房増殖の増加が見られた。

投与期間終了時に見られた幾つかの影響、すなわち、体重増加量、摂餌量、赤血球数、血清インヒビン B レベル、子宮、子宮頸部、及び膣の病理組織学的な変化には、4 週間の休薬により完全な回復性が見られた。他の影響、すなわち、卵巣重量及び卵巣の病理組織学的な変化は部分的な回復性を示した。ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、血漿グルコース濃度、及び肉眼的な卵巣腫大が見られた雌の頻度に回復性は見られなかった。

内分泌系及び生殖臓器の反応は FE 999049 の直接又は間接的な薬理学的 FSH 作用によると考えられた。雌雄各 6 例のラットの血清を用いて 2 及び 4 週間の投与期間終了後並びに 4 週間の休薬期間終了後に ADA を分析した。いずれのラットでも抗体は検出されなかった。これは検出に用いた分析法の感

度不足によると考えられた。4 週間休薬後のサンプル（アッセイにおける FE 999049 の干渉を避けるため）の細胞を用いた *in vitro* アッセイによるその後の分析では、7.31 µg/kg/day 以上で中和抗体の産生が見られた。平均的な抗体価は高用量群の雄並びに中及び高用量群の雌で 5 倍を超えて増加した。

以上の結果より、NOAEL は高用量の 52.2 µg/kg/day と考えられた。

表 2.6.6- 4　ラット 4 週間投与期間中及び 4 週間休薬後のトラフ値（ng/mL）

用量（µg/kg/day)	1.04		7.31		52.2	
性	雄	雌	雄	雌	雄	雌
1 週目	BLQ	BLQ	1.38	1.77	15.5	10.1
2 週目	BLQ	BLQ	2.55	1.96	23.2	17.5
3 週目	BLQ	BLQ	1.64	12.8	11.9	8.56
4 週目	BLQ	BLQ	3.37	BLQ	30.4	37.6
8 週目	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ

BLQ = 定量下限未満

2.6.6.3.3　カニクイザル皮下投与最大耐量試験［添付資料 4.2.3.2-3］

この試験は単回投与の用量漸増相とその後の 7 日間投与の固定用量相に分けて実施した。用量漸増相では、雌雄各 1 例のカニクイザルに FE 999049 の 36.3、72.5、145、及び 290 µg/kg をそれぞれ 1、5、9、及び 15 日目に単回皮下投与した。固定用量相では、FE 999049 の 290 µg/kg/day を雌雄各 1 例に 7 日間皮下投与した。

FE 999049 の 290 µg/kg/day を 1 日 1 回皮下投与すると、FE 999049 は徐々に吸収され、それぞれの動物の血清中濃度は投与後 4～8 時間で最大に達した。固定用量相では、290 µg/kg/day の投与 1 及び 7 日目における投与後 24 時間の血清 FE 999049 濃度は定量可能なレベルであり、7 日間の投与期間での FE 999049 への継続的な曝露が示された。算出可能な投与 7 日目の終末相における見かけの $t_{1/2}$ は雄で 21.6 時間、雌で 21.4 時間と推測された。しかし、比較的短期間における $t_{1/2}$ の推定値であったことから、その推定値の信頼性は乏しいと考えられた。FE 999049 の 290 µg/kg/day の 1 日 1 回 7 日間反復皮下投与により、血清中の FE 999049 の AUC_{0-24} は雄では最大 1.6 倍、雌では 1.9 倍の蓄積性が見られた。投与 1 及び 7 日目において FE 999049 の全身曝露に明らかな性差は見られなかった（表 2.6.6- 5）。

いずれの投与量にも FE 999049 投与による毒性反応は見られなかった。FE 999049 の薬理又は過剰な薬理作用として、卵巣重量の増加、雌雄でインヒビン B の増加、雌ではエストラジオールとプロゲステロンの増加が見られた。これらの作用は肉眼的には両側性の卵巣の腫大、病理組織学的にはごく軽度／中等度の濾胞内出血を伴う中等度～重度の胞状卵胞の嚢胞状拡張を伴っていた。さらに、雄 2 例中 1 例の精巣の精上皮の軽度な萎縮と空胞変性は FE 999049 投与との関連性を否定できなかった。結論として、全ての変化は卵胞刺激ホルモンの薬力学的プロファイルを示す FE 999049 の薬理作用に起因するものであった。この試験条件では FE 999049 の標的毒性は認められず、MTD は算出できなかった。漸増投与段階（試験 25 日目）では、最高用量である 290 µg/kg の投与後のカニクイザルで ADA が検出された。

以上の結果より、NOAEL は高用量の 290 µg/kg/day と考えられた。

表 2.6.6- 5　カニクイザル皮下投与 MTD 試験の固定用量投与相（290 µg/kg/day、7 日間反復投与）のトキシコキネティクス

採取日	性	AUC_{0-24} (ng·h/mL)	C_{max} (ng/mL)
1 日目	雄	18053	1030
	雌	16675	899
7 日目	雄	27405	1617
	雌	31030	1573

2.6.6.3.4　カニクイザル 4 週間皮下投与毒性試験及び 4 週間回復性試験［添付資料 4.2.3.2-4］

各群雌雄各 3 例のカニクイザルに FE 999049 の 0（媒体対照としてクエン酸ナトリウム緩衝液）、0.522、5.22、及び 52.2 µg/kg/day を 4 週間皮下投与し、投与期間終了後に屠殺・剖検した。対照群及び高用量群には追加で雌雄各 1 例を割り当て、4 週間の休薬期間終了後に屠殺・剖検した。

FE 999049 の 0.522、5.22、及び 52.2 µg/kg/day のカニクイザルへの皮下投与の 24 時間後の血清中 FE 999049 濃度は検出可能なレベルにあり、試験期間中を通して継続的に動物が FE 999049 に曝露されたことが示された。終末期の半減期は雄では約 18 時間、雌では 26 時間であった。これらの値は 2 例の休薬動物（雌雄各 1 例）の結果より算出されたものである。曝露は最大で用量比の 2 倍以上に増加する傾向があった。反復投与により、ほとんどの動物の血清中 FE 999049 に明らかな蓄積性が見られ、28 日間の反復投与により雄で 1.3～4.3 倍、雌で 1.6～5.2 倍の曝露増加が見られた。0.522～52.2 µg/kg/day の用量範囲では FE 999049 の全身曝露に性差は見られなかった。5.22 及び 52.2 µg/kg/day 群の曝露の個体差は投与 1 日目でおおむね小さく、CV%は AUC_{0-24} では 9.7%～19.5%、C_{max} では 4.6%～30.1%の範囲であった。対照的に、投与 28 日目の個体差はおおむね大きく、CV%は AUC_{0-24} では 39.3%～84.6%、C_{max} では 38.7%～83.8%の範囲であった。投与 28 日目に見られた大きな個体差は、反復投与によって FE 999049 に対する中和抗体が産生された動物の血清からの FE 999049 のクリアランスの変化を反映している可能性があり、実際に 28 日間投与後のほぼ全てのカニクイザルでは高いレベルの抗体が測定されている。しかし、個体差が大きいことを除き、高いレベルの循環抗体と FE 999049 の薬物動態の変化の間には関連性はなかった（表 2.6.6- 6）。

死亡率、一般状態、体重、心血管パラメータ、眼科的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、及び尿検査では投与に関連した影響はなかった。精巣及び卵巣重量は全ての投与群で著しく増加し、特に卵巣重量は 5.22 µg/kg/day 群で約 9 倍に増加した。この変化には剖検での卵管及び卵巣の大型化と卵巣嚢胞を伴っていた。病理組織学的には用量の増加に伴って投与部位の急性／亜急性の炎症の頻度増加が見られた。卵管では内腔の拡張が、卵巣では投与群の雌全例で卵胞の嚢胞性拡張が見られ、卵胞内出血を伴うこともあった。子宮／子宮頸部では間質の硝子化と嚢胞形成が見られた。下垂体では好酸性細胞の肥大／過形成が雌で見られた。雄ではインヒビン B が事前値から 2～4 倍に増加した。雌では全ての FE 999049 投与群で黄体形成ホルモン（LH）が減少し、17-β エストラジオール及びインヒビン B が事前値から数倍増加した。雌での血中 LH レベルの低下及び子宮内膜間質の硝子化と嚢胞形成を除いて、全ての変化は休薬により完全に回復した。局所刺激性以外の全ての影響は FE 999049 の直接的若しくは間接的な FSH の薬理学的影響と考えられる。オフターゲットの毒性は見られなかった。高用

量群では弱い局所刺激性が見られた。これは高濃度群における非自己ヒトタンパク質の沈着に対する局所反応と考えられることから、ヒトには関連しない変化である。

以上の結果より、NOAEL は高用量の 52.2 µg/kg/day と考えられた。

表 2.6.6- 6　カニクイザル 4 週間反復皮下投与毒性試験のトキシコキネティクス

採取日	用量（µg/kg/day）	性	AUC_{0-24}（ng·h/mL）	C_{max}（ng/mL）
1 日目	0.522	雄	24.2	1.36
		雌	15.0	1.04
	5.22	雄	295	18.0
		雌	218	12.2
	52.2	雄	2631	144
		雌	2751	173
28 日目	0.522	雄	65.3	2.95
		雌	53.8	2.91
	5.22	雄	434	21.5
		雌	564	30.6
	52.2	雄	6838	344
		雌	8613	480

2.6.6.4　遺伝毒性試験

FE 999049 は、内因性タンパクと一次構造が同一であることから［添付資料 3.2.S.3.1］、遺伝毒性試験は実施しなかった。

2.6.6.5　がん原性試験

FE 999049 は、内因性タンパクと一次構造が同一であることから［添付資料 3.2.S.3.1］、がん原性試験は実施しなかった。

2.6.6.6　生殖発生毒性試験（用量設定試験及び補佐的なトキシコキネティクス評価を含む）

FE 999049 の生殖発生毒性試験として、ラットに皮下投与した 2 試験を実施した。受胎能及び初期胚発生毒性の本試験と、それに先立ち用量設定試験を実施した。臨床で妊婦への FE 999049 投与は禁止されており、授乳婦は治療上の有益性及び母乳栄養の有益性を考慮し、授乳の継続又は中止を検討されることから、胚胎児発生に関する試験及び出生前及び出生後の発育試験は実施しなかった。

2.6.6.6.1　ラット受胎能及び初期胚発生に関する皮下投与用量設定試験［添付資料 4.2.3.5.1-1］

各群雌雄各 6 例のラットに 0（媒体対照としてクエン酸ナトリウム緩衝液）、0.363、3.63、及び 36.3 µg/kg/day を皮下注射した。雄には交配前 14 日間、交配期間中、及び交配終了から屠殺・剖検までの少なくとも 14 日間投与した。雌にはサテライト群（各群 4 例）も含めて交配前 14 日間、交配期間中、及び妊娠 6 日目まで投与した。FE 999049 測定用の血液試料はサテライト群の雌から交配前期間の 14 日目の投与 24 時間後及び妊娠 6 日の投与 24 時間後に採取した。サテライト群の雄（各群 4 例）に

は投与せず、サテライト群の雌との交配のみに用いた。雌は妊娠 13 日に屠殺・剖検して子宮内容物を検査した。

血中薬物濃度には大きなばらつきがあり、高用量群の雌の 4 例中 3 例で 2 回、また、中及び低用量群でそれぞれ雌 1 例に 1 回、曝露が確認された。高用量群の雌では交配前 14 日に比べて約 50%の濃度増加が妊娠 6 日に見られ、蓄積性が示された。低用量群では、今回の測定方法では FE 999049 は検出できなかった例もあったが、薬理学的反応は全ての群で認められた。対照動物では曝露はなかった。

FE 999049 は主試験群の 36.3 µg/kg/day 群の 6 例中 2 例の雌に持続的な発情休止期を誘発し、性周期に影響を与えた。その結果、発情周期の数は減少した。妊娠した雌は 6 例中 3 例のみであった。1 例あたりの黄体数は用量に依存して増加した。平均着床数は 36.3 µg/kg/day 群で増加した。群平均着床前死亡は 3.63 及び 36.3 µg/kg/day 群で増加し、1 腹あたりの生存胚数は 36.3 µg/kg/day 群で増加した。
36.3 µg/kg/day 群の雄では精子濃度はやや低下し、頭部屈曲度が減った精子の数は増加した。この群の雄の精巣の絶対及び相対重量の群平均値は増加した。これらの変化は全て FE 999049 の薬理又は過剰な薬理作用に起因すると考えられた。次の受胎能の本試験の高用量群は、この用量設定試験の中間用量 3.63 µg/kg/day と力価表示で同等の 2.61 µg/kg/day が推奨された。0.363 µg/kg/day 群には有害作用は見られなかった。ADA はいずれのラットにも検出されなかった。

2.6.6.6.2　　ラット雌受胎能及び初期胚発生に関する皮下投与毒性試験［添付資料 4.2.3.5.1-2］

各群雌雄各 20 例のラットを用いた。先に実施した用量設定試験で雌雄共に FE 999049 投与の影響が見られた。その詳細評価を行うため、雌のみに FE 999049 を皮下投与した。投与用量は先に実施した用量設定試験（2.6.6.6.1）の成績を参考に 0（媒体対照としてクエン酸ナトリウム緩衝液）、0.261、0.835、及び 2.61 µg/kg/day とし、投与容量はいずれも 0.5 mL/kg/day とした。雌は、少なくとも交配 14 日前から FE 999049 の投与を開始し、交配期間中及び妊娠 6 日まで投与した。全ての交尾雌は妊娠 13 日に屠殺し、非交尾雌は交配期間終了の 14 日後に屠殺した。全ての雌は剖検し、雄は屠殺後に剖検せずに廃棄した。妊娠状態、黄体数、着床数とその分布を記録した。

