目次

2.6.6 毒性試験の概要文 4
2.6.6.1 まとめ....4
急性毒性 6
反復投与毒性 6
遺伝毒性 7
がん原性 7
生殖発生毒性 7
新生児を用いた試験 8
毒性発現の機序に関する試験....8
その他の毒性 9
2.6.6.2 急性毒性試験....9
2.6.6.3 反復投与毒性試験....9
2.6.6.3.1 マウス 7 日間投与予備試験 9
2.6.6.3.2 マウス 4 週間投与試験 10
2.6.6.3.3 ラット 2 週間投与予備試験（2 週間回復性試験）....10
2.6.6.3.4 ラット 4 週間投与試験（4 週間回復性試験）....11
2.6.6.3.5 ラット 26 週間投与試験（8 週間回復性試験）....12
2.6.6.3.6 有色ラット探索的 26 週間投与試験 13
2.6.6.3.7 カニクイザル 5 日間漸増投与及び 2 週間投与用量設定試験....14
5 日間漸増投与試験....14
2 週間投与用量設定試験....14
2.6.6.3.8 カニクイザル 2 週間投与試験（2 週間回復性試験）....14
2.6.6.3.9 カニクイザル 39 週間投与試験（22 週間回復性試験）....15
2.6.6.4 遺伝毒性試験....17
2.6.6.4.1 細菌を用いる復帰突然変異試験 17
2.6.6.4.2 マウスリンフォーマ細胞を用いる *in vitro* 小核スクリーニング試験 18
2.6.6.4.3 *In vitro* 小核試験（機序解析試験）....18
2.6.6.4.4 ラット小核／コメット試験 19
2.6.6.4.5 ラット反復投与試験における小核誘発性の評価 20
2.6.6.4.6 ラット小核誘発に関する用量反応解析 20
2.6.6.5 がん原性試験....20
2.6.6.5.1 rasH2 マウス 26 週間投与試験....20
2.6.6.6 生殖発生毒性試験....21
2.6.6.6.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 21
2.6.6.6.2 ラット胚・胎児発生に関する試験 21

2.6.6.6.3 ウサギ胚・胎児発生に関する試験 22
2.6.6.6.4 ラット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 23
2.6.6.6.5 新生児を用いた試験 24
2.6.6.6.5.1 幼若ラット反復投与試験（用量設定試験） 24
2.6.6.6.5.2 幼若ラット 4 週間投与試験（8 週間回復性試験） 25
2.6.6.6.5.3 幼若ラット 13 週間投与試験（8 週間回復性試験） 26
2.6.6.7 局所刺激性試験 27
2.6.6.8 毒性発現の機序に関する試験 27
2.6.6.8.1 *In vitro* 眼毒性試験 27
2.6.6.8.2 ヒト／カニクイザル iPSCs への影響 28
2.6.6.8.3 *In vivo* RNA 配列解析 28
2.6.6.9 その他の毒性試験 29
2.6.6.9.1 マウス線維芽細胞株を用いた *in vitro* 光毒性試験 29
2.6.6.9.2 マウス皮膚感作性試験 29
2.6.6.10 考察及び結論 30
2.6.6.10.1 死亡又は状態悪化 31
2.6.6.10.2 標的器官毒性 32
2.6.6.10.2.1 副次的スプライシング標的に対する作用 32
2.6.6.10.2.2 網膜変性 36
2.6.6.10.2.3 その他の所見 38
2.6.6.10.2.4 回復性 39
2.6.6.10.3 遺伝毒性 39
2.6.6.10.4 がん原性 40
2.6.6.10.5 生殖発生毒性 40
2.6.6.10.6 新生児を用いた試験 42
2.6.6.10.7 毒性発現の機序に関する試験 43
2.6.6.10.8 その他の毒性 43
2.6.6.10.9 結論 44
2.6.6.11 図表 44
2.6.6.12 参考文献 44

表一覧

表 2.6.6.1-1 リスジプラムの主要な毒性試験一覧 5
表 2.6.6.10-1 主要な反復投与毒性試験におけるリスジプラム（未変化体）の曝露量 31
表 2.6.6.10.3-1 ラット小核試験の NOEL におけるリスジプラムの曝露量 40
表 2.6.6.10.5-1 主要な生殖発生毒性試験におけるリスジプラムの曝露量 41
表 2.6.6.10.6-1 ラット及びカニクイザルの MTD／LOAEL におけるリスジプラムの非結合型曝露量 43

略語一覧

略語	英名	和名
APLP2	Amyloid beta precursor-like protein 2	–
AUC	Area under the concentration-time curve	濃度–時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}24h}$	Area under the concentration-time curve from time 0 to 24 hours	0～24時間までの濃度–時間曲線下面積
BMDL	The lower 90% confidence interval of the benchmark dose	ベンチマークドーズの90%信頼区間の下限値
C_{max}	Maximum concentration	最高濃度
COX	Cyclooxygenase	シクロオキシゲナーゼ
DDR	DNA damage response	DNA 傷害性反応
ERG	Electroretinogram	網膜電図
FAF	Fundus autofluorescence	眼底自発蛍光
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
FOXM1	Forkhead box protein M1	–
GD	Gestation day	妊娠日数
GFAP	Glial fibrillary acidic protein	グリア線維性酸性蛋白質
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
IC_{50}	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
iPSCs	Induced pluripotent stem cells	人工多能性幹細胞
LLNA	Local lymph node assay	局所リンパ節試験
LOAEL	Lowest observed adverse effect level	最小毒性用量
MADD	MAP kinase activating death domain	–
MMD	Microcystic macular degeneration	小嚢胞性黄斑変性
MTD	Maximum tolerated dose	最大耐量
NOAEL	No observed adverse effect level	無毒性量
NOEL	No observed effect level	無影響量
NOGEL	No observed genotoxic effect level	遺伝毒性の無影響量
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase	ポリ(ADP–リボース)ポリメラーゼ
RPE	Retinal pigment epithelium	網膜色素上皮
SD-OCT	Spectral domain-optical coherence tomography	スペクトラルドメイン光干渉断層法
SMA	Spinal muscular atrophy	脊髄性筋萎縮症
SMN	Survival of motor neuron	–
SRSF6	Splicing factor, arginine/serine-rich 6	–
STRN3	Striatin, calmodulin binding protein 3	–
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
VEP	Visual evoked potentials	視覚誘発電位

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6.1 まとめ

リスジプラム（以下，リスジプラム又は本薬）は，遺伝性疾患である脊髄性筋萎縮症（SMA）において，*SMN2*遺伝子のエクソン7を組み込ませるため，mRNA スプライシングを修飾する。リスジプラムの薬理学的標的はヒトのみに存在する *SMN2*遺伝子であるため，毒性試験で通常用いられる動物種はリスジプラムの薬理学的活性に対して反応性を有さない。ヒト *SMN2*遺伝子のトランスジェニック動物については，多数の動物を入手できないこと，本モデル動物の取り扱い及び実験操作が困難であり，生理学的及び病理学的特徴についても十分な背景データが存在しないことから，リスジプラムの毒性試験において，本モデル動物を使用することは適切でないと考えられた。このことから，動物を用いた毒性試験データの妥当性については，主に動物及びヒトにおいて生じる本薬の副次的な mRNA スプライシング標的に対して生じる変化に基づき判断した。具体的には，本薬及び別の *SMN2*スプライシング修飾薬において，mRNA 中に多数の副次的スプライシング標的が確認されている[1) –4)] が，本薬についての SMA 患者由来線維芽細胞，ヒト及びカニクイザルの誘導幹細胞，並びにカニクイザル脾臓組織を用いた検討において，副次的標的遺伝子のスプライシングにそれぞれ類似した変化が認められたことから，カニクイザルがヒトにリスジプラムを投与した際の安全性を外挿する上で，最も適切な動物種と考えられた。その他，本薬の安全性を評価するための動物種として，マウス，ラット及びウサギを使用した。

リスジプラムの主要な毒性試験及び安全性薬理試験は，医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイドラインに準拠し，米国食品医薬品局（FDA）の GLP 規制（21 CFR Part 58）又は経済協力開発機構（OECD）の GLP 原則[C(97)186/最終]を遵守し，OECD のデータ相互受入制度のメンバー国において実施した。追加の補足的な毒性，薬理及び薬物動態試験については，科学的かつ綿密な非 GLP 試験として実施した。また，一部の試験については OECD テストガイドラインも考慮して実施した。

リスジプラムの臨床投与経路は経口であることから，反復投与毒性試験を含む主要な毒性試験は，本薬を1日1回強制経口投与することにより実施した。*In vivo* 試験の対照群には，溶媒（10 mmol/L アスコルビン酸/0.01又は0.0064 mg/mL チオ硫酸ナトリウム，pH 3）を投与した。反復投与毒性試験は，ラットでは最長26週間，カニクイザルでは最長39週間までの投与期間で実施した。その他，有色ラットを用いた探索的26週間投与試験を実施したが，この試験は，カニクイザルにおいて網膜変性の所見が認められたことから，有色ラットにおける網膜への影響の可能性について検討することを目的とした。マウスを用いた反復投与毒性試験については，rasH2トランスジェニックマウスを用いたがん原性試験の用量設定のため，同系の野生型マウスを用いて4週間までの投与期間で実施した。また，本薬は SMA の長期治療薬として開発中であり，SMA の最も重症の病型は，出生後直ちに発症することから，反復投与毒性は，成獣に加えて幼若動物を用いた評価も必要と考えられた。このことから，生後4日目以降の幼若ラットを用いた13週間までの反復投与試験も実施した。これらの試験では，幼若動物の重要な器官系の発達に特化した評価も行った。更に，カニクイザルを用いた39週間投与試験は投与開始時2歳齢の若齢動物（39週間の投与期間終了時及び22週間の休薬期間終了後に依然として性成熟前又は性成熟前後）を用いて実施した。

遺伝毒性については，標準的な *in vitro* 及び *in vivo* 試験に加えて，本薬投与により認められた小核誘発に関する機序を解明するための試験を行った。がん原性については，rasH2トランジェニックマウスを用いた26週間投与試験を実施した。なお，本薬は生命を脅かす重篤な疾患に対する治療薬であることから，ICH M3(R2)（平成22年2月19日 薬食審査発0219第4号「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）及び ICH S1C(R2)（平成20年11月27日 薬食審査発第1127001号 医薬品のがん原性試験に関するガイドラインの改正について）を考慮し，ラットを用いた2年間投与によるがん原性試験は本薬の承認申請後に開始し，当該試験成績を本薬の製造販売承認後に提出予定である。

生殖発生毒性については，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に関する試験において評価した。また，雌雄生殖器官に対する影響（受胎能を含む）について，ラット及びカニクイザル（幼若動物を含む）を用いた反復投与毒性試験において評価した。

リスジプラムは紫外線領域に吸収がみられることから，光毒性について *in vitro* での検討を行った。また，マウスを用いた皮膚感作性試験（刺激性の評価を含む）も実施した。

リスジプラムのヒト主要代謝物である N-水酸化体 M1（RO7112063）については，*in vivo* において不安定であり，開発初期においてバリデートされた測定法が使用できなかったため，ラット及びカニクイザルを用いた主要な毒性試験における代謝物 M1の曝露評価はできなかった。その後，代謝物 M1の測定法をバリデートし，毒性試験におけるラット，ウサギ及びカニクイザルの NOAEL での血漿中 M1曝露量とヒト臨床用量での M1曝露量とを比較した結果，1種類の動物種（ラット）でヒト曝露量の1/2を超えていることを確認した（2.6.4.3.3）。代謝物 M1については，*SMN2*に対するスプライシング修飾作用を有さず（2.6.2.2.1.3），副次的スプライシング標的，各種受容体及びイオンチャネルに対するオフターゲット作用の評価において，代謝物 M1に特有の作用がないことを確認した（2.6.2.3.2，2.6.2.3.3）。

リスジプラムの主要な毒性試験一覧を，表 2.6.6.1-1に示した。

表 2.6.6.1-1 リスジプラムの主要な毒性試験一覧

試験の種類及び投与期間	動物種	投与経路	投与量（mg/kg/日）又は処理濃度	GLP適合性
反復投与毒性				
7日間予備	マウス	経口	0, 10, 30, 100	非
4週間	マウス	経口	0, 3, 9, 20/16	適
2週間予備	ラット	経口	0, 0.75, 2.5, 7.5	非
4週間	ラット	経口	0, 1, 3, 9	適
26週間	ラット	経口	0, 1, 3, 7.5	適
26週間	有色ラット	経口	0, 7.5/5	非
5日間漸増及び2週間	カニクイザル	経口	1, 3, 10, 20 (5日間漸増) 0, 0.75, 1.5, 3, 6 (2週間)	非
2週間	カニクイザル	経口	0, 2, 4, 6	適
39週間	カニクイザル	経口	0, 1.5, 3, 7.5/5	適
遺伝毒性				
復帰突然変異	ネズミチフス菌	*In vitro*	15.8～5000 µg/plate	適
小核	L5178Y マウスリンフォーマ細胞株	*In vitro*	0.5～20 µg/mL	非
小核（機序解析）[DNA 傷害性反応，細胞周期解析及び小核試験]	TK6ヒトリンパ芽球細胞株及び L5178Y マウスリンフォーマ細胞株	*In vitro*	0.0019～100 µM	非
小核／コメット	ラット	経口	0, 0.75, 1.5, 3, 6, 12.5, 25	適
小核（4週間反復投与試験への組み込み）	ラット	経口	0, 1, 3, 9	適
小核（13週間反復投与試験への組み込む）	ラット (生後22～112日)	経口	0, 1, 3, 7.5	適
がん原性				
26週間	rasH2マウス	経口	0, 1, 3, 9	適

表 2.6.6.1-1 リスジプラムの主要な毒性試験一覧（続）

試験の種類及び投与期間	動物種	投与経路	投与量（mg/kg/日）又は処理濃度	GLP適合性
生殖発生毒性				
胚・胎児発生 (妊娠6～17日)	ラット	経口	0, 1, 3, 7.5	適
胚・胎児発生 (妊娠6～19日)	ウサギ	経口	0, 1, 3, 7.5	適
出生前及び出生後の発生 (妊娠6～授乳20日)	ラット	経口	0, 0.75, 1, 3	適
新生児を用いた試験				
4週間又は2週間予備 (生後4～31/22～36日)	ラット	経口	0, 2.5, 3.75, 5, 10 又は0, 1, 3, 9	非
4週間 (生後4～31日)	ラット	経口	0, 0.75, 1.5, 2.5	適
13週間 (生後22～112日)	ラット	経口	0, 1, 3, 7.5	適
その他の毒性				
毒性発現の機序に関する試験	ARPE19ヒト網膜色素上皮細胞株	*In vitro*	0.39～50 μg/mL	非
	ヒト／カニクイザル iPSCs 株	*In vitro*	0.00064～10 μM	非
光毒性	Balb 3T3マウス線維芽細胞株	*In vitro*	0.004～9 μg/mL	非
感作性	マウス	経皮/経口	惹起なし： 1.7, 5, 8.4 (経皮) 惹起あり： 8.4 (経皮)[a], 3 (経口)[b]	適

In vivo 試験の対照群（0 mg/kg/日）には，溶媒（10 mmol/L アスコルビン酸/0.01 又は 0.0064 mg/mL チオ硫酸ナトリウム，pH 3）を投与した。

a: 8.4 mg/kg/日を 3 日間経皮投与し，最終投与後 2 日に 3 mg/kg/日を経口投与

b: 3 mg/kg/日を 3 日間経口投与し，最終投与後 2 日に 8.4 mg/kg/日を経皮投与

急性毒性

リスジプラムの独立した単回投与毒性試験は実施していないが，本薬の急性毒性に関する情報は，反復投与毒性試験又は小核試験（ラット）の高用量投与群において得られている。マウスでは，30 mg/kg/日以上で投与4日目以降に一般状態の異常（円背位，活動性低下，立毛又は粗毛等），体重減少及び摂餌量減少（100 mg/kg/日のみ）が認められ，これらの用量では，顕著な網状赤血球の低下が認められた。ラットでは，100 mg/kg/日までの用量を3日間投与したとき一般状態の異常は認められなかったが，25 mg/kg/日以上で骨髄毒性が認められた。ウサギでは，16 mg/kg/日までの用量を8日間投与したとき，一般状態の異常は認められなかったが，16 mg/kg/日で顕著な摂餌量低下及び軽度の体重減少が認められた。カニクイザルでは，20 mg/kg/日の2日間投与後に重篤な一般状態異常（活動性低下，緩徐な動作，円背位，振戦）及び体重減少（9～12%）が認められ，2回目投与の2日後に安楽死処置を実施した。

反復投与毒性

マウス，ラット及びカニクイザルを用いた反復投与試験における毒性所見として，主に副次的スプライシング標的への作用に関連して，細胞増殖サイクルが速い器官における下記の変化が認められた。これらの変化は，可逆的又は部分的に可逆的であり，その回復性は，休薬期間の長さ及び各器官における細胞の代謝回転に依存していた。

- マウス，ラット及び／又はカニクイザルにおける消化管上皮（アポトーシス／単細胞壊死の増加），粘膜固有層（空胞化）及び膵臓外分泌部上皮（単細胞壊死）の変化
- カニクイザルにおける皮膚，舌及び喉頭上皮の錯角化／過形成／変性及びそれに伴う炎症
- マウス，ラット及びカニクイザルにおける，骨髄の病理組織学的変化を伴わない血液学的検査値の変化（赤血球及び白血球），胸腺の小型及びリンパ系細胞減少，高用量投与により早期死亡又は安楽死処置したマウス及びラットの一部における骨髄細胞減少
- ラット骨髄赤芽球における小核誘発作用（遺伝毒性の項参照）
- ラット及びカニクイザルの精巣における雄性生殖細胞の変性

また，カニクイザル39週間投与試験において網膜変性が認められた。具体的には，網膜電図（ERG）における暗順応 b 波（桿状体由来）の減弱，及び程度はやや小さいものの明順応 b 波（錐状体由来）の減弱がみられ，スペクトラルドメイン光干渉断層法（SD-OCT）による形態学的異常（網膜色素上皮（RPE）の肥大を伴う視細胞層の多巣性網膜辺縁部変性及び網膜内層の小嚢胞腔〔内顆粒層の空胞化〕）と関連していた。これらの変化は ERG 及び SD-OCT を開始した投与20週目以降に認められ，投与期間の35週目まで継続した。網膜変性は病理組織学的検査においても確認された。22週間の休薬期間中に，SD-OCT における形態学的所見は部分的に退縮し，ERG 反応の明確な回復も認められた。病理組織学的には，視細胞の消失及び RPE の肥大を伴う網膜変性が依然として認められたが，内顆粒層の空胞化は消失した。

なお，リスジプラム投与による網膜変性は，ラット（アルビノ及び有色）を用いた26週間までの投与においては認められなかった。

遺伝毒性

細菌を用いた復帰突然変異試験において，リスジプラムによる遺伝子突然変異誘発作用は認められなかったが，マウス及びヒト細胞株を用いた *in vitro* 試験，並びにラット（*in vivo*）の骨髄赤芽球において小核誘発が認められた。本薬を *in vivo* で投与したとき，骨髄での小核を有する細胞を明らかに増加させる高用量においても，肝臓及び空腸における直接的な DNA 傷害性は認められなかった。このことから，本薬による小核誘発は，DNA に対する直接的な作用とは異なる間接的な機序が原因である可能性が示唆された。ヒト細胞株を用いた小核誘発の機序に関する探索的試験結果から，本薬の標的は DNA 以外の分子であり，小核誘発にアポトーシスが関与することが示された。

がん原性

rasH2トランスジェニックマウスを用いた26週間投与によるがん原性試験において，リスジプラムよる発がん性を示唆する変化は認められなかった。

生殖発生毒性

リスジプラムの受胎能及び着床までの初期胚発生への影響については，幼若ラット4週間及び13週間投与試験において評価した。生後4～31日目まで投与を行った幼若ラット4週間投与試験では，2.5 mg/kg/日で投与期間終了時の精巣及び精巣上体重量が対照群と比較して低値を示し，病理組織学的検査では精細管上皮変性が認められた。8週間の休薬期間終了時においても精巣及び精巣上体重量はわずかに低下したままであったが，病理組織学的な異常は認められず，精子検査及び雄の生殖能にも異常は認められなかった。離乳後直ちに（生後22日目）投与を開始した幼若ラット13週間投与試験では，7.5 mg/kg/日で投与期間終了後の交配期間終了時点における精子濃度及び精子運動性の低下，並びに精子の形態異常が認められたが，生殖能（無処置動物との交配及び授胎能）に影響は認められなかった。また，両試験において，雌の生殖能に影響は認められなかった。

ラット及びウサギを用いた試験において，リスジプラムによる胚・胎児発生への影響が認められた。ラットでは7.5 mg/kg/日で母体毒性及び胎児発育阻害が認められたが，催奇形性は認められなかった。ウサギでは，顕著な母体毒性が認められた12 mg/kg/日において，胚胎児致死及び胎児の形態異常が認められた。リスジプラムは細胞周期及びアポトーシス経路に関与する副次的スプライシング標的に作用することから，胚・胎児発生に対する影響は予測されたものである。

ラットを用いた出生前及び出生後の発生に関する試験において，リスジプラムを妊娠6日目～授乳20日目まで投与したとき，高用量の3 mg/kg/日まで，母動物及び出生児（生存性，身体的及び機能的発達［行動学的機能及び生殖能，雌の卵胞数及び卵巣の病理組織学的所見を含む］）に対する影響は認められなかった。3 mg/kg/日で妊娠期間のわずかな延長が認められたが，同用量における妊娠期間の平均値は試験施設における対照群の背景値の範囲内であった。なお，出生前及び出生後の発生に関する用量設定試験では，3 mg/kg/日以上で妊娠期間延長がみられ，更に7.5 mg/kg/日では難産のため6例中3例を安楽死処置した。この変化は，本薬の *in vitro* 副次的薬理試験において確認されている，シクロオキシゲナーゼ（COX）1及び COX2に対する阻害作用に関連した変化の可能性が考えられた。

新生児を用いた試験

幼若ラットを用いた反復投与試験（用量設定試験）において，離乳前にリスジプラムの投与を開始したとき，離乳後に投与を開始した場合と比較して，忍容性が著しく低くなることが確認された。具体的には，離乳前投与（生後4日目から投与開始）では，3.75 mg/kg/日以上で死亡又は状態悪化例が認められたのに対し，離乳後投与（生後22日から目投与開始）では9 mg/kg/日まで死亡例は認められなかった。これは，離乳前ラットにおいて血漿中の非結合型濃度が高く，かつ消失の遅延が生じたことにより，重度の毒性症状が惹起されたものと考えられた。このことから，幼若ラットを用いた反復投与試験は，離乳前（生後4日目）に投与を開始する4週間投与試験と，離乳後（生後22日目）に投与を開始する13週間投与試験に分けて実施した。

離乳前に投与を開始する4週間投与試験（生後4～31日目まで投与）では，高用量の2.5 mg/kg/日で体重及び精巣への影響が認められたが，幼若動物の成長及び機能的発達を含めたその他の検査項目に異常は認められず，8週間の休薬後に体重及び精巣の病理組織学的変化も回復した。また，離乳後に投与を開始する13週間投与試験（生後22～112日目まで投与）では，高用量の7.5 mg/kg/日で精巣への影響及び骨髄における小核誘発が認められたが，幼若動物の成長及び機能的発達を含めたその他の検査項目に異常は認められなかった。

若齢（投与開始時2歳齢）カニクイザルを用いた39週間投与試験では，本薬の精巣に対する影響の有無を評価することができなかったものの，幼若動物の成長及び発達に関連する特異的な影響は認められなかった。

毒性発現の機序に関する試験

カニクイザル39週間投与試験で認められた網膜変性の機序を明らかにするため，ヒト網膜色素上皮細胞株（ARPE19）を用いた *in vitro* 試験を実施した結果，本薬によるリソソーム機能障害及びオートファゴソーム蓄積作用が，網膜傷害に関連している可能性が示唆された。

また，ヒト／カニクイザル人工多能性幹細胞（iPSCs）を用いた *in vitro* 試験において，本薬を含む *SMN2*スプライシング修飾薬による *FOXM1 B/C* 転写産物バリアント発現に対する作用（ダウンレギュレーション）が認められ，その強さと濃度依存的な有糸分裂停止との間に相関があることが示唆された。*In vivo* においても，リスジプラムを投与したラット及びカニクイザルの組織において，細胞周期に関連する *FOXM1*，アポトーシスに関連する *MADD* を含む複数の遺伝子のスプライシングに対する調節作用が認められ，細胞増殖サイクルの速い器官において認められた毒性所見との関連性が示唆された。

その他の毒性

本薬は波長240～400 nm の紫外線を吸収することから，潜在的な光毒性リスクを評価するため，マウス線維芽細胞株（Balb/c 3T3）を用いた *in vitro* 試験を実施した。リスジプラムの溶解性に限度がみられた（最高濃度：9 μg/mL）ものの，本試験条件下においてリスジプラムは光毒性を有さないと判断された。

また，マウスを用いた感作性試験（局所リンパ節試験［LLNA］）において，臨床製剤の1～5倍量までの経皮投与，又はヒトでの治療域の曝露量が得られる用量で3日間経口投与したとき，更に，引き続いて経口又は経皮投与により惹起したとき，感作性及び刺激性の徴候は認められなかった。

2.6.6.2 急性毒性試験

リスジプラムの独立した単回投与毒性試験は実施していないが，本薬の急性毒性に関する情報は，反復投与毒性試験又は小核試験（ラット）の高用量投与群において得られている。マウス，ラット，ウサギ及びカニクイザルにおいて，それぞれ最高用量の100，100，16及び20 mg/kg を投与したとき，初回投与翌日までに死亡例は認められなかった。

マウスでは，30 mg/kg/日以上の用量で投与4日目以降に一般状態の異常（円背位，活動性低下，立毛又は粗毛等），体重減少及び摂餌量減少（100 mg/kg/日のみ）が認められたことから，100 mg/kg/日の生存例全例を4日目に，30 mg/kg/日の生存例全例を5日目に安楽死処置した。これらの用量では，赤血球造血の低下を示唆する顕著な網状赤血球の低下（赤血球容積の顕著な減少を伴わない）が認められた。

ラットでは，100 mg/kg/日までの用量を3日間投与したとき一般状態の異常は認められなかったが，25 mg/kg/日以上で骨髄毒性（正染性赤血球に対する多染性赤血球の比率の50%以上の減少）が認められた。

ウサギでは，16 mg/kg/日までの用量を8日間投与したとき，一般状態の異常は認められなかったが，16 mg/kg/日で顕著な摂餌量低下及び軽度の体重減少が認められた（2.6.6.6.3）。

カニクイザルでは，20 mg/kg/日の2日間投与後に重篤な一般状態異常（活動性低下，緩徐な動作，円背位，振戦）及び体重減少（9～12%）が認められ，2回目投与の2日後に安楽死処置を実施した。

2.6.6.3 反復投与毒性試験

リスジプラムの主要な反復投与毒性試験として，ラットを用いた26週間まで，及びカニクイザルを用いた39週間までの1日1回経口投与による反復投与毒性試験を実施した。また，カニクイザルで認められた網膜毒性がラットにおいても認められるかどうかを確認するため，有色ラットを用いた探索的26週間投与試験（非 GLP）も実施した。更に，rasH2トランスジェニックマウスを用いた26週間投与がん原性試験の用量設定のため，同系の野生型マウスを用いた4週間までの反復投与試験を実施した。

2.6.6.3.1 マウス7日間投与予備試験

（資料番号 4.2.3.2-1）

001178-W（野生型）rasH2マウス（各群雌雄各6例）にリスジプラムを0（溶媒），10，30又は100 mg/kg/日の用量で7日間反復経口投与した。TK サテライト群として各群雌雄各20例を別途設定し，血漿中薬物濃度測定のための血液採取に供した。本試験では30 mg/kg/日以上の用量で重度の毒性がみられたため，20 mg/kg/日（各群雌雄各10例，TK サテライト群なし，7日目に血漿中薬物濃度測定のための血液採取）を追加した。

試験結果を表2.6.7.6-1に示した。

30 mg/kg/日以上の用量で全身状態悪化（安楽死処置）を含む一般状態の異常，体重及び摂餌量減少が認められたことから，100 mg/kg/日の生存例全例を4日目に，30 mg/kg/日の生存例全例を5日目に安楽死処置した。20 mg/kg/日以下の投与群の個体は最終投与の7日目まで全例が生存した。7日目の血液学的検査において30 mg/kg/日以上の用量で赤血球造血への影響（明らかな赤血球容積減少を伴わない顕著な網状赤血球減少）がみられたが，10 mg/kg/日では影響は認められなかった（20 mg/kg/日は血液検査を実施しなかった）。

以上の結果から，本試験条件下におけるリスジプラムの最大耐量（MTD）は，20 mg/kg/日（7日目における $AUC_{0\text{-}24h}$ [雄/雌]：20000/22500 ng•h/mL）と判断した。

2.6.6.3.2 マウス4週間投与試験

（資料番号 4.2.3.2-2）

001178-W（野生型）rasH2マウス（各群雌雄各10例）にリスジプラムを0（溶媒），3，9又は20/16 mg/kg/日の用量で4週間反復経口投与した。TK サテライト群として各群雌雄各20例を別途設定し，血漿中薬物濃度測定のための血液採取に供した。最高用量の20/16 mg/kg/日については，20 mg/kg/日の用量で投与を開始したところ，11日目以降に死亡例又は全身状態悪化に伴う安楽死処置例が認められたことから，17～19日目に投与を中断し，16 mg/kg/日に減量して20～33日目まで更に14日間投与した。

本試験の最高用量は，先に実施した7日間投与試験（2.6.6.3.1）の結果に基づき20 mg/kg/日とし，以下，9及び3 mg/kg/日を設定した。

試験結果を表2.6.7.7.1-1に示した。

20 mg/kg/日で本薬投与に関連した一般状態異常（円背位，活動性低下，斜視，立毛及び不規則呼吸），体重及び摂餌量減少が認められた。同用量で死因が特定できた個体では，消化管（粘膜上皮の変性）及び骨髄（大腿骨及び胸骨骨髄の細胞減少）に病理組織学的所見が認められた。16 mg/kg/日に減量して投与を継続した個体では，投与期間終了時の血液学的検査で赤血球容積，網状赤血球，白血球の低値などがみられ，病理組織学的検査では脾臓における造血亢進が認められた。9 mg/kg/日以下の用量では，本薬投与に関連した変化は認められなかった。

血漿中リスジプラム及び代謝物 M1濃度は，いずれも反復投与による蓄積はみられず，リスジプラム濃度は3～20 mg/kg/日の範囲で概ね用量に比例して増加し，代謝物 M1濃度は3～9 mg/kg/日の範囲で用量比以上の増加を示した。未変化体（リスジプラム）に対する代謝物 M1の比率（雌雄合算平均値の比較）は11.7～16.6%であった。

以上の結果から，本試験条件下におけるリスジプラムの NOAEL は，16 mg/kg/日（29日目における $AUC_{0\text{-}24h}$ [雄/雌]：21200/15100 ng•h/mL）と判断した。

2.6.6.3.3 ラット2週間投与予備試験（2週間回復性試験）

（資料番号 4.2.3.2-3）

Wistar Hannover ラット（各群雌雄各6例）にリスジプラムを0（溶媒），0.75，2.5又は7.5 mg/kg/日の用量で2週間反復経口投与した。各群雌雄各2例については，投与期間中の血漿中薬物濃度測定のための血液採取に供し，投与期間終了後，2週間休薬し剖検した。

試験結果を表2.6.7.6-1に示した。

リスジプラムの7.5 mg/kg/日までの用量の投与による忍容性は概ね良好であり，死亡例は認められなかった。7.5 mg/kg/日の雄で1～14日目の平均体重増加量の低値がみられたが，2週間の休薬期間中に回復した（摂餌量の回復と相関）。その他，一般状態，眼科学的検査，血液学的

検査，血液凝固検査，血液化学的検査，器官重量及び剖検における異常は認められなかった。病理組織学的検査において，7.5 mg/kg/日の雌で十二指腸，空腸及び回腸の陰窩におけるアポトーシス増加が認められたが，その程度は軽微であることから有害な変化ではないと考えられた。

以上の結果から，本試験条件下におけるリスジプラムの NOAEL は，7.5 mg/kg/日（14日目における $AUC_{0\text{-}24h}$ [雄/雌]：19600/17100 ng•h/mL）と判断した。

2.6.6.3.4 ラット4週間投与試験（4週間回復性試験）

（資料番号 4.2.3.2-4）

Wistar Hannover ラット（各群雌雄各16例）にリスジプラムを0（溶媒），1，3又は9 mg/kg/日の用量で4週間反復経口投与した。各群雌雄各6例については，投与期間中の血漿中薬物濃度測定のための血液採取に供し，投与期間終了後，4週間休薬し剖検した。

3 mg/kg/日については更に雄10例を設定して，血漿中並びに眼，脳及び皮膚組織中の本薬濃度測定に供した。また，本試験においては，骨髄小核試験を組み入れたため，陽性対照群（シクロフォスファミド，20 mg/kg を剖検の約24時間前に単回投与，雌雄各3例）も設定した。

本試験の投与量は，先に実施した2週間投与予備試験（2.6.6.3.3）及びラット小核／コメット試験のための用量設定試験（2.6.6.4.4）の結果に基づき設定した。すなわち，ラット2週間投与予備試験では，7.5 mg/kg/日で回復性を有する体重増加量低値（雄）及び有害でないと考えらる小腸陰窩の軽微なアポトーシス増加（雌）が認められた。一方，ラット小核／コメット試験のための用量設定試験では，100 mg/kg までの用量で一般状態の異常は認められなかったものの，50 mg/kg 以上で重篤な骨髄毒性が認められた。このことから，本試験における最高用量は，致死を含む重篤な変化に至らない毒性を惹起すると考えられる9 mg/kg/日とし，以下3及び1 mg/kg/日を中及び低用量として設定した。

試験結果を表2.6.7.7.2-1に示した。

試験期間中に死亡例は認められなかった。9 mg/kg/日の雌雄で投与期間中に体重増加量の低値（雄：−17%，雌：−27%）がみられたが，摂餌量への影響は認められなかった。雄の体重は4週間の休薬により回復したが，雌では休薬期間終了時においても対照群より低値を示した（1，3及び9 mg/kg/日でそれぞれ対照群の−27%，−30%及び−31%）。

3及び9 mg/kg/日の雌雄の骨髄において，小核を有する多染性赤血球の増加が認められたが，3 mg/kg/日の多くの個別値は，対照群の背景値の範囲内であった。

投与期間終了時の病理組織学的検査では，9 mg/kg/日の雌雄において胸腺の委縮（胸腺重量低値及び肉眼的な胸腺の小型に関連），十二指腸，空腸，回腸，盲腸及び直腸（雌のみ）におけるアポトーシス／単細胞壊死の増加，並びに雄の精巣における精母細胞変性の増加が認められた。これらの変化は4週間の休薬後には認められず，完全な回復性を示した。上記の変化の程度は概ね軽微～軽度であり発現頻度も低く，休薬により回復したことから，有害な所見ではないと考えられた。

血漿中リスジプラム濃度の $AUC_{0\text{-}24h}$ は，1～9 mg/kg/日の範囲で用量比以上の増加を示した。また，反復投与による蓄積及び曝露量の性差は認められなかった。血漿を除いた組織中リスジプラム濃度は皮膚で最も高く，続いて網膜，脳及び硝子体液の順で高かった。

以上のとおり，9 mg/kg/日で体重増加量低値及び骨髄小核誘発が認められたことから，本試験条件下におけるリスジプラムの NOAEL は，3 mg/kg/日（28日目における $AUC_{0\text{-}24h}$ [雄/雌]：5450/5890 ng•h/mL）と判断した。

2.6.6.3.5 ラット26週間投与試験（8週間回復性試験）

（資料番号 4.2.3.2-5）

Wistar Hannover ラット（各群雌雄各26例）にリスジプラムを0（溶媒），1，3又は7.5 mg/kg/ 日の用量で26週間反復経口投与した。各群雌雄各6例については，投与期間中の血漿中薬物濃度測定のための血液採取に供し，投与期間終了後，8週間休薬し剖検した。

なお，並行して実施していたカニクイザル39週間投与試験（2.6.6.3.9）において，本薬投与による眼への影響が認められたことから，本試験では ERG を組み入れた。

本試験の投与量は，先に実施した4週間投与試験（2.6.6.3.4）の結果に基づき設定した。すなわち，9 mg/kg/日の4週間投与により体重増加量低値，骨髄小核誘発及び軽微な病理組織学的変化が認められたことから，本試験では26週間投与よる忍容性があり，かつ毒性変化の検索が可能と考えられる7.5 mg/kg/日を最高用量とし，以下3及び1 mg/kg/日を中及び低用量として設定した。

試験結果を表2.6.7.7.3-1に示した。

7.5 mg/kg/日の7例が試験期間中（27～178日目）に死亡又は全身状態悪化により安楽死処置された。死亡前の所見として，活動性低下，背骨の突出，脱水，衰弱及び体重減少が認められた。病理組織学的検査では，消化管における陰窩の単細胞壊死及び／又は変性／壊死，並びに骨髄細胞の減少が認められ，これらの変化が多くの個体における死亡又は状態悪化の原因と考えられた。血液学的検査では，白血球，好中球，リンパ球，赤血球系パラメータ，網状赤血球及び血小板の低値が認められた。上記の変化は同用量群の投与期間終了時剖検例においてみられた変化と同様であったが，その他の所見として，切歯象牙芽細胞の変性／壊死も認められた。7.5 mg/kg/群の生存例では，死亡又は安楽死処置例と同様の一般状態所見及び平均体重増加量の低値（対照群と比較して雄で−12%，雌で−10%）が認められたが，休薬期間中に一般状態の異常は認められず，体重への影響も休薬により完全に回復した。

ERG において，本薬投与に関連した明らかな変化は認められなかった。

投与期間終了時の血液化学的検査では，有害でないと考えられる軽度のカリウム及びクロールの低値（1 mg/kg/日以上の雌及び3 mg/kg/日以上の雄）が認められた。また，尿検査では3及び7.5 mg/kg/日の雌で有害でないと考えられる尿比重低値及び尿量高値が認められた。これらの変化は休薬期間終了時には回復した。

病理組織学的検査では，主に7.5 mg/kg/日において，本薬投与に関連した上皮への影響が認められた。影響が認められた器官は消化管（十二指腸，空腸，回腸，盲腸，結腸及び直腸の陰窩における軽微な単細胞壊死），硬口蓋（軽微な単細胞壊死）及び膵臓外分泌部（軽微～軽度の単細胞壊死）であった。乳腺ではヘモジデリンと考えられる細胞内褐色顆粒の増加を伴う軽微～中等度の萎縮が雄のみで認められた。更に，1及び3 mg/kg/日の一部の個体で，膵臓（1 mg/kg/日の雄1例，3 mg/kg/日の雄1例及び雌4例）及び結腸（3 mg/kg/日の雄1例）における単細胞壊死が認められた。これらの所見はラットの自然発生病変としてみられることのある軽微な変化であり，他に随伴する所見（炎症など）が認められなかったことから，有害な変化ではないと考えられた。

雄性生殖器では，3 mg/kg/日以上で精巣における精細管上皮変性／萎縮（精巣重量低値及び肉眼的観察による精巣の小型及び／又は軟化に関連）及び精巣上体における二次的な精子減少（重量低値及び肉眼的な小型に関連）が認められた。また，7.5 mg/kg/日の1例では，精巣上体管上皮の変性／壊死も認められた。副腎では，皮質の色素沈着（リポフスチン／セロイドと考えられ，肉眼的な暗色化に一致）が1 mg/kg/日以上の雌雄で認められ，3 mg/kg/日以上の雌では急性の皮質出血が認められた。また，7.5 mg/kg/日では副腎重量の高値が認められたが，関連する病理組織学的変化はみられなかった。副腎におけるこれらの所見は，有害な変化ではないと考えられた。胸腺では，7.5 mg/kg/日の雌雄で有害でないと考えられるリンパ系細胞減少（肉眼的な胸腺の小型及び胸腺重量低値に一致）が認められた。雌の3 mg/kg/日以上では，子

宮重量の低値がみられ，これに一致して，発情周期の停止に伴う発情休止期への移行が認められた。7.5 mg/kg/日では休薬期間終了時においても子宮重量の低値がみられたが，関連する病理組織学的所見が認められなかったことから有害な変化ではないと考えられた。

休薬期間終了時において，本薬投与に関連する肉眼的所見，器官重量の変化及び病理組織学的変化は認められず，これらの変化の完全な回復性が示唆された。本薬投与に関連した器官重量（子宮）及び病理組織学的変化（精巣所見及び副腎のリポフスチン／セロイド沈着）については，投与期間終了時と比較して発現頻度は同程度又は低く，所見の程度又は分布に変化が認められたことから，回復傾向を示唆するものと考えられた。

血漿中リスジプラム濃度の $AUC_{0\text{-}24h}$ は，1～7.5 mg/kg/日の範囲で用量に比例して増加した。91及び182日目の曝露量は投与初日と比較して増加し，蓄積率は1.61～3.3であった。また，曝露量の性差は認められなかった。

以上のとおり，3 mg/kg/日以上で精巣の変化，7.5 mg/kg/日で一般状態，体重，消化管及び骨髄の変化が認められたことから，本試験条件下におけるリスジプラムの NOAEL は，雄で1 mg/kg/日（182日目における $AUC_{0\text{-}24h}$：2200 ng•h/mL），雌で3 mg/kg/日（182日目における $AUC_{0\text{-}24h}$：8830 ng•h/mL）と判断した。

2.6.6.3.6 有色ラット探索的26週間投与試験

（資料番号 4.2.3.2-6）

本試験は，有色ラットにリスジプラムを26週間反復経口投与したとき，網膜毒性が惹起されるかどうかについて検討するため実施した。

Brown Norway ラット（各群雄24例）にリスジプラムを0（溶媒）又は7.5/5 mg/kg/日の用量で26週間反復経口投与した。TK サテライト群として各群雄6例を別途設定し，投与期間中の血漿中薬物濃度測定のための血液採取に供した。7.5 mg/kg/日の投与により，42日目以降に重篤な毒性による死亡又は安楽死処置例が認められたため，47/46日目に投与を中断し，53/52日目に投与量を5 mg/kg/日に減量して再開した。投与26週目まで，眼科学的検査，ERG 及び SD-OCT を経時的に実施した。また，各群6例を92及び134日目に，また残り全例を182/183/187日目に剖検し，病理組織学的検査（眼，脳，副腎及び膵臓）を実施した。

試験結果を表2.6.7.7.4-1に示した。

リスジプラムの7.5/5 mg/kg/日の投与により，骨髄細胞減少及び消化管所見に伴う死亡例が認められ，生存例では体重増加量及び摂餌量減少，赤血球系パラメータの低値，並びに副腎皮質におけるリポフスチン／セロイド沈着が認められた。

一方，眼科学的検査，ERG，SD-OCT 及び脈絡膜／網膜の病理組織学的検査において，網膜毒性を示唆する変化は認めらなかった。本薬投与に関連した眼の変化として，眼科学的検査で軽度の硝子体混濁（びまん性）が認められ，この変化は SD-OCT でも確認された。

その他の所見として，肉眼的な精巣の小型及び軟化，精巣上体及び胸腺の小型が認められたが，これらの器官についての病理組織学的検査は実施しなかった。また，脳及び膵臓の病理組織学的検査において異常は認められなかった。

投与初日と比較して，反復投与による血漿中リスジプラム濃度の蓄積が確認され，少なくとも91日目までに定常状態に達していることが確認された（91日目の $AUC_{0\text{-}24h}$：18000 ng•h/mL）。また，95，137及び181/182日目の脈絡膜，網膜及び血漿中リスジプラム濃度は個体差がみられるものの概ね一定であり，95日目までに定常状態に達していると考えられた。脈絡膜中濃度は，血漿中 C_{max} より少なくとも4桁以上高く，網膜中濃度は血漿中 C_{max} より約1桁高かった。