中間用量（0.835 µg/kg/day）以上の群で体重増加量の増加が交配前期間に見られた。これには摂餌量の軽度増加が伴っていた。妊娠 0～13 日の体重増加量と摂餌量には群間差はなかった。性周期の平均数の減少が 2.61 µg/kg/day 群で見られた。中間用量（0.835 µg/kg/day）以上の群で交尾までの平均日数が増加し、平均交尾栓数は減少した。全例の雌が交尾したが、0、0.261、0.835、及び 2.61 µg/kg/day 群で妊娠したのはそれぞれ 18、17、13、及び 14 例のみで、その結果、0.835 µg/kg/day 以上の群で受胎率が低下した。0.835 及び 2.61 µg/kg/day 群の平均黄体数は対照群の約 2 倍であり、被験物質の薬理作用が示された。高用量群の着床前死亡率は対照群の 2 倍（対照群の 25%に対して約 50%）であった。流産／全胚吸収、平均着床数、平均生存胎児数、平均吸収胚数、死亡胎児数、及び平均着床後死亡率（%）には有害作用は見られなかった。NOAEL は 0.261 µg/kg/day であった。

2.6.6.7　　局所刺激性試験

2.6.6.7.1　　ウサギ亜急性及び亜慢性局所刺激性試験［添付資料 4.2.3.6-1］

これまでの毒性試験では、予定臨床投与スケジュールで局所刺激が示唆されるような肉眼的及び病理組織学的変化が投与部位に観察されなかったことから、被験物質の局所刺激性は弱いと判断される。

これを確認するため、FE 999049 の 5 種の異なる処方を各群 6 例の雌ウサギの背部右側（陰性対照として生理食塩液を背部左側）の剃毛皮膚に皮下注射して局所刺激性試験を行った。投与液量は 0.75 mL/site、FE 999049 の投与濃度は 37 µg/mL とした。投与 2 日及び 5 日後に、各群 3 例の雌を屠殺・剖検し、投与部位を肉眼的及び病理組織学的に観察した。

FE 999049 の 5 種の異なる処方を雌ウサギに単回皮下投与しても、生理食塩液投与対照群と比較して投与 2 日及び 5 日後には一般状態、局所反応、並びに肉眼的及び病理組織学的に明らかな違いは見られなかった。

2.6.6.8　その他の毒性試験

2.6.6.8.1　ラット FSH 中和抗体産生試験［添付資料 4.2.3.7.7-1］

各群 6 例の雌ラットを用い、0、0.183、1.83、及び 18.3 µg/head/day を 1 週間に 5 日、計 8 週間、皮下投与した。アッセイで 0、2、4、6、及び 8 週後の前回投与 72 時間後（FE 999049 の干渉を避けるため半減期の約 6 倍）に全ての動物から血清を採取した。

In vitro のルシフェラーゼ法により全群から中和抗体が検出された。ほとんど全ての動物（18 例中 15 例）では、投与量にかかわらず、2～4 週間の間に中和抗体産生が見られた。高用量群では個体差が見られた。すなわち、6 例中 2 例のラットではほとんど又は全く抗体が見られなかったが、残りの 4 例では、高い抗体レベルが見られた。6 及び 8 週後に、高い中和抗体（平均強度が 30～70 倍シフト）が 18 例中 15 例のラットで見られた。このオーダーの抗体濃度は、おそらく全ての投与薬物を中和するのに十分である。

2.6.6.8.2　不純物のリスク評価

2.6.6.8.2.1　宿主細胞タンパク質不純物

FE 999049 の製造に使用される rFSH 原薬は、ヒト胚性網膜芽細胞株から産生される。質量分析法を使用した特性解析により、優性な宿主細胞タンパク質（HCP）「[redacted]」が特定された。

この宿主細胞タンパク質不純物は、非臨床毒性試験、並びに臨床安全性、有効性、及び免疫原性試験に使用された原薬バッチ中に存在していた。重要な非臨床毒性試験に使用した原薬バッチの宿主細胞タンパク質不純物濃度は [redacted] ng/µg FSH であり、第 I 相臨床試験で使用された臨床バッチの最高濃度は [redacted] ng/µg FSH である。

ラット及びカニクイザル 4 週間反復皮下投与毒性試験の NOAEL は、最大用量の 52.2 µg/kg/day である。これらの試験で使用した原薬バッチには、宿主細胞タンパク質不純物が [redacted] ng/µg FSH が含まれていたため、ラットとカニクイザルには宿主細胞タンパク質不純物 [redacted] ng/kg/day が投与された。

臨床試験での患者への FE 999049 製剤の最大 1 日用量は、皮下投与で 9～15 日間 24 µg であった。これは宿主細胞タンパク質不純物の 1 日投与量が [redacted] ng を超えないことを意味し、体重 50 kg の女性では [redacted] ng/kg/day に相当する。毒性試験の NOAEL との比較で、用量に基づく安全係数は約 [redacted] であり、ヒトの曝露リスクに懸念はないと考えられた。ICH Q3D ガイドライン（F1 = 3：サルからヒトへの外挿、

F2 = 10：ヒト個体間変動）に記載されている原則を適用して、カニクイザルの NOAEL から算出された 50 kg のヒトの 1 日最大許容量は[redacted] ng/day（[redacted] ng/kg/day）で、これは投与された薬物中の宿主細胞タンパク質不純物[redacted]%又は[redacted] ng/µg FSH の安全濃度に相当する。

対象患者集団の第Ⅲ相臨床試験成績は、FE 999049 製剤の全体的な免疫原性が非常に低く、宿主細胞タンパク質不純物の存在がヒトでの FE 999049 製剤の免疫原性に無影響であることを示唆しており、他の rFSH 製品に匹敵することを実証した。

結論として、保守的なリスク評価の原則に基づいて、原薬中の宿主細胞タンパク質不純物の最大含有量として[redacted] ng/µg FSH（[redacted]%）は許容され、適格と考えられる。安全性評価の詳細は、宿主細胞タンパク質安全性評価［添付資料 4.2.3.7.7-2］に記載されている。

宿主細胞のタンパク質不純物レベルは、FE 999049 原薬製造の最終段階［添付資料 3.2.S.2.4］の前に、インプロセスコントロールテストによって監視される。

2.6.6.8.2.2　有機不純物

不純物[redacted]ブタン酸（[redacted]）は、FE 999049 製剤製造でのフェノールと L メチオニンの反応で形成される不純物である。[redacted] のレベルは、FE 999049 製剤［添付資料 4.2.3.7.7-3］の毒性学的懸念閾値（TTC）を下回っている。

不純物[redacted]は、FE 999049 製剤の容器閉鎖系から浸出する可能性があり、プランジャーとクリンプキャップセプタムゴム配合物に由来する。[redacted] は更に[redacted]に酸化できる。[redacted] と[redacted] の濃度はともに、TTC を下回っているため、FE 999049 製剤に安全性の懸念はない。[redacted] 及び[redacted] の安全性評価の詳細は、浸出物の安全性評価［添付資料 4.2.3.7.7-4］に記載されている。

2.6.6.8.2.3　抽出物／浸出物

コンテナ閉鎖系のゴム部品からの抽出物を検査するために、抽出物の試験を行った。試験の結果を評価するために、毒性学的懸念閾値 1.5 µg/day を使用した。抽出物中に 1.5 µg/day に相当する濃度を超えて存在する全ての抽出物は、毒性学的に評価されている。毒性学的懸念閾値を超える濃度で存在する化合物で、［添付資料 3.2.P.2.4.1］の試験で見つかったレベルで毒性学的懸念がある化合物はなかった［添付資料 4.2.3.7.7-5］。

FE 999049 製剤中の浸出物の濃度を検査するために、浸出物のスクリーニング試験を行った。保管温度は 5°C、25°C、及び 30°C で、保管期間は最大 36 ヵ月であった。毒性学的懸念閾値を超える濃度の浸出物は特定されなかったため、安全性の懸念はなかった［添付資料 3.2.P.2.4.2］。

2.6.6.8.3　新添加物硫酸ナトリウムの毒性試験

2.6.6.8.3.1　硫酸ナトリウムの単回投与毒性試験

2.6.6.8.3.1.1　硫酸ナトリウムのマウス単回強制経口投与毒性試験(2)

マウス（NA_2均一系、性・動物数不明）に、精製水に溶解した硫酸ナトリウム（無水和物）4440～10800 mg/kg の 5 用量を単回強制経口投与した時の急性毒性を検討した。この試験は、アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウムの薬理及び毒性研究の一環としてその副生物としての硫酸ナトリウムの毒性研究として報告された。

LD_{50}値を Probit 法で求めたところ、投与後 7 日後の LD_{50}値は 5989 mg/kg であった。LD_{50}値以外の毒性情報は報告されていない（表 2.6.6- 7）。

2.6.6.8.3.1.2　硫酸ナトリウムのマウス単回静脈内投与毒性試験(2)

マウス（NA_2均一系、性・動物数不明）に、硫酸ナトリウム（無水和物）を 5 及び 50 mg/kg を単回静脈内投与した時の呼吸と血圧に対する影響を検討した。この試験は、アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウムの薬理及び毒性研究の一環としてその副生物としての硫酸ナトリウムの毒性研究として報告された。

5 mg/kg では呼吸と血圧に影響はなかった。50 mg/kg で呼吸の振幅がわずかに減少し、血圧がわずかに上昇した。概略の致死量は 50 mg/kg より大と判断された（表 2.6.6- 7）。

2.6.6.8.3.1.3　硫酸ナトリウムのラット単回強制経口投与毒性試験（GLP）(3)

Wistar 系雌ラット（10 週齢、3 例）に、polyethylene glycol （PEG300）に溶解した硫酸ナトリウム（結晶形不明）を 2000 mg/10 mL/kg の用量で単回強制経口投与した。

投与後 15 日間に死亡は見られなかった。投与後に軽度鎮静、円背位、及び軽度粗毛が観察されたが、翌日までに消失した。体重及び剖検に変化はなかった。概略の致死量は 2000 mg/kg より大と推定された（表 2.6.6- 7）。

2.6.6.8.3.1.4　硫酸ナトリウムのラット単回腹腔内投与毒性試験(4)

ラット単回腹腔内投与での LD_{50}値が 3000～4100 mg/kg と報告されている。ただし、実験条件などの詳細は記載されていない（表 2.6.6- 7）。

表 2.6.6- 7　硫酸ナトリウムの単回投与試験のまとめ

動物種（系統）	投与方法（媒体）	投与量（mg/kg）	性別 1 郡動物数	特記すべき所見
マウス（NA_2 均一系）	強制経口（精製水）	4440～10800	不明	LD_{50}（Probit 法、7 日間後）5989 mg/kg
マウス（NA_2 均一系）	静脈内（不明）	5, 50	不明	5 mg/kg：呼吸と血圧に影響なし。 50 mg/kg：呼吸わずかな振幅減少、血圧わずかな上昇
ラット（Wistar）	強制経口（polyethylene glycol）	2000	雌 3 匹/群	2000 mg/kg：死亡なし。軽度鎮静、円背位、軽度粗毛、全て翌日までに回復。体重、剖検に変化なし。 LD_{50} > 2000 mg/kg
ラット	腹腔内	不明	不明	LD_{50} 3000～4100 mg/kg

2.6.6.8.3.2　硫酸ナトリウムの反復投与毒性試験

2.6.6.8.3.2.1　硫酸ナトリウムのラット 4 週間（雄）あるいは 7 週間（雌）反復強制経口投与毒性試験（GLP）(5) (6)

経済協力開発機構（OECD）テストガイドライン 421（生殖／発生毒性スクリーニング試験）に準じて実施した。この試験は一般毒性と生殖発生毒性を統合した試験で、生殖発生毒性の検査及び結果は生殖発生毒性試験の 2.6.6.8.3.5.1 項に記載する。Wistar 系雌雄ラット（11 週齢、10 例／群／性）に水に懸濁した硫酸ナトリウム（無水和物）を 0、100、300、及び 1000 mg/kg/day の用量で 1 日 1 回強制経口投与した。用量は先に行った用量設定試験の成績を元に選択した。つまり、0、100、300、及び 1000 mg/kg/day の用量を投与した時、1000 mg/kg/day 群で軟便が観察され、NOEL は 300 mg/kg/day であった。

本試験は一般毒性と受胎能及び初期胚発生に関する生殖毒性を合わせて評価するため、雄は 4 週間以上、雌は分娩後 3 日まで約 7 週間投与した。投薬期間中は生死、臨床症状、摂餌量測定、体重測定を行った。雄は 28 日間投与翌日に、雌は分娩 4 日後に剖検し、雄精巣及び精巣上体の重量測定、及び全身臓器の病理組織学的検査を行った。

死亡例はなく、臨床症状、体重、摂餌量、雄の臓器重量、剖検、及び病理組織学的検査に投薬の影響はなかった。本試験条件下での NOEL は 1000 mg/kg/day と推測された（表 2.6.6- 8）。

2.6.6.8.3.2.2　硫酸ナトリウムの雄ラット 4 週間反復混餌投与毒性試験(7) (8) (9)

Sprague-Dawley 系雄ラット（6 例／群）に、餌に混合した硫酸ナトリウム（無水和物）を約 2000 mg/kg/day の用量で 4 週間混餌投与して、生死、症状、体重、摂餌量、摂水量、尿検査、血液検

査、血液生化学（アルカリホスファターゼ、無機リン、及び蛋白）、剖検（消化管のみ）、及び消化管重量を検査した。

死亡例はなく、下痢が 1 例に投与期間中に 4 日間観察された。それ以外に投薬に関連する変化はなかった。本試験条件下での NOAEL は約 2000 mg/kg/day と推測された（表 2.6.6- 8）。

2.6.6.8.3.2.3　　硫酸ナトリウムの雄ラット 27 あるいは 41 週間反復混餌投与毒性試験(10) (11)

Sprague-Dawley 系雄ラット（5 例／群）に、餌に混合した硫酸ナトリウム（結晶形不明）を約 320～400 mg/kg/day の用量で 27 あるいは 41 週間混餌投与して、生死、症状、体重、血液検査（ヘモグロビン濃度）、剖検、臓器重量（肝、脾）、及び病理組織検査（肝、肺）を行った。なお、この試験はアゾ色素の発がん性に対する硫酸ナトリウムの影響を検討した試験で、溶媒対象として使用した硫酸ナトリウム群の結果を報告する。

いずれの検査でも硫酸ナトリウム投薬の影響は認められなかった。NOAEL は 320 mg/kg と推測された（表 2.6.6- 8）。なお、がん原性の評価は 2.6.6.8.3.4.2 に示す。

2.6.6.8.3.2.4　　硫酸ナトリウムのウサギ 13 週間反復経皮投与毒性試験(12)

NZW 系雌雄ウサギ（5 例／群／性）に、水に溶解した 16% 硫酸ナトリウム 2 mL/kg/day を OECD テストガイドライン 411（亜慢性経皮毒性 90 日試験）に準じて 1 日 1 回、91 日間のうち 65 回経皮投与した。生死、症状、皮膚刺激性観察、体重、血液検査、剖検、及び病理組織学的検査を行った。

血液検査で投薬群の平均赤血球容積及び平均赤血球ヘモグロビン量が対照群に比べて有意に増加した。しかし、全ての値は正常範囲内であったことから、生物学的意義がないと判断された。皮膚の病理組織学検査では、対照群の 3/10 例が軽度の亜急性皮膚炎を示したのに対して、投薬群の 8/10 例に軽度から中程度の亜急性皮膚炎が観察された。最小毒性量（LOAEL）は 2 mL/kg/day であった（表 2.6.6-8）。

表 2.6.6- 8　硫酸ナトリウムの反復投与毒性試験のまとめ

動物種（系統）	投与方法（媒体）	投与量 (mg/kg/day)	性別 動物数	投与期間	特記すべき所見
ラット（Wistar）	強制経口（水）	0, 100, 300, 1000（無水和物として）	雌雄 10 例／群／性	雄 4 週間 雌約 7 週間	死亡例なし。いずれの動物にも投薬に関連した毒性反応なし。 NOEL 雌雄とも 1000 mg/kg/day
雄ラット（Sprague-Dawley）	経口（混餌）	約 2000（無水和物として）	雄 6 例／群	4 週間	死亡例なし。軽度下痢（1 例）、それ以外の毒性なし。 NOAEL 雄約 2000 mg/kg/day
雄ラット（Sprague-Dawley）	経口（混餌）	約 320～400（結晶形不明）	雄 5 例／群	27 あるいは 41 週間	死亡例なし。いずれの動物にも投薬に関連した毒性反応なし。 NOAEL 雄 320 mg/kg/day
ウサギ（NZW）	経皮	2 mL/kg/day（無水和物として）	雌雄 5 例／群／性	91 日間のうち 65 回	死亡例なし。亜急性皮膚炎の軽度増強。 LOAEL 2 mL/kg/day

NOEL = 無影響量、NOAEL = 無毒性量、LOAEL = 最小毒性量

2.6.6.8.3.3　硫酸ナトリウムの遺伝毒性試験

2.6.6.8.3.3.1　硫酸ナトリウムの細菌復帰突然変異試験（GLP）(13)

非代謝活性化（S9–）及び代謝活性化（S9+）でネズミチフス菌（*S. typhimurium* TA1535, TA1537, TA100, TA98）を硫酸ナトリウムの 312.5～5000 µg/plate の 4 用量で処理して、遺伝子突然変異誘発作用を評価した。

細菌への毒性は 5000 µg/plate まで認められなかった。代謝活性化の有無にかかわらず、全ての菌株で遺伝子突然変異誘発作用は陰性であった（表 2.6.6- 9）。

2.6.6.8.3.3.2　硫酸ナトリウムのマウスリンパ腫 L5178Y 細胞遺伝子突然変異試験（GLP）(14)

OECD テストガイドライン 476（哺乳類細胞の *In vitro* 遺伝子突然変異試験）に準じて実施した。予備試験では、マウスリンパ腫 L5178Y 細胞を硫酸ナトリウム（無水和物）の 11.1～1420 µg/mL（10 mmol/L）で S9–で 4 及び 24 時間並びに S9+で 4 時間処理した。その結果、いずれの条件でも細胞毒性は認められなかった。また、培養後に薬物の析出も認められなかった。そこで、本試験では S9–及び S9+ともに、88.8～1420 µg/mL の 5 用量で処理して、突然変異出現を評価した。

その結果、S9–の 4 又は 24 時間処理、並びに S9+の 4 時間処理で硫酸ナトリウムはいずれの濃度でも遺伝突然変異出現に影響しなかった。

以上の結果から、硫酸ナトリウムはマウスリンパ腫 L5178Y 細胞の遺伝子突然変異作用は陰性であった（表 2.6.6- 9）。

2.6.6.8.3.3.3　　硫酸ナトリウムの CHL 線維芽 V79 細胞染色体異常試験（GLP）(15)

OECD テストガイドライン 473（*IN VITRO* 哺乳類細胞染色体異常試験）に準じて実施した。試験は試験 1 と試験 2 の 2 回行った。試験 1 は S9–又は S9+で Chinese hamster lung fibroblast（CHL 線維芽）V79 細胞を硫酸ナトリウム（無水和物）の 11.1～1420 µg/mL の 8 用量で 4 時間処理後、被験物質を含まない培養液で 14 時間回復させた。試験 2 では S9–では 22.2～1420 µg/mL の 7 用量で 18 時間処理し、S9+では 177.5～1420 µg/mL の 4 用量で 4 時間処理後、被験物質を含まない培養液で 14 時間回復させた。培養後、各群 2 例の培養から 100 細胞以上を観察して、細胞毒性、染色体構造異常、倍数体細胞、異数体細胞、及びギャップの有無を求めた。

その結果、いずれの処理群でも被験物質の析出や pH の変化はなかった。また、分裂指数及び細胞数にも影響はなく、細胞毒性は認められなかった。染色体異常細胞数及びギャップは背景値の範囲内であった。陽性対照の ethylmethanesulfonate（非代謝活性化）及び cyclophosphamide（代謝活性化）はいずれも染色体構造異常を持つ細胞数を増加させた。

以上の結果から、硫酸ナトリウムの CHL 線維芽 V79 細胞に対する染色体異常作用は陰性であった（表 2.6.6- 9）。

表 2.6.6- 9　　硫酸ナトリウムの *in vitro* 遺伝毒性試験のまとめ

試験種	細胞／系統	濃度（µg/mL）	代謝活性化	曝露時間	特記すべき所見
復帰突然変異	ネズミチフス菌（*S. typhimurium* TA1535, TA1537, TA100, TA98）	312.5～5000 µg/plate	S9– S9+	該当なし	陰性
遺伝子突然変異	マウスリンパ腫 L5178Y 細胞	88.8～1420	S9– S9+	4, 24 h 4 h	陰性
染色体異常	CHL 線維芽 V79 細胞	試験 1：11.1～1420 試験 2：22.2～1420 試験 2：177.5～1420	S9–, S9+ S9– S9+	4 h 18 h 4 h	陰性

2.6.6.8.3.3.4　　硫酸ナトリウムのマウス腹腔内投与骨髄小核試験(16) (17)

NMRI 系雌雄マウス（2 例／群／性）に 0.375M リン酸緩衝液に溶解した硫酸ナトリウム（結晶形不明）を 0、24.0、48.0、及び 96.1 mg/kg の用量で 0 及び 24 時間に腹腔内投与した。初回投与 30 時間後の骨髄細胞のスライドを作成し、細胞 1000 個中の小核多染性赤血球比率を求めた。

その結果、硫酸ナトリウムは 96.1 mg/kg/day でもマウス骨髄細胞で小核誘発作用を持たなかった（表 2.6.6- 10）。

表 2.6.6- 10　硫酸ナトリウムの *in vivo* 遺伝毒性試験のまとめ

試験種	種／系統	投与方法（媒体）	投与量（mg/kg）	性別 動物数	投与期間	特記すべき所見
骨髄小核	雌雄マウス（NMRI）	腹腔内（0.375M リン酸緩衝液）	24.0, 48.0, 96.1	雌雄 2 例／群／性	2 日間	陰性

2.6.6.8.3.4　硫酸ナトリウムのがん原性試験

2.6.6.8.3.4.1　硫酸ナトリウムのマウス 26 週間反復皮下投与がん原性試験(18) (19)

Swiss 系雌雄マウス（6 週齢、50 例／群／性）に、0.9% NaCl に溶解した硫酸ナトリウム（無水和物）を 31 mg/kg/week の用量で週 1 回 26 週間皮下投与して、死亡及びその経過、剖検、及び病理組織学検査を行った。なお、この試験は 4-(hydroxymethyl)benzenediazonium 硫化物のがん原性試験の対照群として報告されたものである。

その結果、硫酸ナトリウム投与群の 100 週齢の生存数は雄 25/50、雌 21/50 で、140 週齢ではそれぞれ 2/50 及び 4/50 であった。皮下組織の腫瘍は雄 2/50 例に観察され、線維肉腫と診断された。雌にはなかった。一方、皮膚の腫瘍は雌 1 例の耳に観察され、扁平上皮乳頭腫と診断された。雄の皮膚には腫瘍はなかった。その他の腫瘍の発生頻度も低かった。これら腫瘍の頻度は同系マウスの実験施設の背景値の範囲内であった。

これより、この試験条件では、硫酸ナトリウムにはマウスに腫瘍を誘発する作用はないと判断された（表 2.6.6- 11）。

2.6.6.8.3.4.2　硫酸ナトリウムの雄ラット 27 あるいは 41 週間反復混餌投与がん原性試験(20) (21)

Sprague-Dawley 系雄ラット（5 例／群）に、餌に混合した硫酸ナトリウム（結晶形不明）を約 320～400 mg/kg/day の用量で 27 あるいは 41 週間混餌投与して、生死、体重、血液検査（ヘモグロビン濃度）、剖検、臓器重量（肝、脾）、及び病理組織検査（肝、肺）を行った。なお、この試験はアゾ色素の発がん性に対する硫酸ナトリウムの影響を検討した試験で、溶媒対象として使用した硫酸ナトリウム群の結果を報告する。なお、一般毒性の成績は 2.6.6.3.3 に示した。がん原性の評価として剖検、並びに肝と肺のヘマトキシリン・エオジン染色及び periodic acid-Schiff 染色の病理組織学検査を行った。さらに、必要に応じてアルシアンブルー及びトルイジンブルー染色も併用した。

硫酸ナトリウム投薬群には腫瘍の発生は認められなかった。この試験条件では、硫酸ナトリウムは雄ラットに腫瘍を誘発する作用はないと判断された（表 2.6.6- 11）。

表 2.6.6- 11　硫酸ナトリウムのがん原性試験のまとめ

動物種（系統）	投与方法（媒体）	投与量	性別 動物数	投与期間	特記すべき所見
マウス（Swiss）	皮下（0.9% NaCl）	31 mg/kg/week	雌雄 50 例／群／性	週 1 回、26 週間	腫瘍誘発作用なし。
雄ラット（Sprague-Dawley）	経口（混餌）	約 320～400 mg/kg/day	雄 5 例／群	27 及び 41 週間	腫瘍誘発作用なし。

2.6.6.8.3.5　硫酸ナトリウムの生殖発生毒性試験

2.6.6.8.3.5.1　硫酸ナトリウムのラット経口投与受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（GLP）(22)

OECD テストガイドライン 421（生殖／発生毒性スクリーニング試験）に準じて実施した。ここでは生殖発生毒性に関する成績を述べる。反復投与毒性の検査及び結果は 2.6.6.8.3.2.1 項に記載する。Wistar 系雌雄ラット（11 週齢、10 例／群／性）に水に懸濁した硫酸ナトリウム（無水和物）を 0、100、300、及び 1000 mg/kg/day の用量で 1 日 1 回強制経口投与した。雄は 4 週間、雌は分娩後 3 日まで約 7 週間投与した。投薬期間中は生死、臨床症状、摂餌量測定、体重測定を行った。投与開始 2 週後に交配を開始し、妊娠するまで又は 2 週間経過するまで雌雄を同居させ、交配率、受胎能、妊娠期間、黄体数、着床率、着床後死亡、腹子数、及び出生後死亡児数を検査した。最終投与翌日に剖検し、雄精巣及び精巣上体の重量測定、及び生殖臓器の病理組織学的検査を行った。

親動物の一般毒性及び生殖、並びに次世代の発生に硫酸ナトリウムの影響は認められなかった。この試験条件の NOEL は親動物の一般毒性及び生殖、並びに次世代の発生ともに 1000 mg/kg/day と考えられた（表 2.6.6- 12）。

2.6.6.8.3.5.2　硫酸ナトリウムのマウス皮下投与胚・胎児発生に関する試験(23) (24)

CF-1 系雌マウス（体重 25～30 g、6 例／群）に蒸留水に溶解した硫酸ナトリウム（結晶形不明）を 60 mg/kg の用量で妊娠 8 又は 9 日に単回皮下投与し、母動物及び胚・胎児発生への影響を評価した。なお、試験は硫酸モルヒネの胚・胎児発生に対する影響を評価するために実施され、その陰イオン対照群として硫酸ナトリウムが設定され、その他に無処置対照群及び溶媒（生理食塩水）対照群が設定された。

母動物及び胎児に硫酸ナトリウムの影響は認められなかった。この試験条件の NOAEL は母動物の一般毒性、生殖、及び次世代の発生ともに 60 mg/kg/day と考えられた（表 2.6.6- 12）。

2.6.6.8.3.5.3　硫酸ナトリウムのマウス経口投与胚・胎児発生に関する試験(25) (26)