2.6.6.3.7 カニクイザル5日間漸増投与及び2週間投与用量設定試験

（資料番号 4.2.3.2-7）

5日間漸増投与試験

カニクイザルにおけるリスジプラムの最大耐量を決定するため，雌雄各1例に1，3，10及び20 mg/kg/日の用量で1日1回，5日間のサイクルで漸増投与した。

試験結果を表2.6.7.6-1に示した。

10 mg/kg/日までの投与による忍容性は良好であったが，20 mg/kg/日の2回目投与（17日目）後に重篤な一般状態所見（嗜眠／沈静化／活動性低下，緩徐で慎重な動き，円背位及び振戦）及び体重減少（9～12%）が認められたことから，雌雄とも投与を中止し，19日目に安楽死処置した。血液学的検査では好中球，リンパ球及び好酸球の低値，フィブリノゲン高値及び血液凝固時間延長がみられた。また，血液化学的検査では，トランスアミナーゼ，クレアチニン及び尿素の高値が認められた（対照群と比較して最大4倍）。

本薬投与に関連した病理組織学的所見として，皮膚／皮下組織，眼瞼，舌及び食道における錯角化，眼瞼の表皮におけるアポトーシス増加，舌及び食道の上皮におけるアポトーシス増加，空腸及び回腸の粘膜固有層におけるアポトーシス増加，声帯ヒダのびらん／潰瘍，喉頭の側壁上皮のアポトーシス，十二指腸，空腸，回腸，結腸，盲腸及び直腸における変性／再生，精巣の精細胞変性／空胞化及び多核細胞が認められた。

以上の結果から，本試験におけるリスジプラムの MTD は，10 mg/kg/日と判断された。

2週間投与用量設定試験

引き続いて実施した2週間投与試験では，各群雌雄各1例のカニクイザルにリスジプラムを0（溶媒），0.75，1.5，3又は6 mg/kg/日の用量で2週間反復経口投与した。

試験結果を表2.6.7.6-1に示した。

リスジプラムの6 mg/kg/日までの投与による忍容性は良好であった。本薬投与に関連した軽微な所見として，6 mg/kg/日で眼瞼の皮膚／皮下組織における錯角化，並びに空腸の粘膜固有層における空胞化（雄）又はアポトーシス増加（雌）が認められた。その他，本薬投与に関連した変化は認められなかった。

以上のとおり，6 mg/kg/日で軽微な組織学的変化が認められたが，3 mg/kg/日では変化が認められなかったことから，引き続き実施する2週間反復投与試験における最高用量は，6 mg/kg/日とすることとした。

2.6.6.3.8 カニクイザル2週間投与試験（2週間回復性試験）

（資料番号 4.2.3.2-8）

投与開始時2歳齢の若齢カニクイザルにリスジプラムを0（溶媒），2，4又は6 mg/kg/日の用量で2週間反復経口投与した。対照群及び6 mg/kg/日に各群雌雄各5例，2及び4 mg/kg/日に各群雌雄各3例を設定し，各群雌雄各3例を投与期間終了時，対照群及び6 mg/kg/日の各群雌雄各2例を2週間の休薬期間終了時に剖検した。本試験の投与量は，先に実施した2週間投与用量設定試験（2.6.6.3.7）の結果に基づき設定した。

試験結果を表2.6.7.7.5-1に示した。

リスジプラムを投与した動物における主要な一般状態所見として，11日目以降に皮膚のさまざまな部位における表皮脱落／剥離（4 mg/kg/日の雄1例及び6 mg/kg/日の雌雄），顔面，頭部，

鼻口部及び／又は陰嚢の紅潮，並びに過剰な毛づくろい（6 mg/kg/日の雌雄）が認められた。6 mg/kg/日の雌雄では，11日目以降に半眼も認められた。6 mg/kg/日の雌雄各1例では，2週間の休薬期間終了時においても皮膚の表皮脱落／剥離が認められた。

投与期間終了時の病理組織学的検査では，本薬投与に関連する変化として，皮膚における錯角化，炎症，びらん／潰瘍及び表皮の過形成（6 mg/kg/日，肉眼的な表皮剥離と一致），声帯ヒダの上皮変性及び喉頭の炎症（4又は6 mg/kg/日），喉頭腔側壁のびらん／潰瘍，及び扁平上皮化生（6 mg/kg/日），精巣における精細胞変性及び多核細胞増加（6 mg/kg/日の雄），胸腺萎縮（胸腺重量の低値に一致，6 mg/kg/日の雄）が認められた。

2週間の休薬期間終了時において，6 mg/kg/日の精巣の所見を除き，すべての変化が完全に回復した。なお，6 mg/kg/日の休薬期間終了時剖検例及び4 mg/kg/日のほとんどの雄は性的に未成熟であったため，精巣に対する本薬の作用及び回復性を評価することができなかった。その他の検査項目においては，本薬投与による影響は認められなかった。

血漿中リスジプラムの C_{max} は概ね用量に比例して増加し，$AUC_{0\text{-}24h}$ は用量比以上の増加傾向を示した。また，反復投与による蓄積及び性差は認められなかった。

以上のとおり，6 mg/kg/日で皮膚，喉頭及び精巣の変化が認められ，4 mg/kg/日では精巣に対する作用を評価することができなかったことから，本試験におけるリスジプラムの NOAEL は，2 mg/kg/日（14日目における $AUC_{0\text{-}24h}$ [雄/雌]：2650/2460 ng•h/mL）と判断した。

2.6.6.3.9 カニクイザル39週間投与試験（22週間回復性試験）

（資料番号 4.2.3.2-9）

投与開始時2歳齢の若齢カニクイザルにリスジプラムを0（溶媒），1.5，3又は7.5/5 mg/kg/日の用量で39週間反復経口投与した。対照群及び7.5/5 mg/kg/日に各群雌雄各5例，1.5及び3 mg/kg/日に各群雌雄各3例を設定し，各群雌雄各3例を投与期間終了時，対照群及び7.5/5 mg/kg/日の各群雌雄各2例を22週間の休薬期間終了時に剖検した。本試験の投与量は，先に実施した2週間投与用量設定試験（2.6.6.3.7）の結果に基づき設定した。

試験結果を表2.6.7.7.6-1に示した。

7.5 mg/kg/日において明確な一般状態の異常（皮膚のさまざまな部位における表皮脱落／剥離及び顔面紅潮）が認められたことから，13日目に投与を中止し休薬させた。また，12日目の血漿中薬物濃度が想定よりも高かったことから，同群については用量を5 mg/kg/日に減量し，26日目に投与を再開した。5 mg/kg/日の投与により同様の皮膚の変化（表皮脱落／剥離及び脱毛）がみられたが，その程度は7.5 mg/kg/日の投与時よりも軽減しており，全体として，5 mg/kg/日の用量における忍容性は良好であり，軽微な一般状態所見がみられたのみであった。

また，別の *SMN2*スプライシング修飾薬である RO6885247（本薬の先行化合物として Roche 社により SMA を対象として開発が進められていたが，開発を中止した品目）のカニクイザル慢性毒性試験において，網膜の病理組織学的所見が認められた[5)] ことから，本試験では，投与20週目以降に ERG 及び SD-OCT を追加で組み入れた。

ERG では，7.5/5 mg/kg/日のほとんどの個体で，ERG 電位の減少が20週目以降の投与期間を通じて認められた。3 mg/kg/日では軽微な影響が認められた。7.5/5 mg/kg/日の少なくとも1例では，ERG に対する影響の悪化が投与期間の34週目まで継続して認められた。同例については，TK 評価において投与期間終了時の曝露量が最も高かったことから，22週間の休薬群に組み入れて回復性の評価を行うこととした。ERG に影響がみられた個体では，桿状体媒介性の暗順応 b 波の明らかな減弱が認められたが，a 波に対する影響は弱かった。また，視覚機能を反映する ERG 反応の異常と SD-OCT（下記）における網膜構造異常との間には強い関連性が認められた。ERG 及び SD-OCT により機能障害が認められた7.5/5 mg/kg/日において，視覚誘発電位（VEP）反応に影響はみられなかった。7.5/5 mg/kg/日の動物では，休薬期間中に ERG 反応の明確な回

復が認められた。

SD-OCT では，本薬の投与量に依存した異常所見が，検査を開始した投与22週目以降に認められた。対照群及び1.5 mg/kg/日では，投与期間中の22～35週目まで，網膜構造に異常は認められなかった。3及び7.5/5 mg/kg/日では，種々の程度の構造異常（網膜辺縁部における内節／外節の菲薄化及び外顆粒層の高輝度反射及び菲薄化）が認められた。投与期間中の変性性変化は，辺縁部で最も強く認められた。網膜辺縁部の層構造の異常は，休薬期間中に若干の回復が認められたが，広範囲に細胞が消失した領域に変化はみられなかった。7.5/5 mg/kg/日で最も影響の強かった個体では，視神経近傍の内顆粒層における小嚢胞領域を特徴とする，小嚢胞性黄斑変性（MMD）が認められた。MMD は投与期間中に中心窩近傍の領域まで進行したが，主に限局性かつ斑点状であり，網膜全体には広がらなかった。MMD の領域は休薬期間中に明らかな減少が認められた。7.5/5mg/kg/日で最も強い影響が認められた数例では，内境界膜下及び外顆粒層に液体を貯留した小空洞がみられた。この空洞は休薬期間中に徐々に縮小した。視神経及びその近傍のラインスキャンにおいて，神経網膜外周組織の菲薄化及び視神経乳頭陥凹は認められなかった。

眼底自発蛍光（FAF）イメージングでは，最も明らかな変性性変化がみられた個体において，斑点状低蛍光領域及び辺縁部に限局した過蛍光が認められた。白色斑点状の過蛍光領域は休薬期間中に縮小がみられ，わずかな回復性が示唆された。SD-OCT で検出された構造異常は，ERG における機能異常と良く相関していた。これらの所見は3 mg/kg/日以上の数例での病理組織学的所見（視細胞層の部分的消失を伴う網膜外顆粒層及び視細胞層における多巣性の組織破壊，網膜色素上皮細胞の多巣性の肥大，菲薄化，内顆粒層の組織破壊及び空胞化，神経節細胞層の空胞化）とも相関していた。

血液学的検査では，3 mg/kg/日以上で有害でない変化（赤血球系パラメータの減少〔7.5/5 mg/kg/日の雄及び3 mg/kg/日以上の雌〕，網状赤血球増加（3 mg/kg/日以上）並びに血小板及び血小板容積比率の増加〔反応性血小板増多症，3 mg/kg/日以上の雌〕）が認められた。これらの変化に関連した骨髄の組織学的所見は認められなかった。7.5/5 mg/kg/日の雌のみでリンパ球減少が認められ，組織学的な胸腺の萎縮，剖検における胸腺の小型及び胸腺重量低値と関連していた。これらの血液学的検査所見は投与開始後4又は13週目から確認され，投与期間終了時まで持続した。また，すべての変化が休薬期間終了時までに完全に回復した。

病理組織学的検査では，7.5/5 mg/kg/日の雌雄及び3 mg/kg/日の雌において，本薬投与に関連した網膜の変化が認められた。この変化は，主に網膜の中間部から辺縁部における変性であった。この変化は，外顆粒層の多巣性の組織破壊であり，7.5/5 mg/kg の雌1例では視細胞層の部分的消失を伴う多巣性の組織破壊，網膜色素上皮細胞の多巣性の肥大，内顆粒層の菲薄化，組織破壊及び空胞化も認められた。7.5/5 mg/kg/日の1例の標本を用いた電子顕微鏡観察においても網膜変性が確認され，更に3及び7.5/5 mg/kg/日の眼球組織標本を用いた免疫組織化学的検査では，アストロサイト及びミュラー細胞におけるグリア線維性酸性蛋白質（GFAP）の多巣性の発現増加が認められ，網膜変性部位における反応性グリオーシスが示唆された。また，7.5/5 mg/kg/日の雌雄では，眼瞼を含む皮膚において表皮過形成（肉眼的な表皮剥離に一致）が認められ，7.5/5 mg/kg/日の雌では胸腺の萎縮（胸腺重量低値及び剖検における胸腺の小型に一致）が認められた。

22週間の休薬期間終了時において，網膜中間部から辺縁部における変性は7.5/5 mg/kg/日の雌雄で認められ，本薬投与に関連した眼の変化は休薬期間中に回復しないと考えられた。しかし，休薬期間終了時において内顆粒層の空胞化は存在せず，休薬期間中に ERG 電位の増加が認められた。また，7.5/5 mg/kg/日でみられた皮膚及び胸腺の変化は休薬期間終了時には認められず，これらの所見が休薬により完全に回復することが示唆された。その他の検査において，本薬投与に関連した変化は認められなかった。

試験期間を通じて，血漿中リスジプラム濃度の $AUC_{0\text{-}24h}$ は，1.5～5 mg/kg/日の範囲において概ね用量に比例して増加した。また反復投与による蓄積及び性差は認められなかった。投与期

間終了時（39週目）のすべての生体試料（血漿，脳脊髄液，脳，皮膚及び眼組織）でリスジプラムが検出され，休薬期間終了時（61週目）には4例中2例の皮膚，及びほぼすべての眼組織試料においてリスジプラムが検出された。全体として，22週間の休薬期間中に眼組織中のリスジプラム濃度の減少が認められた（投与期間終了時の56～99%）。

以上のとおり，3及び7.5/5 mg/kg/日で網膜及び血液への影響，7.5/5 mg/kg/日で皮膚及び胸腺への影響が認められたことから，本試験におけるリスジプラムの NOAEL は，1.5 mg/kg/日（39週目における $AUC_{0\text{-}24h}$ [雄/雌]：1870/2060 ng•h/mL）と判断した。
なお，本試験では若齢のカニクイザルを用いたため，ほとんどの個体において，投与期間終了時における精巣が未成熟の状態であった。このことから，本試験において，リスジプラムの精巣に対する影響を評価することはできなかった。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

リスジプラムの *in vitro* 遺伝毒性試験として，細菌を用いる復帰突然変異試験及びマウスリンフォーマ細胞を用いる小核スクリーニング試験（非 GLP）を実施した。また *in vivo* 試験として，ラット小核／コメット試験を実施し，更にラット反復投与毒性試験においても小核誘発性の評価を行った。*In vitro* 及び *in vivo* 試験において，本薬による小核誘発が確認されたことから，小核誘発の機序に関する *in vitro* 試験，並びに *in vivo* における小核誘発の用量反応解析も行った。

2.6.6.4.1 細菌を用いる復帰突然変異試験

（資料番号 4.2.3.3.1-1）

リスジプラムの遺伝子突然誘発性について，ネズミチフス菌5菌株（TA1535，TA97，TA98，TA100及び TA102）を用いた復帰突然変異試験により評価した。試験はプレート法により，代謝活性化系（ラット肝 S9）の存在下又は非存在下の条件で実施した。本試験では純度の異なる2つの被験物質を用いて，15.8～5000 µg/plate の濃度範囲で試験を行った。

試験結果を表2.6.7.8.1-1に示した。
最初に低純度品（純度[redacted]%）について，クエン酸緩衝液を溶媒とした試験を行った結果，代謝活性化系存在下において，TA98株の復帰変異コロニー数のわずかな増加が認められた。クエン酸緩衝液中での被験物質が不安定である可能性が考えられたことから，代わりの溶媒としてアスコルビン酸／チオ硫酸緩衝液を用いた試験を追加実施した。しかし，この試験においても同様に，代謝活性化系存在下において TA98株の復帰変異コロニー数のわずかな増加（溶媒対照の2.1倍で試験施設の溶媒対照における背景値の範囲内）が認められた。別ロットを用いた非 GLP スクリーニング試験[6)] において復帰突然変異誘発性は認められていなかったことから，本試験に用いた被験物質の純度が低く，未知の不純物により変異原性が生じた可能性が考えられた。
このことから，高度に精製した被験物質の別ロット（純度[redacted]%[redacted]）について，アスコルビン酸／チオ硫酸緩衝液を溶媒とした試験を更に実施した。高純度品を用いた試験において，代謝活性化系存在下及び非存在下のいずれにおいても，TA98を含む5菌株の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から，高純度の被験物質及びアスコルビン酸／チオ硫酸緩衝液を溶媒として用いた本試験条件下において，リスジプラムは代謝活性化系の存在下又は非存在下において，細菌に対する遺伝子突然変異誘発性を有さないと判断した。

なお，別途実施した TA98株を用いた非 GLP 試験では，本試験で用いた同一ロットの高純度

品[7] 及び低純度品を更に精製したロット[8] のいずれにおいても，代謝活性化系存在下での復帰変異コロニー数が，溶媒対照と比較してわずかに増加した。しかし，その値は試験施設における溶媒対照の背景値の範囲内であった。

2.6.6.4.2 マウスリンフォーマ細胞を用いる *in vitro* 小核スクリーニング試験

（資料番号 4.2.3.3.1-2）

リスジプラムの *in vitro* における染色体構造異常及び異数性誘発性について検討するため，マウスリンフォーマ細胞（L5178Y $tk^{+/-}$）を用いた小核スクリーニング試験を非 GLP 下で実施した。試験細胞に本薬を添加して24時間培養後，本薬を含まない培養液に交換して更に24時間培養した。事前に実施した細胞傷害性及び培養液中の沈澱形成に関する予備試験結果に基づき，本薬の濃度は，24時間処理で0.5～20 μg/mL，24時間処理＋24時間回復で0.5～2.0 μg/mL とした。

試験結果を表2.6.7.8.2-1に示した。

24時間処理では，10 μg/mL で小核を有する細胞の増加（3.7%）が認められ，20 μg/mL で最大（4.4%）となった。また，小核誘発は，細胞毒性との関連がみられた（培養液のみと比較した相対細胞数は，10 μg/mL で50%，20 μg/mL で44%）。

24時間処理＋24時間回復では，明らかな細胞毒性を示さない1 μg/mL から小核誘発が認められ，2 μg/mL で最大の10.3%を示した（この濃度では強い細胞毒性がみられ，培養液のみと比較した相対細胞数は42%であった）。

以上の結果から，リスジプラムは *in vitro* において，代謝活性化系の非存在下で染色体異常（構造異常又は異数性）誘発性を有すると判断された。

2.6.6.4.3 *In vitro* 小核試験（機序解析試験）

（資料番号 4.2.3.3.1-3）

リスジプラムの小核誘発作用の機序について詳細に検討するため，ヒトリンパ芽球細胞株（TK6）又はマウスリンフォーマ細胞株（L5178Y）を用いた *in vitro* 試験を実施した。具体的には，DNA 傷害性反応（DDR）経路の解析，4, 6-diamidin-2-phenylindol（DAPI）を用いた細胞周期解析，並びにアポトーシス阻害剤の存在下及び非存在下での小核試験を実施した。

試験結果を表2.6.7.8.3-1に示した。

1) DDR 経路解析

ヒト TK6細胞にリスジプラムを添加して種々の条件（代謝活性化系存在下又は非存在下，本薬処理後の回復期間あり又はなし）で培養したときの細胞周期に与える影響について検討した。以下の直接的又は間接的 DNA 傷害性マーカー（DNA2本鎖切断のマーカーと考えられるγH2AX，アポトーシスのマーカーと考えられる切断型ポリ(ADP–リボース)ポリメラーゼ（cleaved PARP），有糸分裂のマーカーと考えられるリン酸化ヒストン H3（phospho-H3）及び倍数性及び細胞周期のマーカーと考えられる DNA 含量）について評価した。すべての測定はフローサイトメトリーを用いて行い，細胞数のカウントは生存細胞について行った。

細胞毒性が代謝活性化系非存在下で約5～10 μmol/L，代謝活性化系存在下で約50 μmol/L の濃度から認められた。代謝活性化系非存在下の24時間処理において，再現性を有する明確で濃度依存的なアポトーシス細胞（cleaved PARP 陽性細胞）の比率増加が5 μmol/L 以上の濃度で認められた。また，細胞毒性を示す高濃度（> 20 μmol/L）において，γH2AX 蛍光強度の中央値のシフトがみられた。いくつかの試験では，細胞毒性を示さない濃度において，有糸分裂細胞（phospho-H3陽性細胞）及び倍数性細胞の頻度の増加が認められた。

引き続いて実施した代謝活性化系存在下3時間処理及び21時間回復においては，非常に高い濃度（約50 μmol/L 以上）のみで，細胞毒性，アポトーシス（cleaved PARP）及び弱い倍数性が

認められた。

2) 細胞周期解析

ヒト TK6細胞を用いた代謝活性化系非存在下24時間処理において，アポトーシス誘導を示唆する≤2n DNA 量の細胞の比率（sub-G1ピーク）の増加が5 µmol/L 以上の濃度で認められた。高濃度では G1/G0，S 及び G2/M 期の細胞の比率の減少が認められ，細胞毒性に関連していると考えられた。代謝活性化系存在下短時間処理においては，高濃度で同様の変化がみられたが，変化の程度は弱かった。

3) アポトーシス阻害剤の存在下及び非存在下での小核試験

ヒト TK6細胞及びマウス L5178Y 細胞を種々の濃度（最高30 µmol/L）のリスジプラムで処理したときの小核誘発性について評価した。別途実施した *in vitro* 試験（2.6.6.4.2）及び *in vivo* 試験（2.6.6.4.4）と同様に，本薬処理による強い小核誘発作用が認められた。また，低倍数性作用が随伴して認められたことから，異数性誘発作用が示唆された。

小核誘発は，カスパーゼ阻害剤の前処理により抑制された。カスパーゼはアポトーシスにおいて重要な役割を果たしており，また，細胞周期制御及び他の細胞内プロセスにも関与していることが良く知られているが，カスパーゼ活性化が小核形成の原因と関連しているかどうかは明らかではない。

本試験及び細菌を用いる復帰突然変異試験（2.6.6.4.1）の結果から，リスジプラムは DNA に対する直接的な反応性を有さず，小核誘発は間接的な機序が関連することが示唆された。具体的には，ヒト TK6細胞を用いた試験において，細胞が生存する濃度において直接的な DNA 反応性に起因する染色体構造異常誘発性は認められなかったことから，本薬の小核誘発の機序は，異数性誘発性によるものであることが推察された。

2.6.6.4.4 ラット小核／コメット試験

（資料番号 4.2.3.3.2-1）

リスジプラムの *in vivo* での遺伝毒性について検討するため，雄ラットを用いた小核試験（骨髄）にコメット試験（肝臓及び空腸）を組み合わせて実施した。Wistar Hannover ラット（各群雄5例）にリスジプラムを0（溶媒），0.75，1.5，3，6，12.5及び25 mg/kg/日の用量で3日間経口投与し，最終投与の約1時間後に剖検した。陽性対照物質として，小核試験ではシクロフォスファミド，コメット試験ではエチルメタンスルホン酸を用いた。小核試験はすべての用量での評価を行ったが，コメット試験は0（溶媒），6，12.5及び25 mg/kg/日のみ評価した。

本試験の投与量は，非 GLP 下での用量設定試験の結果に基づき設定した。すなわち，50又は100 mg/kg/日を投与したとき，いずれの用量においても骨髄毒性を示唆する多染色性赤血球／正染性赤血球比の減少が認められたことから，本試験における最高用量を25 mg/kg/日とし，以下，用量反応性を確認するため12.5，6，3，1.5及び0.75 mg/kg/日を設定した

なお，本試験に先立って実施した非 GLP 下での雄ラットを用いた小核／コメット試験[9)] では，リスジプラムの0.15, 0.5及び1.5 mg/kg/日の3日間投与による影響は認められなかった。

試験結果を表2.6.7.9.1-1に示した。

小核試験では，6 mg/kg/日以上で骨髄小核誘発が認められ，本試験における遺伝毒性の無影響量（NOGEL）は，3 mg/kg/日（3日目における C_{max}：260 ng/mL，$AUC_{0\text{-}24h}$：3800 ng•h/mL）と判断した。なお，最高用量の25 mg/kg/日では，骨髄毒性を示唆する多染色性赤血球／正染性赤血球比の減少も認められた。肝臓及び空腸のコメット試験では，最高用量の25 mg/kg/日まで DNA 鎖切断を示唆する変化は認められなかった。

2.6.6.4.5 ラット反復投与試験における小核誘発性の評価

（資料番号 4.2.3.2-4，4.2.3.5.4-4）

ラットを用いた4週間反復投与試験（2.6.6.3.4）において，3及び9 mg/kg/日で小核を有する多染性赤血球の増加が認められたが，3 mg/kg/日の多くの個別値は，対照群の背景値の範囲内であった（表2.6.7.9.2-1）。

また，幼若ラットを用いた13週間投与試験（2.6.6.6.5.3）では，7.5 mg/kg/日で小核を有する多染性赤血球の有意な増加が認められた（表2.6.7.9.3-1）。

2.6.6.4.6 ラット小核誘発に関する用量反応解析

（資料番号 4.2.3.3.2-2）

包括的な統計学的手法により，リスジプラムのラットにおける小核誘発の用量反応性について検討した。具体的には，ラットを用いた *in vivo* 小核試験における各個体の小核データ及び曝露量（$AUC_{0\text{-}24h}$）をプロットし，critical effect size を0.5（すなわち，対照群の平均値と比較して50%の増加を，小核誘発のベンチマークとする）として，PROAST ソフトウェア[10)，11)] を用いて解析を行った。

試験結果を表2.6.7.9.4-1に示した。

ラット急性投与（小核／コメット試験，2.6.6.4.4），4週間及び13週間投与（2.6.6.4.5）での小核誘発のベンチマークドーズにおける $AUC_{0\text{-}24h}$ の90%信頼限界の下限値（BMDL）は，それぞれ2915，3777及び4849 ng•h/mL であった。また，C_{max} の BMDL は，それぞれ236，485及び492 ng/mL であった。

これらの結果から，小核誘発に関する遺伝毒性の無影響量（NOGEL）における曝露量（$AUC_{0\text{-}24h}$）は，少なくとも約3000 ng•h/mL と判断された。本解析の結果から NOGEL の値は投与期間延長に応じて増加し，幼若動物は成熟動物よりも感受性が高くないことが推察された。

2.6.6.5 がん原性試験

本薬のがん原性試験として，rasH2トランスジェニックマウスを用いた26週間投与試験を実施した。なお，本薬は生命を脅かす重篤な疾患に対する治療薬であることから，ICH M3(R2)及びICH S1C(R2)ガイドラインを考慮し，ラットを用いた2年間投与によるがん原性試験は本薬の承認申請後に開始し，当該試験成績を本薬の製造販売承認後に提出予定である。

2.6.6.5.1 rasH2マウス26週間投与試験

（資料番号 4.2.3.4.2-1）

001178-T（半接合性）rasH2トランスジェニックマウス（各群雌雄各25例）にリスジプラムを0 （溶媒），0（水），1，3又は9 mg/kg の用量で26週間反復経口投与した。陽性対照群（各群雌雄各20例）には N-methyl-N-nitrosourea（MNU）の75 mg/kg を投与期間の初日に単回腹腔内投与した。TK サテライト群（001178-W（野生型）rasH2マウスを使用）として各群雌雄各6例（0 mg/kg 群）又は各群雌雄各30例（リスジプラム投与群）を設定し，血漿中薬物濃度測定のための血液採取に供した。

本試験の投与量は，先に実施した野生型 rasH2マウスを用いた4週間投与試験（2.6.6.3.2）の結果に基づき設定した。

試験結果を表2.6.7.10.1-1に示した。

リスジプラムの投与に関連した死亡例は認められず，一般状態，体重，体重増加量及び摂餌量の変化も認められなかった。溶媒又は水投与群で4例，リスジプラム投与群の7例が偶発的な死亡又は全身状態悪化により安楽死処置された。また，陽性対照群の雄13例及び雌15例が死亡

発見又は早期剖検されたが，これらの動物では陽性対照物質（MNU）投与による明確な発がん性が確認された。

リスジプラム投与による血液学的検査値，生存性，死因又は全身状態悪化への影響は認められなかった。また，投薬に関連した肉眼的及び病理組織学的変化も認められず，本薬投与による腫瘍発生頻度への影響も認められなかった。

血漿中リスジプラム及び代謝物 M1濃度は，いずれも1～9 mg/kg/日の範囲で概ね用量に比例して増加し，26週間の投与期間中に明らかな変化は認められなかった。雌雄の曝露量（$AUC_{0\text{-}24h}$）は類似しており，未変化体（リスジプラム）に対する代謝物M1の比率（雌雄合算平均値の比較）は5～18%であった。

以上の結果から，本試験条件下におけるリスジプラムの NOAEL は，9 mg/kg/日（179日目における $AUC_{0\text{-}24h}$ [雄/雌]：15600/11800 ng·h/mL）と判断した。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

本薬の生殖発生毒性試験として，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体の機能に関する試験を実施した。受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験は実施していないが，幼若ラットを用いた4週間及び13週間投与試験において，雌雄受胎能を含めた生殖機能の評価を行った。

2.6.6.6.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

本薬について，受胎能及び着床までの初期胚発生に関する独立した試験は実施していないが，幼若ラットを用いた4週間投与試験（2.6.6.6.5.2）及び13週間投与試験（2.6.6.6.5.3）において，雌雄受胎能を含めた生殖機能の評価を行った。生後4～31日目まで投与を行った幼若ラット4週間投与試験では，2.5 mg/kg/日で投与期間終了時の精巣及び精巣上体重量が対照群と比較して低値を示し，病理組織学的検査では精細管上皮変性が認められた。8週間の休薬期間終了時においても精巣及び精巣上体重量はわずかに低下したままであったが，病理組織学的な異常は認められず，精子検査及び雄の生殖能にも異常は認められなかった。離乳後直ちに（生後22日目）投与を開始した幼若ラット13週間投与試験では，7.5 mg/kg/日で投与期間終了後の交配期間終了時点における精子濃度及び精子運動性の低下，並びに精子の形態異常が認められたが，生殖能（無処置動物との交配及び授胎能）に影響は認められなかった。また，両試験において，雌の生殖能に影響は認められなかった。

2.6.6.6.2 ラット胚・胎児発生に関する試験

（資料番号 4.2.3.5.2-2）

妊娠雌ラット（Wistar Hannover，各群22例）にリスジプラムを0（溶媒），1，3又は7.5 mg/kg/日の用量で妊娠6～17日目まで反復経口投与し，妊娠21日目に帝王切開した。TK サテライト群として各群2例を設定し，投与期間中の血漿中薬物濃度（未変化体及び代謝物 M1）測定のための血液採取に供した。本試験の投与量は，先に実施した用量設定試験（本試験と同一用量，4.2.3.5.2-1，表2.6.7.13.1-1）の結果に基づき設定した。

試験結果を表2.6.7.13.2-1に示した。

試験期間中に死亡例は認められず，本薬投与に関連した一般状態異常及び剖検所見は認められなかった。7.5 mg/kg/日で妊娠13日目以降の体重増加量が低値を示し，投与期間中の平均体重増加量は対照群より14%低かった。7.5 mg/kg/日の妊娠14～18日目における体重は，対照群と比較して有意に低かった。妊娠子宮重量を除いた母体体重増加量に影響はみられなかったことから，母体体重への影響の少なくとも一部は，胎児重量が低いことに関連していると考えられた。7.5 mg/kg/日では，投与期間を通じて軽度の摂餌量低値（妊娠6～18日，対照群と比較して

−12%）も認められた。

リスジプラム投与による子宮及び卵巣パラメータへの影響は認められなかった。7.5 mg/kg/日で有意な胎児重量低値（対照群の−15%）が認められた。外表及び内臓検査において本薬投与に関連した異常はみられなかったが，骨格検査において胸骨分節及び／又は胸椎椎体の骨化減少（変異）を所見とする胎児の発育遅延が認められ，胎児重量の低値と一致していた。胚致死性（胚・胎児死亡）及び胎児形態異常（催奇形性）は認められなかった。

妊娠6及び15日目における血漿中リスジプラムの $AUC_{0\text{-}24h}$ は，1～7.5 mg/k/日の範囲で用量に比例して増加し，投与期間中の蓄積は認められなかった。代謝物 M1の曝露量は，未変化体と比較して低かった（AUC 比：0.113～0.180）。

以上のとおり，7.5 mg/kg/日で母動物及び胎児への影響が認められたことから，本試験条件下におけるリスジプラムの NOAEL は，3 mg/kg/日（妊娠15日目における $AUC_{0\text{-}24h}$：4630 ng•h/mL）と判断した。

2.6.6.6.3 ウサギ胚・胎児発生に関する試験

（資料番号 4.2.3.5.2-5）

妊娠雌ウサギ（ニュージーランドホワイト種，各群22例）にリスジプラムを0（溶媒），1，4又は12 mg/kg/日の用量で妊娠6～19日目まで反復経口投与し，妊娠29日目に帝王切開した。血漿中薬物濃度（未変化体及び代謝物 M1）は，各群2例から採取した血液を用いて評価した。

本試験の投与量は，先に実施した非妊娠ウサギを用いた予備毒性試験（4.2.3.5.2-3，表2.6.7.11-1）及び妊娠ウサギを用いた用量設定試験（4.2.3.5.2-4，表2.6.7.13.3-1）の結果に基づき設定した。すなわち，非妊娠ウサギを用いた予備毒性試験（投与量：3，8又は16 mg/kg/日，8日間投与）では，16 mg/kg/日で摂餌量の減少が認められ，更に用量依存的な体重減少（−2.6～−6.5%）及び糞排泄の減少が認められた。妊娠ウサギを用いた用量設定試験（投与量：3，6又は12 mg/kg/日，妊娠6～19日目に投与，各群9例）では，12 mg/kg/日で母体毒性（摂餌量低値，体重減少及び体重増加量低値）及び胚・胎児致死の増加がみられ，更に形態異常を有する胎児が3，6及び12 mg/kg/日でそれぞれ4例（4母体），1例及び5例（4母体）認められた（対照群は胎児異常なし）。用量設定試験において胎児の変化に対するリスジプラムの影響について判断することができなかったことから，本試験では低用量を1 mg/kg/日とし，中及び高用量を4及び12 mg/kg/日とした。

試験結果を表2.6.7.13.4-1に示した。

12 mg/kg/日の2例で投与期間中の持続的な摂餌量低値及び流産が認められたため，安楽死処置を行った。摂餌量低値を示した同群の他の1例についても全身状態悪化により早期に安楽死処置した。これら3例の剖検において，本薬投与に関連する変化は認められなかった。

12 mg/kg/日では糞排泄の減少及び糞の小型化がみられ，妊娠8日目以降の投与期間中の摂餌量低値と関連していた。また，妊娠6～20日目に体重減少が認められ，妊娠19及び20日目の体重は，対照群と比較して有意な低値を示した。同群では投与期間終了時から剖検（帝王切開）時（妊娠20～29日目）までの体重増加量が高値を示した。血液学的検査では，体重への影響の二次的作用と考えられる軽微～軽度の変化がみられたが，いずれも有害な変化ではないと考えられた。剖検では異常は認められなかった。

12 mg/kg/日では，対照群と比較して後期胚吸収の明らかな高値が認められ，試験施設の背景値を上回っていた。この変化は，主に長期にわたる摂餌量の低値に関連したものと考えられた。また，生存児を出産した雌のみで評価したとき，12 mg/kg/日の生存胎児数がわずかに低値であった。

対照群と比較して，胎児重量に明らかな差はみられなかった。12 mg/kg/日において水頭症（形態異常の所見の一つ）を示す胎児の比率増加（4例の母体[22.2%]からの胎児4例[4.03%]）

が認められた。この用量では重度の母体毒性が認められたものの，4例の水頭症発現とリスジプラムとの関連性を完全に否定することはできない。12 mg/kg/日の胎児では，副肺葉の欠損（変異）を有する胎児の比率増加及び小型の胆嚢（変異）を有する胎児の比率のわずかな増加も認められた。

妊娠6及び15日目における血漿中リスジプラムの $AUC_{0\text{-}24h}$ は，1～12 mg/kg/日の範囲で概ね用量比以上の増加を示したが，投与期間中の蓄積は認められなかった。代謝物 M1の曝露量は，未変化体と比較して低かった（AUC 比：0.020～0.058）。

以上のとおり，12 mg/kg/日で母動物及び胎児への影響が認められたことから，本試験条件下におけるリスジプラムの NOAEL は，4 mg/kg/日（妊娠15日目における $AUC_{0\text{-}24h}$：7990 ng•h/mL）と判断した。

2.6.6.6.4 ラット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

（資料番号 4.2.3.5.3-2）

妊娠雌ラット（Wistar Hannover，各群22例）にリスジプラムを0（溶媒），0.75，1，又は3 mg/kg/日の用量で妊娠6日目～授乳20日目まで反復経口投与し，授乳21日目に剖検した。TK サテライト群として各群2例を設定し，投与期間中の血漿中薬物濃度（未変化体及び代謝物 M1）測定のための血液採取に供した。授乳4日目に，各母動物につき8例（可能な限り雌雄各4例）の出生児を選抜し，残りの個体は安楽死処置した。また，授乳21日目（離乳日）に，上記の選抜個体のうち雌雄各1例を，身体的及び機能的発達（行動機能を含む）及び生殖機能評価用として選抜した。更に，異なる母動物由来の雌出生児を各群につき10例選抜し，離乳日における卵巣の原始卵胞及び一次卵母細胞数のカウントに供した。

本試験の投与量は，先に実施した胚・胎児発生に関する試験（2.6.6.6.2）及び出生前及び出生後の発生に関する用量設定試験（4.2.3.5.3-1，表2.6.7.14.1-1）の結果に基づき設定した。すなわち，胚・胎児発生試験では，7.5 mg/kg/日で母動物の体重増加抑制及び胎児の発育遅延が認められ，出生前及び出生後の発生に関する用量設定試験では，1，3，及び7.5 mg/kg/日を妊娠6日目～授乳6日目まで投与した結果，3 mg/kg/日以上で妊娠期間延長がみられ，更に7.5 mg/kg/日では難産のため6例中3例を安楽死処置した。また，7.5 mg/kg/日の生存児数及び胎児の体重増加量が対照群よりも低かった。これらの結果から，7.5 mg/kg/日はラットの周産期における MTD を超えていると考えられたことから，本試験では最高用量を3 mg/kg/日とし，以下，1.5及び0.75 mg/kg/日を中及び低用量として設定した。

試験結果を表2.6.7.14.2-1に示した。

母動物（F0）に死亡例は認められず，一般状態，体重，摂餌量及び剖検における異常は認められなかった。3 mg/kg/日で統計学的に有意な妊娠期間の延長（21例中18例で妊娠期間が22日以上）が認められ，本薬投与による変化と考えられたが，妊娠期間の群平均値は試験施設の背景値の範囲内であったことから有害な変化ではないと判断した。3 mg/kg/日の1例では難産も認められた。その他，母体機能に対する影響は認められなかった。

出生児（F1）の生存性，授乳率，一般状態及び剖検における影響は認められず，形態異常を有する F1も認められなかった。3 mg/kg/日で雌及び雌雄合算の出生時体重が対照群と比較してわずかに高かったが，同群のわずかな妊娠期間延長に関連したものと考えられた。その後の授乳期間における出生児体重は，全ての用量で対照群と同様であった。

離乳後の F1においても，本薬に関連した死亡，一般状態及び剖検における異常は認められなかった。離乳後の体重は，対照群と同様であった。また，出生後の身体的及び機能的発達に関するパラメータ（膣開口，包皮分離，運動機能，聴覚性驚愕馴化，Cincinnati 水迷路）の変化はみられず，F1の性周期及び生殖機能に対する影響も認められなかった。3 mg/kg/日で黄体数，1.5及び3 mg/kg/日で着床数及び生存胚数のわずかな減少が認められたが，これらの変化は試験

施設の背景値の範囲内であり，有害な変化ではないと判断した。その他の子宮／卵巣パラメータは対照群と同様であり，本薬による影響は認められなかった。

F0における血漿中リスジプラム及び代謝物 M1の AUC は，0.75～3 mg/kg/日の範囲で概ね用量に比例して増加した（0.75～1.5 mg/kg/日の妊娠15日目における用量比以上の血漿中リスジプラム濃度増加，並びに妊娠7日目及び授乳7日目における用量比以上の血漿中代謝物 M1濃度の増加を除く）。妊娠6日目と比較して，妊娠15日目及び授乳7日目の血漿中リスジプラム濃度は同様であった。代謝物 M1については，妊娠6日目と比較して妊娠15日目は同様であったが，授乳7日目には軽度の曝露量低下がみられた。すべての採血時点において，代謝物 M1の曝露量は未変化体と比較して低く，代謝物 M1の未変化体に対する AUC の比は0.12～0.21であった。F1では，0.75 mg/kg/日の一部の個体，並びに1.5及び3 mg/kg/日の全例で授乳7日目における血漿中リスジプラム及び代謝物 M1の曝露が確認された。$AUC_{0\text{-}24h}$ は概ね用量に比例しており，妊娠7日目の曝露量（リスジプラム及び代謝物 M1）は F1よりも F0が高く，代謝物 M1の曝露量は未変化体よりも低かった。

以上のとおり，3 mg/kg/日でわずかな妊娠期間延長が認められたものの，母動物及び出生児におけるその他の検査項目に異常は認められなかったことから，本試験におけるリスジプラムの NOAEL は，3 mg/kg/日（授乳7日目における F0及び F1の $AUC_{0\text{-}24h}$：4230及び381 ng•h/mL）と判断した。

2.6.6.6.5 新生児を用いた試験

リスジプラムの幼若毒性の評価は，幼若ラットを用いた13週間までの反復投与試験及び若齢（2歳齢）カニクイザルを用いた39週間投与試験（2.6.6.3.9）において実施した。幼若ラットを用いた試験では，一般毒性に加えて，幼若動物の身体的及び機能的発達に関する評価も組み入れた。

2.6.6.6.5.1 幼若ラット反復投与試験（用量設定試験）

（資料番号 4.2.3.5.4-1）

離乳前（生後4日目）の Wistar Hannover ラット（各群雌雄各6例）にリスジプラムの0（溶媒），2.5，5又は10 mg/kg/日を4週間（生後4～31日目まで）反復経口投与した。5及び10 mg/kg/群で死亡例が認められたため，3.75 mg/kg/日の用量を追加設定したが，この用量においても死亡例が認められたため，更に離乳後（生後22日目）から投与を開始する群（0［溶媒］，1，3又は9 mg/kg/日の2週間［生後22～36日目］投与，各群雌雄各4例）を設定した。それぞれの用量について別途 TK サテライト群を設定した。

試験結果を表2.6.7.15.1-1に示した。

3.75，5及び10 mg/kg/日では生後6～11日目にかけて死亡又は全身状態悪化例が認められ，その発生率は，それぞれ8.3，50及び100%であった。また，種々の一般状態異常，体重減少及び／又は体重増加量の低値も認められた。一方，生後22日目から投与を開始した群では，最高用量の9 mg/kg/日まで，一般状態，体重，摂餌量，器官重量及び剖検における異常は認められなかった。

2.5及び3.75 mg/kg/日の生後4日目の血漿中リスジプラム濃度は，生後31日目の0.5及び0.7倍であった。一方，生後22～36日目に投与した1及び3 mg/kg/日の雌では，反復投与により曝露量が約2倍に増加していた。離乳前及び離乳後のラットを用いた追加検討において，加齢によるリスジプラムの血中半減期短縮及び血漿蛋白結合の増加が示された（2.6.4.4.2）ことから，これらのことにより離乳前及び離乳後動物の忍容性が異なったものと推察された。

2.6.6.6.5.2 幼若ラット4週間投与試験（8週間回復性試験）

（資料番号 4.2.3.5.4-3）

生後4日目の Wistar Hannover ラット（各群雌雄各12例）にリスジプラムの0（溶媒），0.75，1.5又は2.5 mg/kg/日を4週間反復経口投与し，最終投与翌日（生後32日目）に剖検した。また，各群雄20例及び雌40例のサテライト群を設定し，最終投与後8週間での回復性を含めた幼若動物の発達及び生殖能の評価に供した。更に，別途 TK サテライト群（各群雌雄12例［0 mg/kg群］）又は28例［リスジプラム投与群］）も設定し，投与期間中の血漿中薬物濃度測定のための採血に供した。なお，試験動物は生後21日目に母動物から離乳させた。