ICR/SIM 系雌マウス（体重 32～36 g、28 例／群）に水に溶解した硫酸ナトリウム（結晶形不明）を 2800 mg/kg/day の用量で妊娠 8～12 日に 5 日間強制経口投与し、母動物、胚・胎児発生、及び出生児へ

の影響を評価した。対照群には蒸留水を同様に投与した。なお、この試験はマウスでの発生毒性試験法のバリデーションとして 55 化合物を評価した試験の一部として実施された。

硫酸ナトリウム投与群の産後 1 日の出生児体重がわずかに増加した。しかし、産後 3 日には対照群との差はなくなった。内臓及び骨格には異常はなかったことから、毒性学的に意義のない反応と判断された。この試験条件の NOAEL は母動物の一般毒性、生殖、及び次世代の発生ともに 2800 mg/kg/day と考えられた（表 2.6.6- 12）。

2.6.6.8.3.5.4　　硫酸ナトリウムのラット経口投与出生前発生に関する試験(27)

OECD テストガイドライン 414（出生前発生毒性試験）に準じて実施した。Sprague-Dawley 系雌ラット（体重 225.4～233.9 g、20 例／群）に蒸留水に溶解した硫酸ナトリウム（結晶形不明）を 160 mg/kg の用量で、8 例／群は妊娠 6 日から 12 日まで強制経口投与し、13 日目に安楽死させた。また、残り 12 例／群は妊娠 6 日から 15 日まで強制経口投与し、19 日目に安楽死させた。胎児を摘出し、母動物及び胚・胎児発生への影響を評価した。対照群には蒸留水を同様に投与した。

母動物及び胎児に硫酸ナトリウムの影響は認められなかった。この試験条件の NOAEL は母動物の一般毒性、生殖、及び次世代の発生ともに 160 mg/kg/day と考えられた（表 2.6.6- 12）。

2.6.6.8.3.5.5　　硫酸ナトリウムのマウス飲水投与出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験(28) (29)

ICR 系雌マウス（試験 1：7 例／群、試験 2：4 例／群）に脱イオン蒸留水に溶解した硫酸ナトリウム（無水和物）7392 mg/L を飲料水として妊娠 7 日から 21 日及び授乳 0 日から 14 日まで自由に摂取させ、母動物及び出生児への影響を評価した。対照群には脱イオン蒸留水を与えた。

母動物及び出生児に硫酸ナトリウムの影響は認められなかった。この試験条件の NOAEL は母動物の一般毒性、生殖、及び次世代の発生ともに 7392 mg/L と考えられた（表 2.6.6- 12）。

表 2.6.6- 12　硫酸ナトリウムの生殖発生毒性試験のまとめ

試験種	動物種（系統）	投与方法（媒体）	投与量（mg/kg）	性別 動物数	投与期間	特記すべき所見
受胎能及び初期胚発生	ラット（Wistar）	強制経口（水）	0, 100, 300, 1000	雌雄 10 例／群／性	雄：4 週間 雌：約 7 週間	NOEL：一般毒性、生殖発生ともに 1000 mg/kg/day
胚・胎児発生	マウス（CF-1）	皮下（生理食塩水）	60	雌 6 例／群	単回（妊娠 8 又は 9 日目）	NOAEL：一般毒性、生殖発生ともに 60 mg/kg/day
胚・胎児発生	マウス（ICR/SIM）	強制経口（水）	2800	雌 28 例／群	妊娠 8～12 日目	NOAEL：一般毒性、生殖発生ともに 2800 mg/kg/day
出生前発生	ラット（Sprague-Dawley）	強制経口（蒸留水）	160	雌 20 例／群	妊娠 6～12 あるいは 6～15 日目	NOAEL：一般毒性、生殖発生ともに 160 mg/kg/day
出生前及び出生後の発生並びに母体の機能	マウス（ICR）	経口／飲水（脱イオン蒸留水）	7392 mg/L	雌 11 例／群	妊娠 7～21 日及び授乳 0～14 日目	NOAEL：一般毒性、生殖発生ともに 7392 mg/L

2.6.6.8.3.6　硫酸ナトリウムの局所刺激性試験

2.6.6.8.3.6.1　硫酸ナトリウムのウサギ急性皮膚刺激性／腐食性試験（GLP）(30)

OECD テストガイドライン 404（急性皮膚刺激性／腐食性）に準じて実施した。ウサギ（3.7～4.2 kg、3 例／群、系統・性不明）に硫酸ナトリウム（溶媒ポリエチレングリコール 400）の 500 mg/0.5 mL を皮膚に塗布して、4 時間曝露した。その後、投与部位の紅斑及び浮腫の兆候を観察した。

14 日間の観察期間中、投与部位に紅斑及び浮腫は観察されなかった。本試験条件で、硫酸ナトリウムは皮膚刺激性を持たないと判断された（表 2.6.6- 13）。

2.6.6.8.3.6.2　硫酸ナトリウムのウサギ急性眼刺激性／腐食性試験（GLP）(31)

OECD テストガイドライン 405（急性眼刺激性／腐食性）に準じて実施した。ウサギ（3 例／群、体重、系統、性不明）に硫酸ナトリウム（溶媒、調整法不明）の 90 mg/0.1 mL を点眼して、角膜、虹彩、結膜、結膜浮腫の反応を観察して、スコア化した。

48 時間の観察で結膜発赤が見られスコア 1 と判定された。Day 7 には回復した。その他の部位には変化はなかった。全般的な刺激性スコアは 1.3 で軽度の刺激性と判断された（表 2.6.6- 13）。

2.6.6.8.3.6.3　硫酸ナトリウムの硫酸ナトリウム含有注射剤のウサギ亜急性及び亜慢性皮下投与局所刺激性試験［添付資料 4.2.3.6-1］

硫酸ナトリウムを添加剤として含むレコベル皮下注ペン製剤（ホリトロピン　デルタ組換え 37 μg/mL、リン酸緩衝液 pH 6.5 [redacted] mM、Tween 20 [redacted] mg/mL、フェノール [redacted] mg/mL、L-メチオニン [redacted] mg/mL、硫酸ナトリウム十水和物 14 mg/mL）の 0.75 mL/site を各群 3 例の雌 NZW ウサギの剃毛した右背部皮膚に単回皮下注射した。左背部皮下に生理食塩水を同様に投与した。投与 2 日及び 5 日後に、屠殺・剖検し、投与部位を肉眼的及び病理組織学的に観察した。生理食塩液投与対照群と比較して投与 2 日及び 5 日後には臨床症状、局所反応や肉眼的及び病理組織学的に明らかな違いは見られなかった（表 2.6.6- 13）。

表 2.6.6- 13　硫酸ナトリウムの局所刺激性試験のまとめ

試験種	種	投与濃度	性別 動物数	投与期間	特記すべき所見
経皮	ウサギ	500 mg/0.5 mL	3 例／群	単回（4 時間）	皮膚刺激なし。
点眼	ウサギ	90 mg/0.1 mL	3 例／群	単回	刺激性スコア 1.3 軽度の刺激性
皮膚（皮下）	ウサギ /NZW	Na_2SO_4 $10H_2O$ 14 mg/mL	雌 3 例／群	単回	局所刺激性なし。

2.6.6.8.3.7　硫酸ナトリウムのその他の毒性試験

2.6.6.8.3.7.1　硫酸ナトリウムのラットへ放射標識 $Na_2[^{35}S]O_4$ 投与後の体内動態(32)

ラットでの硫酸ナトリウムを経口投与した時の血漿中濃度と吸収性を検討するために[^{35}S]標識した硫酸ナトリウムを投与後の体内動態を検討した。Wistar 系雄ラット（体重 300～330 g）の右心房にカテーテルを挿入して経時採血を行えるようにした。軽度麻酔下で 2 mL の水に溶解した 600 μCi/kg の $Na_2[^{35}S]O_4$ をラットに経口投与後、経時的に採血して、血漿中の放射活性を測定した。

その結果、血漿中放射活性は投与後 1.5～2 時間後に最大値になり、10 時間後には最大値の約 50%、19 時間後には 10%未満に減少した。

一方、カテーテル前処理をしていない別のラットに 0.3 mM の塩化ナトリウムを含む水に溶解した 50 μCi/kg の $Na_2[^{35}S]O_4$ をラットに経口投与後、ラットを代謝ケージに入れ、7 日間尿及び糞を別々に採取して、その放射活性を測定した。

その結果、投与後 24 時間で投与した放射活性の 84.0%、48 時間で 88.1%、7 日間で 91.0%が尿中に排泄された。

以上の結果から、硫酸ナトリウムをラットに経口投与した時に急速に吸収され、2 時間までに最大値を示した。その後、主に尿中に、24 時間までに 90%近く排泄され、その後は徐々に排泄された。これより、硫酸ナトリウムの経口投与による毒性試験でも皮下投与と同様の体内動態を示していたことが示唆された。

2.6.6.8.3.7.2　　硫酸ナトリウムの健常人の血清中無機硫酸塩濃度(33)

健康成人（男性 6 人、女性 2 人、平均年齢 30 歳、平均体重 75.3 kg、平均推定体表面積 1.92 m^2、平均血清クレアチニン濃度 0.93 mg/dL）の血清中の無機硫酸塩濃度を比濁法で測定した。

その結果、無機硫酸塩濃度は平均 0.410 mM であった。これは硫酸ナトリウム無水和物（分子量 142.04）換算で 58.2 µg/mL、硫酸ナトリウム十水和物（分子量 322.19）換算で 132.1 µg/mL であった。

2.6.6.9　　考察及び結論

rFSH である FE 999049 の毒性プロファイルを、ラット及びマウスの静脈内及び皮下投与による単回投与毒性試験、ラット及びカニクイザルの 4 週間反復投与毒性試験、ラット受胎能及び初期胚発生毒性試験、並びにウサギ皮下局所刺激性試験から明らかにした。

FE 999049 の薬物動態プロファイルは、他の遺伝子組換え FSH 生成物と類似した特性を示した［2.6.4 表 2.6.4- 1］。さらに、重要なラット及びカニクイザル 4 週間反復投与毒性試験で、器官重量（卵巣）の変化を伴う曝露データは、動物が投与期間中 FE 999049 に曝露されていたことを示しており、試験の妥当性を保証している。ラット 8 週間反復投与毒性試験の結果は、8 週間投与後のラットではある程度の中和抗体の産生刺激により全用量が中和される可能性を示している。毒性試験での、曝露データを含むいくつかのパラメータの大きなばらつきは、中和抗体の産生により FE 999049 への曝露の低下や曝露されていない動物が存在することを示している。このメカニズムは臨床での条件設定に外挿するには不適切と考えられる。

ラット及びカニクイザルで、少なくとも投与 24 時間後まで化合物の曝露が見られており、投与期間を通して動物が FE 999049 に持続的に曝露されていることが示された。ラットでの半減期は 6.3～9.7 時間であったが、カニクイザルの半減期は雄 14.8～29.2 時間、雌 21.4～47.6 時間であった。ラットでは 2 週間反復投与しても、蓄積は見られないか目立たない程度のものであった。一方、ほとんどのカニクイザルでは FE 999049 の著しい蓄積が見られた。このことは、カニクイザルの半減期がラットに比べて 2～8 倍長いことと一致している。ラットでは、カニクイザルより曝露レベルが用量比以上に増加する傾向が見られ、その傾向は高用量で顕著であった。一貫した性差は見られなかった。全体として、ラット及びカニクイザルの FE 999049 のトキシコキネティクスは、他の遺伝子組換えヒト FSH で報告されている値と同等であった［2.6.4 表 2.6.4- 1］。

単回及び反復投与毒性試験で毒性徴候は見られず、全ての変化は FE 999049 の直接若しくは間接的な薬理作用に起因するか、その延長線上の変化で、全ての投与群で認められた。FE 999049 は卵胞の成長と発達を刺激し、卵巣重量の大幅な増加を導いた。同様に、FE 999049 は、ラット及びカニクイザルで、いくつかの性ホルモンレベルの変化とその延長線上の変化を伴う内分泌系に対する明らかな相互作用に起因した変化を発現した。

これら変化の回復性をラット及びカニクイザルの 4 週間反復投与毒性試験で 4 週間の休薬により調べたところ、主な変化は部分的若しくは完全に回復した。

生殖発生毒性試験で、FE 999049 の 0.261 µg/kg/day を超える用量をラットに投与すると、受胎能及び初期胚発生に有害作用が見られた。すなわち、交尾活動の軽度な変化と黄体の倍増による着床前死亡が見られた。ラットの交尾活動の変化は種特異的で非生理的であると考えられ、黄体数の増加は過剰な薬理作用に起因し、ヒトの投与量では発現しないと考えられた。ラットの NOAEL は 0.261 µg/kg/day であった。

FE 999049 はウサギ単回投与局所刺激性試験において、5 種の異なる処方で予定製剤（33.3 µg/mL）に近い濃度（37 µg/mL）で評価したところ、局所刺激性は見られず、市販予定製剤による投与部位への影響はないと思われる。

雌ラット試験では、用量に関係なく 2～4 週間の投与後に中和抗体が産生されることが示され、8 週間の投与後に抗体が全投与薬物を中和する可能性が高いと考えられた。一部の毒性試験では、初回投与後の FE 999049 への曝露は均一であったが、試験終了時には不均一となった。曝露の変動は中和抗体に起因すると思われ、ラットの 4 週間以上の試験では毒性評価を妨げると考えられた。ラット反復投与毒性試験では ADA は検出されなかった。これは予想外であり、検出に用いた分析方法が種特異的な抗体を検出できなかった結果と考えられる。しかし、4 週間試験の休薬期間終了時に採取した試料を別の方法で分析したところ、中間用量（7.31 µg/kg/day）以上で中和抗体が検出された。

原薬に含まれる宿主細胞タンパク質不純物「[redacted]」は、非臨床試験で最大[redacted] ng/µg FSH（[redacted]%）の濃度で確認されている。さらに、宿主細胞タンパク質不純物は、免疫原性の可能性が非常に低いと考えられる。