本試験では，幼若動物発達に関する項目として，身体的発達（性成熟），長骨の成長，行動学的検査（機能観察総合評価法［FOB］，運動機能，聴覚性驚愕馴化，Cincinnati水迷路），生殖機能（性周期，生殖能［交配及び受胎能］，精子検査［濃度，形態及び運動能］，妊娠13日目の卵巣及び子宮検査），血漿蛋白結合及びイムノフェノタイピングの評価も行った。生殖能については，生後12又は13週目（87 ± 4日）から無処置動物と交配（最長14日間）させることにより評価し，更に，雌については本薬を投与した雄との交配による評価も行った。

なお，先に実施した離乳前ラットを用いた4週間投与試験（4週間回復性試験）（投与量：0，1又は2.5 mg/kg/日，4.2.3.5.4-2，表2.6.7.15.2-1）では，雄の生殖能評価を実施せず，精巣に対する NOAEL を決定することができなかったことから，再評価を目的として本試験を実施した。

試験結果を表2.6.7.15.3-1に示した。

試験期間中に死亡例は認められなかった。本薬投与に関連した有害でないと考えられる一般状態所見として，一部の個体で脱水の徴候及び痩せが認められた。本薬投与に関連した神経行動学的パラメータの変化は認められなかった。

1.5及び2.5 mg/kg/日では投与期間を通じて体重増加量の低値（投与期間終了時の平均体重は，対照群と比較して2.5 mg/kg/日で−14% (雄)又は−11% (雌)，1.5 mg/kg/日で−4% (雄)及び−7% (雌)）が認められた。2.5 mg/kg/日におけるこの変化は，雄のみでみられた投与開始後早期の軽度の摂餌量低下と関連していた。体重の低値に関連して，1.5及び2.5 mg/kg/日では包皮分離日の有意な遅延がみられたが，雄の授胎能に影響が認められなかったことから有害な変化ではないと判断した。2.5 mg/kg/日では雌の体重は8週間の休薬期間終了時までに対照群と同程度まで回復したが，雄では依然として有意な低値（−9%）を示した。

離乳前期間を通じて，2.5 mg/kg/日で軽度かつ有意な脛骨長の低値が認められ，雌雄とも休薬期間終了時まで持続した。この所見は体重の低値と関連し，全身の成長の遅延を示唆する変化と考えられた。眼科学的所検査では，2.5 mg/kg/日の離乳直後の個体で硝子体前部における多数の小空胞が認められたが，この変化は2.5 mg/kg/日のいずれの個体においても生後4週目以降は認められなかった。この小空胞はサイズが小さく，辺縁部に限局した一過性の変化であることから，有害な変化ではないと判断した。

本薬投与に関連した性周期及び子宮／卵巣パラメータへの影響は認められなかった。生殖能評価（平均交配日，交配率及び妊娠率）では，無処置の雄と交配させた2.5 mg/kg/日の雌で交配率及び妊娠率の軽度の低下が認められたが，統計学的に有意ではなく，関連する卵巣及び子宮の変化も認められなかったことから，有害な変化ではないと判断した。本薬を投与した雄を無処置の雌と交配させたときの生殖能に影響は認められなかった。

血液学的検査では，2.5 mg/kg/日の雄で可逆的かつ軽微なリンパ球減少が認められた。2.5 mg/kg/日の雄及び0.75 mg/kg/日以上の雌では，本薬投与に関連した軽度の有害でないと考えられる B リンパ球の比率及び絶対数の低下が認められた。本薬投与に関連した血液化学的検査，血液凝固検査及び尿検査パラメータの変化は認められなかった。

1.5 mg/kg/日以上の雄で，休薬期間終了時まで持続する精巣及び精巣上体重量の低値が認められ，2.5 mg/kg/日では病理組織学的検査において可逆的な精巣の精細管上皮変性が認められた。しかし，精子検査ではいずれの用量においても本薬投与に関連した変化は認められなかった。

血漿中リスジプラム及び代謝物 M1濃度は，0.75～2.5 mg/kg/日の範囲で用量にほぼ比例して増加した（0.75～1.5 mg/kg/日の生後4日目の雌雄及び生後31日目の雄における用量比以上の血漿中代謝物 M1濃度の増加を除く）。リスジプラムの曝露量は，生後4日目と比較したとき生後12日目に明らかな増加（2.60～3.34倍）が認められ，生後31日目には生後4日目と同程度まで回復した。代謝物 M1の曝露量は生後12日目に僅かな変化がみられたが，生後31日目は生後4日目と同程度であった。すべての時点において，血漿中リスジプラム及び代謝物 M1濃度に性差は認められず，代謝物 M1の曝露量は未変化体（リスジプラム）よりも低かった（AUC 比：0.163～0.380）。

以上のとおり，2.5 mg/kg/日で10%を超える体重の低値，及び精巣の病理組織学的変化が認められたことから，本試験条件下におけるリスジプラムの NOAEL は，1.5 mg/kg/日（生後31日目における $AUC_{0\text{-}24h}$ [雄/雌]：1570/1880 ng•h/mL）と判断した。

2.6.6.6.5.3 幼若ラット13週間投与試験（8週間回復性試験）

（資料番号 4.2.3.5.4-4）

生後22日目の Wistar Hannover ラット（各群雌雄各38例）にリスジプラムの0（溶媒），1，3又は7.5 mg/kg/日を13週間（生後22～112日目まで）反復経口投与した。各群雌雄各12例を投与期間終了時に剖検し，各群雌雄各6例を休薬期間終了時に剖検した。また，各群雌雄各20例を生殖能及び行動学的評価に供した。更に，TK 及び免疫毒性評価のためのサテライト群を別途設定した。なお，本試験には骨髄小核試験も組み入れたため，陽性対照群（シクロフォスファミド，20 mg/kg を剖検の約24時間前に単回投与，雌雄各3例）も設定した。

本試験では，幼若動物発達に関する項目として，性成熟（膣開口及び包皮分離），行動学的試験，長骨測定，免疫機能（T 細胞依存性抗体産生及びイムノフェノタイピング）及び生殖機能（精子検査を含む）の評価も行った。雌雄生殖能については，13週間の投与期間終了翌日から，無処置の雄又は雌と交配（最長14日間）させることにより評価した。

本試験の投与量は，先に実施した用量設定試験（2.6.6.6.5.1）の結果に基づき設定した。すなわち，離乳後ラットへの2週間投与では9 mg/kg/日までの用量で異常は認められなかったものの，離乳前ラットでは3.75 mg/kg/日以上の用量で死亡例が認められており，幼若動物では本薬に対して感受性が高い可能性が考えられたことから，13週間の投与期間も考慮し，高用量を7.5 mg/kg/日とし，以下3及び1 mg/kg/日を中及び低用量として設定した。

試験結果を表2.6.7.15.4-1に示した。

試験期間中に死亡例は認められなかった。また，本薬投与に関連した一般状態，体重，摂餌量，血液凝固検査，尿検査，長骨検査，性成熟，骨髄検査，行動学的検査，生殖能，眼科学的検査及び T 細胞依存性抗体産生への異常は認められなかった。

病理組織学的検査において，7.5 mg/kg/日の雄3例で精巣（精細管上皮の変性／壊死）及び精巣上体（精巣の変化に随伴する精子減少症／無精子症）の所見がみられ，他の1例では精巣に精子肉芽腫が認められ，肉眼的な精巣軟化及び蒼白色巣と関連していた。また，7.5 mg/kg/日の雌雄で消化管（主に空腸及び回腸における単細胞壊死）に所見が認められた。休薬により，精巣上体及び消化管の変化は完全に回復し，精巣の変化は回復傾向を示した。

7.5 mg/kg/日の雄では，交配期間終了時点において精子濃度及び精子運動性の低下がみられ，精子の形態異常を伴っていた。しかし，いずれの用量においても雄の生殖能に有害な影響は認められなかった。また，雌の生殖能に影響は認められなかった。

13週間の投与期間終了時の小核試験では，本薬投与に関連した遺伝毒性として，7.5 mg/kg/日において，小核を有する多染性赤血球の有意な増加が認められた。

その他，13週間の投与期間終了時のリンパ球イムノフェノタイピングにおいて，3 mg/kg/日以上で T 細胞サブセットの絶対数の増加がみられたが，これに一致する総リンパ球数の変化は

みられず，8週間の休薬により回復したことから有害な変化ではないと考えられた。血液検査では，TK／免疫毒性サテライト群の7.5 mg/kg/日において，生後79日目に白血球，リンパ球，好塩基球及び好中球の軽度～中等度増加，平均ヘマトクリット，平均赤血球ヘモグロビン及びカリウムの軽微～軽度の減少，並びに赤血球分布幅の軽微な増加が認められたが，これらの変化は有害でないと考えられた。また，7.5 mg/kg/日の投与期間終了時剖検例（生後113日目）において，ヘマトクリット，平均赤血球ヘモグロビン及びカリウムの軽微～中等度減少，赤血球分布幅及び好中球の軽微な増加，並びに総蛋白及びアルブミンの軽微な減少が認められた。これらの変化は休薬期間終了時には認められず，有害な変化ではないと考えられた。

本試験における血漿中リスジプラムの $AUC_{0\text{-}24h}$ は，1～7.5 mg/kg/日の範囲で用量に比例した増加を示さなかった。投与8及び13週目に曝露量の増加が認められ，AUC の蓄積係数は4.21～8.56であった。AUC の値に性差はみられなかった。

以上のとおり，7.5 mg/kg/日で精巣の病理組織学的変化，精子への影響，並びに遺伝毒性（骨髄小核誘発）が認められたことから，本試験条件下におけるリスジプラムの NOAEL は，3 mg/kg/日（生後112日目における $AUC_{0\text{-}24h}$ [雄/雌]：7160/7830 ng•h/mL）と判断した。

2.6.6.7 局所刺激性試験

リスジプラムの臨床投与経路は経口であり，消化管に対する局所的な影響は，反復投与毒性試験（2.6.6.3参照）において評価している。

2.6.6.8 毒性発現の機序に関する試験

2.6.6.8.1 *In vitro* 眼毒性試験

（資料番号 4.2.3.7.3-1）

本試験は，カニクイザル39週間投与試験において認められた網膜毒性の機序を明らかにするため，ヒト網膜色素上皮細胞株（ARPE19）を種々の濃度（最高50 µg/mL）のリスジプラムで処理したときの主要な細胞機能（食作用，酸化ストレスに対する抵抗性，リソソーム機能及びオートファジー）について評価した。

試験結果を表2.6.7.17.1-1に示した。

リスジプラムの24及び48時間処理により，濃度依存的なリソソーム機能障害が認められ，同時にオートファゴソームの蓄積も認められた。酸化ストレス及び食作用に対する影響は認められなかった。リソソーム機能及びオートファジーに対する影響が本薬の薬理学的作用（副次的作用も含む）によるものかどうかを明らかにするため，共通のファーマコフォア（薬理原子団）を有するものの，薬理学的作用を示さない2つの化合物（RO6889953及び RO6893915）についても評価した。これらは *SMN2*に対するスプライシング修飾作用を有さず，また，構造活性相関に基づき，別のスプライシング標的に対する作用も有さないと考えられる化合物である。これらはリスジプラムと類似した物理化学的特性を有しており，両化合物ともリソソーム機能を同様に障害し，RO6893915についてはオートファゴソームの蓄積も誘発した。

以上の結果から，リスジプラムを含む3化合物で認められた ARPE19細胞のリソソーム機能障害は同様のものであり，薬理学的作用に依存しないものであることが確認された。また，薬理学的作用を有さない2つの化合物ではオートファゴソーム蓄積に対する作用の違いが認められたが，これは logD などの物理化学的性質の違いに関連している可能性があると考えられた。

2.6.6.8.2 ヒト／カニクイザル iPSCs への影響

（資料番号 4.2.3.7.3-2）

動物種間の安全性評価として，リスジプラムを含む4化合物（リスジプラム及びその主要代謝物 RO7112063，並びに別の *SMN2*スプライシング修飾薬 RO6885247及びその主要代謝物 RO6885241）について，副次的スプライシング修飾作用に関連する RNA マーカー（*FOXM1 B/C* 転写産物バリアント）に対する濃度作用関係を，ヒト及びカニクイザルの iPSCs を用いて検討した。また，この *FOXM1 B/C* 転写産物バリアントは細胞周期制御因子の一つである *FOXM1*転写因子に翻訳されることから，本試験では上記4化合物の細胞周期に与える影響についても検討した。

試験結果を表2.6.7.17.2-1に示した。

各物質を0.00064～10 µmol/L の濃度で処理したときの *FOXM1 B/C* 転写産物バリアントのダウンレギュレーションに関する50%阻害濃度（IC_{50}）は，ヒト及びカニクイザル細胞で同様であった。この作用は，リスジプラム及び RO6885241が RO6885247よりも強く，RO7112063は *FOXM1 B/C* 転写産物バリアントの発現レベルに影響を与えなかった。更に，リスジプラム及び RO6885241ではカニクイザル細胞における濃度依存的な有糸分裂の停止がみられたが，RO7112063では認められなかった。同様に，リスジプラム及び RO6885241ではヒト細胞における濃度依存的な細胞周期の変動がみられたが，RO7112063では認められなかった。RO6885247では，ヒト及びカニクイザル細胞において，評価した濃度での明らかな細胞周期の欠如は認められなかった。

以上の結果から，ヒト及びカニクイザル細胞において，評価した4化合物の *FOXM1 B/C* 転写産物バリアント発現に対する作用（ダウンレギュレーション）の強さと，濃度依存的な有糸分裂停止との間には相関があると考えられた。

2.6.6.8.3 *In vivo* RNA 配列解析

（資料番号 4.2.3.2-3及び4.2.3.2-7）

リスジプラムを含む種々の *SMN2*スプライシング修飾薬を用いた *in vitro* 試験において，一定数の遺伝子転写産物の選択的スプライシングに対する影響が示唆された（2.6.2.3.1）[2)]。リスジプラム投与により惹起される毒性の発現機序について理解を深めるため，ラット及びカニクイザルを用いた反復投与予備試験（2.6.6.3.3，2.6.6.3.7）において，RNA配列解析及びそれに引き続くスプライシング遺伝子の詳細な解析を組み入れた。

リスジプラムを2週間反復投与したラットの脾臓，十二指腸及び精巣を用いて，過去に評価した化合物において影響のみられた遺伝子（*MADD*，*STRN3*，*APLP2*，*SMN1*及び *FOXM1*）[4)]の評価を行った。最高用量の7.5 mg/kg/日では，脾臓，十二指腸及び精巣における *MADD* 及び *STRN3*遺伝子のスプライシング反応が認められ，*APLP2*遺伝子の転写産物もわずかに認められた。*SMN1*及び *FOXM1*遺伝子の選択的スプライシングには変化は認められなかった。

同様の評価を，リスジプラムを2週間反復投与（0.75，1.5, 3及び6 mg/kg/日）したカニクイザルの脾臓，十二指腸及び精巣についても実施した。mRNA アイソフォーム特異的な定量的 PCR により，全ての器官においてリスジプラムの6 mg/kg/日投与による *APLP2*，*MADD* 及び *STRN3* 遺伝子の副次的スプライシング反応の変化が確認され，6 mg/kg/日の雄1例の精巣では，*FOXM1 B/C* 転写産物バリアントのダウンレギュレーションが認められた。

脾臓において副次的薬理反応が確認されたことから，この器官を用いてトランスクリプトーム全体の mRNA スプライシング及び発現変化を RNA 配列決定により解析した。その結果，リスジプラムの投与においては，上記のスプライシング転写産物を除き，ほぼすべての mRNA は選択的スプライシングの変化がないか，用量依存性変化の傾向を示さなかった。また，発現経路の変化にも用量依存的な傾向は認められなかった。*SMN1*遺伝子の選択的スプライシングに

も変化は認められなかった。

リスジプラムを3 mg/kg/日の用量で7日間投与したカニクイザル組織分布試験（2.6.4.4.7）で得られた網膜及び脈絡膜／網膜色素上皮についてのスプライシング解析を実施し，別の SMN2 スプライシング修飾薬である RO6885247の結果と比較した[12)] 。主要な選択的スプライシング標的遺伝子として *FOXM1*，*STRN3*，*APLP2*及び *MADD* について評価した結果，脾臓及び皮膚サンプルにおける結果と対照的に，網膜及び脈絡膜/網膜色素上皮においては *APLP2*及び *STRN3*のみでスプライシングの変化が認められ，これらの変化は脾臓及び皮膚よりも明らかに弱かった。本解析では，両化合物とも一貫性のある結果が得られ，スプライシングの変化は6週間の休薬後に対照と同程度まで回復した。同様の変化はアルビノ及び有色ラットを用いた組織分布試験[13)] においても確認された。

2.6.6.9 その他の毒性試験

2.6.6.9.1 マウス線維芽細胞株を用いた *in vitro* 光毒性試験

（資料番号 4.2.3.7.7-1）

リスジプラムは波長240～400 nm の紫外線を吸収する（3.2.S.3.1.4）ことから，本薬の潜在的な光毒性リスクを評価するため，マウス線維芽細胞株（Balb/c 3T3）を用いた *in vitro* 試験を実施した。

試験結果を表2.6.7.17.3-1に示した。

0.004～9 µg/mL（本試験条件下における本薬の溶解限界）の濃度範囲で，ニュートラルレッドの取り込みを指標とした細胞生存率の IC_{50}を算出した結果，紫外線（UVA）照射条件下での IC_{50}は3.56 µg/mL，非照射条件下での IC_{50}は ＞9 µg/mL であった。また，紫外線非照射／照射の IC_{50}の比は約2.5であり，陽性と判定される5を下回った。

リスジプラムの溶解性に限度がみられたものの，本試験条件下においてリスジプラムは光毒性を有さないと判断された。

2.6.6.9.2 マウス皮膚感作性試験

（資料番号 4.2.3.7.7-2）

臨床で用いられるリスジプラムのドライシロップ製剤の皮膚感作性について検討するため，CBA/J マウスを用いた局所リンパ節試験（LLNA）を実施した。

被験物質として，市販予定製剤と同様の添加物を含むリスジプラムのドライシロップ製剤を用い，これを1% Pluronic L92を添加した純水に溶解してマウス（各群雌5例）の耳介皮膚に3日間経皮投与した（投与量：1.7，5又は8.4 mg/kg）。なお，投与液濃度は，臨床で用いられている濃度（0.75 mg/mL），並びにその3倍（2.25 mg/mL）及び5倍（3.75 mg/mL）とした。最終投与後3日に^{3}H-チミジンを静脈内投与し，5時間後に耳介リンパ節を摘出して^{3}H-チミジン取り込み量を測定した。

また別途，マウス（各群雌9例）にリスジプラムの0（溶媒）又は8.4 mg/kg/日を3日間経皮投与，又は3 mg/kg/日を3日間経口投与し，最終投与後2日に経皮投与群にはリスジプラムの3 mg/kg/日を経口投与，経口投与群にはリスジプラムの8.4 mg/kg/日を経皮投与し，翌日に剖検を行った。なお，経口投与用の溶液は，ドライシロップ製剤を純水に溶解することにより調製した。

試験結果を表2.6.7.17.4-1に示した。

いずれの群においても，一般状態，体重及び剖検において，被験物質投与に関連した毒性所見は認められなかった。

耳介皮膚に刺激性を示唆する変化はみられず，また，耳介重量に変化はみられなかったこと

から，いずれの用量（濃度）においても本薬による刺激性はないと考えられた。また耳介リンパ節の大きさ，重量及び増殖（^{3}H-チミジン取り込み量）にも変化は認められなかった。

被験溶液の経皮投与（8.4 mg/kg/日）又は経口投与（3 mg/kg/日）によるリスジプラム及び代謝物 M1の全身曝露が試験3日目に確認されたが，用量で補正した曝露量は，経口投与と比較して経皮投与では低かった。また，両投与経路において，リスジプラムよりも代謝物 M1の曝露量は低かった。なお，本試験では感作性評価のため，経皮吸収性を高めることを目的として1% Pluronic L92を使用したが，本試験での濃度3.75 mg/mL 溶液の3日間経皮投与による全身曝露は，臨床製剤のヒトでの経皮吸収性を予測するものではない。

以上の結果から，リスジプラム（ドライシロップ製剤）は，マウス LLNA において臨床製剤の1～5倍量までの経皮投与，又はヒトでの治療域の曝露量が得られる用量で3日間経口投与したとき，更に，引き続いて経口又は経皮投与により惹起したとき，感作性及び刺激性の徴候を示さないことが明らかとなった。

2.6.6.10 考察及び結論

リスジプラムの安全性プロファイルについて，包括的な毒性試験プログラムにより評価した。本薬の薬理学的標的は *SMN2*遺伝子であり，本遺伝子はヒトのみに存在することから，動物試験結果の外挿性は，主に副次的な mRNA スプライシング標的である *FOXM1*及び *MADD* 等への作用に基づき判断される。各動物種における代謝物プロファイリングの結果（2.4.3.4）から，毒性試験に用いた動物種の妥当性が確認されている。また，本薬の対象疾患である SMA の患者は主に新生児及び小児であるが，成人も含まれることから，安全性評価は成獣及び幼若動物を用いて実施した。

リスジプラムの反復投与毒性試験で認められた毒性学的に意義のある所見は，主に細胞増殖サイクルの速い器官において認められ，すべての有害所見が細胞の代謝回転に依存して回復又は回復傾向を示した。唯一の例外として，カニクイザルにおいて網膜変性が認められたが，この変化は本薬を長期間投与した後の，終末分化した細胞集団に対する影響であり，非可逆的変化と考えられた。

表 2.6.6.10-1に，主要な反復投与毒性試験における未変化体の曝露量を記載した。

表 2.6.6.10-1 主要な反復投与毒性試験におけるリスジプラム（未変化体）の曝露量

試験	投与量 (mg/kg/日)	平均 C_{max} (雄/雌) (ng/mL)	平均 $AUC_{0\text{-}24h}$ (雄/雌) (ng•h/mL)
マウス4週間	3	310/232	2850/2110
	9	1070/764	9520/10400
	20/16[a]	1350/1230	21200/15100
ラット4週間	1	217/200	1540/1650
	3	584/684	5450/5890
	9	1370/1730	15300/17700
ラット26週間	1[b]	203/295	2200/2400
	3[c]	651/768	7010/8830
	7.5	1140/1170	16100/15700
カニクイザル2週間	2	305/386	2650/2460
	4	798/1220	8650/8450
	6	1020/1390	12800/11500
カニクイザル39週間	1.5	414/396	1870/2060
	3	1000/973	4880/4850
	7.5/5[d]	701/1160	5880/6470
幼若ラット4週間 [生後4～31日]	0.75	50.9/51.2	680/668
	1.5	107/131	1570/1880
	2.5	140/141	1950/2190
幼若ラット13週間 [生後22～112日]	1	170/189	2010/1700
	3	759/725	7160/7830
	7.5	1500/1300	15900/17600

NOAEL に下線を付した。

曝露量は，各試験の投与期間中の最終採血時点のデータを示した。

a：20 mg/kg/日で 16 日間投与後休薬し，16 mg/kg/日に減量して 20 日目に投与を再開した。

b：雄の NOAEL

c：雌の NOAEL

d：7.5 mg/kg/日で 12 日間投与後休薬し，5 mg/kg/日に減量して 26 日目に投与を再開した。

2.6.6.10.1 死亡又は状態悪化

リスジプラムの独立した単回投与毒性試験は実施していないが，本薬の急性毒性に関する情報は，反復投与毒性試験又は小核試験（ラット）の高用量投与群において得られている。マウス，ラット，ウサギ及びカニクイザルにおいて，それぞれ最高用量の100，100，16及び20 mg/kg を投与したとき，初回投与翌日までに死亡例は認められなかった。

反復投与による死亡又は状態悪化は，マウス，ラット及びカニクイザルにおいて認められた。マウス7日間投与試験では，30 mg/kg/日以上で全身状態悪化（安楽死処置）を含む一般状態の異常，体重及び摂餌量減少が認められたことから，100 mg/kg/日の生存例全例を4日目に，30 mg/kg/日の生存例全例を5日目に安楽死処置した。マウス4週間投与試験では，20 mg/kg/日で11日目以降に死亡例又は重篤な一般状態異常（円背位，活動性低下，斜視，立毛及び不規則呼吸），体重及び摂餌量減少を示す個体が認められたことから，17～19日目に投与を中断した。死亡及び安楽死処置例の病理組織学的検査では消化管上皮の変性及び骨髄における細胞減少が認められ，これらの変化が死亡／状態悪化の原因と考えられた。16 mg/kg/日に減量して20～33日目まで更に14日間投与した個体では，異常は認められなかった。

ラットでは，26週間投与試験の7.5 mg/kg/日で，27～178日目に死亡又は全身状態悪化による安楽死処置例が認められた。一般状態所見として，活動性低下，背骨の突出，脱水，衰弱及び体重減少が認められた。また，病理組織学的検査では，消化管における陰窩の単細胞壊死及び／又は変性／壊死，並びに骨髄細胞の減少が認められ，これらの変化が多くの個体における死亡／状態悪化の原因と考えられた。有色ラット26週間投与試験においても7.5 mg/kg/日で同様

の所見が認められ，53/52日目以降は投与量を5 mg/kg/日に減量した。

カニクイザルでは，5日間漸増投与試験での20 mg/kg/日の2回目投与（17日目）後に，重篤な一般状態所見（嗜眠／沈静化／活動性低下，緩徐で慎重な動き，円背位及び振戦）及び体重減少（9～12%）が認められたことから，投与を中止し19日目に安楽死処置した。血液学的検査では好中球，リンパ球及び好酸球の低値，フィブリノゲン高値及び血液凝固時間延長がみられ，血液化学的検査では，トランスアミナーゼ，クレアチニン及び尿素の高値が認められた。病理組織学的には，皮膚／皮下組織，舌，喉頭及び消化管上皮におけるアポトーシス増加，精巣の精細胞変性／空胞化及び多核細胞などが認められた。39週間投与試験の7.5 mg/kg/日では，明確な一般状態の異常（皮膚のさまざまな部位における表皮脱落／剥離及び顔面紅潮）が認められたことから，13日目に投与を中止し，5 mg/kg/日に減量して26日目に投与を再開した。5 mg/kg/日においても同様の皮膚の変化（表皮脱落／剥離及び脱毛）がみられたが，その程度は7.5 mg/kg/日の投与時よりも軽減しており，当該用量における忍容性は良好であった。

2.6.6.10.2 標的器官毒性

2.6.6.10.2.1 副次的スプライシング標的に対する作用

選択的スプライシングは多数の遺伝子の中で種々の蛋白質の産生を増加させるための機構の一つである。細胞は，多様な蛋白質を増加させることだけでなく，転写後の mRNA の発現レベルを調節（すなわち，フレームシフト型のエクソンを導入して遺伝子のサイレンシングを誘導する）するため，この機構を利用している。ヒトにおいて，選択的スプライシングは特に神経組織において広く認められる[14)]。

リスジプラムは，*SMN2*の mRNA 転写産物の選択的スプライシングを調節し，スキップされるエクソンの組み込みを促進させ，完全に機能的な SMN 蛋白質を増加させる（2.6.2.2.1）[15)]。しかし，スプライシング修飾薬は，リスジプラムにおいて意図する標的である *SMN2*だけでなく，その他の多くの遺伝子の選択的スプライシング産物に影響を与え，他の遺伝子に対する望ましくない作用や毒性を生じる可能性も考えられる。このことから，リスジプラムの特異性についての包括的な評価により，細胞性パラメータの詳細及び動物における有害作用について検討し，リスジプラムによる毒性所見が *SMN2*以外のスプライシング標的との相互作用により生じたことを示唆する発現機序データを取得した。

最初に，リスジプラムの特異性について評価するため，SMA 患者由来線維芽細胞をリスジプラム，リスジプラムより特異性の低い化合物である RO6885247，又は臨床試験で評価されている LMI070（branaplam）で処理したときの RNA 配列解析を，未処理の対照試料と比較することにより行った（4.2.1.1-1）[4)]。試験に用いた化合物の濃度は，リスジプラムの *SMN2*遺伝子に対するスプライシング修飾作用における90%効果濃度（EC_{50}）の5倍とした。また，*SMN2*スプライシング修飾薬の場合，*SMN2*遺伝子を有していない動物モデルを用いることにより，バイアスを除いたオフターゲット毒性を評価できる利点がある。すなわち，これらの動物種は，主要な標的に対する反応性を有していないことから，投与動物で認められたあらゆる有害作用は，*SMN2*以外の遺伝子のスプライシングに対する相互作用に起因したものか，スプライシングに関連しない機序で生じたものと解釈できる。更に，*SMN2*遺伝子のスプライシング調節作用は即時的に発現することが知られており，このことは，リスジプラムの単回投与後のヒト血液における *SMN2*蛋白質の発現が，本薬の薬物動態と密接に関係していることからも確認されている（2.7.2.2.1.1）。したがって，毒性試験において，リスジプラムの投与開始後早期に認められた有害所見は，特に重要と考えられる。

動物を用いた追加の評価として，ラット及びカニクイザルにおいて毒性が認められた組織，及び毒性が認められなかった組織について，脾臓を含む細胞成分が比較的均一な組織から得られた細胞におけるスプライシング修飾作用について評価した。その後，病理組織学的検査で所見が認められた組織におけるスプライシング修飾作用について， SMA 患者由来線維芽細胞並びにヒト及びカニクイザル iPSCs で同様のスプライシング修飾作用が起こることを確認し，ヒ

トでの潜在的影響に対する関連付けを行った。

この方針に基づいて検討した結果，リスジプラムによる *in vitro* 及び動物での毒性発現に重要と考えられる副次的スプライシングの標的として，*FOXM1*及び *MADD* が同定された（2.6.2.3.1, 2.6.6.8.3）。リスジプラムは，*SMN2*のエクソン7のスプライシング機構に対する相互作用を介してこれを組み込むが，*FOXM1*に対しては，細胞周期停止を誘導する，エクソン9を含むバリアントである *FOXM1A* へのシフト（一方で，エクソン9を含まないバリアントである *FOXM1B/C* のダウンレギュレーション：なお，エクソン9はヒト及びサルにおいて存在するが，ラットでは存在しない），*MADD* に対しては，アポトーシス促進性の *IG20* [16] と呼ばれるエクソン21を含むバリアントへのシフトが主な作用として考えられた。*In vitro* 及び動物試験で確認されたこれらのエクソンを含むバリアントの発現増強，及びエクソンを含まないバリアントの発現低下は，リスジプラムだけでなく，以前に初期臨床開発が行われた本薬と密接に関連する別の*SMN2*スプライシング修飾薬である RO6885247においても認められた[4]。

*FOXM1*及び *MADD* のエクソン組み込み／除外に関する公表データ[4, 16] は，リスジプラムの動物試験で確認された結果と一致していた。すなわち，*FOXM1*及び *MADD* のスプライシングバリアントのエクソンを含むバリアントへのシフトは，細胞周期調節に混乱を生じさせ，上皮細胞にアポトーシスを誘導する可能性が示唆された。また，これらの特徴は，リスジプラム及び RO6885247の両方でみられた主要な毒性所見においても一貫していた。

したがって，これらの機序解析データに基づき，リスジプラム投与により認められた下記の毒性変化は，*SMN2*以外のスプライシング標的との相互作用と関連付けることができると考えられる。

1) 消化管

ラット2週間投与試験において，7.5 mg/kg/日の雌で，十二指腸，空腸及び回腸の陰窩における軽微なアポトーシス増加が認められた。また，ラット4週間投与試験の9 mg/kg/日では，雌雄の十二指腸，空腸，回腸及び盲腸，並びに雌の直腸にアポトーシス／単細胞壊死の増加が認められた。これらの変化の程度はいずれも概ね軽微～軽度であり，発現頻度も低く，休薬により完全に回復したことから，有害な所見ではないと判断した。ラット26週間投与試験では，3 mg/kg/日以上で十二指腸，空腸，回腸，盲腸，結腸，直腸の陰窩及び／又は硬口蓋に軽微な単細胞壊死がみられ，高用量の7.5 mg/kg/日では，より広範かつ高頻度に発現し，同群の早期死亡／安楽死処置例においてこれらの変化がより明らかであった。ラット26週間投与試験では用量依存的なカリウム及びクロールの低値が観察されており，これらの変化も全身状態悪化と関連している可能性が考えられた。これらの消化管に対する影響は，8週間の休薬期間終了時には認められなかった。また，幼若ラット13週間投与試験の7.5 mg/kg/日では，単細胞壊死（主に回腸及び空腸）が認められた。

rasH2マウス（野生型）では，20 mg/kg/日を16日間投与したとき，組織学的な消化管上皮変性が認められ，体重及び摂餌量の減少を伴っていた。これらの影響は早期死亡／安楽死処置した個体のみで認められた。3日間の投与中断後に，16 mg/kg/日に減量して更に14日間投与した個体では，消化管への影響は認められなかった。

カニクイザル2週間投与用量設定試験では，6 mg/kg/日の雄の空腸で粘膜固有層の空胞化がみられ，雌の空腸では粘膜固有層のアポトーシス増加が認められた。粘膜固有層のアポトーシス増加は，同試験の用量漸増期間の高用量投与（20 mg/kg/日の2回投与）後においても認められた。なお，引き続いて実施したカニクイザル2週間投与試験（GLP）では，高用量の6 mg/kg/日まで消化管の変化は認められず，39週間投与試験においても，高用量の7.5/5 mg/kg/日まで消化管の変化は認められなかった。

ラット及びカニクイザルを用いた *in vivo* RNA 配列解析（2.6.6.8.3）における *MADD* 転写産物の変化は，当該用量で消化管上皮にアポトーシスが認められたことに一致していた。*MADD* 遺伝子産物はアポトーシスのプロセスに干渉することが報告されている[16]。

2) 膵臓

ラット26週間投与試験において，消化管所見に加えて膵臓外分泌部の上皮における有害でないと考えられる軽微～軽度で可逆的な単細胞壊死が認められた。本所見はすべての用量（1, 3及び7.5 mg/kg/日）で認められ，発現頻度は用量に依存していたが，1及び3 mg/kg/日における頻度は低かった。公表データによると，げっ歯類の膵臓では散発性の単細胞死が認められることがあり，これは正常組織の恒常性維持の一部であり，背景変化と考えられている[17)]。したがって，1及び3 mg/kg/日で認められた変化はラットの背景病変に含まれると考えられ，有害な所見ではないと判断した。なお，7.5/5 mg/kg/日を投与した有色ラット26週間投与試験では，膵臓に対する影響は認められなかった。

3) 皮膚／皮下組織，舌／食道，喉頭

カニクイザル5日間漸増投与試験で20 mg/kg/日の2回目投与後に安楽死処置した個体において，皮膚／皮下組織，舌及び食道における錯角化，舌及び食道の上皮におけるアポトーシス増加，声帯ヒダのびらん／潰瘍，並びに喉頭の側壁上皮のアポトーシスが認められた。また，カニクイザル2週間投与試験の4及び／又は6 mg/kg/日では，声帯ヒダの上皮変性及び喉頭の炎症，並びに喉頭腹側壁のびらん／潰瘍，及び扁平上皮化生が認められた。6 mg/kg/日では，皮膚における錯角化，炎症，びらん／潰瘍及び表皮過形成（肉眼的な表皮剥離と一致）も認められた。これらの所見は2週間の休薬により回復した。カニクイザル39週間投与試験では，高用量の7.5 mg/kg/日で皮膚への影響（紅潮，表皮脱落／剥離）が認められた。この変化は投与10日目以降に明らかとなり，全身状態の悪化がみられたため，投与開始後13日目から2週間にわたり投与を中断した。その後，用量を5 mg/kg/日に減量し投与を再開したが，39週間の投与期間を通じて表皮脱落／剥離が間欠的に観察された。これらの肉眼的所見は，皮膚（眼瞼皮膚を含む）の病理組織学的所見（表皮過形成）と一致していた。皮膚の変化は，22週間の休薬期間中に完全に回復した。

カニクイザルで認められた皮膚，舌／食道及び喉頭の所見における肉眼的及び病理組織学的特徴は，*FOXM1*の調節不全を示したヒト皮膚／ケラチノサイトについての公表データ[18)–20)]と類似していた。表皮で認められた錯角化及び扁平上皮過形成は，リスジプラムの表皮における *FOXM1* mRNA スプライシングへの干渉に対する反応の一つであると考えられた。同様の変化は，別の *SMN2*スプライシング修飾薬である RO6885247のカニクイザル毒性試験及びヒトケラチノサイトを用いた *in vitro* 試験においても認められた[21)]。スプライシングバリアントの発現量の変化は，皮膚の恒常性に影響を及ぼし，過形成へと進展させた可能性が考えられる。しかし，表皮過形成を含むこれらの作用は完全な可逆性を示し，また，ラット及びカニクイザルの慢性毒性試験，幼若ラットの13週間投与試験，並びに rasH2マウスを用いた26週間投与によるがん原性試験において，前がん病変又は腫瘍性病変への進展を示す変化は認められなかった（2.6.6.10.4）。

4) 胸腺

ラット26週間投与試験において，7.5 mg/kg/日の雌雄で，胸腺のリンパ系細胞の減少が認められ，肉眼的な胸腺の小型及び胸腺重量の低値と一致していた。胸腺の小型は有色ラット26週間投与試験の7.5/5 mg/kg においても認められた（病理組織学的検査は未実施）。カニクイザルでは，2週間投与試験の6 mg/kg/日の雄，及び39週間投与試験の7.5/5 mg/kg/日の雌で，胸腺萎縮，胸腺重量の低値，及び／又は肉眼的な胸腺の小型が認められた（血液学的検査におけるリンパ球減少と一致）。これらの所見は，細胞周期及びアポトーシス因子に対する本薬の副次的なスプライシング作用と一致する。しかしながら，いずれも軽微～軽度の変化であり，休薬により完全に回復したことから，有害な変化ではないと考えられた。

5) 血液／骨髄

骨髄は，ラット小核試験において本薬の毒性標的として特定された（2.6.6.10.3）。高用量（25 mg/kg/日）において，正染性（成熟）赤血球に対する多染性（幼若）赤血球の比率に50%を超える低下が認められ，骨髄毒性が示唆された。ラット4週間投与試験では，最高用量（9 mg/kg/日）の雌のみで，多染性赤血球の比率の群平均値に約50%の低下が認められた。しかし，これは骨髄毒性とみなせるほどの明らかな変化ではなく，細胞形態は対照群と概ね同様であった。この所見は明らかにリスジプラム投与に関連していたが，変化の程度は小さく，可逆的であった。マウス4週間投与試験の20/16 mg/kg/日，ラット26週間投与試験の7.5 mg/kg/日，及び有色ラット26週間投与試験の7.5/5 mg/kg/日の投与期間中に認められた一部の死亡／安楽死処置例では明らかな骨髄毒性が認められ，これらの個体では，組織学的な骨髄細胞減少及び消化管所見が死因と判断された。骨髄の変化は，血液学的検査における白血球，好中球，リンパ球，赤血球パラメータ，網状赤血球及び血小板の減少と関連していた。マウス及びラットでの反復投与による骨髄毒性は，約15,000 ng•h/mL（$AUC_{0\text{-}24h}$）の曝露量との関連が認められた。カニクイザルでは，投与期間が2週間以内の試験において，死亡が発現しない用量での血液学的影響は認められなかった。20 mg/kg/日を2日間経口投与したカニクイザルでは，重篤な全身状態悪化により早期の安楽死処置を行ったが，雌雄の大腿骨及び／又は胸骨で骨髄萎縮が認められ，骨髄細胞減少を特徴としていた。カニクイザル39週間投与試験では，7.5/5 mg/kg/日の雄及び3 mg/kg/日以上の雌で赤血球パラメータの減少が認められ，更に3 mg/kg/日以上の雌雄で網状赤血球の増加，3 mg/kg/日以上の雌で血小板及び血小板容積比率の増加（反応性血小板増多症）が認められた。また，7.5/5 mg/kg/日の雌ではリンパ球の減少も認められた。これらの変化は，骨髄の組織学的変化が認められない用量で発現した。

6) 雄性生殖細胞

ラット26週間投与試験において，3 mg/kg/日以上で精巣の精細管変性／萎縮（重量低値及び肉眼的な小型／軟化と関連），及び二次的な精巣上体の精子減少（重量低値及び肉眼的な小型と関連）が認められ，7.5 mg/kg/日の雄1例では精巣上体管上皮の変性／壊死も認められた。精巣に対する影響は，有色ラットに7.5/5 mg/kg/日を26週間投与したときの早期死亡例においても確認された。なお，ラット4週間投与試験の9 mg/kg/日においても，精巣の精母細胞変性の増加が認められたが，その増加は僅かであり，休薬による回復性が認められたことから有害でないと判断した。

離乳後直ちに（生後22日目）投与を開始した幼若ラット13週間投与試験では，7.5 mg/kg/日で精細管上皮の変性／壊死及びそれに伴う精巣上体の精子減少症／無精子症が認められた。同用量では更に，形態異常を有する精子数の増加と，関連する精子濃度及び精子運動能の低下が認められた。このような所見が認められたにもかかわらず，雄ラットの生殖能は対照群の個体と同様であった。また，生後4～31日目まで投与を行った幼若ラット4週間投与試験では，2.5 mg/kg/日で投与期間終了時の精巣及び精巣上体重量が対照群と比較して低値を示し，病理組織学的検査では，2.5 mg/kg/日のすべての雄で軽微～軽度の精細管上皮変性が認められた。8週間の休薬期間終了時において精巣及び精巣上体重量はわずかに低下したままであったが，病理組織学的な異常は認められず，精子検査及び雄の生殖能にも異常は認められなかった。

カニクイザルでは，5日間漸増投与試験の用量漸増期間中に20 mg/kg/日を2日間投与した雄1例で，精巣における生殖細胞の変性／空胞化及び多核細胞が認められ，その結果として精巣上体に細胞残屑が認められた。細胞残屑は，精巣上体管の内腔における円形細胞又は生殖細胞残屑の増加を特徴としていた。この変化は，本薬投与に関連したものと判断したが，当該個体は20 mg/kg/日の2回目投与後に重篤な全身状態悪化が認められ，早期安楽死処置を行っている。カニクイザル2週間投与試験では，高用量の6 mg/kg/日の2例（ともに完全な性成熟個体ではなかった）において，多核細胞を伴う雄性生殖細胞の変性が認められた。中用量（4 mg/kg/日）及び6 mg/kg/日の休薬期間終了時剖検の雄は性的に未成熟であったことから，本試験における

精巣毒性の NOAEL は，低用量の2 mg/kg/日と判断した。なお，2週間投与用量設定試験では，3 mg/kg/日の雄1例が性成熟に達しており，同個体では精巣への影響は認められなかった。カニクイザル39週間投与試験については，投与開始時2歳齢の若齢動物を使用したため，ほとんどの個体において，投与期間終了時においても精巣が未成熟の状態であった。このことから，39週間投与試験において，リスジプラムの精巣に対する影響を評価することはできなかった。

精子細胞に対する作用については，回復性を有する減数分裂のパキテン期における特異的な変性性変化が，別の *SMN2*スプライシング修飾薬である RO6885247において報告されている[4)]。これは，SMA 患者由来線維芽細胞，ヒト及びカニクイザル iPSCs，並びにカニクイザルの *in vivo* 脾臓組織において，リスジプラム及び RO6885247に特有の副次的スプライシング標的として，*FOXM1*が同定されたことに一致している（2.6.2.3.1，2.6.6.8.2，2.6.6.8.3）。ラットでは，*in vivo* において *FOXM1*のスプライシングバリアントは影響を受けていないと考えられるが，アポトーシス関連遺伝子である *MADD* のスプライシングバリアントに対する影響がみられており，アポトーシス促進性のバリアントである *IG20*の発現増強がみられた。なお，これらの評価時点においては，その他の副次的スプライシング標的に対する作用の可能性も否定できない。

*FOXM1*は精母細胞に高発現しているが，精祖細胞では発現量が低いことが知られている[20)，22)]。また，*FOXM1*は精母細胞のパキテン期において特異的に発現していると考えられている[23)]。一方，*MADD* は精子形成過程における生殖細胞の細胞死に役割を果たしていると考えられている[24)]。パキテン期精母細胞の枯渇に関する同様の所見は，ラットにメトキシ酢酸を単回投与したときに生じることが報告されている[25)]。この生殖細胞の枯渇は可逆的であり，メトキシ酢酸の単回投与後70日以内に回復し，ラットの精巣におけるすべての精子形成ステージは質的に正常であった。メトキシ酢酸の精子に対する影響の機序として，ヒストンの過剰なアセチル化[26)]が関連しており，このことにより，非常に特異的なエピジェネティック修飾が生じ，パキテン期精母細胞においてプログラム細胞死（アポトーシス）に対する感受性が高まることが確認されている[26)]。

リスジプラムにおいて認められた所見は，別の *SMN2*スプライシング修飾薬（RO6885247）でみられた所見と一致しており，このことから，クラスエフェクトである可能性が考えられる[27)]。この作用機序として，本薬の主要な副次的スプライシング標的である *FOXM1*及び *MADD* に対する作用の可能性が示唆される。リスジプラムについては，カニクイザルの雄性生殖細胞おける詳細なステージ解析を実施していないが，雄性生殖細胞の減数分裂におけるパキテン期において *FOXM1*の発現が著しく高くなることが知られていることから，RO6885247を投与したカニクイザルで認められたパキテン期特異的な細胞周期停止は，リスジプラムにも当てはめることができると考えられる。

以上をまとめると，雄性生殖細胞はリスジプラムの毒性標的であり，これは副次的スプライシング標的の *FOXM1*及び *MADD* への作用に基づく，低分子 *SMN2*スプライシング修飾薬（2.6.2.3.1）[3)，4)]において知られている共通のオフターゲット作用と推察された。

2.6.6.10.2.2 網膜変性

本薬に先行して開発されていた別の *SMN2*スプライシング修飾薬である RO6885247では，カニクイザルを用いた39週間投与試験での投与期間終了時の病理組織学的検査において，網膜が毒性の標的として特定された[5)]。RO6885247で観察された網膜所見を考慮し，本薬のカニクイザルを用いた39週間投与試験では，網膜の機能的及び形態学的変化を検出する検査として ERG 及び SD-OCT を，投与20週目以降（35週目まで3回ずつ実施）及び22週間の休薬期間中（休薬期間の22週目まで3回ずつ実施）に組み入れた。なお，本薬のカニクイザルを用いた2週間投与試験では，最高用量の6 mg/kg/日（個体別の最大曝露量：15100 ng•h/mL [$AUC_{0\text{-}24h}$]）まで，網膜への影響は認められなかった。

39週間投与試験の ERG では，7.5/5 mg/kg/日のほとんどの個体で，ERG 電位の減少が20週目以降の投与期間を通じて認められ，3 mg/kg/日においても軽微な影響が認められた。影響が認

められた個体では，桿状体媒介性の暗順応 b 波の明らかな減弱が認められたが，a 波に対する影響は弱かった。このことから，本薬の作用は，視細胞の活性化そのものに対するよりも，RPE 細胞への作用を介した視細胞の双極性刺激伝達への影響が大きいと推察された。内顆粒層の双極細胞は，小嚢胞腔／空胞が生じた領域に存在し，高い曝露量が得られた7.5/5 mg/kg/日の個体では網膜中心部にも変化が認められた。なお，7.5/5 mg/kg において，VEP 反応に影響はみられなかったことから，網膜神経節細胞の軸索から視床及び大脳皮質への投射は影響を受けていないものと推察された。

SD-OCT では，3及び7.5/5 mg/kg/日で種々の程度の構造異常（網膜辺縁部における内節／外節の菲薄化及び外顆粒層の高輝度反射及び菲薄化）が認められ，最も影響の強かった個体では，視神経近傍の内顆粒層における小嚢胞領域を特徴とする MMD が認められた。視神経及びその近傍のラインスキャンにおいて，神経網膜外周組織の菲薄化及び視神経乳頭陥凹は認められず，病理組織学的検査で所見が認められなかったことと一致した。FAF イメージングでは，最も明らかな変性性変化として，斑点状低蛍光領域及び辺縁部に限局した過蛍光が認められた。暗領域は主に RPE の消失部位に一致し，高輝度領域は RPE の傷害部位で，その傷害が進行していることが示唆された。SD-OCT で検出された構造異常は，ERG における機能異常と良く相関していた。

病理組織学的検査では，3及び7.5/5 mg/kg/日の一部の個体において SD-OCT による画像所見が病理組織学的変化と相関していた。網膜変性は軽微～軽度と判定され，外顆粒層の多巣性の組織崩壊を特徴とし，視細胞の一部消失，RPE 細胞の多巣性肥大，内顆粒層の菲薄化及び空胞化，並びに神経節細胞層の部分的な消失を伴っていた。神経細胞層及び視神経には組織学的変化は認められなかった。一部の個体では，SD-OCT で網膜変化が検出されたにもかかわらず，組織学的変化は認められなかったが，これは，本所見が巣状かつ局所的なものであることに起因すると考えられる。7.5/5 mg/kg/日の一部の個体で実施した免疫組織化学的検査により，網膜変性領域において GFAP（グリア線維性酸性蛋白質）の染色性増加を伴う反応性グリオーシスが認められた（この所見は通常の組織学的検査では検出されなかった）。神経細胞のイオン輸送体のマーカーである Na-K-ATPase の染色により，グリオーシス領域の染色強度が低いことが明らかとなり，変性領域における神経細胞膜の減少が示唆された。内顆粒層内の空胞化領域の染色性は対照と同程度であった。細胞外プロテオグリカン（アルシアンブルーPAS）及び水チャネル（アクアポリン4）の染色性は，対照群と網膜変性のある個体で同程度であり，この病変の病理発生につながる更なる手掛かりは得られなかった。7.5/5 mg/kg/日の一部の個体で実施した電子顕微鏡検査では，網膜辺縁部の組織学的所見（視細胞変性，外顆粒層内の反応性グリオーシスと解釈される細胞の結節状配列，並びに RPE の肥大［大半の顆粒がメラノソーム］）が確認され，メラノソーム構造及び血管には変化は認められなかった。

39週間投与後の22週間の休薬期間中に，辺縁部の視細胞層消失を伴う網膜変性は回復しなかった。しかし，SD-OCT では，MMD の領域が著しく減少し，休薬期間の8週目にはすでに部分的な減少が認められた。白色斑状の過蛍光領域は，休薬期間中に密度が低くなり，わずかに回復したようであった。網膜層の完全性／網膜辺縁部の構築についても休薬期間中にいくらかの改善が認められたが，広範な細胞消失がみられた領域には変化がなかった。影響が認められた個体の4例中3例では，ERG において減弱した a 波及び b 波の正常レベルへの著しい回復が認められ，網膜における電気生理学的反応の機能障害がほぼ完全に回復したことが示唆された。7.5/5 mg/kg/日の1例では，依然として ERG 反応が対照群より低かった。病理組織学的には，視細胞層の消失及び RPE の肥大を伴う網膜変性が依然として認められたが，内顆粒層の空胞化は消失しており，これが ERG 反応の低下から回復した理由である可能性が考えられた。全体として，SD-OCT 及び病理組織学的検査で構造的異常が特定された個体と，ERG で機能的異常が特定された個体との間には明確な関連性が認められた。7.5/5 mg/kg/日において，閃光刺激による VEP 反応が依然として認められたことから，本薬により網膜への影響が生じた個体であっても，網膜神経節細胞やその軸索の視覚野への投射が著しく障害されていることはないと考えら

れた。

カニクイザルにおいて認められた網膜所見を考慮し，ラット26週間投与試験においても ERG の評価を行ったが，本薬投与による明らかな変化は認められなかった。また，有色ラットを用いた探索的26週間投与試験においても ERG 及び SD-OCT を実施したが，本薬投与に関連した所見は認められなかった。いずれの試験においても，網膜の病理組織学的変化は認められなかった。

現時点において，リスジプラム投与による網膜変性の機序は完全には解明されていない。リスジプラムはメラニンを含有する眼組織へ沈着することが確認されている（2.6.4.4.7）が，同様のメラニン含有組織への沈着が，別の *SMN2*スプライシング修飾薬である RO6885247でも確認されている[4)]。両化合物とも，ラット及びカニクイザルに投与したときメラニンに強固に結合し，メラニンからの解離は緩徐であることが確認されている。一方，本薬を有色ラットに投与したとき，カニクイザルを上回る高い網膜組織中濃度が確認された（2.6.4.4.7）にも関わらず，網膜における変性所見は認められなかった。このことから，これらの化合物のメラニン結合性自体が網膜毒性に関与するものではないと考えられた。メラニンを含有する RPE 細胞株を用いた *in vitro* 試験において，リスジプラムのリソソーム機能及びオートファジーに対する影響が確認されており（2.6.6.8.1），この結果から，薬物誘発性のリソソーム機能障害及びオートファゴソーム蓄積が RPE 細胞の細胞内成分の分解過程を阻害し，この作用はリスジプラムの薬理学的作用ではなく，物理化学的性質によって引き起こされた可能性が考えられた。RPE 細胞は貪食した視細胞外節及び視物質のリサイクルに関係しており，その作用は視細胞の機能及び健全性維持に重要と考えられている[28)]。一方で，網膜傷害からの回復性欠如に関連すると考えられるアストロサイト及びミュラー細胞の活性化が，リスジプラムを投与したカニクイザルの網膜において認められた。

選択的スプライシングは，網膜においても重要な役割を果たしていることが知られている[29)]が，カニクイザルにおいて認められた網膜毒性は遅延性の毒性であり，一方，選択的スプライシング及びそれに関連する毒性は投与開始後早期に発現する（2.6.6.10.2.1）。また，リスジプラム及び別の *SMN2*スプライシング修飾薬において同定された選択的スプライシング標的に対する作用は，カニクイザルにリスジプラムを7日間反復投与した網膜組織において，皮膚及び脾臓組織で認められた変化と比較して強いものではなかった（2.6.6.8.3）。したがって，網膜毒性は遅延性に発現すること，また，リスジプラムの投与により認められた網膜毒性以外の主要な毒性変化においては，明らかなスプライシング変化を伴っていた（2.6.6.10.2.1）ことを考慮すると，この選択的スプライシングの変化がカニクイザルで認められた網膜毒性の主たる原因である可能性は低いと考えられた。

以上のことから，現時点において，カニクイザルで認められた遅延性の網膜毒性の詳細な機序は明らかではないが，リスジプラムを投与したラット（有色ラットを含む）において網膜毒性が認められていないことから，本薬投与によるカニクイザルでの網膜変性発現において，特異的な生物学的プロセスが存在する可能性が考えられる。また，現時点において，このプロセスがヒトに外挿可能かどうかについても明らかではない。

2.6.6.10.2.3 その他の所見

1) 副腎

ラット26週間投与試験のすべての用量（1，3及び7.5 mg/kg/日）において，用量依存的な副腎の暗色化が認められ，病理組織学的には皮質網状帯及び束状帯における細胞内色素沈着（リポフスチン／セロイドと一致し，肉眼的な暗色化と相関）が認められた。ミネラルコルチコイド産生に関与する球状帯では，色素沈着は認められなかった。同様の変化は，7.5/5 mg/kg/日を投与した有色ラット探索的26週間投与試験においても認められ，幼若ラット13週間投与試験では肉眼的な副腎の暗色化が観察されたが，病理組織学的な相関は認められなかった。ラット26週間投与試験の副腎における変化は，8週間の休薬期間終了時においても同様の頻度及び程度で

残存し，変化の持続性が示唆されたが，休薬群の雌では，色素の大半が網状帯に残存しており，束状帯においては部分的な回復性が示唆された。これは，皮質内の細胞がその寿命（8週間の休薬期間より長い）をかけて髄質方向に移動していく生理学的現象と一致している[30)]。また，ラットにおける副腎皮質の細胞交替は，雄の方が雌より遅いことが報告されており[31)]，本試験の雄でみられた束状帯の色素沈着についても，長期間にわたる通常の細胞交替の過程で回復するものと考えられた。ラットにおいて認められた上記の副腎の変化は，組織損傷や他の機能的障害を伴っておらず，休薬により回復する変化と考えられたことから，有害な変化ではないと考えられた。なお，ラットの副腎皮質におけるリポフスチン沈着は，加齢によりしばしば認められる自然発生性の変化であることも知られている[32)]。

2) 子宮／性周期

ラット26週間投与試験の3 mg/kg/日以上で子宮重量の低値が認められ，発情周期の停止に一致する発情休止期への移行がみられた。発情休止期は異常な状態を反映するものではなく，これらの個体の病理組織学的検査で他の所見は認められなかったことから，有害な変化ではないと判断された。7.5 mg/kg/日の雌では，休薬期間終了時に子宮重量の低値が持続していたが，病理組織学的な相関はみられなかった。幼若ラット13週間投与試験では，ラット26週間投与試験と同程度の曝露量において子宮／性周期及び雌受胎能に対する影響は認められず，生殖発生毒性試験（出生前及び出生後の発生に関する試験）における出生児の病理組織学的検査においても，卵巣の原子卵胞及び一次卵母細胞数に異常は認められなかった（2.6.6.10.5）。

3) 乳腺

ラット26週間投与試験の7.5 mg/kg/日の雄で，軽微～中等度の乳腺萎縮が認められ，Perl 染色でヘモジデリンと確認された細胞内褐色顆粒状色素の増加を伴っていた。この変化は同程度の曝露量が得られた有色ラット探索的26週間投与試験では認められなかった。ホルモンを介した機序の関与を示唆する所見は認められず，ライデッヒ細胞への影響も認められなかったことから，この所見は有害な変化ではないと考えられた。上記の乳腺の変化は，8週間の休薬期間終了時には認められなかった。

2.6.6.10.2.4 回復性

リスジプラム投与によりラット及びカニクイザルで認められた毒性学的に意義のある所見は，カニクイザルで認められた網膜における視細胞変性を除き，すべての変化が可逆的又は部分的に可逆的であった。

ラット26週間投与試験及び幼若ラット4週間及び13週間投与試験において認められた精巣変性については，部分的な回復性がみられたのみであった。しかし，本薬においてラットでの回復傾向が確認されていること，また，*SMN2*及び副次的スプライシング標的に対してリスジプラムと同様の作用を有する別のスプライシング修飾薬（RO6885247）では，カニクイザルにおいて精巣所見の回復性が確認されている（2.6.6.10.2.1）ことから，本薬の精巣に対する影響についても，休薬により完全に回復することが予想される。

2.6.6.10.3 遺伝毒性

リスジプラムは，細菌を用いた試験において変異原性を示さなかった。しかし，マウス及びヒト細胞株を用いた *in vitro* 試験，並びにラット（*in vivo*）の骨髄赤芽球において小核誘発性を示した。リスジプラムを *in vivo* で投与したとき，骨髄での小核を有する細胞を明らかに増加させる高用量においても，肝臓及び空腸における DNA 傷害性は認められなかった。このことから，小核を有する細胞の増加は，リスジプラムの DNA に対する直接的な作用とは異なる間接的な機序により誘発された可能性が示唆された。小核誘発の機序に関する探索的 *in vitro* 試験（2.6.6.4.3）では，ヒト細胞株での本薬処理による小核誘発において，アポトーシス（cleaved

PARP 陽性細胞）の著しい増加及び汎カスパーゼ阻害剤の前処理による小核誘発の抑制が認められ，DNA 以外の標的及びアポトーシスの関与が示唆された。この DNA を直接的な標的としない作用機序の詳細は明らかになっていないが，細胞周期制御及びアポトーシス経路誘導に対して干渉する，本薬の副次的スプライシング標的（*FOXM1*）が関連している可能性が考えられた[33),34)]。

ラット小核試験の無影響量（NOEL）におけるリスジプラムの曝露量を表 2.6.6.10.3-1に示した。また，包括的な統計学的手法により本薬による小核誘発の用量反応性について検討（2.6.6.4.6）した結果，小核誘発に関する遺伝毒性の無影響量（NOGEL）における曝露量（$AUC_{0\text{-}24h}$）は，約3000 ng•h/mL と判断された。NOGEL の値は投与期間延長に応じて増加し，幼若動物は成熟動物よりも感受性が高くないことが推察された。

表 2.6.6.10.3-1 ラット小核試験の NOEL におけるリスジプラムの曝露量

試験	小核試験の NOEL (mg/kg/日)	平均 C_{max} (雄/雌) (ng/mL)	平均 $AUC_{0\text{-}24h}$ (雄/雌) (ng•h/mL)
ラット，3日間投与	3	260 (雄)	3800 (雄)
ラット，4週間投与	1	217/200	1540/1650
幼若ラット，13週間投与	3	759/725	7160/7830

*ラット小核誘発に関する用量反応解析（2.6.6.4.6）において算出された遺伝毒性の無影響量（NOGEL，$AUC_{0\text{-}24h}$ の 90%信頼限界の下限値）は，約 3000 ng•h/mL である。

2.6.6.10.4 がん原性

リスジプラムのがん原性について，rasH2トランスジェニックマウスを用いた26週間投与試験により評価した。最高用量の9 mg/kg/日まで，本薬投与によるがん原性を示唆する所見は認められなかった。

リスジプラムの主要な副次的スプライシング標的である *FOXM1*及び *MADD* に対する作用（2.6.6.10.2.1）は，薬理学的に腫瘍増殖促進よりも抗腫瘍原性に関連していると推察される。また，リスジプラムの投与により，副次的スプライシング標的を介した腫瘍抑制遺伝子の機能阻害や発がん経路の活性化は生じないことが予想される。更に，遺伝毒性試験の結果から，リスジプラムは DNA に対する直接的な傷害性を有さないことが確認されている。

カニクイザルにおいて，リスジプラムの投与により表皮過形成が生じることが確認されているが，これについては，副次的スプライシング標的に対する作用との関連性について更に詳細な検討が必要と考えられる。ヒトの皮膚における過形成及び癌のリスク因子として，選択的スプライシング因子 *SRSF6*及びその下流の因子が主要な標的となる可能性が示唆されている[35)]が，リスジプラムは *SRSF6*及びその下流のスプライシング標的に対していかなる作用も示さなかった[36)]。

2.6.6.10.5 生殖発生毒性

主要な生殖発生毒性試験におけるリスジプラムの曝露量を表 2.6.6.10.5-1に示した。

表 2.6.6.10.5-1　主要な生殖発生毒性試験におけるリスジプラムの曝露量

試験（動物種）	用量 (mg/kg/日)	平均 C_{max} (mg/mL) [雄/雌又は雌]	平均 $AUC_{0\text{-}24h}$ (ng•h/mL) [雄/雌又は雌]
4週間投与（幼若ラット） ［生後4～31日］ 雌雄受胎能の評価	0.75 <u>1.5</u> 2.5[a]	50.9/51.2 107/131 140/141	680/668 1570/1880 1950/2190
13週間投与（幼若ラット） ［生後22～112日］ 雌雄受胎能の評価	1 <u>3</u> 7.5[b]	170/189 759/725 1500/1300	2010/1700 7160/7830 15900/17600
胚・胎児発生（ラット）	1 <u>3</u> 7.5[c]	143 319 962	1540 4630 10700
胚・胎児発生（ウサギ）	1 <u>4</u> 12	310 1500 4220	1880 7990 37900
出生前及び出生後の発生並びに母体の機能（ラット）	0.75 1.5 <u>3</u>	91.6 197 549	954 1880 4230

NOAEL に下線を付した。

a：2.5 mg/kg/日で精巣の病理学的変化が認められたが，雌雄受胎能への影響は認められなかった。

b：7.5 mg/kg/日で精子及び精巣／精巣上体の病理学的変化が認められたが，雌雄受胎能への影響は認められなかった。

c：7.5 mg/kg/日まで催奇形性は認められなかった。

リスジプラムの受胎能及び着床までの初期胚発生への影響については，幼若ラット4週間及び13週間投与試験において評価した。生後4～31日目まで投与を行った幼若ラット4週間投与試験では，2.5 mg/kg/日で投与期間終了時の精巣及び精巣上体重量が対照群と比較して低値を示し，病理組織学的検査では精細管上皮変性が認められた。8週間の休薬期間終了時においても精巣及び精巣上体重量はわずかに低下したままであったが，病理組織学的な異常は認められず，精子検査及び雄の生殖能にも異常は認められなかった。離乳後直ちに（生後22日目）投与を開始した幼若ラット13週間投与試験では，7.5 mg/kg/日で投与期間終了後の交配期間終了時点における精子濃度及び精子運動性の低下，並びに精子の形態異常が認められたが，生殖能（無処置動物との交配及び授胎能）に影響は認められなかった。また，両試験において，雌の生殖能に影響は認められなかった。

胚・胎児発生への影響については，ラットを用いた試験において，7.5 mg/kg/日で母体毒性及び胎児発育阻害が認められたが，催奇形性は認められなかった。一方，ウサギを用いた試験では，顕著な母体毒性がみられた12 mg/kg/日において，胚胎児致死及び胎児形態異常（水頭症）が認められた。

ラットを用いた出生前及び出生後の発生に関する用量設定試験において，リスジプラムを妊娠6日目から授乳6日目まで投与したとき，高用量の7.5 mg/kg/日（TK 測定未実施，ラット胚・胎児発生試験における7.5 mg/kg/日での妊娠15日目の平均 C_{max}：962 ng/mL）で妊娠期間延長及び難産が認められ，6例中3例を安楽死処置した。この変化は，*in vitro* 副次的薬理試験において確認されている，本薬の COX1及び COX2に対する阻害作用（IC_{50}：約800 ng/mL，2.6.2.3.3）に関連した変化の可能性が考えられた。COX1及び COX2阻害により分娩遅延及び難産が発生することが知られており[37)]，げっ歯類は特に感受性が高いことが報告されている[38),39)]。ラット出生前及び出生後の発生に関する本試験（リスジプラムを妊娠6日目から授乳20日目まで投与）では，最高用量の3 mg/kg/日（妊娠15日目の平均 C_{max}：617 ng/mL，ラットにおける非結合型分率を16%（2.6.4.4.1）としたときの非結合型濃度：99 ng/mL）まで，母動物及び出生児（生存性，

身体的及び機能的発達［行動学的機能及び生殖能，雌の卵胞数及び卵巣の病理組織学的所見を含む］）に対する影響は認められなかった。

リスジプラム及び*SMN2*のスプライシングに対し同様の薬理活性を示す別の化合物[4)，40)]において同定された副次的スプライシング標的及び毒性所見から，リスジプラムが雄性生殖細胞に影響を与える可能性が予想された。本薬を投与したラット及びカニクイザルでは精巣の精細管上皮変性が認められ，この作用に対する感受性は，幼若ラットが成熟ラットよりも高く，離乳時から投与を開始したとき特に明らかであった。また，胚・胎児発生に関する試験では，ラット及びウサギにおいて，母体毒性が認められない用量において胎児への影響は認められなかったが，リスジプラムのヒトにおける胚胎児致死及び胎児形態異常誘発の可能性は否定できない。

2.6.6.10.6 新生児を用いた試験

幼若ラット反復投与試験（用量設定試験）において，離乳前にリスジプラムの投与を開始したとき，離乳後に投与を開始した場合と比較して，忍容性が著しく低くなることが確認された。具体的には，離乳前投与（生後4日目から投与開始）では，3.75 mg/kg/日以上で死亡又は状態悪化例が認められたのに対し，離乳後投与（生後22日目から投与開始）では，9 mg/kg/日まで死亡例は認められず，この忍容性の違いは，離乳前及び離乳後ラットにおけるリスジプラムの非結合型／蛋白結合型濃度及び半減期の違いに相関したもの（2.6.4.9）と考えられた。なお，離乳後に投与を開始した幼若ラットにおける毒性所見及び毒性発現時の曝露量は，成獣と概ね一致しており，若齢カニクイザル（投与開始時2歳齢）を用いた39週間投与試験においても，幼若動物の成長，発達への影響を示唆する特異的な変化は認められなかった。

ラット（成獣，幼若）及びカニクイザルの MTD 又は最小毒性用量（LOAEL）における非結合型曝露量を表 2.6.6.10.6-1に示した。動物種及び年齢を問わず，MTD／LOAEL における非結合型 $AUC_{0\text{-}24h}$ は同様であり，離乳前ラットでは消失の遅延が起こっていたことも考慮すると，リスジプラムの非結合型曝露量に基づく毒性プロファイルは，幼若動物と成獣で差がないものと考えられた。

なお，SMA 患者を含むヒトにおいて，血漿中リスジプラム（非結合型）濃度は年齢に関わらず同様であることが確認されており（2.6.4.4.4），離乳前ラットで認められた非結合型の高曝露による忍容性低下は，ヒト新生児においては起こらないと考えられる。

表 2.6.6.10.6-1　ラット及びカニクイザルの MTD／LOAEL におけるリスジプラムの非結合型曝露量

動物種 (年齢)	MTD/LOAEL (mg/kg/日)	平均 総 $AUC_{0\text{-}24h}$ (雄/雌)	非結合型分率 平均値 [最小–最大]	非結合型 $AUC_{0\text{-}24h}$ (雄/雌) 平均値 [最小–最大][h]
ラット(成獣)[a]	7.5	16100/15700	16%[e]	2580/2510
幼若ラット (生後4日)[b]	2.5	2390/2280	35% [28–42%][f]	837 [669–1004] / 798 [638–958]
幼若ラット (生後12日)[b]	2.5	7000/7310	–[g]	–
幼若ラット (生後31日)[b]	2.5	1950/2190	18% [16–21%][f]	351 [312–410] / 294 [350–460]
幼若ラット (生後36日)[c]	9	7940/9580	16%[e]	1270/1530
カニクイザル (2歳齢)[d]	5	5580/6470	15%[e]	882/971

$AUC_{0\text{-}24h}$：0 時間から 24 時間までの濃度–時間曲線下面積，LOAEL：最小毒性用量，MTD：最大耐量

a：ラット 26 週間投与試験（2.6.6.3.5）

b：幼若ラット 4 週間投与試験（2.6.6.6.5.2）

c：幼若ラット反復投与試験（用量設定試験）（2.6.6.6.5.1）

d：カニクイザル 39 週間投与試験（2.6.6.3.9），7.5 mg/kg/日で 12 日間投与後休薬し，5 mg/kg/日に減量して 26 日目に投与を再開した。

e：*In vitro* 血漿蛋白結合（2.6.4.4.1）

f：幼若ラット 4 週間投与試験（2.6.6.6.5.2）において測定した非結合型分率（生後 4 及び 32 日目）

g：幼若マウス及びラットでの血漿蛋白結合（2.6.4.4.2）において，生後 4 日齢，12 日齢及び成熟ラットの非結合型分率はそれぞれ 17.7%～90.4%，17.5%～79.2%及び 11.8%～16.5%であり，幼若ラットでは高いばらつきがみられた。

h：総 $AUC_{0\text{-}24h}$ を，非結合型分率の平均値，最小値又は最大値で割った値を示した。

2.6.6.10.7　毒性発現の機序に関する試験

カニクイザル39週間投与試験で認められた網膜変性の機序を明らかにするため，ヒト網膜色素上皮細胞株（ARPE19）を用いた *in vitro* 試験を実施した結果，本薬によるリソソーム機能障害及びオートファゴソーム蓄積作用が，網膜傷害に関連している可能性が示唆された（2.6.6.10.2.2）。

また，ヒト／カニクイザル iPSCs を用いた *in vitro* 試験において，本薬を含む *SMN2*スプライシング修飾薬による *FOXM1 B/C* 転写産物バリアント発現に対する作用（ダウンレギュレーション）が認められ，その強さと濃度依存的な有糸分裂停止との間に相関があることが示唆された。*In vivo* においても，リスジプラムを投与したラット及びカニクイザルの組織において，細胞周期に関連する *FOXM1*，アポトーシスに関連する *MADD* を含む複数の遺伝子のスプライシングに対する調節作用が認められ，細胞増殖サイクルの速い器官において認められた毒性所見との関連性が示唆された（2.6.6.10.2.1）。

2.6.6.10.8　その他の毒性

1)　光安全性及び感作性

リスジプラムは波長240～400 nm の紫外線を吸収する（3.2.S.3.1.4）ことから，潜在的な光毒性リスクを評価するため，マウス線維芽細胞株（Balb/c 3T3）を用いた *in vitro* 試験を実施した。リスジプラムの溶解性に限度がみられた（最高濃度：9 μg/mL）ものの，本試験条件下においてリスジプラムは光毒性を有さないと判断された。また，マウスを用いた皮膚感作性試験

（LLNA）において，臨床製剤の1～5倍量までの経皮投与，又はヒトでの治療域の曝露量が得られる用量で3日間経口投与したとき，更に，引き続いて経口又は経皮投与により惹起したとき，感作性及び刺激性の徴候は認められなかった。

2) 不純物の安全性

主要な毒性試験において用いたリスジプラムは，市販用と同様の合成ルートで製造した原薬ロットを使用した（表2.6.7.4-1）。不純物については，ICH Q3A(R2)（平成14年12月16日 医薬審発第1216001号 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）（一部改正：平成18年12月4日 薬食審査発1204001号）に適合した規格を設定し，市販用の合成ルートで製造した原薬において，安全性確認を必要とする不純物が存在しないことを確認した（3.2.S.3.2.1.1.1）。したがって，不純物に関する追加の毒性評価は必要ないと判断した。また，リスジプラム原薬中の潜在的な遺伝毒性不純物については，ICH M7（平成27年11月10 日 薬生審査発1110第3号 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）において規定されている許容値を下回るよう管理されている（3.2.S.3.2.1.1.2）。

3) 製剤添加物の安全性

リスジプラムの臨床製剤に含まれる添加物について，小児及び成人での使用時における安全性評価を行った結果，経口投与製剤における個々の添加物について，安全性上の懸念がないことを確認した[41)]。安息香酸ナトリウムの小児における潜在的リスク（黄疸）が確認されたが，リスジプラム製剤において含まれる量は少なく，臨床での使用条件下において有害な影響は生じないと考えられた。

2.6.6.10.9 結論

全体として，リスジプラムによる毒性所見は，その経時的変化及び投与期間に基づき，以下の2つのカテゴリーに分類することができる。

- 副次的スプライシング標的に関連した急性／亜急性の有害作用：細胞増殖サイクルの速い器官に対する作用及び催奇形性を含む
- 網膜変性：本薬の長期投与によりカニクイザルのみで発生し，発生機序は完全には解明されていない

副次的スプライシング標的に対する作用に伴う変化は，本薬の主たる薬理学的作用である*SMN2*に対するスプライシング修飾作用と同様に，早期に変化の徴候が認められ，基本的に可逆的と考えられた。一方，網膜変性は遅延性の毒性であり，視細胞消失を伴う非可逆的変化である。この2つの毒性変化の曝露作用関係は，いずれもヒト治療域の曝露量（平均 AUC の最大値：2000 ng•h/mL）に対する安全性マージンが低い（約1～10倍未満）ことにおいて類似していた（2.4.4.9）。

2.6.6.11 図表

本文中に挿入した。

2.6.6.12 参考文献

1） Naryshkin NA, Weetall M, Dakka A, Narasimhan J, Zhao X, Feng Z, et al. SMN2 splicing modifiers improve motor function and longevity in mice with spinal muscular atrophy. Science 2014;345:688-93.

2） Palacino J, Swalley SE, Song C, Cheung AK, Shu L, Zhang X, et al. SMN2 splice modulators enhance U1-pre-mRNA association and rescue SMA mice. Nat Chem Biol 2015;11:511-7.

3） Sivaramakrishnan M, McCarthy KD, Campagne S, Huber S, Meier S, Augustin A,et al. Binding to SMN2 pre-mRNA-protein complex elicits specificity for small molecule splicing modifiers. Nat Commun 2017;8:1476.
4） Ratni H, Ebeling M, Baird J, Bendels S, Bylund J, Chen KS, et al. Discovery of risdiplam, a selective survival of motor neuron-2 (SMN2) gene splicing modifier for the treatment of spinal muscular atrophy (SMA). J Med Chem 2018;61:6501-17.
5） RO6885247: 39-week oral (gavage) administration toxicity study in the cynomolgus monkey with a 26-week recovery phase (incl. Amendment 1). Roche 社報告書 1060167 (AMENDED), 20[redacted].
6） Results of the Ames microsuspension assay with RO7034067-000-002 (Study No. 2414S13, non-GLP screening test for genotoxic activity). Roche 社報告書 1063055, 20[redacted].
7） RO7034067-000-013: Bacterial reverse mutation test (Ames test) in Salmonella typhimurium strain TA98. Roche 社報告書 1065344, 20[redacted].
8） RO7034067-000-014: Bacterial reverse mutation test (Ames test) in Salmonella typhimurium strain TA98. Roche 社報告書 1065345, 20[redacted].
9） RO7021707, RO7034067: Combined Comet assay (liver, jejunum) and Micronucleus test (bone marrow) in rat – Oral administration (gavage). Roche 社報告書 1059949, 20[redacted].
10） MacGregor JT, Frötschl R, White PA, Crump KS, Eastmond DA, Fukushima S, et al. IWGT Report on quantitative approaches to genotoxicity risk assessment I. Methods and metrics for defining exposure-response relationships and points of departure (PoDs). Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen 2015;783:55-65.
11） Zeller A, Duran-Pacheco G, Guérard M. An appraisal of critical effect sizes for the benchmark dose approach to assess dose-response relationships in genetic toxicology. Arch Toxicol 2017;91:3799-807.
12） Measurement of secondary pharmacology by splice variant specific RT-qPCR assays in a multiple dose terminal oral pharmacokinetic study in Cynomolgus monkey including tissue distribution of RO7034067 and RO6885247. Roche 社報告書 1067982, 20[redacted].
13） Measurement of secondary pharmacology by splice variant specific RT-qPCR assays in a multiple dose terminal oral pharmacokinetic study in albino and pigmented rats including tissue distribution of RO7034067 and RO6885247. Roche 社報告書 1068196, 20[redacted].
14） Raj B, Blencowe BJ. Alternative Splicing in the Mammalian Nervous System: Recent Insights into Mechanisms and Functional Roles. Neuron. 2015;87:14-27.
15） Ratni H, Mueller L, Ebeling M. Rewriting the (tran)script: Application to spinal muscular atrophy. Prog Med Chem 2019;58:119-56.
16） Kurada BR, Li LC, Mulherkar N, Subramanian M, Prasad KV, Prabhakar BS. MADD, a splice variant of IG20, is indispensable for MAPK activation and protection against apoptosis upon tumor necrosis factor-alpha treatment. J Biol Chem 2009;284:13533-41.
17） Nolte T, Brander-Weber P, Dangler C, Deschl U, Elwell MR, Greaves P, et al. Nonproliferative and proliferative lesions of the gastrointestinal tract, pancreas and salivary glands of the rat and mouse. J Toxicol Pathol 2016;29:1S-124S.
18） Gemenetzidis E, Elena-Costea D, Parkinson EK, Waseem A, Wan H, Teh MT. Induction of human epithelial stem/progenitor expansion by FOXM1. Cancer Res 2010;70:9515-26.
19） Teh MT, Gemenetzidis E, Chaplin T, Young BD, Philpott MP. Upregulation of FOXM1 induces genomic instability in human epidermal keratinocytes. Mol Cancer 2010;9:45.
20） Ye H, Kelly TF, Samadani U, Lim L, Rubio S, Overdier DG, et al. Hepatocyte nuclear factor 3/fork head homolog 11 is expressed in proliferating epithelial and mesenchymal cells of embryonic and adult tissues. Mol Cell Biol 1997;17:1626-41.
21） Herrmann A, Mueller L. A human keratinocyte tissue model can differentiate between phototoxicity and direct skin toxicity. Poster #418, Society of Toxicology 54th Annual Meeting, San Diego, CA, 2015.

22) Chaudhary J, Mosher R, Kim G, Skinner MK. Role of winged helix transcription factor (WIN) in the regulation of Sertoli cell differentiated functions: WIN acts as an early event gene for follicle-stimulating hormone. Endocrinology 2000;141:2758-66.
23) O'Donnell L, Pratis K, Wagenfeld A, Gottwald U, Müller J, Leder G, et al. Transcriptional profiling of the hormone-responsive stages of spermatogenesis reveals cell-, stage-, and hormone-specific events. Endocrinology 2009;150:5074-84.
24) Blanco-Rodríguez J. A matter of death and life: the significance of germ cell death during spermatogenesis. Int J Androl 1998;21:236-48.
25) Bartlett JM, Kerr JB, Sharpe RM. The selective removal of pachytene spermatocytes using methoxy acetic acid as an approach to the study in vivo of paracrine interactions in the testis. J Androl 1988;9:31-40.
26) Wade MG, Kawata A, Williams A, Yauk C. Methoxyacetic acid-induced spermatocyte death is associated with histone hyperacetylation in rats. Biol Reprod 2008;78:822-31.
27) Testicular seminiferous degeneration with selective survival of motor neuron-2 (SMN2) gene splicing modifying agents: a common off-target class effect. Roche 社報告書 1093542 (version 2), 20[redacted].
28) Kevany BM, Palczewski K. Phagocytosis of retinal rod and cone photoreceptors. Physiology (Bethesda) 2010;25:8-15.
29) Liu MM, Zack DJ. Alternative splicing and retinal degeneration. Clin Genet 2013;84:142-9.
30) Kataoka Y, Ikehara Y, Hattori T. Cell proliferation and renewal of mouse adrenal cortex. J Anat 1996;188:375-81.
31) Malendowicz LK, Jachimowicz B. Sex differences in adrenocortical structure and function. XI. Autoradiographic studies on cell proliferation and turnover in the adrenal cortex of the male and female rat and its dependence on testosterone and estradiol. Cell Tissue Res 1982;227:651-7.
32) Rebuffat P, Belloni AS, Rocco S, Andreis PG, Neri G, Malendowicz LK, et al. The effects of ageing on the morphology and function of the zonae fasciculata and reticularis of the rat adrenal cortex. Cell Tissue Res 1992;270:265-72.
33) Costa RH. FoxM1 dances with mitosis. Nat Cell Biol 2005;7:108-10.
34) Laoukili J, Kooistra MR, Brás A, Kauw J, Kerkhoven RM, Morrison A, et al. FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability. Nat Cell Biol 2005;7:126-36.
35) Jensen MA, Wilkinson JE, Krainer AR. Splicing factor SRSF6 promotes hyperplasia of sensitized skin. Nat Struct Mol Biol 2014;21:189-97.
36) Possible treatment effect of RO7034067 on SRSF6. Roche 社報告書 1092960, 20[redacted].
37) Urrego D, Liwa AC, Cole WC, Wood SL, Slater DM. Cyclooxygenase inhibitors for treating preterm labour: What is the molecular evidence? Can J Physiol Pharmacol 2019;97:222-31.
38) Chester R, Dukes M, Slater SR, Walpole AL. Delay of parturition in the rat by anti-inflammatory agents which inhibit the biosynthesis of prostaglandins. Nature 1972;240:37-8.
39) Reese J, Paria BC, Brown N, Zhao X, Morrow JD, Dey SK. Coordinated regulation of fetal and maternal prostaglandins directs successful birth and postnatal adaptation in the mouse. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97:9759-64.
40) Ratni H, Karp GM, Weetall M, Naryshkin NA, Paushkin SV, Chen KS, et al. Specific correction of alternative survival motor neuron 2 splicing by small molecules: Discovery of a potential novel medicine to treat spinal muscular atrophy. J Med Chem 2016;59:6086-100.
41) SMN2 (RO7034067): Toxicological assessment report on excipients in an oral drug formulation (Ro703-4067/F12) for pediatric use. Roche 社報告書 1077240, 20[redacted].