コンテナ閉鎖系からの抽出物／浸出物、並びに原薬又は製剤中に存在する有機不純物又は分解生成物はいずれも安全性の懸念事項ではなかった。

要約すると、非臨床毒性プログラムでは FE 999049 による全身毒性及びオフターゲット毒性は見られず、予定臨床使用に必要な安全性及び薬力学的プロファイルを持つことが示された。FE 999049 の予定臨床使用範囲での女性への皮下投与では、副作用や局所刺激を誘発することはないと結論した。動物で見られた抗体反応はヒトへの外挿に乏しく、FE 999049 の臨床使用で予想される唯一のリスクは、ホルモンの過剰投与に関連した薬理又は過剰な薬理作用に起因するものである。

レコベル皮下注ペン製剤に含まれる添加剤はいずれも安全性上の懸念はないと考えられ、硫酸ナトリウムの新添加剤としての評価について以下に記載する。

2.6.6.9.1　　新添加物硫酸ナトリウムの毒性

今回、製造販売承認申請を行うレコベル皮下注ペン製剤には添加物として硫酸ナトリウム十水和物が含まれており、硫酸ナトリウムは日本では経口剤の医薬品の添加物として使用実績があるものの（無水和物として一日最大 51.2 mg）（医薬品添加物事典）、レコベル皮下注ペン製剤の投与経路である皮下注を含む注射剤の添加物としての実績はない。一方、硫酸ナトリウムは無機化合物で、化粧品(34)や家庭用洗浄剤(35)の添加剤として使われており、また食品添加剤(36)としても使用されている。さら

に、米国では医薬品の添加物として、硫酸ナトリウム無水和物が眼科用薬として 1.2%まで、吸入剤として 0.03%まで、経口剤として 96 mg、及び静注剤として 1.14%までの使用が認められている(37)。皮下投与における硫酸ナトリウムの安全性評価を文献あるいは公的機関からの報告などの毒性情報に基づき行った。ただし、皮下投与による毒性試験情報は限られていることから、静脈内投与試験情報及び必要に応じて経口投与を含む他の投与経路の毒性試験の情報も参照した。なお、レコベル皮下注ペン製剤の添加剤である硫酸ナトリウムは十水和物（分子量 322.19）であるが、レコベル皮下注ペン製剤は溶液の注射剤であること、またほとんどの試験は無水和物（硫酸ナトリウム、分子量 142.04）として表記されていることから、この申請資料でも特に断りのない場合は試験成績は無水和物の投与量、濃度として表記した。また、GLP 準拠で実施された試験は GLP 試験として表示したが、不明な場合は表示していない。

単回投与毒性試験はマウスの経口及び静脈内投与並びにラットの強制経口投与及び腹腔内投与で検討した。その結果、マウスの経口投与の LD_{50} 値は 5989 mg/kg、静脈内投与の概略の致死量は 50 mg/kg より大、ラットの経口投与の LD_{50} 値は 2000 mg/kg より大、腹腔内投与の LD_{50} 値が 3000～4100 mg/kg であった。死亡動物の症状の詳細は報告されていないが、ラット経口投与試験で観察された鎮静、円背位、及び軽度粗毛はいずれも翌日までに回復し、剖検では変化は認められていない。以上のことから、単回投与時の LD_{50} 値はいずれの投与経路でも 2000 mg/kg より大きく、この用量では重度の毒性は報告されていない。

反復投与毒性試験はラットの強制経口及び混餌投与並びにウサギ経皮投与で検討した。その結果、ラット強制経口投与試験（雄 4 週間、雌約 7 週間投与）で、投薬に関連した毒性は認められず、NOEL は最大投与量の 1000 mg/kg/day であった。また、ラット 4 週間混餌投与試験でも軽度の下痢以外には投薬に関連した毒性は認められず、NOAEL は約 2000 mg/kg/day であった。ラット 27 あるいは 41 週間混餌投与試験でも投薬に関連した毒性は認められず、NOAEL は 320 mg/kg/day であった。これらから、ラットへの経口投与では軽度の下痢以外に毒性は認められず、反復投与毒性は弱いことが示された。ウサギ経皮 91 日間投与試験では、2 mL/kg/day で亜急性皮膚炎の軽度増強が認められ、硫酸ナトリウム溶液は軽度の局所刺激性を有していたが、全身性の毒性は認められなかった。

遺伝毒性試験は、*in vitro* 試験として細菌復帰突然変異試験、マウスリンパ腫 L5178Y 細胞遺伝子突然変異試験、及び CHL 線維芽 V79 細胞染色体異常試験、*in vivo* 試験としてマウス腹腔内投与骨髄小核試験で評価した。いずれの試験も陰性で、硫酸ナトリウムは遺伝毒性の懸念はないと判断された。

がん原性試験は、マウス 26 週間皮下投与がん原性試験と雄ラット 27 あるいは 41 週間反復混餌投与がん原性試験で評価した。いずれの試験でも硫酸ナトリウム投与群の腫瘍発生は背景値の範囲内で、硫酸ナトリウムに発がん性作用はないと判断された。

生殖発生毒性試験は、ラット経口投与受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、マウス皮下投与胚・胎児発生に関する試験、マウス経口投与胚・胎児発生に関する試験、ラット経口投与出生前発生に関する試験、及びマウス飲水投与出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験で評価した。いずれの試験でも親動物、胚・胎児、及び出生児に投薬の影響は認められず、NOEL あるいは NOAEL は各試験の最高用量であった。これらより、硫酸ナトリウムは生殖発生に対する毒性はないと判断された。

局所刺激性試験は、ウサギの急性皮膚刺激性試験及び眼刺激性試験で評価した。皮膚刺激性は陰性であったが、眼には軽度の刺激性が観察された。ウサギ反復経皮投与試験では軽度の皮膚炎が見られた。しかし、硫酸ナトリウム十水和物 14 mg/mL を添加剤として含むレコベル皮下注ペン製剤を皮下投与しても皮膚に刺激性は認められなかった。

その他の毒性試験として、ラット経口投与時の薬物動態試験を行った。投与後、血漿中硫酸ナトリウムは投与 2 時間までに最大値に達し、24 時間までに投与された放射活性の 90%近くが尿中に排泄された。経口投与された硫酸ナトリウムは皮下投与と同様に大部分の薬物が急速に循環血液中に取り込まれた。

2.6.6.9.1.1　経口投与試験を使用することの妥当性

皮下注製剤中の添加物として硫酸ナトリウムの毒性を評価するために、経口投与の毒性試験の成績も使用した。経口投与毒性試験の成績を皮下注製剤の毒性評価に用いる場合はトキシコキネティクスの情報が重要であるが、この申請で用いたラット反復経口投与試験では硫酸ナトリウムのトキシコキネティクスの情報が得られていない。これは、硫酸ナトリウムは内因性の物質であり、投与された非標識体の硫酸ナトリウムとの分離測定を簡易的に行うことは難しいことが理由の 1 つと考えられた。一方、体内動態を検討した標識体を用いたラット薬物動態試験では、経口投与された硫酸ナトリウムの大部分は急速に循環血液中に取り込まれた。これより、硫酸ナトリウムの経口投与試験の毒性結果は、皮下注製剤の毒性評価に適応可能であると考えられた。

2.6.6.9.1.2　投与された硫酸ナトリウムの内因性硫酸ナトリウムへの影響

レコベル皮下注ペン製剤として投与される硫酸ナトリウムと、内因性硫酸ナトリウムの血清中の量的関係を検討する目的で、ヒトでの内因性血清中硫酸ナトリウム濃度を検討した。健康成人の平均血清濃度は硫酸ナトリウム十水和物換算で 132.1 µg/mL であった。レコベル皮下注ペン製剤の一日最大使用量 12 µg 中の硫酸ナトリウムは 11.4 mg であり、体重 60 kg のヒトの循環血液量 60/13 = 4.6 L 中の濃度は 2.48 µg/mL（= 11400 µg/4600 mL）であった。これは内因性硫酸ナトリウム十水和物の約 1/50 であり、レコベル皮下注ペン製剤中の硫酸ナトリウムがヒトの生体内反応に影響を及ぼすことはほとんどないと推測された。

2.6.6.9.1.3　新添加物硫酸ナトリウムの結論

経口投与を含めた硫酸ナトリウムの毒性試験の報告及び毒性試験結果から、反復経口投与したラットの軽度の下痢、並びに経皮投与及び点眼投与のウサギでの局所刺激性が見られたものの、重篤な全身性の毒性は認められなかった。単回投与時の LD_{50} 値はいずれの投与経路でも 2000 mg/kg より大きく、反復投与毒性試験、がん原性試験、及び生殖発生毒性の NOEL あるいは NOAEL はいずれも最大投与量で、遺伝毒性は陰性であった。レコベル皮下注ペン製剤の一日最大使用量 12 µg 中の硫酸ナトリウムは 11.4 mg で、体重 60 kg では 0.19 mg/kg である。上記の毒性試験の成績を考慮すると、レコベル皮下注ペン製剤の添加剤である硫酸ナトリウムは十分な安全域を有し、安全性の懸念はないと考えられた。

2.6.6.10　図表

図表は本文中の適切な場所に記載した。

2.6.6.11　参考文献

(1) U.S. FDA. Review and evaluation of pharmacology/toxicology data. Gonal-F (r-hFSHα; follitropin alpha for injection. NDA #020378. 2000 May 120-129 p. [cited 2019 Oct 30] Available form: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2000/20-378S-006_review.pdf

(2) 岡原国男, 蔵行義雄, 井関元八, 谷口繁, 山田明男. ABS に関する薬理学的研究. 食品衛生学雑誌. 1963; 4 (1): 15-31.

(3) European Chemical Agency (ECHA). Sodium sulphate (CAS # 7757-82-6). Acute Toxicity: oral 001 Key: [cited 2019 Nov 18]. Available from: https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15539/7/3/2

(4) European Chemical Agency (ECHA). Sodium sulphate (CAS # 7757-82-6). Acute Toxicity: other routes: [cited 2019 Nov 18]. Available from: https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15539/7/3/5#

(5) European Chemical Agency (ECHA). Sodium sulphate (CAS # 7757-82-6). Repeated dose toxicity: oral 005 Supporting: [cited 2019 Dec 24]. Available from: https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15539/7/6/2

(6) European Chemical Agency (ECHA). Sodium sulphate (CAS # 7757-82-6). Repeated dose toxicity: oral 001 Key: [cited 2019 Nov 18]. Available from: https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15539/7/6/2

(7) European Chemical Agency (ECHA). Sodium sulphate (CAS # 7757-82-6). Repeated dose toxicity: oral 002 Key: [cited 2019 Nov 18]. Available from: https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15539/7/6/2/?documentUUID=8cd6cef8-a006-49f6-82ec-3ba53dc6765f#

(8) European Chemical Agency (ECHA). Sodium sulphate (CAS # 7757-82-6). Repeated dose toxicity: oral 008 Supporting: [cited 2019 Nov 18]. Available from: https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15539/7/6/2/?documentUUID=10467550-a418-4d14-bcc8-9633aba66ae4

(9) Moinuddin JF, Lee HW. Alimentary, blood and other changes due to feeding manganous sulfate, magnesium sulfate and sodium sulfate. Am J Physiol. 1960 Jul; 199: 77-83.

(10) European Chemical Agency (ECHA). Sodium sulphate (CAS # 7757-82-6). Repeated dose toxicity: oral 003 Key: [cited 2019 Nov 19]. Available from: https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15539/7/6/2/?documentUUID=0722a841-f564-4c78-9240-e8b59faf07eb#

(11) Blunck JM, Crowther CE. Enhancement of azo dye carcinogenesis by dietary sodium sulphate. Eur J Cancer. 1975 Jan; 11(1): 23-31.

(12) European Chemical Agency (ECHA). Sodium sulphate (CAS # 7757-82-6). Repeated dose toxicity: dermal 001 Supporting: [cited 2019 Nov 18]. Available from: https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15539/7/6/4

(13) European Chemical Agency (ECHA). Sodium sulphate (CAS # 7757-82-6). Genetic toxicity: in vitro 001 Key: [cited 2019 Nov 18]. Available from: https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15539/7/7/2

(14) European Chemical Agency (ECHA). Sodium sulphate (CAS # 7757-82-6). Genetic toxicity: in vitro 002 Key: [cited 2019 Nov 18]. Available from: https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15539/7/7/2/?documentUUID=d00f0396-b917-48d4-a59e-6d5bf61f2573

(15) European Chemical Agency (ECHA). Sodium sulphate (CAS # 7757-82-6). Genetic toxicity: in vitro 003 Key: [cited 2019 Nov 18]. Available from: https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15539/7/7/2/?documentUUID=00b4a578-42e2-47fd-a533-6648916cc975

(16) European Chemical Agency (ECHA). Sodium sulphate (CAS # 7757-82-6). Genetic toxicity: in vivo 001 Key: [cited 2019 Nov 27]. Available from: https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15539/7/7/3

(17) Gocke E, King MT, Eckhardt K, Wild D. Mutagenicity of cosmetics ingredients licensed by the European Communities. Mutat Res. 1981 Oct; 90 (2): 91-109.

(18) European Chemical Agency (ECHA). Sodium sulphate (CAS # 7757-82-6). Carcinogenicity 004 Other: [cited 2019 Nov 27]. Available from: https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15539/7/8/?documentUUID=575cc40e-14a1-4788-a147-510eae772ef8

(19) Toth B. Cancer induction by the sulfate form of 4-(hydroxymethyl) benzenediazonium ion of Agaricus bisporus. In Vivo. 1987 Jan-Feb; 1 (1): 39-42.

(20) European Chemical Agency (ECHA). Sodium sulphate (CAS # 7757-82-6). Carcinogenicity 002 Key: [cited 2019 Nov 27]. Available from: https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15539/7/8/?documentUUID=f2bd115c-7af7-47e2-8c69-234928c17a16#

(21) Blunck JM, Crowther CE. Enhancement of azo dye carcinogenesis by dietary sodium sulphate. Eur J Cancer. 1975 Jan; 11(1): 23-31.

(22) European Chemical Agency (ECHA). Sodium sulphate (CAS # 7757-82-6). Toxicity to reproduction 001 Key: [cited 2019 Nov 18]. Available from: https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15539/7/9/2

(23) European Chemical Agency (ECHA). Sodium sulphate (CAS # 7757-82-6). Developmental toxicity / teratogenicity 002 Key: [cited 2019 Nov 27]. Available from: https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15539/7/9/3/?documentUUID=d5cef981-6856-4a3f-8f52-73b49834ddb7

(24) Arcuri AA, Gautieri RF. Morphine-induced fetal malformations III: Possible mechanisms of action. J Pharm Sci. 1973 Oct; 62 (10): 1626-34.

(25) European Chemical Agency (ECHA). Sodium sulphate (CAS # 7757-82-6). Developmental toxicity / teratogenicity 001 Key: [cited 2019 Nov 27]. Available from: https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15539/7/9/3/?documentUUID=218d0b4f-b8e0-4b8a-903d-cf198d693cf6#

(26) Seindenberg JM, Anderson DG, Becker RA. Validation of an in vivo developmental toxicity screen in the mouse. Teratog Carcinog Mutagen. 1986; 6 (5): 361-74.

(27) European Chemical Agency (ECHA). Sodium sulphate (CAS # 7757-82-6). Developmental toxicity / teratogenicity 004 Supporting: [cited 2019 Nov 18]. Available from: https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15539/7/9/3/?documentUUID=48730f00-5e7d-4426-93ef-24d3844ea86e

(28) European Chemical Agency (ECHA). Sodium sulphate (CAS # 7757-82-6). Toxicity to reproduction 004 Other: [cited 2019 Nov 27]. Available from: https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15539/7/9/2/?documentUUID=dc438a0a-4136-43fe-8c39-270f44441bcd

(29) Andres CJ, Cline TR. Influence of sulfate in drinking water on mouse reproduction during two parities. J Anim Sci. 1989 May; 67 (5): 1313-7.

(30) European Chemical Agency (ECHA). Sodium sulphate (CAS # 7757-82-6). Skin irritation / corrosion 001 Key: [cited 2019 Nov 18]. Available from: https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15539/7/4/2

(31) European Chemical Agency (ECHA). Sodium sulphate (CAS # 7757-82-6). Eye irritation 001 Key: [cited 2019 Nov 18]. Available from: https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15539/7/4/3

(32) Krijgsheld KR, Frankena H, Scholtens E, Zweens J, Mulder GJ. Absorption, serum levels and urinary excretion of inorganic sulfate after oral administration of sodium sulfate in the conscious rat. Biochim Biophys Acta. 1979 Sep 3; 586 (3): 492-500.

(33) Morris ME, Levy G. Serum concentration and renal excretion by normal adults of inorganic sulfate after acetaminophen, ascorbic acid, or sodium sulfate. Clin Pharmacol Ther. 1983 Apr; 33 (4): 529-36.

(34) Bergfeld WF, Belsito DV, Hill RA, Klaassen CD, Liebler DC, Marks JG Jr, et al. Final amended safety assessment of sodium sulfate as used in cosmetics: The 2016 Cosmetic Ingredient Review. Washington: 2016 June29 [cited 2019 Nov 18]. Avairable from: https://www.cir-safety.org/sites/default/files/SODSUL062016FR.pdf

(35) Human and Environmental Risk Assessment team. Human and environmental risk assessment on ingredients of household cleaning products. Substance: Sodium sulfate (CAS# 7757-82-6) Edition 1.0: 2006 January [cited 2019 Nov 18]. Avairable from https://www.heraproject.com/files/39-F-06_Sodium_Sulfate_Human_and_Environmental_Risk_Assessment_V2.pdf

(36) World Health Organization. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. WHO food additive series: 44. Sodium Sulfate: [cited 2019 Nov 27]. Avairable from: http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v44jec07.htm

(37) Food and Drug Administration (FDA). Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products: Sodium Sulfate: [updated 2019 October 23; cited 2019 Nov 18]. Available from: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm?event=BasicSearch.page

2.6.7 毒性試験概要表

目次

2.6.7.1 毒性試験：一覧表 3
2.6.7.2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表 4
2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧 5
2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧 7
2.6.7.5 単回投与毒性試験 9
2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 10
2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験 12
2.6.7.8 *In Vitro* 遺伝毒性試験 19
2.6.7.9 *In Vivo* 遺伝毒性試験 20
2.6.7.10 がん原性試験 21
2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 22
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 23
2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 25
2.6.7.14 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 26
2.6.7.15 新生児を用いた試験 27
2.6.7.16 局所刺激性試験 28
2.6.7.17 その他の毒性試験 29

2.6.7.1　毒性試験：一覧表

Test Article: FE 999049

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses[a] IU/kg	Doses[a] µg/kg	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location
Single-Dose Toxicity	Mice, Crl:CD-1(ICR) BR VAF/PLUS	Intravenous	Single dose	4000	290[b]	Yes	[redacted]	ADR0054	[4.2.3.1-1]
	Mice, Crl:CD-1(ICR) BR VAF/PLUS	Subcutaneous	Single dose	4000	290[b]	Yes	[redacted]	ADR0052	[4.2.3.1-2]
	Rats, Crl:WI (Han)	Intravenous	Single dose	4000	290[b]	Yes	[redacted]	ADR0053	[4.2.3.1-3]
	Rats, Crl:WI (Han)	Subcutaneous	Single dose	4000	290[b]	Yes	[redacted]	ADR0051	[4.2.3.1-4]
Repeat-Dose Toxicity	Rats, Crl:WI (Han)	Subcutaneous	2 weeks	0, 20, 200, 2000	0, 1.45, 14.5, 145[b]	Yes	[redacted]	ADR0055	[4.2.3.2-1]
	Rats, Crl:WI (Han)	Subcutaneous	4 weeks + 4 weeks off dose	0, 20, 140, 1000	0, 1.04, 7.31, 52.2[c]	Yes	[redacted]	ADR0060	[4.2.3.2-2]
	Cynomolgus monkeys	Subcutaneous	MTD: Single escalating dose Fixed dose: 7 days	500, 1000, 2000, 4000 4000	36.3, 72.5, 145, 290 290[b]	Yes	[redacted]	1475-099	[4.2.3.2-3]
	Cynomolgus monkeys	Subcutaneous	4 weeks + 4 weeks off dose	0, 10, 100, 1000	0, 0.522, 5.22, 52.2[c]	Yes	[redacted]	1475-101	[4.2.3.2-4]
Genotoxicity	No genotoxicity studies performed								
Carcinogenicity	No carcinogenicity studies performed								
Reproductive and Developmental Toxicity	Rats, Crl:WI (Han)	Subcutaneous	DRF FEED: 2 weeks pre-pairing-Gday 6	M+F: 0, 5, 50, 500	0, 0.363, 3.63, 36.3[b]	Yes	[redacted]	ADR0056	[4.2.3.5.1-1]
	Rats, Crl:WI (Han)	Subcutaneous	FEED: 2 weeks pre-pairing-Gday 6	F only: 0, 5, 16, 50	0, 0.261, 0.835, 2.61[c]	Yes	[redacted]	ADR0061	[4.2.3.5.1-2]
Local Tolerance	Rabbits, New Zealand White	Subcutaneous	Single dose	0.75 mL of 600 IU/mL per site	0.75 mL of 37 µg/mL[d] per site	Yes	[redacted]	70933	[4.2.3.6-1]
Other Toxicity Studies: Neutralising Ab Study	Rats, Sprague-Dawley	Subcutaneous	5 days a week for 8 weeks	F: 0, 2.5, 25, 250 IU/head	0, 0.183, 1.83, 18.3 µg/head[e]	No	Ferring Research Institute	FE 999049 DSPHA 0902	[4.2.3.7.7-1]

[a] Unless otherwise stated. [b] Conversion factor = 0.0725 µg/IU. [c] Conversion factor = 0.0522 µg/IU. [d] Conversion factor = 0.0617 µg/IU. [e] Conversion factor = 0.0732 µg/IU.
The No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) is underlined. DRF = Dose range finding. FEED = Fertility and early embryonic development. Gday = Gestational day.

2.6.7.2　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表

Test Article: FE 999049

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose (µg/kg/day)	GLP Compliance	Study Number	Location
Repeat-Dose Toxicity (14-Day)	Rat	Subcutaneous	0, 1.45, 14.5, 145	Yes	ADR0055	[4.2.3.2-1]
Repeat-Dose Toxicity (4-Week) [a]	Rat	Subcutaneous	0, 1.04, 7.31, 52.2	Yes	ADR0060	[4.2.3.2-2]
MTD study (single escaration dose)	Monkey	Subcutaneous	36.3, 72.5, 145, 290	Yes	1475-099	[4.2.3.2-3]
MTD study (fixed dose, 7-Day)	Monkey	Subcutaneous	290	Yes	1475-099	[4.2.3.2-3]
Repeat-Dose Toxicity (4-Week)	Monkey	Subcutaneous	0, 0.522, 5.22, 52.2	Yes	1475-101	[4.2.3.2-4]
Fertility and Early Embryonic Development [a]	Rat	Subcutaneous	0, 0.363, 3.63, 36.3	Yes	ADR0056	[4.2.3.5.1-1]

a: Trough concentration only.

2.6.7.3　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧

Test Article: FE 999049

$AUC_{0\text{-}24}$ (ng·h/mL)															
Study	Rat 14 days[a]				Monkey MTD[b]		Monkey 7 days[c]				Monkey 4 weeks[d]				Human[e,k]
Measurement day	Day 1		Day 14		Day 1		Day 1		Day 7		Day 1		Day 28		Day1
Number of anilals	M:5	F:5	M:5	F:5	M:1	F:1	M:1	F:1	M:1	F:1	M:3	F:3	M:3	F:3	F:6
Dose (μg/kg)															
0.098															9.14
0.195															23.8
0.297															30.1
0.522											24.2[g]	15.0[g]	65.3[h]	53.8	
0.588															72.9
1.45	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ											
5.22											295	218	434	564	
14.5	456.0	145.0	120.4	130.5											
36.3					2211	2342									
52.2											2631[i]	2751[i]	6838	8613[i]	
72.5					3690	4350									
145	2494.0	2494.0	2581.0	1747.3	8555	8845									
290					12615	23925	18053	16675	27405	31030					

a: rat 14 day dose range finding study (ADR0055), b: cynomorgus monkey single asending MTD study (1475-099), c: cynomolgus monkey 14-day repeated dose study (1475-099), d: cynomolgus monkey 4-week repeated dose study (475-101), e: Phase I study in Japanese healthy female volunteer (CS03), g: N = 2, h: N = 1, i: N = 4, k: AUC_t

BLQ = below limit of quantitation; NA = not applicable

C_{max} (ng/mL)															
Study	Rat 14 days[a]				Monkey MTD[b]		Monkey 7 days[c]				Monkey 4 weeks[d]				Human[e]
Measurement day	Day 1		Day 14		Day 1		Day 1		Day 7		Day 1		Day 28		Day1
Number of anilals	M:5	F:5	M:5	F:5	M:1	F:1	M:1	F:1	M:1	F:1	M:3	F:3	M:3	F:3	F:6
Dose (μg/kg)															
0.098															0.209
0.195															0.418
0.297															0.496
0.522											1.36	1.04	2.95[h]	2.91	
0.588															1.13
1.45	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ											
5.22											18.0	12.2	21.5	30.6	
14.5	46.3	9.3	7.8	9.3											
36.3					136	131									
52.2											144[i]	173[i]	344	480[i]	
72.5					223	225									
145	165.3	175.5	222.6	169.7	529	474									
290					724	1849	1030	899	1617	1573					

a: rat 14 day dose range finding study (ADR0055), b: cynomorgus monkey single asending MTD study (1475-099), c: cynomolgus monkey 14-day repeated dose study (1475-099), d: cynomolgus monkey 4-week repeated dose study (475-101), e: Phase I study in Japanese healthy female volunteer (CS03), h: N = 1, i: N = 4, BLQ = below limit of quantitation; NA = not applicable

2.6.7.4　毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧

Test Article: FE 999049

Batch No.	Specific Activity (IU/mg protein)	Biological Activity (IU/mL)	Specified Impurities (%)		Test Facility Study Number	Type of Study
			Oxidised forms	Aggregates[#]		
Tox Batch 1: 1178-160 [3.2.S.4.4 Table 2]	13785	5404	1.1	0.13	[redacted] [ADR0054]	Single dose toxicity study in mice by intravenous administration
					[redacted] [ADR0052]	Single dose toxicity study in mice by subcutaneous administration
					[redacted] [ADR0053]	Single dose toxicity study in rats by intravenous administration
					[redacted] [ADR0051]	Single dose toxicity study in rats by subcutaneous administration
					[redacted] [ADR0055]	2-week dose range finding study in rats by subcutaneous administration
					[redacted] [ADR0056]	Subcutaneous fertility and early embryonic developmental toxicity range finding study in the rat
					[redacted] [1475-099]	Maximum tolerated dose study in cynomolgus monkeys by subcutaneous administration
Tox Batch 2: 2192-122 [3.2.P.5.4 Table 3]	19163	5404	1	0.02	[redacted] [ADR0060]	4-week repeated dose toxicity study in rats by subcutaneous administration
					[redacted] [1475-101]	4-week repeated dose toxicity study in cynomolgus monkeys by subcutaneous administration
					[redacted] [ADR0061]	Subcutaneous female fertility and early embryonic developmental toxicity study in the rat
					[redacted] [ZNA 16669.001]	Cardiovascular effects in cynomolgus monkeys by subcutaneous administration
					[redacted] [ZNA 16669.002]	hERG tail current study