目次

2.6.7 毒性試験概要表 6
2.6.7.1 毒性試験一覧表 6
2.6.7.2 トキシコキネティクス試験の一覧表 10
2.6.7.3 トキシコキネティクス試験成績の一覧 11
2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）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 21
2.6.7.7.1 マウス 4 週間投与試験 21
2.6.7.7.2 ラット 4 週間投与試験（4 週間回復性試験） 24
2.6.7.7.3 ラット 26 週間投与試験（8 週間回復性試験） 28
2.6.7.7.4 有色ラット探索的 26 週間投与試験 36
2.6.7.7.5 カニクイザル 2 週間投与試験（2 週間回復性試験） 43
2.6.7.7.6 カニクイザル 39 週間投与試験（22 週間回復性試験） 47
2.6.7.8 *In vitro* 遺伝毒性試験 57
2.6.7.8.1 細菌を用いる復帰突然変異試験 57
2.6.7.8.2 マウスリンフォーマ細胞を用いる *in vitro* 小核スクリーニング試験 61
2.6.7.8.3 *In vitro* 小核試験（機序解析試験） 62
2.6.7.9 *In vivo* 遺伝毒性試験 65
2.6.7.9.1 ラット小核／コメット試験 65
2.6.7.9.2 ラット 4 週間投与試験（小核誘発性評価） 67
2.6.7.9.3 幼若ラット 13 週間投与試験（小核誘発性評価） 68
2.6.7.9.4 ラット小核誘発に関する用量反応解析 69
2.6.7.10 がん原性試験 70
2.6.7.10.1 rasH2 マウス 26 週間投与試験 70
2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 74
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 76
2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 77
2.6.7.13.1 ラット胚・胎児発生に関する予備試験 77
2.6.7.13.2 ラット胚・胎児発生に関する試験 78
2.6.7.13.3 ウサギ胚・胎児発生に関する予備試験 81
2.6.7.13.4 ウサギ胚・胎児発生に関する試験 82
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 86
2.6.7.14.1 ラット出生前及び出生後の発生に関する予備試験 86
2.6.7.14.2 ラット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 87

2.6.7.15 新生児を用いた試験 92
2.6.7.15.1 幼若ラット反復投与試験（用量設定試験） 92
2.6.7.15.2 幼若ラット 4 週間投与試験（4 週間回復性試験） 94
2.6.7.15.3 幼若ラット 4 週間投与試験（8 週間回復性試験） 98
2.6.7.15.4 幼若ラット 13 週間投与試験（8 週間回復性試験） 105
2.6.7.16 局所刺激性試験 112
2.6.7.17 その他の毒性試験 113
2.6.7.17.1 *In vitro* 眼毒性試験 113
2.6.7.17.2 ヒト/カニクイザル iPS 細胞への影響 114
2.6.7.17.3 マウス線維芽細胞株を用いた *in vitro* 光毒性試験 114
2.6.7.17.4 マウス皮膚感作性試験 115

表一覧

表 2.6.7.1-1 毒性試験一覧表 6
表 2.6.7.2-1 トキシコキネティクス試験の一覧表 10
表 2.6.7.3-1 トキシコキネティクス試験成績の一覧 11
表 2.6.7.4-1 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧 14
表 2.6.7.6-1 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 17
表 2.6.7.7.1-1 マウス4週間投与試験 21
表 2.6.7.7.2-1 ラット4週間投与試験（4週間回復性試験） 24
表 2.6.7.7.3-1 ラット26週間投与試験（8週間回復性試験） 28
表 2.6.7.7.4-1 有色ラット探索的26週間投与試験 36
表 2.6.7.7.5-1 カニクイザル2週間投与試験（2週間回復性試験） 43
表 2.6.7.7.6-1 カニクイザル39週間投与試験（22週間回復性試験） 47
表 2.6.7.8.1-1 細菌を用いる復帰突然変異試験 57
表 2.6.7.8.2-1 マウスリンフォーマ細胞を用いる *in vitro* 小核スクリーニング試験 61
表 2.6.7.8.3-1 *In vitro* 小核試験（機序解析試験） 62
表 2.6.7.9.1-1 ラット小核／コメット試験 65
表 2.6.7.9.2-1 ラット4週間投与試験（小核誘発性評価） 67
表 2.6.7.9.3-1 幼若ラット13週間投与試験（小核誘発性評価） 68
表 2.6.7.9.4-1 ラット小核誘発に関する用量反応解析 69
表 2.6.7.10.1-1 rasH2マウス26週間投与試験 70
表 2.6.7.11-1 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 74
表 2.6.7.13.1-1 ラット胚・胎児発生に関する予備試験 77
表 2.6.7.13.2-1 ラット胚・胎児発生に関する試験 78
表 2.6.7.13.3-1 ウサギ胚・胎児発生に関する予備試験 81
表 2.6.7.13.4-1 ウサギ胚・胎児発生に関する試験 82
表 2.6.7.14.1-1 ラット出生前及び出生後の発生に関する予備試験 86
表 2.6.7.14.2-1 ラット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 87
表 2.6.7.15.1-1 幼若ラット反復投与試験（用量設定試験） 92
表 2.6.7.15.2-1 幼若ラット4週間投与試験（4週間回復性試験） 94
表 2.6.7.15.3-1 幼若ラット4週間投与試験（8週間回復性試験） 98
表 2.6.7.15.4-1 幼若ラット13週間投与試験（8週間回復性試験） 105

表 2.6.7.17.1-1 *In vitro* 眼毒性試験 113
表 2.6.7.17.2-1 ヒト/カニクイザル iPS 細胞への影響 114
表 2.6.7.17.3-1 マウス線維芽細胞株を用いた *in vitro* 光毒性試験 114
表 2.6.7.17.4-1 マウス皮膚感作性試験 115

略語一覧

略語	英名	和名
2-AA	2-aminoanthracene	2-アミノアントラセン
2-NF	2-nitrofluorene	2-ニトロフルオレン
APLP2	Amyloid precursor-like protein 2	–
ARPE19	Human retinal pigment epithelial cell line	ARPE19（ヒト網膜色素上皮細胞株）
AUC	Area under the concentration-time curve	濃度–時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}24h}$	Area under the concentration-time curve from time 0 to 24 hours	0～24時間までの濃度–時間曲線下面積
BLQ	Below lower limit of quantification	定量下限未満
BMD	Benchmark dose	ベンチマークドーズ
BMDL	The lower 90% confidence interval of the BMD	ベンチマークドーズの90%信頼区間の下限値
CCCP	Carbonyl cyanide 3-chlorophenyl hydrazone	カルボニルシアナイド3-クロロフェニルヒドラゾン
C_{max}	Maximum concentration	最高濃度
CNS	Central nervous system	中枢神経系
CP	Cyclophosphamide monohydrate	シクロホスファミド一水和物
CSF	Cerebrospinal fluid	脳脊髄液
D	Day	日
DAPI	4’, 6-Diamidin-2-phenylindol	4’, 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール
DDR	DNA damage response	DNA 傷害性反応
DE	Dose escalation phase	用量漸増期
DMSO	Dimethylsulfoxide	ジメチルスルホキシド
DRF	Dose-range finding	投与量設定
EFD	Embryofetal development	胚・胎児発生
EMS	Ethyl methanesulfonate	エチルメタンスルホン酸
ERG	Electroretinogram	網膜電図
FD	Fixed-dose phase	固定用量期
FOXM1	Forkhead box protein M1	–
GD	Gestation day	妊娠日数
GFAP	Glial fibrillary acidic protein	グリア線維性酸性蛋白質
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
hERG	human ether-à-go-go-related gene	ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子
IC_{50}	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
iPSCs	Induced pluripotent stem cells	人工多能性幹細胞
LLNA	Local lymph node assay	局所リンパ節試験
LUC	Large unstained cells	大型非染色細胞
M/F	Male/Female	雄／雌
MADD	MAP kinase activating death domain	–
MCHC	Mean corpuscular hemoglobin concentration	平均赤血球ヘモグロビン濃度
MMC	Mitomycin	マイトマイシン
MMD	Microcystic macular degeneration	小嚢胞性黄斑変性
MMS	Methylmethanesulfonate	メチルメタンスルホン酸
MN	Micronucleus, Micronucleated	小核

略語	英名	和名
MN cells	Cells containing micronuclei	小核を有する細胞
MN-PCE	Micronucleated polychromatic erythrocytes	小核を有する多染性赤血球
MTD	Maximum tolerated dose	最大耐量
n.s.	Not significant	有意でない
NA	Not applicable	該当なし
Na-azide	Sodium azide	アジ化ナトリウム
NC	Not calculated	算出せず
NCE	Normochromatic erythrocytes	正染性赤血球
ND	Not detected	検出せず
NOAEL	No observed adverse effect level	無毒性量
NOGEL	No observed genotoxic effect level	遺伝毒性の無影響量
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase	ポリ(ADP–リボース)ポリメラーゼ
PCE	Polychromatic erythrocytes	多染性赤血球
PD	Population doubling	倍加
PND	Postnatal day	生後日数
PO	Per os (by mouth; orally)	経口
pp	Post partum	産後
PPND	Pre- and postnatal development	出生前及び出生後の発生
RCC	Relative cell count	相対的な細胞カウント数
RDW	Red blood cell distribution width	赤血球分布幅
RINC	Relative increase of nuclei count	相対的な核カウント数の増加
RNC	Relative nuclei count	相対的な核カウント数
RPD	Relative population doubling	相対的な倍加
RPE	Retinal pigment epithelium	網膜色素上皮
SMN	Survival of motor neuron	–
STRN3	Striatin, calmodulin binding protein 3	–
TK	Toxicokinetic	トキシコキネティクス
T_{max}	Time to maximum concentration	最高濃度到達時間
UV	Ultraviolet	紫外線
wk	Week	週
zVAD-FMK	Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]- fluoromethylketone	–
γH2AX	Phosphorylation of serine 139 residue of histone protein 2A	ヒストン蛋白2A のリン酸化部位（セリン139）

2.6.7 毒性試験概要表

2.6.7.1 毒性試験一覧表

表 2.6.7.1-1 毒性試験一覧表

Test Article: Risdiplam

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Location in CTD [Report No.]
Single-Dose Toxicity No dedicated studies of this type were conducted.							
Repeat-Dose Toxicity							
Tolerability	Mouse/RasH2 wt	PO/gavage	7 days	0, 10, 20, 30, 100	No	[redacted]	4.2.3.2-1 [1073193]
Repeat dose toxicity	Mouse/RasH2 wt	PO/gavage	4 weeks	0, 3, 9, 20/16	Yes	[redacted]	4.2.3.2-2 [1077199]
Non-pivotal repeat dose toxicity	Rat/HanWistar	PO/gavage	14 days	0, 0.75, 2.5, 7.5	No	Roche	4.2.3.2-3 [1061416]
Repeat dose toxicity	Rat/HanWistar	PO/gavage	4 weeks	0, 1, 3, 9	Yes	[redacted]	4.2.3.2-4 [1064057]
Repeat dose toxicity	Rat/HanWistar	PO/gavage	26 weeks	0, 1, 3, 7.5	Yes	[redacted]	4.2.3.2-5 [1067365]
Repeat dose toxicity	Rat/Brown Norway, pigmented	PO/gavage	26 weeks	0, 7.5/5	No	[redacted]	4.2.3.2-6 [1067962]
Non-pivotal repeat dose toxicity	Monkey/ Cynomolgus	PO/gavage	DE:17 days FD: 2 weeks	DE: up to 20 FD: 0, 0.75, 1.5, 3, 6	No	[redacted]	4.2.3.2-7 [1061651]
Repeat dose toxicity	Monkey/ cynomolgus	PO/gavage	2 weeks	0, 2, 4, 6	Yes	[redacted]	4.2.3.2-8 [1066289]
Repeat dose toxicity	Monkey/ Cynomolgus	PO/gavage	39 weeks	0, 1.5, 3, 7.5/5	Yes	[redacted]	4.2.3.2-9 [1063584]

表 2.6.7.1-1 毒性試験一覧表（続）

Test Article: Risdiplam

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Location in CTD (Report. No)
Genotoxicity							
Bacterial reverse mutation	Salmonella typhimurium Escherichia coli	*In vitro*	—	S9 mix (+/−): up to 5000 µg/plate	Yes	Roche	4.2.3.3.1-1 [1063901]
Micronucleus assay	L5178Y $tk^{+/-}$ mouse lymphoma cells	*In vitro*	—	0.5–20 µg/mL	No	Roche	4.2.3.3.1-2 [1063026]
Micronuclei, DNA damage response, cell cycle and caspase inhibition	L5178Y $tk^{+/-}$ mouse lymphoma cells, Human TK6 lymphoblastoid cells	*In vitro*	—	0.0019–100 µM	No	Roche	4.2.3.3.1-3 [1066849]
Micronucleus and Comet assay	Rat/HanWistar	PO/gavage	3 days	0, 0.75, 1.5, 3, 6, 12.5, 25	Yes	Roche	4.2.3.3.2-1 [1063368]
Micronucleus	Rat/HanWistar	PO/gavage	*In vivo* (4 weeks)	0, 1, 3, 9	Yes	[redacted]	4.2.3.2-4 [1064057]
Micronucleus	Rat/HanWistar	PO/gavage	*In vivo* (13 weeks)	0, 1, 3, 7.5	Yes	[redacted]	4.2.3.5.4-4 [1065114]
Micronucleus, dose response modelling	TK data from rat plasma	—	—	—	No	Roche	4.2.3.3.2-2 [1069153]
Carcinogenicity							
26 week carcinogenicity study in TG mice	Mouse/RasH2	PO/gavage	26 weeks	0, 1, 3, 9	Yes	[redacted]	4.2.3.4.2-1 [1081793]

表 2.6.7.1-1 毒性試験一覧表（続）

Test Article: Risdiplam

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Location in CTD (Report No.)
Reproductive and Developmental Toxicity							
DRF embryo-fetal development	Rat/HanWistar	PO/gavage	GD6–17	0, 1, 3, 7.5	Yes	[redacted]	4.2.3.5.2-1 [1080127]
Embryo-fetal developmental	Rat/HanWistar	PO/gavage	GD6–17	0, 1, 3, 7.5	Yes	[redacted]	4.2.3.5.2-2 [1084123]
Tolerability repeat dose	Rabbit/NZW	PO/gavage	8 days	0, 3, 8, 16	No	[redacted]	4.2.3.5-2-3 [1076595]
DRF embryo-fetal development	Rabbit/NZW	PO/gavage	GD6–19	0, 3, 6, 12	Yes	[redacted]	4.2.3.5.2-4 [1080126]
Embryo-fetal developmental	Rabbit/NZW	PO/gavage	GD6–19	0, 1, 4, 12	Yes	[redacted]	4.2.3.5.2-5 [1084122]
DRF pre-and postnatal development	Rat/HanWistar	PO/gavage	GD6–PND6	0, 1, 3, 7.5	No	[redacted]	4.2.3.5.3-1 [1085603]
Pre-and postnatal development	Rat/HanWistar	PO/gavage	GD6–PND20	0, 0.75, 1.5, 3	Yes	[redacted]	4.2.3.5.3-2 [1088289]
Juvenile Animals							
Juvenile toxicity PND4–31 PND22-36	Rat/HanWistar	PO/gavage	4 weeks 2 weeks	0, 2.5, 3.75, 5, 10 0, 1, 3, 9	No	[redacted]	4.2.3.5.4-1 [1063098]
Juvenile toxicity PND4–31	Rat/HanWistar	PO/gavage	4 weeks	0, 1, 2.5[b]	Yes	[redacted]	4.2.3.5.4-2 [1066709]
Juvenile toxicity PND4–31	Rat/HanWistar	PO/gavage	4 weeks	0, 0.75, 1.5, 2.5	Yes	[redacted]	4.2.3.5.4-3 [1088815]
Juvenile toxicity PND22–112	Rat/HanWistar	PO/gavage	13 weeks	0, 1, 3, 7.5	Yes	[redacted]	4.2.3.5.4-4 [1065114]

表 2.6.7.1-1 毒性試験一覧表（続）

Test Article: Risdiplam

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)[a]	GLP Compliance	Testing Facility	Location in CTD (Report No.)
Other Toxicity Studies							
Ocular toxicity	Retinal pigment epithelial cells (ARPE19 cell line)	*In vitro*	—	0.39–50 µg/mL	No	Roche	4.2.3.7.3-1 [1066986]
Effect on cell cycle regulation	Monkey and Human induced pluripotent stem cells	*In vitro*	—	0.00064–10 µM	No	Roche	4.2.3.7.3-2 [1067264]
Phototoxicity	3T3 mouse fibroblasts	*In vitro*	—	0.004–9 µg/mL	No	Roche	4.2.3.7.7-1 [1063018]
Skin irritation and sensitization (Local lymph node assay)	Mouse/ CBA/J	Dermal/PO	3 days	0, 1.7, 5.0, 8.4 (dermal), 3 (PO)	Yes	[redacted]	4.2.3.7.7-2 [1087553]

[redacted] ([redacted], [redacted]), Roche: F. Hoffmann-La Roche Ltd (Basel, Switzerland), [redacted] ([redacted], [redacted]), [redacted] ([redacted], [redacted]), [redacted] ([redacted], [redacted])

2.6.7.2 トキシコキネティクス試験の一覧表

表 2.6.7.2-1 トキシコキネティクス試験の一覧表

Test Article: Risdiplam

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Doses (mg/kg/day)	GLP Compliance	Location in CTD
7-day repeat dose toxicity	Mouse/RasH2 wt	PO/gavage	0, 10, 20, 30, 100	No	4.2.3.2-1
4-week repeat dose toxicity	Mouse/RasH2 wt	PO/gavage	0, 3, 9, 20/16	Yes	4.2.3.2-2
14-day repeat dose toxicity	Rat/HanWistar	PO/gavage	0, 0.75, 2.5, 7.5	No	4.2.3.2-3
4-week repeat dose toxicity	Rat/HanWistar	PO/gavage	0, 1, 3, 9	Yes	4.2.3.2-4
26-week repeat dose toxicity	Rat/HanWistar	PO/gavage	0, 1, 3, 7.5	Yes	4.2.3.2-5
26-week repeat dose toxicity	Rat/Brown Norway, pigmented	PO/gavage	0, 7.5/5	No	4.2.3.2-6
17-day and 2-week repeat dose toxicity	Monkey/ Cynomolgus	PO/gavage	DE: up to 20 FD: 0, 0.75, 1.5, 3, 6	No	4.2.3.2-7
2-week repeat dose toxicity	Monkey/ Cynomolgus	PO/gavage	0, 2, 4, 6	Yes	4.2.3.2-8
39-week repeat dose toxicity	Monkey/ Cynomolgus	PO/gavage	0, 1.5, 3, 7.5/5	Yes	4.2.3.2-9
26-week carcinogenicity	Mouse/RasH2	PO/gavage	0, 1, 3, 9	Yes	4.2.3.4.2-1
DRF embryofetal development	Rat/HanWistar	PO/gavage	0, 1, 3, 7.5	Yes	4.2.3.5.2-1
Embryofetal development	Rat/HanWistar	PO/gavage	0, 1, 3, 7.5	Yes	4.2.3.5.2-2
Tolerability repeat dose	Rabbit/NZW	PO/gavage	0, 3, 8, 16	No	4.2.3.5.2-3
DRF embryofetal development	Rabbit/NZW	PO/gavage	0, 3, 6, 12	Yes	4.2.3.5.2-4
Embryofetal developmental	Rabbit/NZW	PO/gavage	0, 1, 4, 12	Yes	4.2.3.5.2-5
DRF pre- and postnatal development	Rat/HanWistar	PO/gavage	0, 1, 3, 7.5	No	4.2.3.5.3-1
Pre- and postnatal development	Rat/HanWistar	PO/gavage	0, 0.75, 1.5, 3	Yes	4.2.3.5.3-2
Juvenile animal toxicity (4-week daily dose, PND4–31) (2-week daily dose, PND22–36)	Rat/HanWistar	PO/gavage	 0, 2.5, 3.75, 5, 10 0, 1, 3, 9	No	4.2.3.5.4-1
Juvenile animal toxicity (4-week daily dose, PND4–31)	Rat/HanWistar	PO/gavage	0, 1, 2.5	Yes	4.2.3.5.4-2
Juvenile animal toxicity (4-week daily dose, PND4–31)	Rat/HanWistar	PO/gavage	0, 0.75, 1.5, 2.5	Yes	4.2.3.5.4-3
Juvenile animal toxicity (13-week daily dose, PND22–112)	Rat/HanWistar	PO/gavage	0, 1, 3, 7.5	Yes	4.2.3.5.4-4

2.6.7.3 トキシコキネティクス試験成績の一覧

表 2.6.7.3-1 トキシコキネティクス試験成績の一覧

Test Article: Risdiplam

Daily Doses (mg/kg)	Steady State AUC (ng•h/mL) of Risdiplam									
	Mouse		Rat		Monkey		Juvenile Rat		Pregnant rat	Pregnant rabbit
	M	F	M	F	M	F	M	F		
0.75			1760[d]	1940[d]	589[h]	840[h]	680[m]	668[m]	1020[q]	
1	1730[c]	797[c]	1540[e]	1650[e]	1860[h]	1650[h]	563[k]	854[k]	1540[p]	1880[t]
1			2200[f]	2400[f]			744[l]	868[l]	1360[o]	
1							2010[n]	1700[n]		
1.5					1170[h]	1970[h]	1570[m]	1880[m]	3190[q]	
1.5					1870[j]	2060[j]				
2					2650[i]	2460[i]				
2.5			5600[d]	6240[d]			1340[k]	1560[k]		
2.5							1920[l]	2260[l]		
2.5							1950[m]	2190[m]		
3	2850[b]	2110[b]	5450[e]	5890[e]	4230[h]	4300[h]	2420[k]	3350[k]	4630[p]	6050[r, *]
3	4850[c]	3630[c]	7010[f]	8830[f]	3130[h]	6720[h]	7160[n]	7830[n]	5500[o]	6710[s]
3					4880[j]	4850[j]			6710[q]	
3.75							2430[k]	2660[k]		
4					8650[i]	8450[i]				7990[t]
5 (7.5)			14500[g]	NA	5880[j]	6470[j]				
6					12800[i]	11500[i]				12300[s]
6					15800[h]	12200[h]				

表 2.6.7.3-1 トキシコキネティクス試験成績の一覧（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Doses (mg/kg)	Steady State AUC (ng•h/mL) of Risdiplam									
	Mouse		Rat		Monkey		Juvenile Rat		Pregnant rat	Pregnant rabbit
	M	F	M	F	M	F	M	F		
7.5			16100 [f]	15700 [f]			15900 [n]	17600 [n]	10700 [p]	
7.5			19600 [d]	17100 [d]					18800 [o]	
8										31000 [r, *]
9	9520 [b]	10400 [b]	15300 [e]	17700 [e]			7940 [k]	9580 [k]		
	15600 [c]	11800 [c]								
10	11500 [a]	11600 [a]			19300 [h]	34300 [h]				
12										37900 [t]
12										28600 [s]
16										71300 [r, *]
16 (20)	21200 [b]	15100 [b]								
20	20000 [a]	22500 [a]			36900 [h, #]	53800 [h, #]				
30	29000 [a, #]	29600 [a, #]								
100	66500 [a, #]	80200 [a, #]								

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

a. 7 day mouse [4.2.3.2-1], b. 4 week mouse [4.2.3.2-2], c. 26 week carcinogenicity mouse [4.2.3.4.2-1], d. 14 day DRF rat [4.2.3.2-3], e. 4 week rat [4.2.3.2-4],
f. 26 week rat [4.2.3.2-5], g. 26 week pigmented rat [4.2.3.2-6], h. DRF and 2 week FD monkey [4.2.3.2-7], i. 2 week monkey [4.2.3.2-8], j. 39 week monkey [4.2.3.2-9],
k. 4 week DRF juvenile rat [4.2.3.5.4-1], l. 4 week juvenile rat [4.2.3.5.4-2], m. 4 week juvenile rat [4.2.3.5.4-3], n. 13 week juvenile rat [4.2.3.5.4-4],
o. DRF EFD rat [4.2.3.5.2-1], p. EFD rat [4.2.3.5.2-2], q. PPND rat [4.2.3.5.3-2], r. Tolerability rabbit [4.2.3.5.2-3], s. DRF EFD rabbit [4.2.3.5.2-4],
t. EFD rabbit [4.2.3.5.2-5].

*. No pregnant rabbits were used. #. Single dose

表 2.6.7.3-1 トキシコキネティクス試験成績の一覧（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Doses (mg/kg)	Steady State AUC (ng•h/mL) of Metabolite M1 (RO7112063)					
	Mouse		Juvenile Rat		Pregnant rat	Pregnant rabbit
	M	F	M	F		
0.75			163 [c]	173 [c]	176 [f]	
1	122 [b]	102 [b]			156 [d]	63.1 [i]
1					235 [e]	
1.5			439 [c]	406 [c]	624 [f]	
2.5			457 [c]	485 [c]		
3	180 [a]	362 [a]			576 [e]	163 [h]
3	423 [b]	472 [b]			584 [d]	235 [g, *]
3					1020 [f]	
4						303 [i]
6						304 [h]
7.5					1210 [e]	
7.5					1670 [d]	
8						907 [g, *]
9	1320 [a]	1170 [a]				
9	1690 [b]	1580 [b]				
12						400 [h]
12						760 [i]
16						1530 [g, *]
20/16	2550 [a]	3210 [a]				

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

a. 4 week mouse [4.2.3.2-2], b. 26 week carcinogenicity mouse [4.2.3.4.2-1], c. 4 week juvenile rat [4.2.3.5.4-3], d. DRF EFD rat [4.2.3.5.2-1], e. EFD rat [4.2.3.5.2-2], f. PPND rat [4.2.3.5.3-2], g. Tolerability rabbit [4.2.3.5.2-3], h. DRF EFD rabbit [4.2.3.5.2-4], i. EFD rabbit [4.2.3.5.2-5].

*. No pregnant rabbits were used.

2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧

表 2.6.7.4-1 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧

Test Article: Risdiplam

Batch No.	Assay (%)	Specified Impurities [a] (%) ＊不純物A	＊不純物B	＊不純物C	Unspecified impurities (%)	Total Impurities (%)	Type of Study	Location in CTD
Proposed specification:	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]		
RO7034067[redacted]	NA	NA	NA	NA	NA	NA	*In vitro* MN assay	4.2.3.3.1-2
RO7034067[redacted]	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Phototoxicity	4.2.3.7.7-1
RO7034067[redacted]	[redacted]	NA	NA	NA	NA	NA	MTD and 2 week toxicity in monkey	4.2.3.2-7
RO7034067[redacted]	[redacted]	NA	NA	NA	NA	NA	2 week toxicity in rat	4.2.3.2-3
RO7034067[redacted]	[redacted]	NA	NA	NA	NA	NA	4 week DRF in juvenile rat	4.2.3.5.4-1
RO7034067[redacted]	[redacted]	NA	NA	NA	NA	NA	Telemetry in monkey (GLP)	4.2.1.3-3
							CNS/Irwin test in rat (GLP)	4.2.1.3-4
							Respiratory in rats (GLP)	4.2.1.3-5
							4 week toxicity in rat (GLP)	4.2.3.2-4
							26 week toxicity in pigmented rat	4.2.3.2-6
							2 week toxicity in monkey (GLP)	4.2.3.2-8
							39 week toxicity in monkey (GLP)	4.2.3.2-9
							Bacterial reverse mutation (GLP) [b]	4.2.3.3.1-1
							MN and Comet assay in rat (GLP)	4.2.3.3.2-1
							4 week toxicity in juvenile rats (GLP)	4.2.3.5.4-2
							13 week toxicity in juvenile rat (GLP)	4.2.3.5.4-4

***新薬承認情報提供時に置き換え**

表 2.6.7.4-1 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧（続）

Test Article: Risdiplam

Batch No.	Assay (%)	Specified Impurities [a] (%) ＊不純物A	＊不純物B	＊不純物C	Unspecified impurities (%)	Total Impurities (%)	Type of Study	Location in CTD
Proposed specification:	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]		
RO7034067[redacted]	[redacted]	NA	NA	NA	NA	NA	hERG assay	4.2.1.3-1
RO7034067[redacted]	[redacted]	NA	NA	NA	NA	NA	Bacterial reverse mutation [b]	4.2.3.3.1-1
RO7034067[redacted]	[redacted]	NA	NA	NA	NA	NA	*In vitro* MN assay (Mechanistic investigation)	4.2.3.3.1-3
RO7034067[redacted]	[redacted]	ND	[redacted]	NA	[redacted]	[redacted]	26 week toxicity in rat (GLP)	4.2.3.2-5
RO7034067[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	NA	[redacted]	[redacted]	hERG channel assay (GLP)	4.2.1.3-2
							7 day tolerability in mouse	4.2.3.2-1
							4 week toxicity in mouse (GLP)	4.2.3.2-2
							DRF EFD in rat (GLP)	4.2.3.5.2-1
							8 day MTD in rabbit	4.2.3.5.2-3
							DRF EFD in rabbit (GLP)	4.2.3.5.2-4
RO7034067[redacted]	[redacted]	[redacted]	NA	[redacted]	[redacted]	[redacted]	Carcinogenicity rasH2 mouse (GLP)	4.2.3.4.2-1
							EFD in rat (GLP)	4.2.3.5.2-2
							EFD in rabbit (GLP)	4.2.3.5.2-5
							DRF PPND in rat	4.2.3.5.3-1
							PPND in rat (GLP)	4.2.3.5.3-2
							4 week toxicity in juvenile rat (GLP)	4.2.3.5.4-3
							Skin sensitization (LLNA) in mice	4.2.3.7.7-2

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

a. Area percent.

b. Two different batches of risdiplam were used in the study (RO7034067[redacted] and RO7034067[redacted]).

***新薬承認情報提供時に置き換え**

2.6.7.5 単回投与毒性試験

該当試験なし。

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

表 2.6.7.6-1 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

Test Article: Risdiplam

Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Sex/ No./Group	Dose (mg/kg/day) [a]	Noteworthy Findings			Location in CTD (Report No.)
Mouse/ RasH2 wt	Oral gavage	7 days, once daily	Tox: 6/sex, 10/sex (only 20 mg/kg group) TK: 20/sex (except 20 mg/kg group)		Day	C_{max} (ng/mL) [M/F]	AUC_{0-24h} (ng•h/mL) [M/F]	4.2.3.2-1 [1073193]
				0	1,7	BLQ	BLQ	
				10	1	949 / 1280	1200 / 9760	
					7	1230 / 1560	11500 / 11600	
				20 [b]	1	NA	NA	
					7	1760 / 1480	20000 / 22500	
				30	1	2410 / 2870	29000 / 29600	
				100	1	4500 / 6690	66500 / 80200	
					≥30 mg/kg/day: From day 4 (at 30 and 100 mg/kg/day) onwards, clinical observations of hunched appearance, hypoactivity, piloerection, ataxia, squinting eyes, entire body cold-to-the-touch, green genital discharge, nonformed feces and/or rough hair coat, correlating with reduced food consumption and body weight loss. Animals dosed at 100 and 30 mg/kg/day were sacrificed on Day 4 and 5, respectively. Clinical pathology effects were markedly decreased absolute reticulocyte count, without a prominent decrease in red cell mass, which suggested reduced erythropoiesis. All other hematology and clinical chemistry changes were considered secondary to stress, dehydration, and/or decreased food consumption or body weight. No risdiplam-related macroscopic or organ weight findings were noted in any group. **MTD: 20 mg/kg/day.**			

表 2.6.7.6-1 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続）

Test Article: Risdiplam

Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Sex/ No./Group	Dose (mg/kg/day) [a]	Noteworthy Findings			Location in CTD [Report No.]
Rat/ Wistar Hannover RccHan: WIST	Oral gavage	2 weeks, once daily, followed by 2 weeks recovery	Tox: main study: 4/sex recovery: 2/sex TK: 2/sex	0	Day	C_{max} (ng/mL) [M/F]	$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng•h/mL) [M/F]	4.2.3.2-3 [1061416]
					1, 14	BLQ	BLQ	
				0.75	1	127 / 172	1160 / 1470	
					14	181 / 300	1760 / 1940	
				2.5	1	631 / 1020	3870 / 6860	
					14	677 / 930	5600 / 6240	
				7.5	1	1620 / 3350	16100 / 19500	
					14	1820 / 1640	19600 / 17100	
					At 7.5 mg/kg/day: In males, reduced body weight gain by 19% and reduced food consumption; minimally increased apoptosis in crypts in the duodenum, jejunum, ileum in females. The gene expression analysis resulted in splicing response for *MADD*, *STRN3*, *APLP2* gene transcripts in the spleen, duodenum, and testis. There were no abnormal clinical signs and no findings of toxicologic relevance in ophthalmoscopy, clinical pathology, organ weights, gross pathology and no findings after the recovery period. Transcripts of the *SMN1* and *FOXM1* genes remained unchanged. **NOAEL: 7.5 mg/kg/day**			

表 2.6.7.6-1 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続）

Test Article: Risdiplam

Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Sex/ No./Group	Dose (mg/kg/day) [a]	Noteworthy Findings			Location in CTD [Report No.]
Monkey, cynomolgus	Oral gavage	17 days once daily (dose-escalating phase)	M/1 F/1	1 (D1-5)	Day	C_{max} (ng/mL) [M/F]	AUC_{0-24h} (ng•h/mL) [M/F]	4.2.3.2-7 [1061651]
					1	170 / 155	1410 / 1160	
					5	645 / 665	1860 / 1650	
				3 (D6-10)	6	236 / 439	2570 / 3340	
					10	688 / 495	4230 / 4300	
				10 (D11-15)	11	724 / 1660	10500 / 16500	
					15	1550 / 2640	19300 / 34300	
				20 (D16-17)	16	2140 / 2940	36900 / 53800	
					At 20 mg/kg/day: In-life: Deteriorated condition after second administration with suspension of dosing. Further deterioration leading to sacrifice of the animals on D19. Marked clinical signs (lethargy/subdued/sluggish, slow and deliberate movement, hunched posture and tremors) and weight loss. Clinical pathology: Lowered neutrophil, lymphocyte and eosinophil counts, increased fibrinogen and coagulation times, transaminases, creatinine and urea. Histopathology: Parakeratosis in the skin/subcutis, eyelid, tongue and oesophagus; increased apoptosis in the eyelid epidermis, epithelium of tongue, oesophagus, lamina propria involving the jejunum and ileum, and in the ventral epithelium of the larynx at level 1; degeneration/regeneration involving the duodenum, jejunum, ileum, colon, caecum and rectum; erosion/ulcer involving the laryngeal vocal folds; germ cell degeneration/vacuolation and multinucleate cells in the testes. Maximal toleration was exceeded at 10 mg/kg/day.			

表 2.6.7.6-1 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続）

Test Article: Risdiplam

Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Sex/ No./Group	Dose (mg/kg/day) [a]	Noteworthy Findings			Location in CTD (Report No.)
Monkey, cynomolgus	Oral gavage	14 days, once daily (fixed-dose phase)	1/sex/ group		Day	C_{max} (ng/mL) [M/F]	$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng•h/mL) [M/F]	4.2.3.2-7 [1061651] (continued)
				0	1, 7, 14	BLQ	BLQ	
				0.75	1	57.2 / 90.0	378 / 534	
					7	64.8 / 93.8	317 / 505	
					14	111 / 201	589 / 840	
				1.5	1	251 / 176	1480 / 1500	
					7	156 / 112	1270 / 886	
					14	213 / 183	1170 / 1970	
				3	1	475 / 413	2310 / 3120	
					7	379 / 442	3250 / 3370	
					14	378 / 604	3130 / 6720	
				6	1	1050 / 586	8640 / 4430	
					7	797 / 663	9860 / 5870	
					14	1160 / 831	15800 / 12200	
					At 6 mg/kg/day: Parakeratosis in the skin/subcutis and eyelid; vacuolation and increased apoptosis in the lamina propria of the jejunum (all minor in one or both sexes). The gene expression analysis resulted in splicing response for *MADD*, *STRN3*, *APLP2* gene transcripts in the spleen, duodenum, and testis. The transcript variants *FOXM1B/C* of the *FOXM1* gene showed in the testis a down-regulation in one animal at the highest dose. There were no clinical signs, no findings on body weight, food consumption, ophthalmoscopy, clinical pathology, organ weights or gross pathology. Transcripts of the *SMN1* gene remained unchanged. The few changes in alternative transcript splicing seem not greatly to affect biological pathways or processes. **NOAEL: 3 mg/kg/day**			

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

a. Vehicle: 10 mM ascorbic acid/0.01 mg/mL sodium thiosulfate pentahydrate, pH 3.

b. Dose group which comprised of extra animals and included into study on study day 8.

2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験

2.6.7.7.1 マウス4週間投与試験

表 2.6.7.7.1-1 マウス4週間投与試験

Test Article: Risdiplam

Report Title:	**RO7034067: 4-Week Oral Gavage Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetic Dose-Range Finding (DRF) Study with RO7034067 in the 001178-W (Wild Type) RasH2 Mouse**							
Species/Strain:	Mice/ RasH2 (001178-W [wild type], CByB6F1-Tg[HRAS]2Jic)	**Duration of Dosing:**	28 Days [a]		**Location in CTD:**	4.2.3.2-2		
		Duration of Postdose:	NA		**Report No. :**	1077199		
					GLP compliance:	Yes		
Initial Age:	8 weeks							
Date of First Dose:	[redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:**	Oral (gavage), once daily					
NOAEL:	**16 mg/kg/day**	**Vehicle/Formulation:**	10 mM ascorbic acid/0.01 mg/mL sodium thiosulfate pentahydrate, pH 3					
Special Features:	None							
Performed Examinations:	Clinical observations, food consumption, body weight, hematology, clinical chemistry, organ weights, necropsy, histology, toxicokinetics							

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**		**3**		**9**		**20/16[a]**	
No. Evaluated [Main]	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10
No. Evaluated [Toxicokinetics]	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20
Toxicokinetics: Risdiplam								
$AUC_{(0\text{-last})}$ (ng•h/mL)								
Day 1	NC	NC	3560	3050	8990	11500	15400	24900
Day 16	NA	NA	NA	NA	NA	NA	23400	27000
Day 26	NC	NC	2850	2110	9520	10400	NA	NA
Day 29	NA	NA	NA	NA	NA	NA	21200	15100
C_{max} (ng/mL)								
Day 1	BLQ	BLQ	647	277	739	965	1340	2060
Day 16	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3140	1850
Day 26	BLQ	BLQ	310	232	1070	764	NA	NA
Day 29	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1350	1230

表 2.6.7.7.1-1 マウス4週間投与試験（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	0 (Control)		3		9		20/16[a]	
No. Evaluated [Main]	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10
No. Evaluated [Toxicokinetics]	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20
Toxicokinetics: Metabolite M1 (RO7112063)								
$AUC_{(0\text{-last})}$ (ng•h/mL)								
Day 1	NC	NC	132 [f]	440	1310	2390	2790	5500
Day 16	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2360	4970
Day 26	NC	NC	180 [f]	362	1320	1170	NA	NA
Day 29	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2550	3210
C_{max} (ng/mL)								
Day 1	BLQ	BLQ	28.0	44.8	113	233	239	725
Day 16	NA	NA	NA	NA	NA	NA	222	378
Day 26	BLQ	BLQ	34.8	34.0	190	148	NA	NA
Day 29	NA	NA	NA	NA	NA	NA	277	314
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund								
Toxicity Animals	0	1[b]	0	0	0	0	3[c]	4[c]
Toxicokinetic Animals	0	0	0	0	0	0	1[c]	0
Body Weight	—	—	—	—	—	—	—	—
Food Consumption (g/animal/day or %)[d]								
Days 8 to 15	3.8 g	—	−2.6	—	−13.2*	—	−5.3	—
Clinical Observations								
Hunched Posture	0	1	0	0	0	0	4	3
Hematology (day 29/34[e])								
Red Blood Cell Count (10^6/µL)	10.46	10.10	10.15	9.98	10.37	10.06	8.44	8.93
Hemoglobin (g/dL)	15.9	15.6	15.5	15.6	15.8	15.5	13.1	13.8
Hematocrit (%)	55.2	53.9	54.1	53.5	54.6	53.7	43.2	45.4
Mean Corpuscular Volume (fL)	52.7	53.3	53.3	53.6	52.7	53.3	51.1	51.0
White Blood Cell (10^3/µL)	—	4.55	—	2.18	—	2.53	—	1.34
Red Cell Distribution Width (%)	22.2	22.1	22.0	22.0	22.2	22.0	16.2	15.5
Reticulocyte Count (10^3/µL)	—	273.0	—	295.9	—	317.9	—	85.3

表 2.6.7.7.1-1 マウス4週間投与試験（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**		**3**		**9**		**20/16[a]**	
No. Evaluated [Main]	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10
Noteworthy Findings (continued)								
Hematology (day 29/34[e]) (continued)								
Platelet Count (10^3/μL)	—	1003	—	1099	—	1012	—	792
Abs.Neutrophil Count (10^3/μL)	—	0.38	—	0.21	—	0.25	—	0.19
Abs.Lymphocyte Count (10^3/μL)	—	3.83	—	1.76	—	2.22	—	1.08
Clinical Chemistry	—	—	—	—	—	—	—	—
Organ Weights	—	—	—	—	—	—	—	—
Gross Pathology	—	—	—	—	—	—	—	—
Histopathology	—	—	—	—	—	—	—	—

— No noteworthy findings; ANOVA and Dunnett's test: * $p < 0.05$.

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

a. Dosing was suspended on days 17 to 19 due to excessive effects at 20 mg/kg/day. Dosing resumed on day 20 at 16 mg/kg/day and continued for 14 days.

b. One control female was sacrificed in a moribund condition on day 5 and replaced with another animal.

c. Animals were found dead or sacrificed in a moribund condition on days 13, 14, 15, and 16 (males) or days 11, 14, 15 and 19 (females) when dosed at 20 mg/kg/day. Clinical observations in these animals included hunched posture, hypoactive behavior, squinted eyes, piloerection, and/or irregular respiration. Most animals had lower body weights/body weight loss and reduced food consumption. When determined, death/moribund condition was attributed to degeneration of the epithelium in the mucosa of the intestine and/or decreased cellularity in the bone marrow. Correlating effects were low levels in albumin and total protein, lower thymus weight and decreased lymphocytes, increased spleen weight and increased extramedullary hematopoiesis, increased adrenal weight and hyperplasia in the adrenal cortex. Histopathological changes, correlated to stress, were hypertrophy in the adrenal cortex, decreased lymphocytes in the mandibular and mesenteric lymph node, thymus, spleen and Peyers patches, accumulation of secretions in mucinous acinar cells of the mandibular salivary gland, decreased zymogen granules in the pancreas and decreased glycogen in the liver.

d. For controls, group means are shown. For treated groups, percent difference from controls is shown.

e. Samples for the control-, low-, and mid-dose groups were collected on day 29; samples for the high-dose group were collected on day 34.

f. t_{last} = 7h; for all other AUC values t_{last} =24h

2.6.7.7.2 ラット4週間投与試験（4週間回復性試験）

表 2.6.7.7.2-1 ラット4週間投与試験（4週間回復性試験）

Test Article: Risdiplam

Report Title:	**RO7034067: 4 Week Oral (Gavage) Administration Toxicity Study in the Rat with a 4 Week Treatment-Free Period**				
Species/Strain:	Rat/ Wistar Hannover Crl:WI (Han)	**Duration of Dosing:**	4 weeks	**Location in CTD:**	4.2.3.2-4
		Duration of Postdose:	4 weeks	**Report No. :**	1064057
Initial Age:	7 weeks			**GLP compliance:**	Yes [a]
Date of First Dose:	[redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:**	Oral (gavage), once daily		
NOAEL:	**3 mg/kg/day**	**Vehicle/Formulation:**	10 mM ascorbic acid/0.01 mg/mL sodium thiosulfate pentahydrate, pH 3		
Special Features:	An additional 10 male animals included in the main group dosed at 3 mg/kg/day for plasma, brain, skin and eye tissue concentration analysis at 0, 3, 24, 48 and 72 h after last dosing (2M/time-point). 4 animals/sex/group at main group necropsies were also sampled for brain and skin, and 3 animals/sex/risdiplam-treated dose groups for eye tissue concentration analysis at necropsy. Micronucleus assessment in 5 animals/sex/main group (see 2.6.7.9.2). An additional group of 3 animals/sex were dosed orally with 20 mg/kg cyclophosphamide approximately 24 h prior to necropsy as the micronucleus positive control.				
Performed Examinations:	Clinical observations, food consumption, body weight, hematology, clinical chemistry, urine analysis, ophthalmoscopy, organ weights, necropsy, histology				

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**		**1**		**3**		**9**	
No. Evaluated [Main]	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 20	F: 10	M: 10	F: 10
No. Evaluated [Recovery and Toxicokinetics]	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6
Toxicokinetics								
AUC_{0-24h} (ng•h/mL)								
Day 1	NC	NC	821	1150	2970	3650	11100	15500
Day 28	NC	NC	1540	1650	5450	5890	15300	17700
C_{max} (ng/mL)								
Day 1	BLQ	BLQ	127	139	499	628	1630	2010
Day 28	BLQ	BLQ	217	200	584	684	1370	1730
Terminal tissue concentration/plasma ratio (Day 28)								
Brain:Plasma Ratio	NA	NA	0.404	0.714	0.938	0.700	0.691	0.834
Skin:Plasma Ratio	NA	NA	6.00	28.5	1.32	3.59	1.93	3.75
Retina:Plasma Ratio	NA	NA	1.80	2.00	1.932	1.963	2.14	2.15
Vitreous Humour:Plasma Ratio	NA	NA	0.425	0.352	0.650	0.432	0.325	0.177

表 2.6.7.7.2-1 ラット4週間投与試験（4週間回復性試験）（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	0 (Control)		1		3		9	
No. Evaluated [Main]	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 20	F: 10	M: 10	F: 10
No. Evaluated [Recovery and Toxicokinetics]	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6
Noteworthy Findings								
Terminal Kill								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	1[b]	0	0	0	0
Body Weight Gain (%)[c]	107.2g	54.0g	−3	4	1	8	−17**	−27**
Organ Weights (%)[c]								
Thymus								
Absolute, adjusted for overall mean terminal body weight (g)	0.521g	0.498g	−1	9	−8	11	−31++	−54+++
Relative to body weight (%)	0.1952	0.2692	−1	6	−7	8	−33***	−52***
Relative to brain weight (%)	27.5635	27.9449	−2	7	−7	10	−36***	−54***
Gross Pathology								
No. Evaluated	10	10	10	10	10	10	10	10
Thymus								
Small	0	0	0	0	0	0	2	3
Histopathology								
No. Evaluated	10	10	10	10	10	10	10	10
Thymus								
Atrophy								
Minimal	0	0	0	0	0	0	5	2
Slight	0	0	0	0	0	0	2	5
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	3
Duodenum								
Increased apoptosis/single cell necrosis								
Minimal	0	0	0	0	0	0	4	9
Jejunum								
Increased apoptosis/single cell necrosis								
Minimal	0	0	0	0	0	0	8	9

表 2.6.7.7.2-1 ラット4週間投与試験（4週間回復性試験）（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	0 (Control)		1		3		9	
No. Evaluated [Main]	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 20	F: 10	M: 10	F: 10
No. Evaluated [Recovery and Toxicokinetics]	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6
Noteworthy Findings (continued)								
Histopathology (continued)								
No. Evaluated	10	10	10	10	10	10	10	10
Ileum								
Increased apoptosis/single cell necrosis								
Minimal	0	0	0	0	0	0	9	9
Slight	0	0	0	0	0	0	0	1
Caecum								
Increased apoptosis/single cell necrosis								
Minimal	0	0	0	0	0	0	6	9
Rectum								
Increased apoptosis/single cell necrosis								
Minimal	0	0	NA	0	NA	0	0	4
Testis								
Increased degenerated spermatocytes								
Minimal	0	NA	0	NA	0	NA	4	NA
Postdose Evaluation								
No. Evaluated	6	6	6	6	6	6	6	6
Body Weight Gain (%)[c]	64.6g	32.2g	−2	−27**	−11	−30**	15	−31**

Statistical test: ANOVA and Dunnett * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001; ANCOVA and Dunnett ++ = p < 0.01, +++ = p < 0.001.

表 2.6.7.7.2-1 ラット4週間投与試験（4週間回復性試験）（続）

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

a. No claim of GLP compliance is made for all aspects of the brain, eye and skin tissue bioanalysis.

b. One recovery group animal was euthanized on day 9 of the dosing phase due to an eye lesion. The eye findings consisted of unilateral inflammation, possibly due to trauma, and were considered not to be test item-related.

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

2.6.7.7.3 ラット26週間投与試験（8週間回復性試験）

表 2.6.7.7.3-1 ラット26週間投与試験（8週間回復性試験）

Test Article: Risdiplam

Report Title:	**RO7034067: A 26-Week Oral Gavage Toxicity Study in the Albino Rat Followed By an 8-Week Recovery**				
Species/Strain:	Rat/ Wistar Hannover	**Duration of Dosing:**	26 weeks	**Location in CTD:**	4.2.3.2-5
	Crl:WI (Han)	**Duration of Postdose:**	8 weeks	**Report No. :**	1067365
Initial Age:	7 weeks			**GLP compliance:**	Yes
Date of First Dose:	[redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:**	Oral (gavage), once daily		
NOAEL:	**Males: 1 mg/kg/day**	**Vehicle/Formulation:**	10 mM ascorbic acid/0.01 mg/mL sodium thiosulfate pentahydrate, pH 3		
	Females: 3 mg/kg/day				
Special Features:	None				
Performed Examinations:	Clinical observations, food consumption, body weight, hematology, clinical chemistry, urine analysis, ophthalmoscopy, electroretinography, organ weights, necropsy, histology				

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**		**1**		**3**		**7.5**	
No. Evaluated [Main]	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20
No. Evaluated [Recovery and Toxicokinetics]	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6
Toxicokinetics								
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng•h/mL)								
Day 1	NC	NC	809	1010	2630	3260	8700	9780
Day 91	NC	NC	1960	2720	8690	8510	21200	20900
Day 182	NC	NC	2200	2400	7010	8830	16100	15700
C_{max} (ng/mL)								
Day 1	BLQ	BLQ	92.3	97.6	256	320	786	907
Day 91	BLQ	BLQ	198	280	753	972	1720	1970
Day 182	BLQ	BLQ	203	295	651	768	1140	1170
Noteworthy Findings								
Terminal Kill								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	1[a]	1[b]	0	4[c]	3[c]
Clinical Observations [d]								
Prominent Backbone	—	—	—	—	1 (D112)	—	9 (D91)	7 (D26)
Hunched Posture	—	—	—	—	—	1 (D180)	22 (D126)	26 (D26)
Dehydration	—	—	—	—	1 (D112)	1 (D180)	5 (D91)	5 (D26)
Weakness	—	—	—	—	—	—	1 (D168)	3 (D136)
Decreased Activity	—	—	—	—	—	1 (D180)	11 (D91)	6 (D26)
Body Weight Gain (%)[e]	263g	119g	6.8	4.2	8.7	10.1**	−11.8*	−10.1*

表 2.6.7.7.3-1 ラット26週間投与試験（8週間回復性試験）（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**		**1**		**3**		**7.5**	
No. Evaluated [Main]	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20
No. Evaluated [Recovery and Toxicokinetics]	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6
Noteworthy Findings (continued)								
Terminal Kill (continued)								
Clinical Chemistry								
Potassium (mmol/L)								
Week 12	5.4	4.9	5.1	4.6	4.7***	4.1***	4.7***	3.9***
Week 27	4.6	4.0	4.3	3.3***	4.0***	3.2***	3.9***	3.1***
Chloride (mmol/L)								
Week 12	103	103	102	102	101**	101*	102	100**
Week 27	105	104	103	101**	102**	101**	102*	100***
Urine Analysis								
Volume (mL)								
Week 12	3.4	1.3	3.3	1.4	4.0	3.5**	4.4	4.6***
Week 26	3.5	1.2	2.7	1.0	3.4	3.0^{+}	3.7	4.1^{++}
Specific Gravity								
Week 12	1.043	1.048	1.043	1.047	1.040	1.038*	1.033**	1.026***
Week 26	1.048	1.063	1.058	1.058	1.056	1.048	1.044	1.029***
Electroretinography								
No. Evaluated [Recovery animals]	M: 6	F: 6	M: 6	F: 5	M: 6	F: 6	M: 5	F: 6
Slight Decreased Group Mean Scotopic B-wave Amplitudes, Week 13 and 26.	—	—	—	—	—	P	—	P
Organ Weights (%)[e]								
Testis								
Absolute organ weight (g)	3.797	NA	0.303	NA	0.387	NA	−12.714	NA
Relative to body weight (%)	0.8878	NA	−4.4035	NA	−3.4647	NA	−4.3373	NA
Relative to brain weight (%)	185.7569	NA	−1.0752	NA	−0.4768	NA	−15.9888^{++}	NA

表 2.6.7.7.3-1 ラット26週間投与試験（8週間回復性試験）（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**		**1**		**3**		**7.5**	
No. Evaluated [Main]	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20
No. Evaluated [Recovery and Toxicokinetics]	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6
Noteworthy Findings (continued)								
Terminal Kill (continued)								
Organ Weights (%)[c] (continued)								
Epididymis								
Absolute organ weight (g)	1.365	NA	1.429	NA	1.723	NA	−8.793*	NA
Relative to body weight (%)	0.3198	NA	−3.3269	NA	−2.4041	NA	−0.2461	NA
Relative to brain weight (%)	66.8135	NA	0.0145	NA	0.6593	NA	−12.3720***	NA
Uterus								
Absolute organ weight (g)	NA	0.750	NA	−0.293	NA	-29.267^{+}	NA	-46.320^{+++}
Relative to body weight (%)	NA	0.3194	NA	−5.2831	NA	-33.2558^{++}	NA	-43.8990^{+++}
Relative to brain weight (%)	NA	39.8256	NA	−0.9662	NA	-31.1038^{+}	NA	-46.6091^{+++}
Adrenal gland								
Absolute organ weight (g)	0.0521	0.0657	−0.0576	−4.7130	7.3836	3.4567	28.1309***	21.1136***
Relative to body weight (%)	0.01215	0.02771	−4.37120	−8.02120	3.12504	−1.26563	40.66355***	27.88880***
Relative to brain weight (%)	2.55332	3.48471	−1.57111	−5.10389	5.83254	0.83338	22.75423***	20.09164***
Thymus								
Absolute organ weight (g)	0.191	0.209	18.714	7.310	19.823	35.741***	−22.495*	−25.325*
Relative to body weight (%)	0.0445	0.0879	12.1828	3.3965	15.5447	29.2056**	−15.6633	−21.4401*
Relative to brain weight (%)	9.3298	11.1063	16.8352	6.9844	18.5835	32.0671**	−25.2954*	−26.4045*
Gross Pathology								
No. Evaluated	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 19	F: 20	M: 17	F: 17
Adrenal gland								
Dark discoloration	0	1	5	2	13	12	17	15
Thymus								
Small	0	0	0	1	1	0	7	4
Testis								
Small	0	NA	0	NA	0	NA	2	NA
Abnormal soft consistency	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Epididymis								
Small	0	NA	0	NA	0	NA	2	NA

表 2.6.7.7.3-1 ラット26週間投与試験（8週間回復性試験）（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**		**1**		**3**		**7.5**	
No. Evaluated [Main]	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20
No. Evaluated [Recovery and Toxicokinetics]	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6
Noteworthy Findings (continued)								
Terminal Kill (continued)								
Histopathology								
No. Evaluated	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 19	F: 20	M: 17	F: 17
Cecum								
Single cell necrosis; epithelial								
Minimal	0	0	0	0	0	0	4	3
Colon								
Single cell necrosis; epithelial								
Minimal	0	0	0	0	1	0	4	4
Rectum								
Single cell necrosis; epithelial								
Minimal	0	0	0	0	0	0	4	3
Duodenum								
Single cell necrosis; epithelial								
Minimal	0	0	0	0	0	0	7	6
Ileum								
Single cell necrosis; epithelial								
Minimal	0	0	0	0	0	0	13	12
Jejunum								
Single cell necrosis; epithelial								
Minimal	0	0	0	0	0	0	13	9
Body cavity, nasal								
Single cell necrosis; epithelial; hard palate								
Minimal	0	0	0	0	0	0	12	10
Pancreas								
Single cell necrosis; acinar								
Minimal	0	0	1	0	0	2	5	4
Mild	0	0	0	0	1	2	2	1

表 2.6.7.7.3-1 ラット26週間投与試験（8週間回復性試験）（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**		**1**		**3**		**7.5**	
No. Evaluated [Main]	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20
No. Evaluated [Recovery and Toxicokinetics]	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6
Noteworthy Findings (continued)								
Terminal Kill (continued)								
Histopathology (continued)								
No. Evaluated	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 19	F: 20	M: 17	F: 17
Testis								
Degeneration/atrophy; tubular								
Minimal	0	NA	0	NA	2	NA	5	NA
Mild	0	NA	0	NA	0	NA	3	NA
Marked	0	NA	0	NA	0	NA	2	NA
Epididymis								
Decreased sperm								
Minimal	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Mild	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Moderate	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Marked	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Degeneration/necrosis; ductular								
Minimal	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Adrenal gland								
Pigmentation; cortical								
Minimal	0	0	2	20	18	9	13	1
Mild	0	0	0	0	1	10	4	8
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	8
Hemorrhage; cortical								
Minimal	0	0	0	0	0	6	0	8
Mild	0	0	0	0	0	2	0	1

表 2.6.7.7.3-1 ラット26週間投与試験（8週間回復性試験）（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**		**1**		**3**		**7.5**	
No. Evaluated [Main]	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20
No. Evaluated [Recovery and Toxicokinetics]	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6
Noteworthy Findings (continued)								
Terminal Kill (continued)								
Histopathology (continued)								
No. Evaluated	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 19	F: 20	M: 17	F: 17
Thymus								
Decreased cellularity; lymphoid								
Minimal	0	0	0	0	0	0	6	7
Mild	0	0	0	0	0	0	6	4
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	1
Mammary gland[f]								
Atrophy								
Minimal	0	0	0	NA	0	NA	3	0
Mild	0	0	0	NA	0	NA	6	0
Moderate	0	0	0	NA	0	NA	3	0
Vagina								
Diestrus	NA	5	NA	5	NA	8	NA	9
Proestrus	NA	4	NA	6	NA	4	NA	2
Estrus	NA	4	NA	6	NA	4	NA	2
Metestrus	NA	7	NA	3	NA	4	NA	4
Postdose Evaluation								
No. Evaluated	M: 6	F: 6	M: 6	F: 5	M: 6	F: 6	M: 5	F: 6
Body Weight Gain (%)[e]	26g	5g	−4	200	12	140	54	120
Organ Weights (%)[e]								
Uterus								
Absolute organ weight (g)	NA	1.247	NA	−48.782	NA	−21.615	NA	−52.012[+]
Relative to body weight (%)	NA	0.4969	NA	−50.8057	NA	−29.6362	NA	−51.1517[+]
Relative to brain weight (%)	NA	65.3941	NA	−49.4464	NA	−22.3725	NA	−52.6378[+]

表 2.6.7.7.3-1 ラット26週間投与試験（8週間回復性試験）（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	0 (Control)		1		3		7.5	
No. Evaluated [Main]	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20
No. Evaluated [Recovery and Toxicokinetics]	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6
Postdose Evaluation (continued)								
No. Evaluated	M: 6	F: 6	M: 6	F: 5	M: 6	F: 6	M: 5	F: 6
Gross Pathology								
Testis								
Small	1	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Histopathology								
Testis								
Degeneration/atrophy; tubular								
Minimal	0	NA	0	NA	0	NA	3	NA
Marked	1	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Epididymis								
Cellular debirs; lumen								
Minimal	0	NA	0	NA	0	NA	2	NA
Adrenal gland								
Pigmentation; cortical								
Minimal	0	0	6	5	6	1	4	0
Mild	0	0	0	0	0	5	1	3
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	3

— no noteworthy findings/not present; P: present; Statistical test: ANOVA and Dunnett * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; Dunn + = $p < 0.05$, ++ = $p < 0.01$, +++ = $p < 0.001$.

表 2.6.7.7.3-1 ラット26週間投与試験（8週間回復性試験）（続）

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

a. Found dead on day 88. Considered incidental with macroscopic and microscopic changes being unrelated to the test article.

b. Euthanized on day 128 due to mass on the head, correlating to malignant adenocarcinoma of the mammary gland, which was considered unrelated to the test article. Microscopic changes in the adrenal gland and lymphoid organs and clinical pathology changes were related to treatment with risdiplam.

c. One female was misgavaged and found dead on day 27. All other animals were found dead or euthanized due to poor and/or deteriorating condition on days 93, 125, 136, 170 and 178. Clinical signs preceding death included decreased activity, prominent backbone, dehydration, weakness, and weight loss. Microscopically these animals showed test item-related crypt single cell necrosis and/or degeneration/necrosis in the intestinal tract and decreased cellularity of the bone marrow, both considered as cause of death in most cases. The findings correlated with decreases in white blood cell counts, absolute neutrophil counts, absolute lymphocyte counts, red cell mass parameters, absolute reticulocyte counts and in platelet counts seen in clinical pathology. In addition, these animals showed test item-related microscopic findings comparable to the main study animals at scheduled termination and as additional test item-related finding odontoblast degeneration/necrosis in the incisor tooth was seen.

d. Number of animals affected (day of first appearance).

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

f. No. of evaluated animals was 18, 17 and 16 for treatment at 0, 3, and 7.5 mg/kg/day, respectively.

2.6.7.7.4 有色ラット探索的26週間投与試験

表 2.6.7.7.4-1 有色ラット探索的26週間投与試験

Test Article: Risdiplam

Report Title:	**A 26-Week Oral Gavage Retinopathy Study of RO7034067 and RO6885247 in Pigmented Rats** [a]				
Species/Strain:	Rat/ Brown Norway	**Duration of Dosing:**	26 weeks	**Location in CTD:**	4.2.3.2-6
Initial Age:	8.5 weeks	**Duration of Postdose:**	None	**Report No. :**	1067962
Date of First Dose:	[redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:**	Oral (gavage), once daily	**GLP compliance:**	No
NOAEL:	–	**Vehicle/Formulation:**	10 mM ascorbic acid/0.01 mg/mL sodium thiosulfate pentahydrate, pH 3		
Special Features:	None				
Performed Examinations:	Mortality, clinical observations, food consumption, body weight, hematology, clinical chemistry, ophthalmoscopy, electroretinography, spectral domain optical coherence tomography, necropsy, histology (after 13, 19 and 26 weeks)				

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**		**7.5/5** [b]	
No. Evaluated [Main]	M: 24		M: 24	
No. Evaluated [Toxicokinetics]	M: 6		M: 6	
Toxicokinetics		$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng•h/mL)	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)
Day 1	BLQ	5500 ± 228	731 ± 16.5	1
Day 28	BLQ	14200 ± 418	1270 ± 210	1
Day 91	BLQ	18000 ± 4740	1500 ± 435	3
Day 127	BLQ	16800 ± 3120	997 ± 274	7
Day 176	BLQ	14500 ± 769	844 ± 57	3
Terminal concentration in ocular tissue (Median)				
No. evaluated	0	3	3	3 (2 for vitreous humor)
		Day 95 (25–29h after last dose)	Day 137 (28–29h after last dose)	Day 181 (23–29h after last dose)
Choroid + RPE (ng/mL)	NA	19100000	15700000	22200000
Retina (ng/mL)	NA	10400	15100	11400
Vitreous Humor (ng/mL)	NA	NA	452	1210

表 2.6.7.7.4-1 有色ラット探索的26週間投与試験（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**	**7.5/5** [b]
No. Evaluated [Main]	M: 24	M: 24
Noteworthy Findings		
Died or Sacrificed Moribund	0	9 [c]
Clinical Observations [d]		
Prominent Backbone	—	9 (D40–180)
Dehydration	—	23 (D40–180)
Hunched Posture	—	12 (D45–180)
Decreased Activity	—	5 (D45–175)
Thin	—	18 (D40–180)
Decreased muscle tone	—	2 (D47–75)
Weakness	—	2 (D47–49)
Laying on side	—	1 (D46–46)
Erected fur	—	4 (D45–47)
Labored breathing	—	1 (D46–46)
Body Weight (g) [e]		
Day 47	274g	−23***
Day 54	282g	−15***
Day 166	349g	−20***
Day 180	357g	−26***
Body Weight Gain (g) [e]		
Day −4 - 180	196g	−51***
Food consumption (%) [e]		
Day 49-56	16.8g	−7.8
Day 56-63	18.0g	−43.5
Day 175-182	17.8g	−57.9

表 2.6.7.7.4-1 有色ラット探索的26週間投与試験（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**	**7.5/5** [b]
No. Evaluated [Main]	M: 24	M: 24
Noteworthy Findings (continued)		
Hematology		
Red blood cell count		
Week 22	9.57 10^{12}/L	−35.57
Week 26/27	8.50 10^{12}/L	−58.67
Hemoglobin		
Week 22	16.2 g/dL	−31.6
Week 26/27	14.4 g/dL	−55.5
Hematocrit		
Week 22	48.1%	−30.3
Week 26/27	43.8%	−55.6
Reticulocytes		
Week 22	139.2 10^{9}/L	−15.5
Week 26/27	150.4 10^{9}/L	−51.5
Red cell distribution width		
Week 22	11.4%	70.9
Week 26/27	12.1%	79.9
White blood cell count		
Week 22	8.13 10^{9}/L	−28.95
Week 26/27	4.62 10^{9}/L	−24.36
Lymphocyte count		
Week 22	6.69 10^{9}/L	−35.76
Week 26/27	3.61 10^{9}/L	−35.90

表 2.6.7.7.4-1 有色ラット探索的26週間投与試験（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**	**7.5/5** [b]
No. Evaluated [Main]	M: 24	M: 24
Noteworthy Findings (continued)		
Clinical Chemistry		
Glucose		
Week 22	81 mg/dL	27
Week 26/7	143 mg/dL	60
Cholesterol		
Week 22	69 mg/dL	0
Week 27	58 mg/dL	−21
Triglycerides		
Week 22	60 mg/dL	18
Week 27	42 mg/dL	300
Ophthalmoscopy		
Faint and diffuse haziness of retina		
Week 19, Very Slight	0	10
Week 26, Very Slight	0	1
Week 26, Slight	0	2
Week 26, Moderate	0	1
Retinal vessel attenuation		
Week 26, Moderate	0	2
Electroretinography		
Photopic 0.5Hz Flicker B-wave amplitude (μV)	(mean ± SD)	
Prestudy	70.69 ± 27.12	67.50 ± 22.68
Week 2	76.08 ± 26.39	66.72 ± 15.29
Week 4	79.81 ± 26.00	57.67 ± 18.99
Week 8	87.84 ± 27.08	46.63 ± 15.84
Week 13	51.78 ± 14.69	24.91 ± 5.48
Week 19	64.38 ± 23.08	18.23 ± 5.39
Week 26	56.10 ± 20.20	10.23 ± 3.89

表 2.6.7.7.4-1 有色ラット探索的26週間投与試験（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**	**7.5/5** [b]
No. Evaluated [Main]	M: 24	M: 24
Noteworthy Findings (continued)		
Electroretinography (continued)		
Photopic 29Hz Flicker B-wave amplitude (μV) (mean ± SD)		
Prestudy	18.19 ± 6.20	17.43 ± 4.38
Week 2	19.70 ± 5.45	23.01 ± 5.23
Week 4	20.22 ± 5.03	16.15 ± 4.83
Week 8	19.12 ± 6.08	12.43 ± 3.85
Week 13	11.35 ± 2.29	7.08 ± 2.25
Week 19	16.41 ± 4.57	5.97 ± 1.38
Week 26	15.66 ± 4.68	2.81 ± 0.80
Photopic 29Hz Flicker B-wave latency (ms) (mean ± SD)		
Prestudy	36.06 ± 1.40	35.47 ± 1.33
Week 2	36.75 ± 2.32	33.71 ± 1.03
Week 4	35.92 ± 1.24	35.21 ± 2.07
Week 8	39.25 ± 1.74	39.71 ± 1.94
Week 13	36.96 ± 2.94	39.25 ± 2.52
Week 19	38.21 ± 2.21	46.33 ± 2.14
Week 26	37.75 ± 1.06	38.56 ± 9.93
Spectral domain optical coherence tomography	There were no obvious changes in retinal structure. Reflectivity, likely condensation of the vitreous with posterior vitreous detachment or possibly material was observed in the vitreous in proximity to the retina and progressed over time. It was noted in all groups with a slightly higher severity in the test item treated groups by Week 26. This may have contributed to the hazy appearance of the retina during the ophthalmology examinations.	

表 2.6.7.7.4-1 有色ラット探索的26週間投与試験（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**	**7.5/5** [b]
No. Evaluated [Main]	M: 24	M: 24
Noteworthy Findings (continued)		
Gross Pathology		
No. Evaluated (Week 13/ Week 19 / Week 26)	M: 6/ 6/ 12	M: 6/ 6/ 6
Thymus		
Small	0/ 0/ 1	0/ 6/ 6
Testis		
Small	0/ 0/ 1	0/ 3/ 4
Abnormal soft consistency	0/ 0/ 1	0/ 1/ 4
Epididymis		
Small	0/ 0/ 1	0/ 0/ 2
Histopathology		
No. evaluated, Week 26	24	18
Adrenal gland		
Pigmentation; cortical		
Minimal	0	4

— no noteworthy findings/not present; Statistical test: ANOVA and Dunnett * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

表 2.6.7.7.4-1　有色ラット探索的26週間投与試験（続）

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

a. Only data on the vehicle control and on RO7034067 (Groups 1 and 2) are shown in this table.

b. Dosing at 7.5 mg/kg/day was stopped on study day 47/46 due to severe clinical signs and after a treatment-free period, dosing has resumed on study day 53/52 at 5 mg/kg/day.

c. Death or euthanasia of 7 main study animals on days 42-47 and of two toxicokinetic animals on days 48 and 49. After reduction of the dose level to 5 mg/kg/day, the death of two main study animals and one toxicokinetic animal on days 176-182 was leading to early necropsy of the group. Microscopically, these animals showed test item-related moderate to marked decreased cellularity of the bone marrow of femur and sternum in combination with intestinal tract findings. These are crypt single cell necrosis, associated with villous atrophy and regenerative crypt hyperplasia. Other treatment-related changes were minimal to mild degeneration/atrophy of the seminiferous tubules in the testis, and minimal degeneration and necrosis of the ductular epithelium and secondary minimal to mild decreased sperms with luminal cellular debris in the epididymis. Decreased lymphocytes were observed in the thymus, spleen, gut-associated lymphoid tissue, and mandibular and mesenteric lymph node. Stress and the moribund condition might have contributed to these latter findings.

d. Number of animals affected (days of first and last appearances).

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

2.6.7.7.5 カニクイザル2週間投与試験（2週間回復性試験）

表 2.6.7.7.5-1 カニクイザル2週間投与試験（2週間回復性試験）

Test Article: Risdiplam

Report Title:	**RO7034067: 2 Week Oral (Gavage) Administration Toxicity Study in the Monkey with a 2 Week Treatment-Free Period**							
Species/Strain:	Monkey/cynomolgus	**Duration of Dosing:**	2 weeks			**Location in CTD:**	4.2.3.2-8	
Initial Age:	26-32 months	**Duration of Postdose:**	2 weeks			**Report No. :**	1066289	
Date of First Dose:	[redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:**	Oral (gavage), once daily			**GLP compliance:**	Yes [a]	
NOAEL:	**2 mg/kg/day**	**Vehicle/Formulation:**	10 mM ascorbic acid/0.01 mg/mL sodium thiosulfate pentahydrate, pH 3					
Special Features:	Intraocular pressure assessment							
Performed Examinations:	Clinical observations, food consumption, body weight, ophthalmoscopy, hematology, clinical chemistry, urine analysis, organ weights, necropsy, histology							
Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**		**2**		**4**		**6**	
No. Evaluated [Main]	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3
No. Evaluated [Recovery]	M: 2	F: 2	0	0	0	0	M: 2	F: 2
Toxicokinetics								
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng•h/mL)								
Day 1	NC	NC	1610	2110	5790	6340	10500	11000
Day 14	NC	NC	2650	2460	8650	8450	12800	11500
C_{max} (ng/mL)								
Day 1	BLQ	BLQ	373	398	969	1010	1290	1610
Day 14	BLQ	BLQ	305	386	798	1220	1020	1390
Terminal Kill								
Clinical Observations								
Shedding/peeling skin at various locations (chin, face, inguinals, urogenital area)	—	—	—	—	1 (D11 onwards)	—	4 (D11 onwards)	4 (D13 onwards)
Reddening of the face, head, muzzle and/or scrotum	—	—	—	—	—	—	5 (D10 onwards)	5 (D10 onwards)
Excessive grooming	—	—	—	—	—	—	2 (D14)	1 (D13)
Semi-closed eyes	—	—	—	—	—	—	5 (D12 onwards)	4 (D11 onwards)
Hunched posture, increased activity, itching skin, mouth rubbing, twitching body, staggering	—	—	—	—	—	—	in one or two animals, on one or two days.	

表 2.6.7.7.5-1 カニクイザル2週間投与試験（2週間回復性試験）（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	0 (Control)		2		4		6	
No. Evaluated [Main]	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3
No. Evaluated [Recovery]	M: 2	F: 2	0	0	0	0	M: 2	F: 2
Organ Weights (%)[b]								
Thymus								
Absolute (g)	2.965	3.206	23	−21	2	−23	−15	−22
Relative to body weight (%)	0.1004	0.1264	16	−17	−7	−21	−31	−32
Relative to brain weight (%)	4.6045	5.0556	11	−18	−10	−23	−26	−23
Gross Pathology								
No. Evaluated	3	3	3	3	3	3	3	3
Skin/subcutis								
Flaky	0	0	0	0	0	0	3	2
Histopathology								
No. Evaluated	3	3	3	3	3	3	3	3
Skin/subcutis								
Parakeratosis								
Minimal	0	0	0	0	0	0	3	2
Slight	0	0	0	0	0	0	0	1
Inflammation								
Minimal	0	0	0	0	0	0	2	2
Slight	0	0	0	0	0	0	1	0
Erosion/ulcer:								
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	0
Hyperplasia, epidermis								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	1
Slight	0	0	0	0	0	0	3	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Skin, Back								
Parakeratosis								
Minimal	0	0	0	0	0	0	2	2
Hyperplasia, epidermis								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	1
Slight	0	0	0	0	0	0	2	2

表 2.6.7.7.5-1 カニクイザル2週間投与試験（2週間回復性試験）（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**		**2**		**4**		**6**	
No. Evaluated [Main]	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3
No. Evaluated [Recovery]	M: 2	F: 2	0	0	0	0	M: 2	F: 2
Histopathology (continued)								
No. Evaluated	3	3	3	3	3	3	3	3
Larynx								
Epithelial degeneration, vocal folds								
Minimal	0	0	0	0	1	2	2	1
Slight	0	0	0	0	1	0	1	0
Inflammation								
Minimal	0	0	0	0	1	2	2	1
Epithelial degeneration, lateral ventricle								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	0
Erosion/ulcer								
Slight	0	0	0	0	0	0	1	0
Squamous cell metaplasia, lateral ventricle								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	1
Thymus								
Atrophy								
Slight	0	0	0	0	0	0	2	0
Testis[c]								
Degeneration, germ cell								
Minimal	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Slight	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Increased multinucleate cells								
Slight	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Moderate	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA

表 2.6.7.7.5-1 カニクイザル2週間投与試験（2週間回復性試験）（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**		**2**		**4**		**6**	
No. Evaluated [Main]	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3
No. Evaluated [Recovery]	M: 2	F: 2	0	0	0	0	M: 2	F: 2
Postdose Evaluation								
No. Evaluated	2	2	0	0	0	0	2	2
Clinical Observations								
Shedding/peeling skin at various locations (anus, face, hind legs, urogenital area, inguinals)	—	—	NA	NA	NA	NA	2	1

— no noteworthy findings.

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

a. No claim of GLP compliance is made for the intraocular pressure measurements.

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

c. Reversibility of the testis findings not assessed due to sexual immaturity.

2.6.7.7.6 カニクイザル39週間投与試験（22週間回復性試験）

表 2.6.7.7.6-1 カニクイザル39週間投与試験（22週間回復性試験）

Test Article: Risdiplam

Report Title:	**RO7034067: 39 Week Oral (Gavage) Administration Toxicity Study in the Monkey with a 22 Week Treatment-Free Period**							
Species/Strain:	Monkey/cynomolgus		**Duration of Dosing:**	39 weeks		**Location in CTD:**	4.2.3.2-9	
Initial Age:	24-26 months		**Duration of Postdose:**	22 weeks		**Report No. :**	1065384	
Date of First Dose:	[redacted] 20[redacted]		**Method of Administration:**	Oral (gavage), once daily		**GLP compliance:**	Yes [a]	
NOAEL:	**1.5 mg/kg/day**		**Vehicle/Formulation:**	10 mM ascorbic acid/0.0064 mg/mL sodium thiosulfate pentahydrate, pH 3				
Special Features:	Electroretinography, spectral domain optical coherence tomography, electron microscopy, immunohistochemistry							
Performed Examinations:	Clinical observations, food consumption, body weight, hematology, clinical chemistry, urine analysis, ophthalmology, organ weights, necropsy, histology							
Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**		**1.5**		**3**		**7.5/5[b]**	
No. Evaluated [Main]	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3
No. Evaluated [Recovery]	M: 2	F: 2	0	0	0	0	M: 2	F: 2
Toxicokinetics								
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng•h/mL)								
Day 1	NC	NC	1670	1780	3510	3730	7570	8790
Day 12	NC	NC	1380	1230	4760	4640	11200	10200
Day 26	NA	NA	NA	NA	NA	NA	4810	4900
Day 57	NC	NC	1130	800	4420	2470	4940	4930
Day 92	NC	NC	1450	2000	5120	4860	6290	7510
Day 180	NC	NC	2430	1490	5160	4660	8210	7860
Day 267	NC	NC	1870	2060	4880	4850	5880	6470

表 2.6.7.7.6-1 カニクイザル39週間投与試験（22週間回復性試験）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**		**1.5**		**3**		**7.5/5[b]**	
No. Evaluated [Main]	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3
No. Evaluated [Recovery]	M: 2	F: 2	0	0	0	0	M: 2	F: 2
Toxicokinetics (continued):								
C_{max} (ng/mL)								
Day 1	BLQ	BLQ	323	422	696	578	820	1070
Day 12	BLQ	BLQ	154	176	458	500	1020	1070
Day 26	NA	NA	NA	NA	NA	NA	683	549
Day 57	BLQ	BLQ	130	162	670	339	469	525
Day 92	BLQ	BLQ	233	363	888	710	606	703
Day 180	BLQ	BLQ	459	275	652	626	1090	846
Day 267	BLQ	BLQ	414	396	1000	973	701	1160
Terminal concentration in								
Plasma (ng/mL)	BLQ	BLQ	303	248	703	449	942	455
CSF (ng/mL)	BLQ	BLQ	18.3	20.9	41.0	34.6	65.1	49.0
Brain cortex (ng/g)	BLQ	BLQ	241	175	347	342	523	576
Brain stem (ng/g)	BLQ	BLQ	168	175	382	326	612	463
Skin (ng/g)	BLQ	BLQ	2105	2107	8288	2163	8540	2827
Terminal concentration in ocular tissue:								
Choroid + RPE (ng/g)	15.3	12.9	487000	939000	1450000	679000	2440000	993000
Iris (ng/g)	20.5	26.9	1640000	932000	1070000	1410000	1180000	1330000
Sclera (ng/g)	3.68	5.94	23600	27300	48600	47800	96400	52900
Retina (ng/g)	3.60	6.26	18100	21100	22000	7090	22500	23300
Cornea (ng/g)	<2.50	12.2	2110	767	1890	2110	4500	4300
Lens (ng/g)	<1.25	2.20	719	330	1090	332	1170	493
Vitreous Humor 1 (ng/mL) [c]	<0.500	0.826	21.8	21.7	86.9	133	141	69.0
Vitreous Humor 2 (ng/mL) [d]	<0.500	1.35[e]	111	68.5	343	136	459	233
Aqueous Humor (ng/mL)	<0.500	<0.500	6.88	2.91	12.7	6.30	66.9	19.5

表 2.6.7.7.6-1 カニクイザル39週間投与試験（22週間回復性試験）（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**		**1.5**		**3**		**7.5/5[b]**	
No. Evaluated [Main]	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3
No. Evaluated [Recovery]	M: 2	F: 2	0	0	0	0	M: 2	F: 2
Noteworthy Findings								
Terminal Kill								
Clinical Observations								
Shedding/peeling skin at various locations[f]	—	—	—	—	—	—	5/5 (D11 onwards)	5/5 (D11 onwards)
Reddening of the face	—	—	—	—	—	—	5/5 (D10-19)	4/5 (D10-19)
Hair loss, tail	—	—	—	—	—	—	2	2
Thin appearance	—	—	—	1	—	1	—	3
Electroretinograhy[g]								
Depressed scotopic -34dB Blue B-wave amplitudes (visual inspection)								
Week 20	0/5	0/5	0/3	0/3	1/3	2/3	2/5	3/5
Week 26	0/5	0/5	0/3	0/3	0/3	0/3	2/5	0/5
Week 34	0/5	0/5	1/3	0/3	0/3	0/3	3/5	4/5
Reduced photopic 0 dB White B-wave amplitude and 30 Hz flicker amplitudes (visual inspection)								
Week 20	0/5	0/5	0/3	0/3	0/3	0/3	1/5	2/5
Week 26	0/5	0/5	0/3	0/3	0/3	0/3	0/5	2/5
Week 34	0/5	0/5	0/3	0/3	0/3	0/3	0/5	1/5
Depressed rod response (semi-quantitative grading)								
Week 20	0/5	0/5	0/3	0/3	1/3	3/3	4/5	4/5
Week 26	0/5	1/5	0/3	0/3	0/3	0/3	2/5	2/5
Week 34	1/5	1/5	0/3	2/3	0/3	1/3	5/5	4/5
Quantitative evaluation of electroretinography A- and B-wave peak latencies and amplitudes:								
Depressed scotopic -34dB Blue Single Flash B-wave amplitudes: Significant difference between groups: p=0.0047**.								
Depressed scotopic -34dB Blue Single Flash B-wave latency: Significant difference between groups: p=0.0370*.								
Depressed scotopic 0dB White Single Flash A-wave latency: Significant difference between groups: p=0.0116*.								
Reduced photopic 0dB White Single Flash B-wave amplitude: Significant difference between groups: p=0.0449*.								

表 2.6.7.7.6-1 カニクイザル39週間投与試験（22週間回復性試験）（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**		**1.5**		**3**		**7.5/5[b]**	
No. Evaluated [Main]	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3
No. Evaluated [Recovery]	M: 2	F: 2	0	0	0	0	M: 2	F: 2
Noteworthy Findings (continued)								
Terminal Kill (continued)								
Spectral domain optical coherence tomography (Week 35)[h]								
Grade 1 (Retinal changes, disorganization/thinning of layers, in periphery; increased or decreased reflectivity, haziness in retinal layers; few hyper-reflective spots in inner retinal layers and inner or outer segment):								
Week 35	0/5	0/5	0/3	0/3	3/3	1/3	2/5	0/5
Grade 2 (Retinal changes, disorganization/thinning, closer to the macula layers, like inner or outer segment, may be discontinuous or absent; microcystoid macular degeneration may be present but confined to small area temporal to outer nuclear layer; hyper-reflective spots may be seen in retinal pigment epithelium where inner or outer segment is absent):								
Week 35	0/5	0/5	0/3	0/3	0/3	2/3	2/5	1/5
Grade 3 (microcystoid macular degeneration more widespread, e.g. on either side of the macula; disruptions, optically empty spaces under the inner limiting membrane and in the outer nuclear layer; speckled hypo- and hyper-fluorescent spots in the periphery in fundus autofluorescence images):								
Week 35	0/5	0/5	0/3	0/3	0/3	0/3	1+MMD/5	4+MMD/5
Hematology								
Hemoglobin concentration (g/dL)								
Week 4	13.4	13.6	14.0	13.6	14.2	13.7	13.0	11.9
Week 13	13.4	13.5	14.0	13.6	13.4	13.5	12.8	12.4
Week 26	13.0	12.9	13.2	12.5	13.1	12.4	12.2	11.8
Week 35	13.5	13.3	13.8	13.1	13.6	12.6	12.5	11.9
Week 39	13.4	13.2	13.9	13.2	13.7	12.6	12.7	12.1
Red blood cell count (10^{12}/L)								
Week 4	6.85	6.64	7.71	6.71	7.30	6.81	6.64	6.09
Week 13	6.80	6.61	7.56	6.60	6.76	6.41	6.15	5.99
Week 26	6.80	6.43	7.38	6.25	6.80	6.00	5.84	5.62
Week 35	6.74	6.50	7.53	6.35	6.79	6.04	5.76	5.50
Week 39	6.89	6.62	7.72	6.58	6.93	6.06	5.94	5.76

表 2.6.7.7.6-1 カニクイザル39週間投与試験（22週間回復性試験）（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**		**1.5**		**3**		**7.5/5[b]**	
No. Evaluated [Main]	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3
No. Evaluated [Recovery]	M: 2	F: 2	0	0	0	0	M: 2	F: 2
Noteworthy Findings (continued)								
Terminal Kill (continued)								
Hematology (continued)								
Packed cell volume (%)								
Week 4	44.9	45.5	47.0	44.4	47.5	45.6	42.9	39.8
Week 13	44.5	44.9	46.4	43.6	43.0	43.4	40.5	39.3
Week 26	44.0	43.9	44.7	41.8	42.6	40.8	38.9	38.2
Week 35	44.1	44.1	45.5	42.2	42.5	41.5	38.1	37.3
Week 39	44.5	44.4	46.7	42.7	44.0	41.3	40.0	38.5
Absolute reticulocyte count (10^9/L)								
Week 4	47.8	51.2	37.3	35.5	55.4	63.3	90.2	85.7
Week 13	30.0	41.2	35.8	39.1	62.9	74.6	136.7	73.0
Week 26	32.6	46.5	35.2	49.0	63.3	86.0	125.5	108.7
Week 35	28.3	31.3	24.0	21.9	37.1	57.8	95.9	114.5
Week 39	28.3	27.1	35.8	38.6	74.7	84.2	120.8	118.9
Platelet count (10^9/L)								
Week 4	345	355	457	463	440	555	375	343
Week 13	269	313	341	374	380	437	570	547
Week 26	333	398	447	423	422	486	655	653
Week 35	361	388	483	500	461	495	745	779
Week 39	359	389	437	483	458	543	711	725
Platelet crit (%)								
Week 4	0.30	0.31	0.38	0.40	0.45	0.50	0.33	0.29
Week 13	0.25	0.30	0.30	0.33	0.37	0.40	0.49	0.46
Week 26	0.28	0.33	0.33	0.35	0.37	0.42	0.48	0.45
Week 35	0.26	0.28	0.32	0.36	0.34	0.37	0.47	0.48
Week 39	0.29	0.31	0.33	0.41	0.43	0.44	0.52	0.49

表 2.6.7.7.6-1 カニクイザル39週間投与試験（22週間回復性試験）（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	0 (Control)		1.5		3		7.5/5[b]	
No. Evaluated [Main]	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3
No. Evaluated [Recovery]	M: 2	F: 2	0	0	0	0	M: 2	F: 2
Noteworthy Findings (continued)								
Terminal Kill (continued)								
Hematology (continued)								
Lymphocyte count (10^9/L)								
Week 4	4.21	5.20	6.99	4.97	6.33	4.92	7.73	5.56
Week 13	4.09	5.41	6.76	4.04	3.96	4.32	3.98	2.60
Week 26	4.84	5.41	6.83	4.52	4.90	4.25	4.67	2.72
Week 35	4.49	4.62	5.28	4.20	4.09	3.77	3.71	2.35
Week 39	6.34	5.64	7.61	4.89	5.61	3.97	4.48	2.48
Organ Weights (%) [i]								
Thymus								
Absolute (g)	4.518	3.401	+30	−7	−31	+2	−9	−58
Relative to body weight (%)	0.1286	0.1178	+14	−5	−21	−2	−7	−53
Relative to brain weight (%)	6.2620	4.6692	+33	−3	−30	+14	−15	−53
Gross Pathology								
No. examined	3	3	3	3	3	3	3	3
Skin. subcutis								
Flaky	0	0	0	0	0	0	1	1
Thymus								
Small	0	0	0	0	0	0	0	1
Histopathology								
No. examined	3	3	3	3	3	3	3	3
Eye								
Retinal degeneration								
Minimal	0	0	0	0	0	1	2	1
Slight	0	0	0	0	0	0	0	1

表 2.6.7.7.6-1 カニクイザル39週間投与試験（22週間回復性試験）（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**		**1.5**		**3**		**7.5/5[b]**	
No. Evaluated [Main]	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3
No. Evaluated [Recovery]	M: 2	F: 2	0	0	0	0	M: 2	F: 2
Noteworthy Findings (continued)								
Terminal Kill (continued)								
Histopathology (continued)								
No. examined	3	3	3	3	3	3	3	3
Thymus								
Atrophy								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	1
Slight	0	0	0	0	0	0	0	2
Skin/subcutis								
Epidermal hyperplasia								
Minimal	0	0	0	0	0	0	3	1
Eyelid								
Epidermal hyperplasia								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	1
Slight	0	0	0	0	0	0	2	2
Electron microscopy								
No. examined	1	1	0	0	0	0	1	1
Retinal degeneration	0	0	NA	NA	NA	NA	0	1
Immunohistochemistry [j]								
No. examined	1	1	0	0	0	1	0	1
Increased multifocal GFAP expression in astrocytes and Müller cells in eye specimens	0	0	NA	NA	NA	1	NA	1
Decrease in neuronal membranes in areas of degeneration.	0	0	NA	NA	NA	1	NA	1

表 2.6.7.7.6-1 カニクイザル39週間投与試験（22週間回復性試験）（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**		**1.5**		**3**		**7.5/5[b]**	
No. Evaluated [Main]	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3
No. Evaluated [Recovery]	M: 2	F: 2	0	0	0	0	M: 2	F: 2
Postdose Evaluation								
No. evaluated	2	2	0	0	0	0	2	2
Terminal concentration in								
Plasma (ng/mL)	BLQ	BLQ	NA	NA	NA	NA	BLQ	BLQ
CSF (ng/mL)	BLQ	BLQ	NA	NA	NA	NA	BLQ	BLQ
Brain (ng/g)	BLQ	BLQ	NA	NA	NA	NA	BLQ	BLQ
Skin (ng/g)	BLQ	BLQ	NA	NA	NA	NA	394[k]	6.87[k]
Terminal concentration in ocular tissue:								
Choroid + RPE (ng/g)	4.17	3.86	NA	NA	NA	NA	879000	273000
Iris (ng/g)	11.9	11.9	NA	NA	NA	NA	585000	531000
Sclera (ng/g)	<0.75	1.08	NA	NA	NA	NA	24800	14800
Retina (ng/g)	11.3	1.24	NA	NA	NA	NA	477	456
Cornea (ng/g)	<2.5	24.2	NA	NA	NA	NA	47.5	886
Lens (ng/g)	<1.25	2.17	NA	NA	NA	NA	53.0	16.0
Vitreous Humor 1 (ng/mL) [c]	<0.500	<0.500	NA	NA	NA	NA	2.10	0.523
Vitreous Humor 2 (ng/mL) [d]	<0.500	<0.500	NA	NA	NA	NA	16.9	66.1
Aqueous Humor (ng/mL)	<0.500	<0.500	NA	NA	NA	NA	0.964	<0.500
Clinical Observations								
Tail, hair loss	0	0	NA	NA	NA	NA	1	1
Electroretinograhy								
Week 22	The decrease in ERG amplitude diminished during the recovery period in female animals treated previously at 7.5/5 mg/kg/day. The B-wave amplitude remained just below normal limits in one female animal. This female also showed a reduced rod response at the end of the recovery period.							