Batch No.	Specific Activity (IU/mg protein)	Biological Activity (IU/mL)	Specified Impurities (%)		Test Facility Study Number	Type of Study
			Oxidised forms	Aggregates[#]		
					[redacted] [ZNA 16669.003]	Irwin test in rats by single dose, subcutaneous administration
					[redacted] [ZNA 16669.004]	Respiration and tidal volume in rats by single dose, subcutaneous administration
Batch: 09D20-01	16235	600	2.1	ND	[redacted] [70933]	Local tolerance study in rabbits (5 different formulations tested)
Batch: 09D20-02	16235	600	2.2	ND	[redacted] [70933]	Local tolerance study in rabbits (5 different formulations tested)
Batch: 09D20-03	16235	600	2.2	ND	[redacted] [70933]	Local tolerance study in rabbits (5 different formulations tested)
Batch: 09D20-06	16235	600	2.4	ND	[redacted] [70933]	Local tolerance study in rabbits (5 different formulations tested)
Batch: 09D20-07	16235	600	2.2	ND	[redacted] [70933]	Local tolerance study in rabbits (5 different formulations tested)
Batch: 7PD-210-011	~13670	13123	2.9	NP	Ferring Research Institute [FE 999049 DSPHA 0902]	Neutralising antibody formation in rats following repeated dosing for 8 weeks by subcutaneous administration

ND = Not detected. NP = Not performed

[#]Aggregates = High Molecular Weight (HMW) forms; at the time of testing the method for separation between Low Molecular Weight (LMW) forms and HMW forms was not yet developed

2.6.7.5　単回投与毒性試験

Test Article: FE 999049

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Doses (µg/kg)	No. and Gender per Group	Observed Maximum Nonlethal Dose (µg/kg)	Anticipated Lethal Dose (µg/kg)	Noteworthy Findings	Study Number
Mice/Crl:CD-1(ICR) BR VAF/PLUS	Intravenous [a]	290	5M+5F	290	>290	None. The anticipated lethal dose was 290 µg/kg.	[ADR0054]
Mice/Crl:CD-1(ICR) BR VAF/PLUS	Subcutaneous [a]	290	5M+5F	290	>290	None. The anticipated lethal dose was 290 µg/kg.	[ADR0052]
Rats/Crl:WI (Han)	Intravenous [a]	290	5M+5F	290	>290	None. The anticipated lethal dose was 290 µg/kg.	[ADR0053]
Rats/Crl:WI (Han)	Subcutaneous [a]	290	5M+5F	290	>290	None. The anticipated lethal dose was 290 µg/kg.	[ADR0051]

[a] The vehicle was 10 mM sodium citrate buffer, pH 6.5

2.6.7.6　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

Test Article: FE 999049

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (µg/kg/day)	No. and Gender per Group	NOAEL[a] (µg/kg/day)	Noteworthy Findings	Study Number
Rat/Crl:WI (Han)	Subcutaneous (10 mM sodium citrate buffer, pH 6.5)	2 weeks	0 (vehicle controls), 1.45, 14.5, 145	5M+5F Satellites for TK and ADA: 12M+12F (3M+3F in control group)	145	Day 1 exposure in terms of $AUC_{0\text{-}24}$ in µg·h/mL: across male groups: 0, 0, 456.0, 2494.0; across female groups: 0, 0, 145.0, 2494.0. Day 14 exposures across male groups: 0, 0, 120.4, 2581.0; across female groups: 0, 0, 130.5, 1747.3. Subcutaneous doses of up to and including 145 µg/kg/day were well tolerated and did not affect mortality, body weight, body weight gain, food consumption or clinical observations in rats. Ovary weight increased dose dependently across all treated groups. This was reflected in the macroscopic observation of large ovaries in all treated females and in microscopic observations of follicular cysts and prominent corpora lutea in most treated females, but not in controls. In addition, histopathology revealed mammary feminisation in most treated males and increased acinar proliferation in mid and high dose females. Inhibin B levels were increased in mid and high dose males and in females. All effects were ascribed to FSH-related pharmacology or exaggerated pharmacology effects of FE 999049. No ADA formation could be detected 5 days after the end of dosing.	[ADR0055]

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (µg/kg/day)	No. and Gender per Group	NOAEL[a] (µg/kg/day)	Noteworthy Findings	Study Number
Cynomolgus monkeys	Subcutaneous (10 mM sodium citrate buffer, pH 6.5)	MTD: single escalating doses on Days 1, 5, 9, and 15	36.3, 72.5, 145, 290	1M+1F	290	Exposure in terms of $AUC_{0\text{-}24}$ in µg·h/mL during dose escalation in 1 male and 1 female, respectively: 36.3 µg/kg: 2.211 (M), 2.342 (F); 72.5 µg/kg: 3.690 (M), 4.350 (F); 145 µg/kg: 8.555 (M), 8.845 (F); 290 µg/kg: 12.615 (M), 23.93 (F). Exposure Day 1 of the fixed dose phase in 1 new male and female: $AUC_{0\text{-}24}$ in µg·h/mL: 18.05 (M) and 16.68 (F). The corresponding figures for Day 7 were: 27.41 (M) and 31.03 (F). A strong ADA response was observed at the end of the dose escalation phase. No ADA measurement was made at the end of the fixed dose phase. There was no adverse reaction to treatment with respect to mortality, clinical observations, body weight, haematology, blood chemistry, urinalyses and organ weight. However, there was an increase in ovary weight, which was accompanied by macroscopic enlargement and microscopic cystic dilation of follicles. During dose escalation, Inhibin B levels increased approximately 2 fold in males and 6 fold in females with a slight increase in estrogen in the latter sex. In the fixed dose phase, Inhibin B was increased approximately 2.5 fold in males and 10 fold in females. In the latter sex, a 4 fold increase in progesterone level and 13 fold increase in estrogen level were observed. All these observations were ascribed to the pharmacological effect of the compound.	[1475-099]
		Fixed dose: 7 days	290	1M+1F			

a: No Observed Adverse Effect Level. TK: Toxicokinetics. ADA: anti-drug antibody. MTD: Maximum tolerated dose

2.6.7.7　反復投与毒性試験：重要な試験

2.6.7.7.1　Report Title: Four Week Subcutaneous Toxicity Study in the Rat with a Four Week Treatment-Free period

Test Article: FE 999049

Species/Strain:	Rat/Crl:WI (Han)	**Duration of Dosing:**	4 weeks	**Study No.:**	[redacted] ADR0060
Initial Age:	5-6 weeks	**Duration of Postdose:**	4 weeks	**Location in CTD**	[4.2.3.2-2]
Date of First Dose:	15[redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:**	Subcutaneous injection	**GLP Compliance:**	Yes
Special Features:	None	**Vehicle/Formulation:**	10 mM sodium citrate buffer pH 6.5		
No Observed Adverse Effect Level:	52.2 µg/kg/day				

Daily Dose (µg/kg)	**0 (Control)**		**1.04**		**7.31**		**52.2**	
Number of Animals	**10M**	**10F**	**10M**	**10F**	**10M**	**10F**	**10M**	**10F**
Toxicokinetics[a]: ng/mL Week 1	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	1.38	1.77	15.5	10.1
Toxicokinetics[a]: ng/mL Week 2	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	2.55	1.96	23.2	17.5
Toxicokinetics[a]: ng/mL Week 3	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	1.64	12.8	11.9	8.56
Toxicokinetics[a]: ng/mL Week 4	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	3.37	BLQ	30.4	37.6
Toxicokinetics[a]: ng/mL Week 8, End of recovery	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	1[1]	0	0	0	0
Body Weight Gain Day 8-29 (%[b])	53.7	26.8	94	118	101	106	115	145*
Food Consumption Day 8-29 (%[b])	23.4	17.1	103	106	103	111	109*	117*
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology (Week 4)								
Red blood cell Count (10^6 cells/µl)	8.49	8.09	8.39	8.11	8.66	7.79	8.37	7.47**

Daily Dose (µg/kg)	**0 (Control)**		**1.04**		**7.31**		**52.2**	
Haemoglobin (g/dl)	15.5	14.6	15.8	14.9	15.9	14.3	15.5	13.9**
Number of Animals	**10M**	**10F**	**10M**	**10F**	**10M**	**10F**	**10M**	**10F**
Packed Cell Volume (%)	44.6	42.9	45.4	43.0	46.5	41.2*	44.1	40.3**
APTT (seconds)	17.7	19.4	19.5	20.1	18.8	18.0	15.9	15.9**
Serum Chemistry (Week 4)								
Glucose (mg/dl)	177	173	202*	185	238***	181	211***	185
Alkaline Phosphatase (U/l)	154	93	152	102	162	96	139	73*
Alanine aminotransferase (U/l)	34	30	41	40*	40	38*	39	42**
Urinalysis (Week 4)	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights[c] (%)								
Pituitary (g)	0.008	0.010	113	100	100	100	113	120*
Adrenals (g)	0.065	0.076	97	103	111	101	109	120*
Testes/Ovary (g)	3.48	0.091	100	255**	102	285**	110**	241**
Gross Pathology								
Ovary (-ies) increased size	ND	2/10	ND	10/10	ND	10/10	ND	10/10
Ovarian cyst	ND	0/10	ND	1/10	ND	3/10	ND	4/10
Histopathology								
Ovarian follicular cysts	ND	0/10	ND	10/10	ND	9/10	ND	7/10
Number of corpora lutea increased	ND	3/10	ND	9/10	ND	8/10	ND	4/10
Prominent corpora lutea	ND	0/10	ND	2/10	ND	2/10	ND	3/10
Ovarian follicular haemorrhage	ND	0/10	ND	1/10	ND	0/10	ND	4/10
Vaginal epithelial mucification	ND	0/10	ND	6/10	ND	4/10	ND	3/10
Cervical epithelial mucification	ND	0/10	ND	5/10	ND	4/10	ND	2/10
Uterine epithelial hypertrophy	ND	0/10	ND	0/10	ND	3/10	ND	2/10
Moderate mammary acinar proliferation	ND	0/10	ND	0/10	ND	1/10	ND	3/10
Additional Examinations								
Oestradiol (nmol/L)[d]	<0.040	<0.060	<0.040	<0.242	<0.040	<0.040	<0.040	<0.090
Inhibin B (pg/mL) [d]	127.9	135.3	<114.9	1885.7***	<131.6	<2594.3***	143.8	<2110.4***
Antibody formation[e]	-	-	-	-	-	-	-	-

Daily Dose (µg/kg)	0 (Control)		1.04		7.31		52.2	
Recovery Evaluation: Number Evaluated	**5M**	**5F**	**0M**	**0F**	**0M**	**0F**	**5M**	**5F**
Body Weight Gain Day 29-57 (%[a])	40.8	17.4	ND	ND	ND	ND	106	20
Food Consumption Day 29-57 (%[a])	22.0	17.3	ND	ND	ND	ND	106	101
Hematology								
Red blood cell Count (10^6 cells/µl)	8.91	8.15	ND	ND	ND	ND	8.81	8.01
Haemoglobin (g/dl)	16.6	16.2	ND	ND	ND	ND	16.3	15.2†
Packed Cell Volume (%)	46.3	43.4	ND	ND	ND	ND	44.8	41.0
APTT (seconds)	20.1	19.9	ND	ND	ND	ND	16.4††	14.9†††
Serum Chemistry								
Glucose (mg/dl)	158	151	ND	ND	ND	ND	239††	188†
Alkaline Phosphatase (U/l)	127	75	ND	ND	ND	ND	115	61
Alanine aminotransferase (U/l)	51	30	ND	ND	ND	ND	34	32
Organ Weights[b]								
Pituitary (g/%)	0.008	0.011	ND	ND	ND	ND	125	118†
Adrenals (g/%)	0.066	0.072	ND	ND	ND	ND	91	101
Testes/Ovary (g/%)	3.57	0.082	ND	ND	ND	ND	108	182†
Gross Pathology								
Ovary (-ies) increased size	ND	0/5	ND	ND	ND	ND	ND	4/5
Ovarian cyst	ND	0/5	ND	ND	ND	ND	ND	0/5
Histopathology (Preliminary Data)								
Ovarian follicular cysts	ND	0/5	ND	ND	ND	ND	ND	0/5
Increased number of corpora lutea	ND	0/5	ND	ND	ND	ND	ND	1/5
Prominent corpora lutea	ND	0/5	ND	ND	ND	ND	ND	4/5
Ovarian follicular haemorrhage	ND	0/5	ND	ND	ND	ND	ND	2/5
Vaginal epithelial mucification	ND	0/5	ND	ND	ND	ND	ND	0/5
Cervical epithelial mucification	ND	0/5	ND	ND	ND	ND	ND	0/5
Uterine epithelial hypertrophy	ND	0/5	ND	ND	ND	ND	ND	0/5
Mammary acinar proliferation	ND	0/5	ND	ND	ND	ND	ND	0/5

Daily Dose (µg/kg)	**0 (Control)**		**1.04**		**7.31**		**52.2**	
Recovery Evaluation: Number Evaluated	**5M**	**5F**	**0M**	**0F**	**0M**	**0F**	**5M**	**5F**
Additional Examinations								
Oestradiol (nmol/L)[d]	<0.040	<0.100	ND	ND	ND	ND	<0.040	<0.041
Inhibin B (pg/mL)[d]	147.2	150.1	ND	ND	ND	ND	137.1	<123.9
Antibody formation[e]	-	-	-	-	-	-	-	-
NAb formation, average potency shift[f]	-	-	1.0	2.2	2.0	20.9	29.8	10.7

BLQ: Below limit of quantitation - No noteworthy findings ND: Not done

[1] One female at 1.04 µg/kg/day died on Day28 under anaesthesia during blood sampling for clinical laboratoury investigatin. Not treatment related

* - p<0.05, ** - p<0.01, *** - p<0.001 (Williams' test for parametric, Shirley's for non-parametric), † - p<0.05, †† - p<0.01, ††† - p<0.001 (Student's t-test for marametric, Wilcoxon's Rank Sum test for non-parametric)

[a] Blood samples for toxicokinetic assessment were taken at approximately 24 hours post-dose, on one occasion at the start of each week during the 4 week treatment period and towards the end of the treatment-free period (Week 8). For the toxicokinetic evaluations there were 6 males and 6 females in the main study and 6 males and 6 females for recovery.