表 2.6.7.7.6-1 カニクイザル39週間投与試験（22週間回復性試験）（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**		**1.5**		**3**		**7.5/5[b]**	
No. Evaluated [Main]	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3
No. Evaluated [Recovery]	M: 2	F: 2	0	0	0	0	M: 2	F: 2
Postdose Evaluation (continued)								
Spectral domain optical coherence tomography (Weeks 8, 13 and 22 of recovery)								
Week 22	Animals previously treated at 7.5/5 mg/kg/day showed some mild improvement after 22 weeks of recovery. There was slightly less edema in the far periphery and there appeared to be mildly improved layer organization in the near periphery, closer to the macula. Degenerative changes (layer disorganization, absent layers, haziness, and thinning) remained in the far periphery. The microcystoid spaces in the inner nuclear layer around the macula improved from the dosing phase. The Fundus autofluorescence images mildly improved with the area of hyperreflective white spots becoming less dense and/or receding more towards the far periphery.							
Grade 2:	0/2	0/2	NA	NA	NA	NA	1/2	0/2
Grade 3:	0/2	0/2	NA	NA	NA	NA	1+MMD/2	2+MMD/2
Histopathology								
No. examined	2	2	0	0	0	0	2	2
Eye								
Retinal degeneration								
Minimal	0	0	NA	NA	NA	NA	2	1
Slight	0	0	NA	NA	NA	NA	0	1

— no noteworthy findings; Dunnett's Test: * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

表 2.6.7.7.6-1 カニクイザル39週間投与試験（22週間回復性試験）（続）

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

a. No claim of GLP compliance is made for any reference to the brain, skin and ocular bioanalyses, to the electroretinography , spectral domain optical coherence tomography and the electron microscopy examinations.

b. High dose animals were administered 7.5 mg/kg/day on Days 1 to 12. Following a treatment-free period on Days 13 to 25, dosing resumed at 5 mg/kg/day from Day 26 onwards.

c. Central vitreous.

d. Peripheral vitreous close to retina.

e. Small section of choroid with vitreous humor.

f. Various regions are: anus, body, eyelids, face, inguinals, legs and/or mouth.

g. Number of animals with findings/number of animals evaluated.

h. Assessment in Week 22 and 27 revealed similar results except for 2 animals with an increase in grading over time.

i. 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.

j. Two selected females with retinal degeneration were investigated and compared with two control animals. Due to suboptimal fixation conditions, the markers Iba-1 and glutamine synthetase could not be assessed.

k. Data (greater than 5.00 ng/g) were obtained from 1 animal/sex.

2.6.7.8 *In vitro* 遺伝毒性試験

2.6.7.8.1 細菌を用いる復帰突然変異試験

表 2.6.7.8.1-1 細菌を用いる復帰突然変異試験

Test Article: Risdiplam

Test for Induction of:	Gene mutations in bacterial cells	**Independent assays:**	4, 3 evaluable (2259M15/1 aborted)	**Location in CTD:**	4.2.3.3.1-1
Strains:	*Salmonella typhimurium*	**Replicate cultures:**	3 plates per dose point (2 for pos. controls)	**Report No.:**	1063901
				GLP compliance:	Yes
Metabolizing System:	Phenobarbital/ 5,6-benzoflavone-induced rat liver S-9	**Cells analyzed/culture:**	The number of revertant colonies was counted		
Vehicles for test article:	2259M15/2: 10 mM citric acid buffer, pH3 2259M15/3 and 2259M15/4: 10 mM ascorbic acid buffer/0.01 mg/mL thiosulfate buffer, pH3	**Positive controls:**	Na-azide, Mitomycin C, ICR 191, 2-nitrofluorene, 2-aminoanthracene	**Date of treatment:**	[redacted] 20[redacted]
for positive controls:	DMSO or water				
Treatment:	Plate incorporation test procedure with and without metabolic activation system				
Cytotoxic Effects:	None				
Genotoxic Effects:	None				

Experiment 2259M15/2

Metabolic activation	Test article	Dose level per plate	Revertant colony counts (mean±SD) TA 1535	TA 97	TA 98	TA 100	TA 102
Without activation							
	Citric acid buffer		15 ± 5	123 ± 19	16 ± 7	164 ± 11	389 ± 21
	Risdiplam	15.8 µg	12 ± 4	115 ± 20	13 ± 4	159 ± 15	379 ± 24
	(Batch:	50 µg	13 ± 7	142 ± 15	15 ± 5	161 ± 26	419 ± 6
	RO7034067[redacted]	158 µg	12 ± 3	126 ± 15	12 ± 3	181 ± 25	401 ± 11
	[redacted]	500 µg	13 ± 4 [f]	151 ± 9 [f]	17 ± 3 [f]	165 ± 6 [f]	418 ± 16 [f]
	Purity: [redacted]%)	1580 µg	13 ± 6 [f]	125 ± 17 [f]	12 ± 4 [f]	177 ± 8 [f]	330 ± 69 [f]
		5000 µg	16 ± 1 [w f]	9 ± 2 [r w f]	12 ± 6 w [f]	163 ± 3 [w f]	102 ± 6 [r w f]
	Na azide	1 µg	922 ± 6			830 ± 4	
	MMC	0.2 µg					2069 ± 129
	ICR 191	1 µg		3263 ± 16			
	2NF	2 µg			264 ± 40		

表 2.6.7.8.1-1 細菌を用いる復帰突然変異試験（続）

Test Article: Risdiplam

Experiment 2259M15/2 (cont.)							
Metabolic activation	Test article	Dose level per plate	Revertant colony counts (mean±SD)				
			TA 1535	TA 97	TA 98	TA 100	TA 102
With activation							
	Citric acid buffer		11 ± 2	204 ± 13	20 ± 2	192 ± 14	392 ± 49
	Risdiplam	15.8 µg	11 ± 6	189 ± 12	22 ± 8	194 ± 30	404 ± 33
	(Batch:	50 µg	16 ± 4	250 ± 11	40 ± 10	197 ± 21	458 ± 43
	RO7034067	158 µg	17 ± 3	216 ± 30	44 ± 7	187 ± 25	455 ± 18
	[redacted]	500 µg	14 ± 3 [f]	243 ± 7 [f]	35 ± 5 [f]	187 ± 14 [f]	440 ± 41 [f]
	Purity: [redacted]%)	1580 µg	13 ± 2 [f]	266 ± 23 [f]	38 ± 5 [f]	203 ± 8 [f]	353 ± 16 [f]
		5000 µg	15 ± 3 [w f]	256 ± 21 [w f]	46 ± 12 [w f]	185 ± 21 [w f]	157 ± 17 [r w f]
	2-AA	10 µg					1973 ± 169
	2-AA	4 µg	245 ± 14	1523 ± 54	1470 ± 197	3037 ± 226	

表 2.6.7.8.1-1 細菌を用いる復帰突然変異試験（続）

Test Article: Risdiplam

Experiment 2259M15/3							
Metabolic activation	Test article	Dose level per plate	Revertant colony counts (mean±SD)				
			TA 1535	TA 97	TA 98	TA 100	TA 102
Without activation							
	Ascorbic acid buffer		16 ± 5	136 ± 10	13 ± 2	107 ± 4	419 ± 10
	Risdiplam (Batch: RO7034067[redacted] Purity: [redacted]%)	78.13 µg	16 ± 9	138 ± 13	16 ± 6	106 ± 7	428 ± 36
		156 µg	11 ± 1	134 ± 15	9 ± 3	105 ± 10	400 ± 29
		313 µg	17 ± 13	133 ± 25	14 ± 4	120 ± 13	439 ± 8
		625 µg	13 ± 3 [f]	127 ± 11 [f]	15 ± 3 [f]	113 ± 15 [f]	440 ± 10 [f]
		1250 µg	13 ± 2 [f]	128 ± 17 [f]	10 ± 5 [f]	117 ± 17 [f]	432 ± 19 [f]
		2500 µg	10 ± 3 [f]	102 ± 35 [f]	12 ± 1 [f]	96 ± 14 [f o m]	295 ± 58 [f]
		5000 µg	16 ± 4 [f]	28 ± 16 [r f]	12 ± 1 [f]	110 ± 9 [f o m]	166 ± 13 [f]
	Na azide	1 µg	675 ± 17			736 ± 37	
	MMC	0.2 µg					1917 ± 66
	ICR 191	1 µg		3046 ± 361			
	2NF	2 µg			255 ± 26		
With activation							
	Ascorbic acid buffer		14 ± 2	163 ± 10	17 ± 5	112 ± 10	506 ± 18
	Risdiplam (Batch: RO7034067[redacted] Purity: [redacted]%)	78.13 µg	12 ± 4	192 ± 2	30 ± 7	120 ± 10	494 ± 40
		156 µg	7 ± 2	184 ± 22	23 ± 4	125 ± 8	559 ± 50
		313 µg	14 ± 4	183 ± 28	25 ± 5	142 ± 8	502 ± 43
		625 µg	15 ± 4 [f]	193 ± 9 [f]	26 ± 3	119 ± 11 [f]	444 ± 45 [f]
		1250 µg	14 ± 3 [f]	224 ± 28 [f]	33 ± 5 [f]	140 ± 4 [f]	414 ± 26 [f]
		2500 µg	7 ± 4 [f]	178 ± 7 [f]	29 ± 8 [f]	128 ± 21 [f o]	306 ± 21 [f]
		5000 µg	10 ± 6 [f]	207 ± 19 [f]	36 ± 3 [f]	128 ± 4 [f o]	198 ± 11 [t f]
	2-AA	10 µg					2220 ± 102
		4 µg	145 ± 19	1758 ± 95	1567 ± 100	2860 ± 66	

表 2.6.7.8.1-1 細菌を用いる復帰突然変異試験（続）

Test Article: Risdiplam

Experiment 2259M15/4							
Metabolic activation	Test article	Dose level per plate	Revertant colony counts (mean±SD)				
			TA 1535	TA 97	TA 98	TA 100	TA 102
Without activation							
	Ascorbic acid buffer		18 ± 7	148 ± 8	14 ± 2	125 ± 9	459 ± 26
	Risdiplam	156 µg	20 ± 9	136 ± 19	14 ± 2	129 ± 7	452 ± 57
	(Batch:	312 µg	15 ± 7	134 ± 1	16 ± 3	129 ± 8	492 ± 5
	RO7034067[redacted]	625 µg	16 ± 4	134 ± 10	13 ± 2	126 ± 19	480 ± 10
	[redacted]	1250 µg	16 ± 7	132 ± 12	12 ± 1	142 ± 9 [o m]	452 ± 23
	Purity: [redacted]%)	2500 µg	19 ± 2	132 ± 14	15 ± 4	117 ± 12 [o m]	450 ± 152
		5000 µg	5 ± 2 [w m]	77 ± 38 [w m]	10 ± 5 [w]	120 ± 7 [w m o]	305 ± 164 [c]
	Na azide	1 µg	745 ± 94			1050 ± 5	
	MMC	0.2 µg					2067 ± 162
	ICR 191	1 µg		2353 ± 191			
	2NF	2 µg			201 ± 8		
With activation							
	Ascorbic acid buffer		15 ± 5	183 ± 16	21 ± 8	147 ± 6	562 ± 62
	Risdiplam	156 µg	12 ± 1	164 ± 6	24 ± 4	156 ± 4	515 ± 56
	(Batch:	312 µg	10 ± 3	173 ± 24	21 ± 4	149 ± 21	582 ± 45
	RO7034067[redacted]	625 µg	10 ± 2	168 ± 2	28 ± 3	153 ± 5	522 ± 24
	[redacted]	1250 µg	14 ± 5	231 ± 4	24 ± 5	183 ± 10	540 ± 26
	Purity [redacted]%)	2500 µg	11 ± 2	251 ± 17	26 ± 3	182 ± 10	419 ± 30
		5000 µg	14 ± 2 [w]	234 ± 33 [w]	27 ± 3 [w m]	138 ± 13 [w m o]	189 ± 59 [w]
	2-AA	4 µg	127 ± 9	2042 ± 74	1607 ± 151	2641 ± 252	
		10 µg					3901 ± 184

Plate postfix codes: c=contaminated plate, f=colored plate, m=manual counting necessary, r=background growth reduced, o=other postfix, t: background growth absent, w=weak precipitation. For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

2.6.7.8.2 マウスリンフォーマ細胞を用いる *in vitro* 小核スクリーニング試験

表 2.6.7.8.2-1 マウスリンフォーマ細胞を用いる *in vitro* 小核スクリーニング試験

Test Article: Risdiplam

Test for Induction of:	Micronuclei	**Independent assays:**	1	**Location in CTD:**	4.2.3.3.1-2
Strains:	L5178Y $tk^{+/-}$ mouse lymphoma cells	**Replicate cultures:**	2	**Report No.:**	1063026
		Cells analyzed/culture:	1000	**GLP compliance:**	No
Vehicles for test article:	DMSO	**Positive controls:**	MMS	**Date of treatment:**	Unknown
Treatment:	24 h continuous treatment in absence of an exogenous metabolic activation system, followed by 24 h recovery				
Cytotoxic Effects:	≥20 µg/mL directly after a 24h exposure and ≥2 µg/mL following a 24 h recovery period (>50% decrease in RCC)				
Genotoxic Effects:	Clastogenic/aneugenic activity with a lowest observed effect concentration of 10 µg/mL directly after a 24 h exposure, associated with pronounced cytotoxicty. Following 24 h recovery, effects at ≥1 µg/mL, associated with pronounced cytotoxicity at ≥2 µg/mL				

			0 h Recovery				24 h Recovery			
Metabolic activation	Test Article	Concentration (µg/mL)	MN cells (%)	RCC (%)	Mitotic cells (%)	PD (%)	MN cells (%)	RCC (%)	Mitotic cells (%)	PD (%)
Without activation	MMS	15	12.2	61	3.9	0.34	22.1	75	–	1.02
	1% DMSO	–	0.7	100	3.9	1.05	0.9	100	3.6	1.43
	Risdiplam	0.5	1.0	101	4.5	1.06 [a]	1.1	87	6.9	1.24
		1	0.5	94	8.4	0.97 [a]	2.2	81	5.2	1.13
		2	1.8	74	6.6	0.62 [a]	10.3	42	5.0	0.19
		5	1.2	55	11.1	0.18 [a]	[b]	32	[b]	-0.22
		10	3.7	50	11.0	0.04 [a]	[b]	28	[b]	-0.38
		20	4.4	44	13.2	-0.13 [a]	[b]	23	[b]	-0.68

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

a. Precipitation visible under the microscope.

b. Dose levels could not be evaluated due to cytotoxicity.

2.6.7.8.3 *In vitro* 小核試験（機序解析試験）

表 2.6.7.8.3-1 *In vitro* 小核試験（機序解析試験）

Test Article: Risdiplam

Test for Induction of:	Micronuclei, DNA damage response, cell cycle and caspase inhibition	**Independent assays:**	11 DDR assays, 4 cell cycle assays, 18 micronucleus assays	**Location in CTD:**	4.2.3.3.1-3
				Report No.:	1066849
				GLP compliance:	No
Strains:	L5178Y $tk^{+/-}$ mouse lymphoma cells, human TK6 lymphoblastoid cells.	**Replicate cultures:**	1-3 (for micronucleus assays)		
Metabolizing System:	Phenobarbital/ 5,6-benzoflavone-induced rat liver S-9	**Cells analyzed/culture:**	10000-20000 for DDR pathway analysis; 50000 for cell cycle analysis	**Date of treatment:**	[redacted] 20[redacted] to [redacted] 20[redacted]
Vehicles for test article:	DMSO	**Positive controls:**	MMS, hydroxyurea, CCCP, nocodazole.		
Treatment:	3-24 h treatment in presence or absence of an exogenous metabolic activation system, or followed by 0-24h recovery				
Cytotoxic Effects:	Cytotoxicity was observed in all experiments, starting at concentrations of approx. 5–10 µM in the absence of metabolic activation, and at approx. 50 µM in the presence of metabolic activation (likely due to different exposure time).				
Genotoxic Effects:	An increase of cleaved PARP, indicative of apoptotic processes, was noted at concentrations of ≥25 µM. Micronucleus induction was suppressed by pre-treatment of the cells with a pan-caspase inhibitor, which gives supportive evidence for a non-DNA target of risdiplam and an involvement of apoptotic processes in the induction of micronuclei in a human cell line. However, it remains unclear whether caspase activation is causally linked to micronucleation, as caspases are well known as key players in apoptosis, but are also involved in cell cycle regulation and other cellular processes. The results exclude a direct DNA-reactive, clastogenic mode of action at concentrations compatible with cell survival. The results suggest an indirect, non-DNA targeting, possibly aneugenic mechanism of micronuclei induction by risdiplam in cultured mammalian cells.				
Performed assays:	1. DDR pathway analysis in the absence or presence of S-9 and a range of treatment duration of 3, 4 or 24h, followed by a 0, 21 or 24h recovery in human TK6 lymphoblastoid cells. The direct or indirect biomarkers cover the following DNA damage types: gH2AX (indicator of primary DNA double-strand breaks), cleaved PARP (marker of apoptosis), phospho-H3 (marker of mitotic cells), and DNA content (indicative for polyploidy and cell cycle phase). Cytotoxicity parameters included RNC, RINC, RPD. Numbers of healthy cells were used to calculate viability. All measurements were performed via flow cytometry and evaluated with an established gating strategy. Positive controls were MMS, hydroxyurea and CCCP. 2. Cell cycle analysis in TK cells with DAPI methodology in absence and in the presence of S-9. Treatment duration was 3 or 24h, followed by a 0, 21 or 24h recovery. 3. Micronucleus assay in TK cells or L5178Y cells, in the presence and absence of apoptosis inhibitor zVAD-FMK and in absence of S9. Positive controls were MMS, hydroxyurea, CCCP an nocodazole. Treatment duration was 24h, followed by a 0 or 24h recovery. Flow cytometric micronucleus analysis was combined with the evaluation of several biomarkers of DDR pathways.				

表 2.6.7.8.3-1 *In vitro* 小核試験（機序解析試験）（続）

Test Article: Risdiplam

Additional information: Data was evaluated mainly using data plots and approximates were used. The assays are well established and positive controls were included in one DDR and one micronuclei experiments. They induced the expected responses in TK6 cells.		
Biomarker	**Endpoint**	**Results**
DNA damage response (DDR) pathway analysis (TK6 cells)		
gH2AX	DNA double-strand breaks	A small increase (less than 1.5-fold over controls) was observed following 24h treatment at high, cytotoxic concentrations (≥50 µM), implying low biologically relevance.
Cleaved PARP	Apoptosis	Increase at ≥5 µM following 24h treatment, but not after 4h. Increase at 50 µM after treatment for 3h in presence of an exogenous metabolic activation system with wash-off and recovery for 21h.
Phosphorylated H3	Mitotic cells	A small increase (up to 2.2-fold over controls) was observed at 5 µM following 24h treatment. It was not observed at higher concentrations, likely due to cytotoxicity.
DNA content	Polyploidy and cell cycle phase	A moderate (approx. 2-5-fold over control) increase in the proportion of polyploid cells was observed following 4h treatment at non-cytotoxic concentrations. Weak polyploidy at 50 µM after treatment for 3h in presence of an exogenous metabolic activation system with wash-off and recovery for 21h.
Cytotoxicty	Viable cell counts RNC, RINC, RPD	Decrease in viable cell count at approx. 50-100 µM following treatment for 3h in presence of an exogenous metabolic activation system with wash-off and recovery for 21h, and at approx. 5–10 µM following treatment for 24h in absence of metabolic activation
Cell cycle analysis with DAPI methodology (TK6 cells)		
DNA content	Cell cycle phase and apoptotic cells	A strong increase of cells in the “sub-G1” part (generally indicative for apoptotic cells) of the DNA-content histogram was observed at ≥5 µM following treatment for 24h in absence of metabolic activation. The proportions of cells in G1/G0, S and G2/M phase decreased with higher concentrations, most likely due to cytotoxicity. Similar, but less pronounced effects were noticed at higher concentrations in the presence of metabolic activation. Prolonged treatment periods (including a 24h recovery period) give similar results as 24h treatments with a shift towards lower concentrations.

表 2.6.7.8.3-1 *In vitro* 小核試験（機序解析試験）（続）

Test Article: Risdiplam

Biomarker	Endpoint	Results
Micronuceus assay in the presence and absence of apoptosis inhibitor zVAD-FMK		
Cytotoxicty in TK6 cells	Viable cell count, RNC, RINC, RPD	Reduced mean RCC (48–58% of concurrent controls) after incubation of 24h and at 20 µM in three independent experiments. The proportion of apoptotic/necrotic cells was 21–26%. At 10 µM, RCC was approx. 62% in the two most relevant experiments and proportion of apoptotic/necrotic was approx. 13%. After incubation of 48h, including a 24h treatment-free period, cytotoxicity and proportion of apoptotic/necrotic cells were high at 20 µM and this concentration level is considered to be overly toxic. At 10 µM, viability was below 32% of control and nearly 50% of cells show apoptotic/necrotic features.
Micronucleation in TK6 cells		After incubation of 24 h micronucleus frequency in TK6 cells was increased at ≥1.25 µM. At 20 µM, 29% of cells (a 33-fold increase over concurrent controls) were micronucleated. After incubation of 48 h, including a 24h treatment-free period, the micronucleus frequency remained below approx.10% (corresponding to a 3-fold increase over concurrent controls) at all concentrations. There was a dose-related increase in the number of hypodiploid events. Micronucleus induction was inhibited by pre-treatment of the cells with pan-caspase inhibitor zVAD-FMK. This is indicative of the involvement of apoptotic processes in the induction of micronuclei.
Cytotoxicty in L5178Y cells		Reduced mean RCC (27% of concurrent controls) after incubation of 24h and at 20 µM. The proportion of apoptotic cells was 50%. At 10 µM, RCC was 67% and proportion of apoptotic/necrotic was 16%. After incubation of 48h, including a 24h treatment-free period, cytotoxicity and proportion of apoptotic/necrotic cells were high at 20 µM and this concentration level is considered to be overly toxic. At 10 µM, viability was 24% of control and 42% of cells show apoptotic/necrotic features.
Micronucleation in L5178Y cells		After incubation of 24h micronucleus frequency in L5178Y cells was slightly increased at 10 µM. After incubation of 48h, including a 24h treatment-free period, the micronucleus frequency increased at 20 µM (corresponding to a 9-fold increase over concurrent controls). However, cytotoxicity and proportion of apoptotic/necrotic cells increased concurrently and genotoxic evaluation was not possible. At 10 µM, viability was below 25% of control and micronucleus frequency was approx. 4.6% (corresponding to a 3-fold increase over concurrent controls). There was no increase in the number of hypodiploid events at 10 µM, which is probably related to concurrent cytotoxicity.

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

2.6.7.9 *In vivo* 遺伝毒性試験

2.6.7.9.1 ラット小核／コメット試験

表 2.6.7.9.1-1 ラット小核／コメット試験

Test Article: Risdiplam

Test for Induction of:	Micronuclei in bone marrow cells, Comet Assay in liver and jejunum	**Treatment Schedule:**	Risdiplam at 0, 24 and 47h, CP at 24 h, EMS at 45 h	**Location in CTD:**	4.2.3.3.2-1
				Report No.:	1063368
Species/Strain:	Rat/ Wistar HanRcc rats (male)	**Sampling time:**	At necropsy (48 h after first administration)	**GLP compliance:**	Yes
Age:	6–8 weeks				
Cells evaluated:	Polychromatic erythrocytes (MN test); liver, jejunum cells (comet assay).	**Method of Administration:**	Oral (gavage)	**Date of Dosing:**	[redacted] 20[redacted]
Cells Analyzed/Animal:	About 4000 polychromatic cells; about 150 liver and jejunum cells	**Vehicle/Formulation:**	0.176% L-ascorbic acid, 0.001% sodium thiosulfate pentahydrate, water (demin.) ad 100%; EMS in water; CP in 0.9% NaCl.		
Special Features:	Positive controls are cyclophosphamide (24 mg/kg) for the micronucleus test and ethyl methane sulfonate (200 mg/kg) for the comet assay.				
Evidence of Exposure:	Toxicokinetic evaluation on day1 (at 3 mg/kg/day): $AUC_{0\text{-}24h}$: 3800 ng•h/mL; C_{max} of 260 ng/mL				
Toxic/Cytotoxic Effects:	MN test: reduction of PCE/NCE ratio at 25 mg/kg/day, being indicative of bone marrow toxicity. Comet assay: none				
Genotoxic Effects:	MN test: statistically significant increase in the frequency of micronucleated PCE at doses of ≥6 mg/kg/day. 3 mg/kg/day is judged to be the no observed genotoxic effect level (NOGEL) of this study. Comet assay: Risdiplam does not induce DNA strand breaks as determined by the comet assay in liver and jejunum.				

Test Article	Dose (mg/kg/day)	No. of Animals	Ratio median PCE/NCE	Median % MN-PCE	Statistical significance
Vehicle	0	5M	0.97	0.18	
Risdiplam	0.75	5M	1.37	0.05	*
	1.5	5M [a]	1.20	0.21	n.s.
	3	5M	1.93	0.18	n.s.
	6	5M [a]	0.75	0.30	*
	12.5	5M	1.35	0.78	**
	25	5M [b]	0.41	0.41	**
CP	24	5M	1.10	2.00	**

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

Note: Historical control data for negative controls: range of median values of % MN-PCE is 0.10 to 0.28; the range of median values of the PCE/NCE ratio is 0.54 to 1.53.

Historical control data for positive controls: range of median values of % MN-PCE is 1.23 to 2.28; range of median values of the PCE/NCE ratio is 0.38 to 1.00.

a. A total of 4000 PCE could not be reached in one animal due to toxicity.

b. A total of 4000 PCE could not be reached in two animals due to toxicity.

表 2.6.7.9.1-1 ラット小核／コメット試験（続）

Test Article: Risdiplam

Test Article	Dose (mg/kg/day)	No. of Animals	No. of cells	%Tail Intensity		Olive Tail Moment	
				Mean [d]	SD [d]	Mean [d]	SD [d]
Tissue: liver							
Vehicle	0	5M	1000	3.20	0.33	0.39	0.03
Risdiplam	6	5M	1000	3.37	0.73	0.43	0.08
	12.5	5M	1000	2.93	1.29	0.37	0.11
	25	5M	1000	3.06	0.51	0.40	0.06
EMS	200	5M	1000	17.54	2.15	2.73	0.45
Tissue: jejunum							
Vehicle	0	5M	1000	5.81	1.65	1.01	0.38
Risdiplam	6	5M	900 [c]	4.74	1.85	0.66	0.34
	12.5	5M	1000	6.76	1.11	1.01	0.18
	25	5M	1000	5.39	0.37	0.76	0.08
EMS	200	5M	1000	21.39	6.67	3.95	1.46

Note: Historical control data in liver tissue: range of mean values for % tail intensity of the negative control is 0.49 to 8.16, range of mean values for % tail intensity of the positive control is 9.33 to 37.46. Historical control data in jejunum tissue: range of mean values for % tail intensity of the negative control is 3.03 to 15.82, range of mean values for % tail intensity of the positive control is 9.78 to 37.21.

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

c. One replicate of animal 501 could not be evaluated.

d. Two replicates per tissue and animal were analyzed.

2.6.7.9.2 ラット4週間投与試験（小核誘発性評価）

表 2.6.7.9.2-1 ラット4週間投与試験（小核誘発性評価）

Test Article: Risdiplam

Test for Induction of:	Micronuclei[a]	**Treatment Schedule:**	5/sex/group (main study animals) were treated at 0, 1, 3 and 9 mg/kg/day for 4 weeks	**Location in CTD:**	4.2.3.2-4
				Report No.:	1064057
				GLP compliance:	Yes
Species/Strain:	Rat/ Wistar Hannover Crl:WI (Han)	**Sampling time:**	At necropsy, bone marrow (femur)	**Date of First Dose:**	[redacted] 20[redacted]
Age:	7 weeks[b]				
Cells evaluated:	Polychromatic erythrocytes	**Method of Administration:**	Oral (gavage), once daily		
Cells Analyzed/Animal:	4000 for MN PCE, 500 for PCE and NCE.	**Vehicle/Formulation:**	10 mM ascorbic acid/0.01 mg/mL sodium thiosulfate pentahydrate, pH 3.		
Special Features:	3/Sex were dosed orally with the positive control cyclophosphamide at 20 mg/kg, approximately 24 h prior to necropsy (group 5).				
Evidence of Exposure:	Toxicokinetic evaluation on day 28 (M/F at 9 mg/kg/day): $AUC_{0\text{-}24h}$: 15300/17700 ng•h/mL; C_{max}: 1370/1730 ng/mL				
Toxic/Cytotoxic Effects:	NA				
Genotoxic Effects:	Dose-dependent, statistically significant induction of micronuclei in PCE of bone marrow of male and female rats treated at 3 and 9 mg/kg/day (at 3 mg/kg/day within the range of historical control values). Decrease in %PCE in females at 9 mg/kg/day demonstrating bone marrow toxicity.				

	Risdiplam (mg/kg/day)								Cyclophosphamide	
Dose:	0 (Control)		1		3		9		20 mg/kg	
No. Evaluated:	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 3	F: 3
% PCE	52.12	56.92	50.12	54.72	54.72	52.26	43.40	21.68	25.53	35.53
Number of MN PCE	19	29	19	35	34**	72**	924**	1324**	150*	157*
% MN PCE	0.10	0.15	0.10	0.18	0.17	0.36	4.62	6.62	1.25	1.31

Wilcoxon Rank: * $p<0.05$, ** $p<0.01$. The Terpstra-Jonckheere test for dose response in both sexes was performed and showed a statistically significant linear trend indicating a dose response. All tests were interpreted with one-sided risk for increased frequency with increasing dose.

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

a. Assessment as part of 4-week repeated dose toxicity study in rats (see 2.6.7.7.2).

b. Animals were 11 weeks old at treatment with the positive control cyclophosphamide.

2.6.7.9.3 幼若ラット13週間投与試験（小核誘発性評価）

表 2.6.7.9.3-1 幼若ラット13週間投与試験（小核誘発性評価）

Test Article: Risdiplam

Test for Induction of:	Micronuclei[a]	**Treatment Schedule:**	5/sex/group (subset A) were treated at 0, 1, 3 and 7.5 mg/kg/day for 13 weeks	**Location in CTD:**	4.2.3.5.4-4
				Report No.:	1065114
				GLP compliance:	Yes
Species/Strain:	Rat/ Wistar Hannover Crl:WI (Han)	**Sampling time:**	At necropsy, bone marrow (femur)		
Age:	22 days pp			**Date of First Dose:**	[redacted] 20[redacted]
		Method of Administration:	Oral (gavage), once daily		
Cells evaluated:	Polychromatic erythrocytes				
Cells Analyzed/Animal:	4000 IE for MIE 500 erythrocytes for IE	**Vehicle/Formulation:**	10 mM ascorbic acid/0.01 mg/mL sodium thiosulfate pentahydrate, pH 3.		
Special Features:	5/sex were dosed orally with the positive control cyclophosphamide at 20 mg/kg, approximately 24 h prior to necropsy.				
Evidence of Exposure:	Toxicokinetic evaluation on day 112 (M/F at 7.5 mg/kg/day): $AUC_{0\text{-}24h}$: 15900/17600 ng•h/mL; C_{max}: 1500/1300 ng/mL				
Toxic/Cytotoxic Effects:	There was no effect on the proportion of immature erythrocytes, indicating there was no evidence of bone marrow cell toxicity.				
Genotoxic Effects:	This *in vivo* rat bone marrow micronucleus test in juvenile rats showed genotoxic activity. There were statistically significant increases in the incidence of micronucleated immature erythrocytes in animals treated at 7.5 mg/kg/day. NOGEL was determined at 3 mg/kg/day.				

			Risdiplam (mg/kg/day)						Cyclophosphamide	
Dose:	0 (Control)		1		3		7.5		20 mg/kg	
No. Evaluated:	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 3	F: 3
% of immature erythrocytes	49.4	49.3	48.6	42.3	52.8	48.6	57.1	48.0	36.4	27.1
Incidence MIE	19	14	16	31*	29	32*	233*	134*	173*	107*
% MIE	0.095	0.070	0.080	0.155	0.145	0.160	1.165	0.670	0.865	0.535
%MME	0	0.07	0	0	0	0	0	0.07	0.06	0

* $P \leq 0.05$ (Fisher's exact).

IE=immature erythrocytes; MIE=micronucleated immature erythrocytes; MME=micronucleated mature erythrocytes.

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

a. Assessment as part of 13-week repeated dose toxicity study in juvenile rats (see 2.6.7.15.4). Dosing of animals from age 22–112pp.

2.6.7.9.4 ラット小核誘発に関する用量反応解析

表 2.6.7.9.4-1 ラット小核誘発に関する用量反応解析

Test Article: Risdiplam

Test for:	Points of departure[a] (dose-response modeling for micronucleus induction in rat bone marrow cells)	**Location in CTD:**	4.2.3.3.2-2
		Report No.:	1069153
		GLP Compliance:	No
Data providing studies:	4.2.3.3.2-1 (acute study), 4.2.3.2-4 (4 wk study in adult rats), 4.2.3.5.4-4 (13 wk study in juvenile rats)		
Modelling results:	The overall lowest (most conservative) benchmark dose (BMD) values for the induction of micronuclei in polychromatic erythrocytes of rats by risdiplam were 4570 ng•h/mL ($AUC_{0\text{-}24h}$) and 438 ng/mL (C_{max}). They were obtained in a 4 wk study with adult rats and in an acute study with male adult rats, respectively. The most conservative 90% lower confidence level of the BMD is 2915 ng•h/mL ($AUC_{0\text{-}24h}$) and 236 ng/mL (C_{max}). Both values were calculated from data obtained in the acute study with male adult rats.		
Performed assays:	Benchmark dose modeling, using software package PROAST v38.9. $AUC_{0\text{-}24h}$ and C_{max} toxicokinetic data (composite design) were used to calculate a benchmark exposure. For the analysis of erythrocyte micronucleation a critical effect size (CES) of 0.5 was chosen (i.e. the "tolerable" increase in micronuclei is 50% over mean controls) and both Hill and exponential modelling was applied. In addition, the lower 90% confidence interval of the BMD (BMDL) was analyzed.		

Results	**Acute (48 h) study in male rats**	**4 wk study in adult rats**	**13 wk study in juvenile rats (PND22-112)**
BMD $AUC_{0\text{-}24h}$ (ng•h/mL)	5530	4570	6920
BMDL $AUC_{0\text{-}24h}$ (ng•h/mL)	2915	3777	4849
BMD C_{max} (ng/mL)	438	549	649
BMDL C_{max} (ng/mL)	236	485	492

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

a. Point of departure is defined as the dose or exposure at which a (geno)toxic response is statistically discernible from the background.

2.6.7.10 がん原性試験

2.6.7.10.1 rasH2マウス26週間投与試験

表 2.6.7.10.1-1 rasH2マウス26週間投与試験

Test Article: Risdiplam

Report Title:	**RO7034067: A 26 Week Oral Gavage Carcinogenicity Study in the 001178 RasH2 Mouse**									
Species/Strain:	Carcinogenicity: RasH2 001178-T, CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic Toxicokinetic: RasH2 001178-W (wild type), CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic		**Method of Administration:** Groups 1 to 5: Oral (gavage), once daily Group 6: Intraperitoneal injection[a]				**Location in CTD:** 4.2.3.4.2-1 **Report No. :** 1081793 **GLP compliance:** Yes			
Initial Age:	8-9 weeks		**Vehicle/Formulation:**	10 mM ascorbic acid/0.01 mg/mL sodium thiosulfate pentahydrate, in reverse osmosis water, pH 3 Water control: reverse osmosis (RO) water						
Date of First Dose:	[redacted] 20[redacted]									
Duration of Dosing:	26 Weeks									
Basis for high-dose selection:	Based on toxicity in previous study		**Treatment of Controls:**	Drug-free administration of vehicle or water						
Special Features:	None									
Daily Dose (mg/kg/day):	**0 (Vehicle Control)**		**0 (Water Control)[b]**		**1**		**3**		**9**	
No. Evaluated [Carcinogenicity]	M: 25	F: 25	M: 25	F: 25	M: 25	F: 25	M: 25	F: 25	M: 25	F: 25
No. Evaluated [Toxicokinetics]	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 30	F: 30	M: 30	F: 30	M: 30	F: 30
Toxicokinetics: Risdiplam										
AUC_{0-24h} (ng • h/mL)										
Day 1	NC	NC	NC	NC	1180	1030	4680	3370	15000	8980
Day 87	NC	NC	NC	NC	1190	853	3830	4050	11500	12700
Day 179	NC	NC	NC	NC	1730	797	4850	3630	15600	11800
C_{max} (ng/mL)										
Day 1	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	157	133	732	530	1550	1190
Day 87	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	138	101	359	317	1320	1140
Day 179	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	170	119	495	429	1230	1150

表 2.6.7.10.1-1 rasH2マウス26週間投与試験（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg/day):	**0 (Vehicle Control)**		**0 (Water Control)[b]**		**1**		**3**		**9**	
No. Evaluated [Carcinogenicity]	M: 25	F: 25	M: 25	F: 25	M: 25	F: 25	M: 25	F: 25	M: 25	F: 25
No. Evaluated [Toxicokinetics]	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 30	F: 30	M: 30	F: 30	M: 30	F: 30
Toxicokinetics: Metabolite M1 (RO7112063)										
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng • h/mL)										
Day 1	NC	NC	NC	NC	64.4	145	415	536	1570	1650
Day 87	NC	NC	NC	NC	64.3	94.7	318	522	1100	1600
Day 179	NC	NC	NC	NC	122	102	423	472	1690	1580
C_{max} (ng/mL)										
Day 1	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	10.9	18.9	61.1	63.6	166	176
Day 87	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	8.63	10.5	30.9	38.3	153	148
Day 179	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	13.7	15.6	49.0	55.2	137	143
Noteworthy findings										
Died/Sacrificed Moribund[c]	0	3	0	1	0[d]	1[e]	1	1	0	2[d]
Terminal Sacrifice	25	22	25	24	25	24	24	24	25	23
Survival (%)	100	88	100	96	100	96	96	96	100	92
No. of Carcinogenicity Animals with Neoplastic Lesions										
No. Evaluated	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Vascular neoplasms										
BEN-Hemangioma	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MAL-Hemangiosarcoma	1	0	0	4	1	3	2	0	2	1
Adrenal cortex										
BEN-Adenoma, subcapsular cell	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Lung										
BEN-Adenoma, bronchio-alveolar	1	0	1	0	1	3	1	2	0	1
Harderian Gland										
BEN-Adenoma	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1
MAL-Adenocarcinoma	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1

表 2.6.7.10.1-1 rasH2マウス26週間投与試験（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg/day):	0 (Vehicle Control)		0 (Water Control)[b]		1		3		9	
No. Evaluated [Carcinogenicity]	M: 25	F: 25	M: 25	F: 25	M: 25	F: 25	M: 25	F: 25	M: 25	F: 25
No. of Carcinogenicity Animals with Neoplastic Lesions (cont.)										
No. Evaluated	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Thymus										
BEN-Thymoma	1	5	0	2	0	2	1	3	0	2
MAL-Malignant thymoma	0	1	1	0	0	0	0	0	0	2
Liver										
BEN-Adenoma, hepatocellular	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
Skin/Subcutis										
BEN-Papilloma, squamous cell	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BEN-Keratoacanthoma	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Mandibular Salivary Gland										
MAL-Carcinoma	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Stomach, Glandular										
MAL-Carcinoma	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Stomach, Nonglandular										
BEN-Papilloma, squamous cell	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Cavity, Other										
MAL-Carcinoma, squamous cell	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Hemolymphoreticular system										
MAL-Malignant lymphoma	0	1	0	0	0	0	1	0	2	1

BEN=benign; MAL=malignant.

表 2.6.7.10.1-1 rasH2マウス26週間投与試験（続）

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

a. Animals in Group 6 were dosed with one intraperitoneal dose of positive control article (N-methyl-N-nitrosourea ([MNU]) on Day 1 of the dosing phase. These animals were included as positive controls to ensure animals supplied appropriately express oncogenes and respond to carcinogenic insult.

b. Animals in Group 2 were administered water only.

c. Three vehicle control toxicity females were found dead on Days 151, 171, and 24, respectively, of the dosing phase, and one water control toxicity female was found dead on Day 42 of the dosing phase. One toxicity female administered 1 mg/kg/day of R07034067 was sacrificed in moribund condition on Day 164 of the dosing phase. It was noted with a small stationary scab on the left ventral thorax with red discharge that was later noted as a mass by the Clinical Veterinarian, which resulted in the moribund sacrifice due to the size and/or appearance of a mass. One toxicity male and one toxicity female administered 3 mg/kg/day of R07034067 were sacrificed in moribund condition on Day 169 or found dead on Day 114, respectively, of the dosing phase. The male was noted as hunched and hypoactive with piloerection and lateral recumbency prior to sacrifice for general debilitation. The female did not have any noteworthy findings. Two toxicity females administered 9 mg/kg/day were sacrificed in moribund condition or found dead on Days 121 and 155, respectively, of the dosing phase. One of the toxicity females was noted with a swollen, discolored (red) vagina by the Clinical Veterinarian prior to sacrifice for general debilitation. The other female did not have any noteworthy findings. No RO7034067-related deaths occurred.

d. One toxicokinetic male administered 1 mg/kg/day of RO7034067 was found dead on Day 3 with no noteworthy findings. One toxicokinetic female administered 9 mg/kg/day was found dead on Day 2 of the dosing phase with no noteworthy findings. The mortalities were considered not RO7034067-related.

e. On Day 1 of the dosing phase, one toxicity female administered 1 mg/kg/day of RO7034067 had an accidental death, which occurred due to falling off the dosing cart. This animal was replaced on study.

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

表 2.6.7.11-1 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

Test Article: Risdiplam

Species/ Strain	Method of Administration	Dosing Period	No. per Group (Sex)	Doses (mg/kg/day)[a]	Noteworthy Findings					Location in CTD [Report No.]
Rabbit/ New Zealand White (Crl:KBL [NZW])	Oral gavage	Once daily, for 8 days	2/group (F)		**Toxicokinetics**					4.2.3.5.2-3 [1076595]
						Risdiplam		**Metabolite M1 (RO7112063)**		
					Day	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-24h} (ng•h/mL)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-24h} (ng•h/mL)	
				0	1, 7	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	
				3	1	721	5110	37.7	286	
					7	806	6050	25.2	235	
				8	1	3960	24900	205	1510	
					7	4620	31000	136	907	
				16	1	4340	50100	292	2280	
					7	7270	71300	172	1530	
					Tissue concentration ratio					
					Brain/plasma		**Choroid/plasma**		**Retina/plasma**	
					Risdiplam					
				0	BLQ		BLQ		BLQ	
				3	0.295		1.91		3.13	
				8	0.172		1.19		1.70	
				16	0.239		0.508[b]		0.955	
					Metabolite M1 (RO7112063)					
				0	BLQ		BLQ		BLQ	
				3	NC		0.938		1.91	
				8	0.024		0.462		0.879	
				16	0.024		0.155[b]		0.461	

表 2.6.7.11-1 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験（続）

Test Article: Risdiplam

Species/ Strain	Method of Administration	Dosing Period	No. per Group (Sex)	Doses (mg/kg/day)[a]	Noteworthy Findings	Location in CTD [Report No.]
					≥ 3 mg/kg/day: Dose-dependent loss in body weight by 2.6, 4.6 and 6.5 % over the treatment period at 3, 8 and 16 mg/kg/day, respectively, when compared to controls (body weight gain by 4.1%). **16 mg/kg/day:** Clear reductions in food consumption (transient effect at 8 mg/kg/day). The MTD is considered close to 16 mg/kg/day. There were no effects on clinical condition or gross pathology findings.	

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

a. Vehicle: 10 mM ascorbic acid/0.01 mg/mL sodium thiosulfate pentahydrate, pH 3.

b. Choroid and sclera were sampled.

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

該当試験なし。

雌雄受胎能に関する評価は，幼若ラット毒性試験において実施した（2.6.7.15.3及び2.6.7.15.4参照）。

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 ラット胚・胎児発生に関する予備試験

表 2.6.7.13.1-1 ラット胚・胎児発生に関する予備試験

Test Article: Risdiplam

Species/ Strain	Method of Administration	Dosing Period	No. per Group (Sex)	Doses (mg/kg/day)[a]	Noteworthy Findings					Location in CTD [Report No.]
Rat/ Wistar Hannover Crl:WI (Han)	Oral gavage	Once daily, main study: GD6 to 17 TK: GD6 to 15	Main study: 8/group (F) TK: 2/group		**Toxicokinetics**					4.2.3.5.2-1 [1080127]
						Risdiplam		**Metabolite M1 (RO7112063)**		
					Gestation Day	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-24h} (ng·h/mL)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-24h} (ng·h/mL)	
				0	6, 15	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	
				1	6	124	1080	12.4	133	
					15	121	1360	12.7	156	
				3	6	316	3440	31.1	445	
					15	429	5500	45.8	584	
				7.5[b]	6	1430	14200	150	1780	
					15	1620	18800	113	1670	
					7.5 mg/kg/day: Reduced body weight gain and reduced food consumption, associated with minor changes in clinical pathology parameters. Reduced fetal weights. No evidence of embryo-lethality or teratogenicity.					