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

[c] Both absolute and relative weights differed from controls in the direction indicated. Number indicates percent difference for the absolute organ weights in the control group.

[d] < Mean includes individual values below lower limit of quantification (LLOQ). For the purposes of calculating the mean, these values have been taken as LLOQ values.

[e] The analysis could not detect anti-drug antibodies in samples taken week 2 and 4 of the treatment period and at the end of the 4-week recovery period

[f] Cell based analysis of neutralising antibodies using samples drawn at the end of the 4-week recovery period in 6 males and 6 females

2.6.7.7.2 Report Title: 4 Week subcutaneous Administration in the Cynomolgus Monkey with a 4 Week Treatment Free Period

Test Article: FE 999049

Species/Strain:	Cynomolgus monkeys of Mauritian origin	**Duration of Dosing:**	4 weeks	**Study No.:**	[redacted] 1475-101
Initial Age:	>3 years	**Duration of Postdose:**	4 weeks	**Location in CTD**	[4.2.3.2-4]
Date of First Dose:	07 [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:**	Subcutaneous injection	**GLP Compliance:**	Yes
Special Features:	Hormone analyses	**Vehicle/Formulation:**	10 mM sodium citrate buffer pH 6.5		
No Observed Adverse Effect Level:	52.2 µg/kg/day				

Daily Dose (µg/kg)	**0 (Control)**		**0.522**		**5.22**		**52.2**	
Number of Animals	**3M**	**3F**	**3M**	**3F**	**3M**	**3F**	**3M**	**3F**
Toxicokinetics[a]:								
C_{max} Day 1, ng/mL	-	-	1.36	1.04	18.0	12.2	144	173
T_{max} Day 1, hours	-	-	4	4	4	4	8	4
AUC_{0-24} Day 1, ng·h/mL	-	-	24.2	15.0	295	218	2631	2751
C_{max} Day 28, ng/mL	-	-	2.95	2.91	21.5	30.6	344	480
T_{max} Day 28, hours	-	-	4	8	4	2	8	6
AUC_{0-24} Day 28, ng·h/mL	-	-	65.3	53.8	434	564	6838	8613
Anti-FE 999049 antibody formation								
Mean (Δ=(Day 28-Day 1), OD	0.038	0.104	1.599	0.093	2.442	2.706	2.598	2.621
Range (Δ=Day 28-Day 1), OD	0.007 - 0.079	0.001 - 0.285	0.041 - 3.555	0.013 - 0.230	0.394 - 3.577	1.171 - 3.699	2.301 - 3.325	1.645 - 3.442
Δ=(Day 56-Day1), OD	-0.057	-0.063	ND	ND	ND	ND	3.054	0.045
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight Day 28 (kg, %[b])	6.0	3.6	95	83	127	89	100	92

Daily Dose (µg/kg)	**0 (Control)**		**0.522**		**5.22**		**52.2**	
Number of Animals	**3M**	**3F**	**3M**	**3F**	**3M**	**3F**	**3M**	**3F**
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights[c] (%)								
Testes/Ovary (g)	34.411	0.489	140	816	182	880	132	401
Spleen (g)	-	7.767	-	62	-	64	-	64
Gross Pathology								
Oviduct large	ND	0/3	ND	1/3	ND	0/3	ND	2/3
Ovarian cyst	ND	0/3	ND	1/3	ND	0/3	ND	0/3
Ovaries large	ND	0/3	ND	3/3	ND	3/3	ND	3/3
Histopathology								
Injection site: subacute inflammation	0/3	0/3	2/3	0/3	2/3	3/3	2/3	2/3
Injection site: acute inflammation	-	0/3	-	0/3	-	0/3	-	1/3
Oviduct: dilation of lumen	ND	0/1	ND	1/1	ND	0/0	ND	2/2
Ovarian cystic follicles	ND	0/3	ND	3/3	ND	3/3	ND	3/3
Ovarian follicular haemorrhage	ND	0/3	ND	1/3	ND	3/3	ND	2/3
Parovarian cyst	ND	0/3	ND	1/3	ND	0/3	ND	0/3
Pituitary hyperplasia/hypertrophy	-	0/3	-	1/3	-	1/3	-	2/3
Uterus/cervix: Cyst/hyalinisation	ND	0/3	ND	1/3	ND	1/3	ND	0/3
Additional Examinations: Hormones								
Luteinising hormone (IU/L) Δ	-	170	-	-7	-	-2	-	-20
Inhibin B (pg/mL) Δ	-258	-87	1661	811	1303	Missing	1953	710
17-β Oestradiol (pmol/L) Δ	-	284	-	1021	-	2446	-	1446
Frequency of antibody positives	0/4	0/4	2/3	0/3	2/3	3/3	4/4	3/4

Daily Dose (µg/kg)	**0 (Control)**		**0.522**		**5.22**		**52.2**	
Number of Animals	**3M**	**3F**	**3M**	**3F**	**3M**	**3F**	**3M**	**3F**
Anti-FE 999049 antibodies, µg/mL	0	8	167	6	153	284	5885	401
Postdose Evaluation: Number Evaluated	**1M**	**1F**	**0M**	**0F**	**0M**	**0F**	**1M**	**1F**
Organ Weights[c] (%)								
Testes/Ovary (g)	31.642	0.339	ND	ND	ND	ND	124	118
Spleen (g)	-	6.272	ND	ND	ND	ND	-	89
Gross Pathology	-	-	ND	ND	ND	ND	-	-
Histopathology								
Uterus/cervix: Sequels of cyclic disturbances	-	0/1	ND	ND	ND	ND	-	1/1
All other tissues: NAD	-	1/1	ND	ND	ND	ND	-	1/1
Additional Examinations: Hormones			ND	ND	ND	ND		
Luteinising hormone (IU/L) Δ	-	-6.8	ND	ND	ND	ND	-	-20.9
Inhibin B (pg/mL) Δ	-140	-212	ND	ND	ND	ND	-151	-204
17-β Oestradiol (pmol/L) Δ	-	11	ND	ND	ND	ND	-	-42
Frequency of antibody positives	0/1	0/1	ND	ND	ND	ND	1/1	0/1
Anti-FE 999049 antibodies, µg/mL	0	0	ND	ND	ND	ND	492	0

- No noteworthy findings. ND: Not done. Δ: Change from pre-dose. NAD: No abnormality detected.

[a] Blood samples for toxicokinetic assessment were taken at pre-dose and 1, 2, 4, 8, 12, and 24 hours after dosing on Day 1 and pre-dose and 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 96, and 144 hours after dosing on Day 28

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

[c] Both absolute and relative weights differed from controls in the direction indicated. Number indicates percent difference for the absolute organ weights.

2.6.7.8　*In Vitro* 遺伝毒性試験

該当する試験なし

2.6.7.9　*In Vivo* 遺伝毒性試験

該当する試験なし

2.6.7.10　　がん原性試験

該当する試験なし

2.6.7.11　生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

Test Article: FE 999049

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Dosing Period	Doses (µg/kg)	No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Rats/Crl:WI (Han)	Subcutaneous injection	2 weeks pre-pairing till Gestational Day 6	0, 0.363, 3.63, 36.3	6M+6F Satellites for toxicokinetics: 4F	In satellite females, exposure in terms of mean trough values on day 14 of the pre-pairing period was (range in parentheses): 0 µg/kg: 0 (0); 0.363 µg/kg: 0 (0); 3.63 µg/kg: 0.305 (0-1.22); 36.3 µg/kg: 6.67 (0-9.43) ng/mL. On Day 6 of gestation the corresponding values were 0 (0); 2.25 (0-8.99); 0 (0); 10.1 (0-13.7) ng/mL. Satellite males remained untreated. Treatment with 36.3 µg/kg/day of FE 999049 affected the cyclicity by causing persistent dioestrus in 2 out of 6 main study females. This resulted in a reduced number of oestrous cycles. There was a dose-related increase in the group mean number of corpora lutea. The group mean number of implantations was increased at 36.3 µg/kg/day. Group mean pre-implantation loss was increased at 3.63 and 36.3 µg/kg/day. The mean number of live embryos was increased at 3.63 µg/kg/day. The group mean absolute and body weight-related testes weight was increased at 36.3 µg/kg/day; the sperm concentration was marginally decreased and the number of sperm with reduced hook was marginally increased in this dose group. All effects were considered pharmacological or exaggerated pharmacological FSH effects. For the subsequent main study, 2.61 µg/kg/day was recommended as the high dose level. There were no adverse effects at 0.363 µg/kg/day. No anti FE 999049 antibodies were detected.	[ADR0056]

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

Report Title: Subcutaneous Female Fertility and Early Embryonic Developmental Toxicity Study in the Rat

Test Article: FE 999049

Design similar to ICH S5	Yes	**Duration of Dosing:**	M: Not dosed F: 14 days pre-pairing until Gestational Day 6	[redacted] **Study No.:**	ADR0061
Species/Strain:	Rats/Crl:WI(Han)	**Day of Mating:**	F**:** Gestational Day 0	**Location in CTD**	[4.2.3.5.1-2]
Initial Age:	F**:** ca. 8 weeks	**Day of C-Section:**	Gestational Day 13	**GLP Compliance:**	Yes
Date of First Dose:	27 [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:**	Subcutaneuos injection		
Special Features:		**Vehicle/Formulation:**	Sodium citrate buffer, pH 6.5		
No Observed Adverse Effect Level:					
F_0 Males:	Not Applicable				
F_0 Females:	0.261 µg/kg/day				
F_1 Litters:	0.261 µg/kg/day				

Daily Dose (mg/kg)	**Males were not treated or evaluated**

2.6.7.12 Reproductive and developmental toxicity (continued) **Study No. ADR0061**

Daily Dose (µg/kg)		0 (Control)	0.261	0.835	2.61
Females	Toxicokinetics:	Not performed, see [2.6.7.11]			
	No. Evaluated	20	20	20	20
	No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
	Clinical Observations	-	-	-	-
	Necropsy Observations				
	Large ovaries	0	0	6	8
	Premating Body Weight, pre-pairing day 15 (g, %[a])	199.6	98	101	101
	Premating Body Weight Gain day 1-15 (g, %[a])	23.8	104	116*	123*
	Gestation Body Weight, gestational day 13 (g, %[a])	264.3	97	101	101
	Premating Food Consumption, week 2 pre-pairing (g, %[a])	18.5	99	102	105
	Gestation Food Consumption, gestational day 0-7 (g, %[a])	25	96	104	96
	Gestation Food Consumption, gestational day 7-13 (g, %[a])	26	100	100	104
	Mean No. Estrous Cycles/15 days	1.9	1.7	1.8	1.4
	Mean No. Days Prior to Mating	3.4	3.5	3.8	4.3
	No. of Females Mated	20	20	20	20
	Mean No. of Copulation Plugs	2.0	2.0	1.3	1.4
	No. of Pregnant Females	18	17	13	14
	No. Aborted or with Total Resorption of Litter	1	0	0	0
	Mean No. Corpora Lutea	12.5	14.5*	29.2**	23.4**
	Mean No. Implantations	9.7	11.3	21.0	10.8
	Mean % Preimplantation Loss	25.6	23.2	28.8	51.0*
	Mean No. Live Conceptuses	9.1	10.9	19.2	9.6
	Mean No. Resorptions	12	5	21	16
	No. Dead Conceptuses	0	1	2	0
	Mean % Postimplantation Loss	13.1	2.7	6.6	10.9

- No noteworthy findings.

* - p<0.05 ** - p<0.01 (Williams' test for parametric, Kruskal-Wallis Test and Shirley's for non-parametric)

[a] - At end of premating or gestation period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

2.6.7.13　生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

該当する試験なし

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

該当する試験なし

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

Test Article: FE 999049

Species/ Strain	Method of Administration	Doses (µg/mL)	No. and Gender per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Rabbit/ New Zealand White	Subcutaneous	0.75 mL of 37 µg/mL per site	6 females	Five groups of rabbits were treated with subcutaneous injections of 5 different formulations each containing of 37 µg/mL in the right side of the shaven skin of the back and with saline (negative control) on the left side of the back. On day 2 and 5 after dosing 3 females from each group were killed and necropsied. Macroscopic and microscopic observations of the injection sites were made. It was concluded that single dose subcutaneous injection to female rabbits of 5 different formulations of FE 999049 resulted in no test item related clinical signs, local reactions or any apparent differences in macroscopic and microscopic appearance, 2 and 5 days after administration, when compared to similar injection with saline control.	[70933]

2.6.7.17　その他の毒性試験

Test Article: FE 999049

Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (µg/head)	No. and Gender per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Rat/Sprague-Dawley	Subcutaneous injection	5 days a week for 8 weeks	0, 0.183, 1.83, 18.3	6F	Neutralising antibodies were detected in all treated groups by means of an *in vitro* luciferase method using HEK-293 cells transiently expressing the human FSH receptors. The assay was performed in the presence of serum from FE 999049 treated animals and from untreated controls. The presence of neutralising antibodies in serum was indicated by a decrease in potency of FE 999049. Almost all treated animals (15 out of 18) developed neutralising antibodies between 2 and 4 weeks, irrespective of dose. At the high dose level there was some variability, since 2 out of six rats had formed little or no antibody, while 4 out of 6 showed high antibody levels. Neutralising antibodies continued to be detectable in 15 of 18 animals at week 6 and 8 of the study. From week 4 the potency shift was between 25 and 70 fold across all treated groups.	[FE 999049 DSPHA 0902]