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

a. Vehicle: 10 mM ascorbic acid/0.01 mg/mL sodium thiosulfate pentahydrate, pH 3.

b. One of two animals not pregnant.

2.6.7.13.2 ラット胚・胎児発生に関する試験

表 2.6.7.13.2-1 ラット胚・胎児発生に関する試験

Test Article: Risdiplam

Report Title:	**RO7034067: An Embryo-fetal Development Oral (Gavage) Study in the Rat (including Amendment 1)**				
Design Similar to ICH 4.1.3:	Yes	**Duration of Dosing:**	GD6–GD17	**Location in CTD:**	4.2.3.5.2-2
		Day of Mating:	GD0	**Report No. :**	1084123
Species/Strain:	Rat/ Wistar Hannover Crl:WI (Han)	**Day of C-Section:**	GD21	**GLP compliance:**	Yes
Initial Age:	82 to 86 days	**Method of Administration:**	Oral (gavage), once daily		
Date of First Dose:	[redacted] 20[redacted]	**Vehicle/Formulation:**	10 mM ascorbic acid/0.01 mg/mL sodium thiosulfate pentahydrate, pH 3		
NOAEL:	**3 mg/kg/day (F_0 Females and F_1 Litters)**				
Special Features:	None				

Daily Dose (mg/kg):		**0 (Control)**	**1**	**3**	**7.5**
Dams/Does					
No. of Females for Toxicokinetics		2	2	2	2
Toxicokinetics: Risdiplam					
GD6	T_{max} (h)	BLQ	3	3	1
	C_{max} (ng/mL)	BLQ	152	459	957
	$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)	BLQ	1520	4150	11400
GD15	T_{max} (h)	BLQ	1	1	1
	C_{max} (ng/mL)	BLQ	143	319	962
	$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)	BLQ	1540	4630	10700
Toxicokinetics: Metabolite M1 (RO7112063)					
GD6	T_{max} (h)	BLQ	3	3	3
	C_{max} (ng/mL)	BLQ	24.2	62.1	136
	$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)	BLQ	274	651	1730
GD15	T_{max} (h)	BLQ	7	3	7
	C_{max} (ng/mL)	BLQ	15.9	41.0	77.6
	$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)	BLQ	235	576	1210

表 2.6.7.13.2-1 ラット胚・胎児発生に関する試験（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	0 (Control)	1	3	7.5
No. dams mated	22	22	22	22
No. pregnant	21	20	20	20
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
No. Aborted or with Total Resorption of Litter	0	0	0	0
Clinical Observations	—	—	—	—
Body Weight Gain (%)[a]				
GD6 to 18	61.6g	7	3	−14* D
GD6 to 21	91.0g	10	7	−8
GD6 to 21 (corrected for gravid uterine weight)	16.74g	60	33	−7
GD18 to 21	29.4g	16	15	4
Food Consumption (%)[a]				
GD6 to 18	19.4g/animal/day	−3	−2	−12
GD6 to 21	19.5g/animal/day	−1	0	−10
Necropsy Observations	—	—	—	—
Mean No. Corpora Lutea	12.3	12.2	12.7	12.3
Mean No. Implantations	10.6	10.9	11.0	11.0
Mean % Preimplantation Loss	13.11	10.33	13.01	10.35
Litters				
No. Litters Evaluated	21	20	20	20
Mean No. Live Fetuses	10.2	10.2	10.5	10.4
Total No. Resorptions	0.4	0.8	0.5	0.6
No. of Litters with Dead Fetuses	0	0	0	0
Mean % Post-implantation Loss	3.18	6.35	4.56	5.86
Mean Fetal Body Weight (g)[b]	5.459	5.333	5.331	4.622*** D
Fetal Sex Ratios (% males)	50.84	52.80	47.36	46.88

表 2.6.7.13.2-1 ラット胚・胎児発生に関する試験（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	0 (Control)	1	3	7.5
Litters				
No. Litters Evaluated	21	20	20	20
Malformations[c]				
Brain, Cerebellum	0(0)	0.71(5.0)	0(0)	0(0)
Absent				
External Variations[c]				
Skin, Tag	0(0)	0(0)	0.42(5.0)	0(0)
Visceral Variations[c]				
Liver, Lobe	0(0)	0(0)	2.08(10.0)	5.10(25.0)* K
Supernumerary (vestigial)				
Skeletal Variations[c,d]				
Rib	0(0)	0(0)	2.55(15.0)* K	0(0)
Unossified				
Skull, Interparietal	26.67(61.9)	27.40(60.0)	12.17(35.0)	3.67(10.0)** K
Incomplete ossification				
Sternebrae	0.79(4.8)	3.25(10.0)	2.0(10.0)	8.63(40.0)** K
Incomplete ossification				

—no noteworthy findings; Statistical Test: * p<0.05, ** p<0.01; *** p<0.001; D=Anova and Dunnett: K=Kruskal-Wallis and Dunn.

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

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

b. Combined (male and female) fetal weight.

c. Percentage of fetuses affected (percentage of litter affected).

d. Relevant findings and findings with significantly different value from control group are listed.

2.6.7.13.3 ウサギ胚・胎児発生に関する予備試験

表 2.6.7.13.3-1 ウサギ胚・胎児発生に関する予備試験

Test Article: Risdiplam

Species/ Strain	Method of Administration	Dosing Period	No. per Group (Sex)	Doses (mg/kg/day)[a]	Noteworthy Findings					Location in CTD [Report No.]
Rabbit/ New Zealand White (Crl:KBL [NZW])	Oral gavage	Once daily, from GD6 to 19	9/group (F) 2/group also for TK		**Toxicokinetics**					4.2.3.5.2-4 [1080126]
						Risdiplam		**Metabolite M1 (RO7112063)**		
					Gestation Day	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-24h} (ng•h/mL)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-24h} (ng•h/mL)	
				0	6, 15	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	
				3	6	870	5380	27.8	193	
					15	1070	6710	22.8	163	
				6	6	2360	13900	91.8	532	
					15	2080	12300	53.3	304	
				12	6	3770	25700	121	828	
					15	3670	28600	62.2	400	
					≥3 mg/kg/day: Increased incidences of malformed fetuses (4 fetuses in 4 litters at 3 mg/kg/day, 1 fetus in 1 litter at 6 mg/kg/day and 5 fetuses in 4 litters at 12 mg/kg/day) with major defects in the cranium and/or brain in 5 fetuses. **6 mg/kg/day:** Reduced food consumption on GD6-8 and GD14-19, but overall group mean during dosing comparable to controls. Decreased feces output. **12 mg/kg/day:** Body weight loss and/or reduced bodyweight gain and reduced food consumption, associated with minor changes in clinical pathology parameters. Decreased feces output. Increased number of late and early resorptions, post-implantation loss and decreased number of live fetuses. **No NOAEL**					

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

a. Vehicle: 10 mM ascorbic acid/0.01 mg/mL sodium thiosulfate pentahydrate, pH 3.

2.6.7.13.4 ウサギ胚・胎児発生に関する試験

表 2.6.7.13.4-1 ウサギ胚・胎児発生に関する試験

Test Article: Risdiplam

Report Title:	**RO7034067: An Embryo-fetal Development Oral (Gavage) Study in the Rabbit**				
Design Similar to ICH 4.1.3:	Yes	**Duration of Dosing:**	GD6–GD19	**Location in CTD:**	4.2.3.5.2-5
		Day of Mating:	GD0	**Report No. :**	1084122
Species/Strain:	Rabbit / New Zealand White (Crl:KBL[NZW])	**Day of C-Section:**	GD29	**GLP compliance:**	Yes [a]
Initial Age:	5-6 months	**Method of Administration:**	Oral (gavage), once daily		
Date of First Dose:	[redacted] 20[redacted]	**Vehicle/Formulation:**	10 mM ascorbic acid/0.01 mg/mL sodium thiosulfate pentahydrate, pH 3		
NOAEL:	**4 mg/kg/day (F_0 Females and F_1 Litters)**				
Special Features:	Toxicokinetics				

Daily Dose (mg/kg):		**0 (Control)**	**1**	**4**	**12**
Dams/Does					
No. of Females for Toxicokinetics		2	2	2	2
Toxicokinetics: Risdiplam					
GD6	T_{max} (h)	BLQ	1	1	1
	C_{max} (ng/mL)	BLQ	305	1590	4690
	$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)	BLQ	1710	8480	34300
GD15	T_{max} (h)	BLQ	1	1	1
	C_{max} (ng/mL)	BLQ	310	1500	4220
	$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)	BLQ	1880	7990	37900
Toxicokinetics: Metabolite M1 (RO7112063)					
GD6	T_{max} (h)	BLQ	1	1	1
	C_{max} (ng/mL)	BLQ	9.41	92.8	213
	$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)	BLQ	61.1	492	1520
GD15	T_{max} (h)	BLQ	1	1	1
	C_{max} (ng/mL)	BLQ	9.56	57.0	90.0
	$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)	BLQ	63.1	303	760

表 2.6.7.13.4-1 ウサギ胚・胎児発生に関する試験（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**	**1**	**4**	**12**
No. dams mated	22	22	22	22
No. pregnant	18	20	21	21
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	3[b]
No. Aborted or with Total Resorption of Litter	1[c]	0	0	3[d]
Clinical Observations[e]				
Decreased fecal output	10(31)	10(38)	13(39)	19(141)
Decreased fecal size	9(35)	12(31)	12(35)	18(96)
Thinness	1(3)	0(0)	1(1)	4(13)
Deceased activity	0(0)	0(0)	0(0)	2(2)
Salivation	0(0)	0(0)	1(1)	2(2)
Red liquid material on cage floor	1(6)	0(0)	0(0)	4(5)
Body Weight Gain (%)[f]				
GD6 to 20	0.21kg	−10	−33	−157*** D
GD20 to 29	0.13kg	15	23	123** U
Food Consumption (%)[f]				
GD6 to 20	120.4 g/animal/day	−7	−8	−28** U
Hematology				
GD10				
Platelet (10^9/L)	444.7	NA	NA	580.2** W
Lymphocyte (10^9/L)	6.789	NA	NA	5.800** T
GD20				
White Blood Cell (10^9/L)	7.255	NA	NA	5.045*** T
Lymphocyte (10^9/L)	5.581	NA	NA	3.770*** T
Monocyte (10^9/L)	0.182	NA	NA	0.050*** W
LUC (10^9/L)	0.024	NA	NA	0.004*** W
Red Blood Cell (10^{12}/L)	5.906	NA	NA	5.438** T
Hemoglobin (g/dL)	12.69	NA	NA	11.89** T
Hematocrit (%)	37.63	NA	NA	33.88*** T
MCHC (g/dL)	33.74	NA	NA	35.17*** W
RDW (%)	15.79	NA	NA	14.49* T
Platelet (10^9/L)	360.2	NA	NA	589.9*** W
Reticulocytes (10^9/L)	291.99	NA	NA	140.0** W

表 2.6.7.13.4-1 ウサギ胚・胎児発生に関する試験（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	0 (Control)	1	4	12
No. dams mated	22	22	22	22
No. pregnant	18	20	21	21
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	3[b]
No. Aborted or with Total Resorption of Litter	1[c]	0	0	3[d]
Hematology (cont.)				
GD29				
Basophil (10^9/L)	0.171	NA	NA	0.388** [W]
Red Blood Cell (10^{12}/L)	5.932	NA	NA	5.161*** [T]
Hemoglobin (g/dL)	12.56	NA	NA	10.88*** [T]
Hematocrit (%)	38.06	NA	NA	32.89*** [T]
Reticulocytes (10^9/L)	59.45	NA	NA	129.11* [W]
Necropsy Observations	—	—	—	—
Mean No. Corpora Lutea	11.1	12.3	12.2	11.4
Mean No. Implantations	10.2	11.1	11.5	10.4
Mean % Preimplantation Loss	9.21	8.35	5.51	7.94
Litters				
No. Litters Evaluated	18	20	21	18
Mean No. Live Fetuses	9.1	10.7	11.0	9.2
Total No. Resorptions	1.1	0.4	0.5	1.2
Mean % Postimplantation Loss	9.07	3.38	4.47	12.83
Mean Fetal Body Weight (g) [g]	40.436	38.390	38.125	38.409
Fetal Sex Ratios (% males)	50.75	51.22	55.47	44.09
Malformations [h, i]				
Head, Domed	0	0	0	4.03(22.2)* [K]
Lateral Ventricles, Dilated	0	0	0	5.56(16.7)* [K]
Visceral Variations [h]				
Lung, Absent Lobe	0.53(5.9)	0.42(5.0)	0	4.74(33.3)* [K]
Gallbladder, Small	0	0.36(5.0)	0	3.36(16.7)

—No noteworthy findings; Statistical Test: * p<0.05, ** p<0.01; *** p<0.001; W=Wilcoxon, T=T-test, D=Dunn; U=Dunnett; K=Kruskal-Wallis and Dunn.

表 2.6.7.13.4-1　ウサギ胚・胎児発生に関する試験（続）

Test Article: Risdiplam

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

a. No claim of GLP compliance is made for bioanalysis of metabolite M1 (RO7112063).

b. Female No. 4509 was euthanized early on GD20, due to its clinical condition and marked weight loss after a prolonged period of low food intake; the cause of death was considered undetermined based on the macroscopic findings. Females No. 4603 and No. 4507 were euthanized early (on GD22 and GD24), as they had aborted after prolonged periods of low food intake.

c. Female No. 1521 had total resorption.

d. Female No. 4509 had total resorption and female Nos. 4603 and 4507 aborted.

e. Number of animals affected (number of observations).

f. 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.

g. Combined (male and female) fetal weight.

h. Percentage of fetuses affected (percentage of litter affected).

i. Relevant findings and findings with significantly different value from control group are listed.

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

2.6.7.14.1 ラット出生前及び出生後の発生に関する予備試験

表 2.6.7.14.1-1 ラット出生前及び出生後の発生に関する予備試験

Test Article: Risdiplam

Species/ Strain	Method of Administration	Dosing Period	No. per Group (Sex)	Doses (mg/kg/day)[a]	Noteworthy Findings	Location in CTD [Report No.]
Rat/ Wistar Hannover Crl:WI (Han)	Oral gavage	Once daily, from GD6 to PND6	6/group (F)	0 1 3 7.5	**≥ 3 mg/kg/day:** Dose-related increase in the length of gestation and lower live birth index than the controls. Dark discoloration of the dam's adrenal glands. **7.5 mg/kg/day:** 3 Dams euthanized on GD23/24 due to dystocia; 1 dam euthanized on day 1 pp as its whole litter had died. Markedly lower live litter size and viability index than in controls. Lower mean pup body weight gain than in controls from Days 0 to 7 pp.	4.2.3.5.3-1 [1085603]

2.6.7.14.2 ラット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

表 2.6.7.14.2-1 ラット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

Test Article: Risdiplam

Report Title:	**RO7034067: An Oral (Gavage) Pre and Postnatal Development Study in the Rats**				
Design Similar to ICH 4.1.2:	Yes	**Duration of Dosing:**	GD6 – PND20	**Location in CTD:**	4.2.3.5.3-2
		Day of Mating:	GD0	**Report No. :**	1088289
Species/Strain:	Rat/ Wistar Hannover Crl:WI (Han)			**GLP compliance:**	Yes
		Method of Administration:	Oral (gavage), once daily		
Initial Age:	77 to 84 days	**Vehicle/Formulation:**	10 mM ascorbic acid/0.01 mg/mL sodium thiosulfate pentahydrate, pH 3		
Date of First Dose:	[redacted] 20[redacted]	**Litters Culled:**	Culled to 4/sex/litter on PND4		
NOAEL:	**3 mg/kg/day (F_0 Females and F_1 Litters/Pups)**				
Special Features:	None				

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**	**0.75**	**1.5**	**3.0**
F_0 Females				
No. Evaluated for Toxicokinetics	2	2	2	2
Toxicokinetics: Risdiplam				
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)				
GD6	BLQ	1050	2360	5230
GD15	BLQ	1020	3190	6710
PND7	BLQ	954	1880	4230
C_{max} (ng/mL)				
GD6	BLQ	103	218	514
GD15	BLQ	102	249	617
PND 7	BLQ	91.6	197	549

表 2.6.7.14.2-1 ラット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（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	0 (Control)	0.75	1.5	3.0
F_0 Females (cont.)				
Toxicokinetics: Metabolite M1 (RO7112063)				
No. Evaluated for Toxicokinetics	2	2	2	2
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)				
GD6	BLQ	188	504	804
GD15	BLQ	176	624	1020
PND7	BLQ	112	266	490
C_{max} (ng/mL)				
GD6	BLQ	19.6	34.1	60.0
GD15	BLQ	16.8	39.2	86.1
PND7	BLQ	11.5	20.1	51.6
No. Pregnant	22	21	22	22
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	1[a]
Clinical Observations	—	—	—	—
Necropsy	—	—	—	—
Gestation Body Weight Gain (%)[b]				
GD6 to 21	97.0g	−1	0.5	−0.1
Lactation Body Weight Gain (%)[b]				
PND0 to 21	36.4g	19	18	34**
Gestation Food Consumption (%)[b]				
GD6 to 20	19.19g	−3	0	−1
Lactation Food Consumption (%)[b]				
PND1 to 14	43.80g	5	4	6
Mean Duration of Gestation (days)	21.5	21.6	21.3	21.9[+]
Abnormal Parturition	0	0	0	1[a]

表 2.6.7.14.2-1 ラット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（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	0 (Control)	0.75	1.5	3.0
F_1 Litters (Pre-weaning)				
No. of Pups (Sex Combined) for TK	3	3	3	3
Toxicokinetics: Risdiplam – PND7				
C_{max} (ng/mL)	—	5.07	7.16	20.0
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)	—	NC [c]	146	381
Toxicokinetics: Metabolite M1 (RO7112063) – PND7				
C_{max} (ng/mL)	—	1.71	2.40	5.32
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)	—	26.0	47.3	99.8
No. Litters Evaluated	22	21	22	21
Mean No. Pups/Litter – PND0	9.4	9.5	9.6	9.5
Mean No. Liveborn Pups/Litter	9.4	9.5	9.6	9.5
Mean No. Dead Pups/Litter	0.2	0.2	0	0
Postnatal Survival to Day 4 (%)	100	99.5	100	99
Postnatal Survival to Weaning (%)	100	100	99.4	100
No. of Total Litter Losses	0	0	0	0
Pup Body Weights (g)				
Day 0 pp (Males)	6.23	6.28	6.24	6.57
Day 0 pp (Females)	5.81	5.90	5.82	6.24^{++}
Pup Clinical Signs	—	—	—	—
Pup Necropsy Observations	—	—	—	—
F_1 Males (Postweaning)				
No. Evaluated	22	21	22	21
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
Clinical Observations	—	—	—	—
Necropsy Observations	—	—	—	—
Premating Body Weight Change (%)[b]				
PND21 to 77	308.0g	−4.1	−3.0	−1.9
Body Weight Change (%)[b]				
PND21 to 118	398.6g	−5.6	−3.8	−1.7

表 2.6.7.14.2-1 ラット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（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	0 (Control)	0.75	1.5	3.0
F_1 Males (Postweaning) (cont.)				
No. Evaluated	22	21	22	21
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
Preputial Separation (age in days)	43.6	43.0	43.0	42.3
Startle Habituation	—	—	—	—
Motor Activity	—	—	—	—
Learning and Memory	—	—	—	—
No. of Males Placed for Mating	21	21	22	21
Mean No. Days Prior to Mating	3.1	3.0	3.1	3.2
No. of Males that mated	21	20	22	21
No. of Fertile Males	21	20	22	21
F_1 Females (Postweaning)				
No. Evaluated	21	21	22	21
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	1[d]	0
Clinical Observations	—	—	—	—
Necropsy Observations	—	—	—	—
Premating Body Weight Change (%)[b]				
PND21 to 77	162.0g	−1.4	−0.5	−4.6
Gestation Body Weight Change (%)[b]				
GD0 to 13	45.6g	−2.2	4.6	−2.2
Mean age of vaginal patency (days)	29.5	30.2	30.7	31.5**
Startle Habituation	—	—	—	—
Motor Activity	—	—	—	—
Learning and Memory	—	—	—	—
Estrous Cycle	—	—	—	—
Mean No. Days Prior to Mating	3.1	3.0	3.1	3.2
No. of Females Sperm-Positive	21	20	22	21
No. of Pregnant Females	21	20	22	21
No. of Corpora Lutea	14.0	13.7	13.7	13.1
No. of Implantations	13.5	13.3	12.4	12.2[+]
Mean % Preimplantation Loss	3.9	3.0	9.0	6.4

表 2.6.7.14.2-1 ラット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（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	0 (Control)	0.75	1.5	3.0
F_2 Litters				
No. Evaluated	21	20	22	21
Mean No. of Implantations	13.5	13.3	12.4	12.2^{+}
Mean No. Live Conceptuses	12.7	12.8	11.9	11.7
Mean No. Resorptions	0.9	0.5	0.5	0.5
Mean % Postimplantation Loss	6.0	3.2	4.2	4.4

— no noteworthy findings/not present; Statistical test: ANOVA and Dunnett * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; Dunn + = $p < 0.05$, ++ = $p < 0.01$.

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

a. One female (No. 466) at 3 mg/kg/day was euthanized on Day 22 of gestation after showing signs of prolonged labour (dystocia). At the uterine examination, there were 11 live fetuses. There were no macroscopic findings that could explain the dystocia in this animal (No. 466).

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

c. Not reported because there were less than 3 quantifiable concentrations at consecutive time points.

d. F1 generation female No. 3526 (1.5 mg/kg/day) assigned to the Primordial and Primary Follicle Counts Subset was euthanized in poor condition on PND26. The animal had previously shown decreased activity, was cold to touch and dehydrated, thin, and the skin of its hindlimbs was blue. Gross necropsy observations included dilatation of the jejunum with gas and a small, pale spleen. Tissues from this animal were not evaluated microscopically and the cause of morbidity was uncertain. As the animal was from a dam at the mid dose level (1.5 mg/kg/day) and as this was a single occurrence, it was considered not to be indicative of an adverse effect of RO7034067.

2.6.7.15 新生児を用いた試験

2.6.7.15.1 幼若ラット反復投与試験（用量設定試験）

表 2.6.7.15.1-1 幼若ラット反復投与試験（用量設定試験）

Test Article: Risdiplam

Species/ Strain	Method of Administration	Dosing Period	No. per Group (Sex)	Doses (mg/kg/day)[a]	Noteworthy Findings	Location in CTD [Report No.]
Rat/ Wistar Hannover Crl:WI (Han)	Oral gavage	Once daily, 4 weeks, PND4 to 31	6/group/sex for TK: 4/vehicle group/sex/ timepoint, 8/risdiplam-group/sex/ timepoint	0 2.5 3.75 5[b] 10[b]	**Toxicokinetics: Pre-weaning rats [c]** Dose (mg/kg/day) / C_{max} (ng/mL) [M/F] / AUC_{0-24h} (ng•h/mL) [M/F] PND4 2.5: 153 / 152; 1880 / 2200 3.75: 281 / 293; 4840 / 5910 5[b]: 274 / 324; 3850 / 2910 10[b]: 447 / 384; 7040 / 7560 PND31 2.5: 137 / 132; 1340 / 1560 3.75: 235 / 268; 2430 / 2660 **≥ 3.75 mg/kg/day:** Mortality: 8.3%, 50% and 100% of main study pups at 3.75, 5 and 10 mg/kg/day, respectively. Clinical signs: decreased activity, tremors, coldness to touch, thinness, weakness, dehydration, empty stomach, abdominal distension and/or skin pallor. Ptosis, prominent backbone, abnormal gait or abdominal distension only at 3.5 mg/kg/day. Body weight losses/lower body weight gains from PND6 onwards. Lower food intake (postweaning) at 3.75 mg/kg/day. Changes in hematology parameters at 3.75 and 5 mg/kg/day indicate a complete myelosuppression of all cell lineages. **10 mg/kg/day:** Microscopic findings (selected pups): necrosis of the cryptal cells in the intestine and hemorrhage in the esophagus, stomach and brain. **NOAEL: 2.5 mg/kg/day for treatment on PND 4-31**	4.2.3.5.4-1 [1063098]

表 2.6.7.15.1-1 幼若ラット反復投与試験（用量設定試験）（続）

Test Article: Risdiplam

Species/ Strain	Method of Administration	Dosing Period	No. per Group (Sex)	Doses (mg/kg/day)[a]	Noteworthy Findings			Location in CTD [Report No.]
		2 weeks: PND22 to 36	4/group/sex for TK: 4/vehicle group/sex 8/risdiplam-group/sex	0 1 3 9	**Toxicokinetics: Post weaning rats [c]**			
					Dose (mg/kg/day)	C_{max} (ng/mL) [M/F]	AUC_{0-24h} (ng•h/mL) [M/F]	
					PND22			
					1	51.2 / 56.2	550 / 420	
					3	266 / 203	2070 / 1590	
					9	665 / 769	7040 / 7360	
					PND36			
					1	58.8 / 84.9	563 / 854	
					3	280 / 325	2420 / 3350	
					9	729 / 910	7940 / 9580	
					NOAEL: 9 mg/kg/day (post-weaning, PND22-36)			

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

a. Vehicle: 10 mM ascorbic acid/0.01 mg/mL sodium thiosulfate pentahydrate, pH 3.

b. Dosing at 5 mg/kg/day terminated on PND13/14 and dosing at 10 mg/kg/day terminated on PND10/11.

c. None of the samples from vehicle treated animals in Group 1 (PND 4 and 31) and Group 8 (PND22 and 36) contained quantifiable plasma concentrations of Risdiplam.

2.6.7.15.2 幼若ラット4週間投与試験（4週間回復性試験）

表 2.6.7.15.2-1 幼若ラット4週間投与試験（4週間回復性試験）

Test Article: Risdiplam

Report Title:	**RO7034067: 4-Week Oral Gavage Toxicity Study in Preweaning Juvenile Wistar Hannover Rats with a 4-Week Recovery (including Amendment 1 and 2)**					
Species/Strain:	Rat/ Wistar Hannover Crl:WI (Han)	**Duration of Dosing:**	4 weeks (PND4-31)	**Location in CTD:**	4.2.3.5.4-2	
		Duration of Postdose:	4 weeks (PND32-60)	**Report No. :**	1066709	
Initial Age:	4 days	**Method of Administration:**	Oral (gavage), once daily	**GLP compliance:**	Yes	
Date of First Dose:	[redacted] 20[redacted]	**Vehicle/Formulation:**	10 mM ascorbic acid/0.01 mg/mL sodium thiosulfate pentahydrate, pH 3			
NOAEL:	**Males: — , Females: 2.5 mg/kg/day**					
Special Features:	Weaning was on PND21, toxicokinetics.					
Performed Examinations:	Mortality; clinical observations, food consumption, body weight, long bone tibia growth, physical development (day of pinna detachment, hair growth, eye opening, incisor eruption), reflexological development, sexual maturation, ophthalmology, behavioral performance (functional observation battery, motor activity, auditory startle habituation, 'Cincinnati' water maze), hematology, clinical chemistry, urinalysis, bone marrow smear evaluation, immunophenotyping, organ weights, necropsy, histology					

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**		**1**		**2.5**	
No. Evaluated [Main]	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12
No. Evaluated [Recovery]	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6
No. Evaluated [Toxicokinetics[a]]	M: 4/4	F: 4/4	M: 8/8	F: 8/8	M: 8/8	F: 8/8
Toxicokinetics						
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng•h/mL)						
PND4	BLQ	BLQ	1070	1090	2520	2550
PND31	BLQ	BLQ	744	868	1920	2260
C_{max} (ng/mL)						
PND4	BLQ	BLQ	63.2	70.1	148	151
PND31	BLQ	BLQ	83.4	82.9	204	217

表 2.6.7.15.2-1 幼若ラット4週間投与試験（4週間回復性試験）（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**		**1**		**2.5**	
No. Evaluated [Main]	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12
No. Evaluated [Recovery]	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6
Noteworthy Findings						
Terminal Kill						
Died or Sacrificed Moribund	1[b]	0	0	0	0	0
Body Weight (%)[c]						
No. Evaluated [PND4-21]	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20
No. Evaluated [PND22-32]	M: 17	F: 18	M: 18	F: 18	M: 18	F: 18
Pre Weaning, PND12	26.26g	25.69g	−2	−2	0	2
Pre Weaning, PND21	48.01g	46.50g	−2	−2	−10^{+++}	−9**
Post Weaning, PND22	47.5g	45.2g	1	2	−12^{++}	−11**
Post Weaning, PND32	103.5g	88.9g	0	5	−11*	−9^{+}
Food consumption (%)[c]						
No. Evaluated [PND25-29]	M: 17	F: 18	M: 18	F: 18	M: 18	F: 14
No. Evaluated [PND22-32]	M: 14	F: 18	M: 18	F: 18	M: 18	F: 14
Post Weaning, PND25-29	21.3g	11.6g	−35	—	−41	—
Post Weaning, PND22-32	159.4g	105.1g	−25	—	−28	—
Long Bone Growth (%)[c]						
No. Evaluated [Recovery]	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6
Pre Weaning, PND11	20.48mm	19.57mm	−7*	−4	−9**	−4
Pre Weaning, PND21	27.55mm	26.93mm	−3	−1	−5*	−4*
Post Weaning, PND25	30.65mm	28.33mm	−5*	−3	−12***	−6*
Post Weaning, PND32	33.40mm	30.68mm	−4	−1	−10**	−2
Sexual Maturation (d)						
No. Evaluated	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6
Day of vaginal opening	NA	33.2	NA	33.8	NA	35.0
Day of preputial separation	42.5	NA	42.7	NA	47.3^{++}	NA
Functional Observation Battery						
No. Evaluated	M: 11	F: 11	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12
Forelimb Grip strength (g)	216.06	210.89	229.73	241.11	187.78	209.31
Hindlimb Grip strength (g)	157.63	131.37	140.95	168.41	119.58	132.45
Hindlimb splay (cm)	5.9	5.0	5.8	5.8	6.7	6.7**

表 2.6.7.15.2-1 幼若ラット4週間投与試験（4週間回復性試験）（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**		**1**		**2.5**	
No. Evaluated [Main]	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12
No. Evaluated [Recovery]	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6
Organ Weights (%)[c]						
No. Evaluated	M: 11	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12
Testis						
Absolute organ weight (g)	0.8809	NA	−4	NA	−34***	NA
Relative to body weight (%)	0.9006	NA	−7*	NA	−30***	NA
Relative to brain weight (%)	55.0064	NA	−5	NA	−35***	NA
Epididymis						
Absolute organ weight (g)	0.1139	NA	−3	NA	−17*	NA
Relative to body weight (%)	0.1177	NA	−7	NA	−14*	NA
Relative to brain weight (%)	7.1334	NA	−5	NA	−18**	NA
Histopathology						
No. Evaluated	M: 11	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12
Testis						
Degeneration; seminiferous epithelium						
Minimal	0	NA	0	NA	6	NA
Mild	0	NA	1	NA	5	NA
Moderate	0	NA	0	NA	1	NA
Postdose Evaluation						
No. Evaluated	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0
Body Weight (%)[c]						
PND60	257.8g	154.8g	0	7	−11	−6
Food consumption (%)[c]						
PND32-60	556.3g	374.7g	−3	—	5	—
Long Bone Growth (%)[c]						
PND60	43.70mm	39.32mm	−1	0	−3	−2

表 2.6.7.15.2-1 幼若ラット4週間投与試験（4週間回復性試験）（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	0 (Control)		1		2.5	
No. Evaluated [Main]	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12
No. Evaluated [Recovery]	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6
Postdose Evaluation (cont.)						
No. Evaluated	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6
Functional Observation Battery						
No. Evaluated[d]	M: 10	F: 10	NA	NA	M: 12	F: 12
Forelimb Grip strength (g)	676.18	540.67	NA	NA	647.50	561.53
Hindlimb Grip strength (g)	403.50	372.83	NA	NA	386.99	323.18
Hindlimb splay (cm)	6.2	5.8	NA	NA	8.3°	5.9
Organ Weights (%)[c]						
Testis						
Absolute organ weight (g)	3.0265	NA	−10	NA	−24***	NA
Relative to body weight (%)	1.1808	NA	−10	NA	−15*	NA
Relative to brain weight (%)	159.0218	NA	−8	NA	−27***	NA
Epididymis						
Absolute organ weight (g)	0.6233	NA	−7	NA	−19*	NA
Relative to body weight (%)	0.2425	NA	−7	NA	−10	NA
Relative to brain weight (%)	32.6863	NA	−6	NA	-22^{++}	NA

— no noteworthy findings/not present; Statistical test: ANOVA and Dunnett * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; Dunn + = $p < 0.05$, ++ = $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$; t-test ° $p < 0.05$, °° $p < 0.01$; °°° $p < 0.001$.

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

a. Samples for toxicokinetic evaluations on Days 4 and 31 pp (4 controls/sex and 8 rats/sex in Groups 2 and 3 per occasion).

b. Found dead on PND24 with poor clinical condition on the same day. Cause of death most probable due to gavage error.

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

d: Some toxicokinetics animals were included for evaluation.

.

2.6.7.15.3 幼若ラット4週間投与試験（8週間回復性試験）

表 2.6.7.15.3-1 幼若ラット4週間投与試験（8週間回復性試験）

Test Article: Risdiplam

Report Title:	**A 4-Week Toxicity Study by Oral Gavage in Juvenile Wistar Hannover Rats with an 8-Week Recovery (including Amendment)**							
Species/Strain:	Rat/ Wistar Hannover Crl:WI (Han)	**Duration of Dosing:**	4 weeks (PND4-31)		**Location in CTD:**	4.2.3.5.4-3		
		Duration of Postdose:	8 weeks (PND 32-87)		**Report No. :**	1088815		
Initial Age:	4 days	**Method of Administration:**	Oral (gavage), once daily		**GLP compliance:**	Yes [a]		
Date of First Dose:	[redacted] 20[redacted]	**Vehicle/Formulation:**	10 mM ascorbic acid/0.01 mg/mL sodium thiosulfate pentahydrate, pH 3					
NOAEL:	**1.5 mg/kg/day**							
Special Features:	Weaning on PND21, toxicokinetics, plasma protein binding, blood phenotyping.							
Performed Examinations:	Mortality, clinical observations, food consumption, body weight, physical development (sexual maturation), long bone growth, ophthalmology, behavioral performance (functional observation battery, motor activity, auditory startle habituation, 'Cincinnati' water maze), reproductive performance (estrous cycles, mating and fertility, ovarian and uterine examination on Day 13 of gestation), hematology, coagulation, clinical chemistry, urine analysis, necropsy, organ weights, reproductive function including sperm assessment (concentration, motility, morphology), and histology							
Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**		**0.75**		**1.5**		**2.5**	
No. Evaluated [Main]	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12
No. Evaluated Recovery/ Reproductive[b]]	M: 20	F: 20/20	M: 20	F: 20/20	M: 20	F: 20/20	M: 20	F: 20/20
No. Evaluated [Toxicokinetics[c]]	M: 4/4/4	F: 4/4/4	M: 8/10/10	F: 8/10/10	M: 8/10/10	F: 8/10/10	M: 8/10/10	F: 8/10/10
Toxicokinetics: Risdiplam								
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng•h/mL)								
PND4	BLQ	BLQ	551	541	1630	1440	2390	2280
PND12	BLQ	BLQ	1540	1810	4240	4040	7000	7310
PND31	BLQ	BLQ	680	668	1570	1880	1950	2190
C_{max} (ng/mL)								
PND4	BLQ	BLQ	39.3	47.5	102	82.7	141	155
PND12	BLQ	BLQ	113	98.6	237	233	337	416
PND31	BLQ	BLQ	50.9	51.2	107	131	140	141

表 2.6.7.15.3-1 幼若ラット4週間投与試験（8週間回復性試験）（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**		**0.75**		**1.5**		**2.5**	
No. Evaluated [Main]	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12
No. Evaluated [Recovery/ Reproductive[b]]	M: 20	F: 20/20	M: 20	F: 20/20	M: 20	F: 20/20	M: 20	F: 20/20
No. Evaluated [Toxicokinetics[c]]	M: 4/4/4	F: 4/4/4	M: 8/10/10	F: 8/10/10	M: 8/10/10	F: 8/10/10	M: 8/10/10	F: 8/10/10
Toxicokinetics: Metabolite M1 (RO7112063)								
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng•h/mL)								
PND4	BLQ	BLQ	170	145	541	546	758	721
PND12	BLQ	BLQ	332	402	825	727	1140	1320
PND31	BLQ	BLQ	163	173	439	406	457	485
C_{max} (ng/mL)								
PND4	BLQ	BLQ	9.33	7.27	35.3	38.2	42.9	42.0
PND12	BLQ	BLQ	17.6	20.4	41.1	40.0	56.1	69.2
PND31	BLQ	BLQ	12.0	12.1	31.6	30.9	32.2	32.3
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (g)[d]								
PND14	33.43	32.55	—	—	—	—	−6*	—
PND17	40.06	38.87	—	—	—	−7*	−8**	—
PND19	44.28	42.81	—	—	−6*	−7*	−10***	−8*
PND21	51.05	49.99	—	—	−7*	−10***	−17***	−16***
PND31	104.8	95 3	—	—	—	−7**	−14***	−11***
Body Weight Gain (g)[d]								
PND4-21	40.27	39.53	—	—	−9**	−12***	−22***	−21***
Food Consumption (g/animal/day)[d]								
PND21-31	10.77	10.20	—	—	—	—	−7	—

表 2.6.7.15.3-1 幼若ラット4週間投与試験（8週間回復性試験）（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**		**0.75**		**1.5**		**2.5**	
No. Evaluated [Main]	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12
No. Evaluated [Recovery/ Reproductive[b]]	M: 20	F: 20/20	M: 20	F: 20/20	M: 20	F: 20/20	M: 20	F: 20/20
Clinical Observations[e]								
Pups (PND3-21)								
Suspected dehydration	0	0	0	0	0	4(16)	1(3)	2(8)
Thinness	0	0	0	0	1(1)	1(12)	0	1(4)
Adults (PND21-118)								
Suspected dehydration	0	0	0	0	0	2(4)	3(3)	2(8)
Thinness	0	0	0	0	0	1(3)	1(4)	2(6)
Long Bone Growth(mm)[d]								
PND15	23.83	23.13	−2	0	−3	−4	−5	−5*
PND21	28.41	28.02	−3	−4	−4	−5*	−5	−7**
PND28	32.15	30.97	−1	0	−6***	-6^{+}	−8***	-10^{+++}
Ophthalmology[f]								
Anterior vitreal vacuoles nasal and /or temporal PND21 or 23	—	—	—	—	—	—	4(5)	4(7)
Anterior vitreal vacuoles nasal and temporal - PND28	—	—	—	—	—	—	1(2)	—
Behavioral Performance								
Functional Observational Battery								
Quantitative(g)[d] – PND26								
Grip strength forelimb	271.78	257.89	−5	5	−6	−7	−17***	−14*
Grip strength hindlimb	119.56	121.87	−4	−8	−6	−15**	−11	−13*
Hematology- PND32								
Lymphocyte counts (10^9/L)	2.807	—	3.245	—	3.366	—	1.982*	—

表 2.6.7.15.3-1 幼若ラット4週間投与試験（8週間回復性試験）（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	0 (Control)		0.75		1.5		2.5	
No. Evaluated [Main]	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12
No. Evaluated [Recovery/ Reproductive[b]]	M: 20	F: 20/20	M: 20	F: 20/20	M: 20	F: 20/20	M: 20	F: 20/20
Organ Weights, PND32 (%)[d]								
Epididymis								
Absolute organ weight (g)	0.1052	NA	3.4073	NA	−0.7132	NA	−22.5040**	NA
Relative to Body Weight (%)	0.10324	NA	−3.43372	NA	−3.81223	NA	−15.49362^{+}	NA
Relative to Brain Weight (%)	6.59145	NA	1.23870	NA	−4.40564	NA	−24.02386**	NA
Testis								
Absolute organ weight (g)	0.8766	NA	10.6189	NA	−6.2649	NA	−35.4882***	NA
Relative to Body Weight (%)	0.85925	NA	3.20237	NA	−9.80859	NA	−29.98799^{+++}	NA
Relative to Brain Weight (%)	54.80286	NA	8.60163	NA	−9.62496	NA	−36.76854***	NA
Gross Pathology - PND32								
No. Evaluated	12	12	12	12	12	12	12	12
Testis								
Small	0	NA	0	NA	0	NA	2	NA
Histopathology - Main Subset (PND32)								
No. examined	12	12	12	12	12	12	12	12
Testis								
Degeneration, seminiferous tubule								
Minimal	1	NA	2	NA	4	NA	6	NA
Mild	1	NA	0	NA	0	NA	6	NA

表 2.6.7.15.3-1 幼若ラット4週間投与試験（8週間回復性試験）（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**		**0.75**		**1.5**		**2.5**	
No. Evaluated [Main]	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12
No. Evaluated [Recovery/ Reproductive[b]]	M: 20	F: 20/20	M: 20	F: 20/20	M: 20	F: 20/20	M: 20	F: 20/20
Postdose Evaluation:								
No. Evaluated	20	20	20	20	20	20	20	20
Body Weight (g)[d]								
PND35	141.7	118.1	−3	0	−7*	−7*	−13***	−9**
PND56	281.4	181.4	−4	+1	−4	−5*	−10***	−6*
PND115	443.8	NA	−6*	NA	−3	NA	−9**	NA
Body Weight Gain (g)[d]								
PND35 to 87	NA	105.3	NA	2	NA	2	NA	2
PND35 to 115	302.1	NA	−7*	NA	−1	NA	−7	NA
Clinical Observations[e]								
Gestation period								
Prominent backbone	NA	0	NA	0	NA	1(1)	NA	1(1)
Suspected dehydration	NA	0	NA	0	NA	1(2)	NA	0
Thinness	NA	0	NA	0	NA	2(7)	NA	1(2)
Long Bone Growth[d] (mm)								
PND35	36.15	34.57	−2	−2	−4*	−5	−6**	−4
PND84	51.94	44.87	−3	−1	−4	−5**	−5*	−5***
PND112	52.85	NA	−3	NA	−2	NA	−5 ***	NA
Phenotyping Blood Values[d] (PND49)								
B Lymphocytes (CD3-/CD45RA+) absolute count (cells/µL)	2197.077	2102.453	1	−22*	5	−21	−19	−29**
B Lymphocytes (CD3-/CD45RA+) relative percentage	37.283	33.499	−9	−18	−4	−13	−18**	−12
Sexual Maturation (Day pp)								
Preputial separation	44.8	NA	45.0	NA	46.2^{+}	NA	47.2^{+++}	NA
Vaginal opening	NA	30.8	NA	31.0	NA	29.4	NA	30.2

表 2.6.7.15.3-1 幼若ラット4週間投与試験（8週間回復性試験）（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**		**0.75**		**1.5**		**2.5**	
No. Evaluated [Main]	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12
No. Evaluated [Recovery/ Reproductive[b]]	M: 20	F: 20/20	M: 20	F: 20/20	M: 20	F: 20/20	M: 20	F: 20/20
Postdose Evaluation (cont.):								
Reproductive Function Assessment								
Parental Performance								
Treated Males								
No. Evaluated	20	NA	20	NA	20	NA	20	NA
Mean No. Days Prior to Mating	2.6	NA	3.5	NA	3.0	NA	2.8	NA
No. of Males that Mated	20	NA	20	NA	20	NA	19	NA
No. of Fertile Males	19	NA	17	NA	20	NA	17	NA
Ovarian and Uterine Findings								
Naive Females								
No. with Total Resorption of Litter	NA	1	NA	0	NA	0	NA	0
Mean No. Implantations	NA	12.1	NA	12.9	NA	11.3	NA	11.4
Mean % Preimplantation Loss	NA	10.13	NA	4.48	NA	12.32	NA	11.35
Mean No. Live Conceptuses	NA	11.3	NA	12.4	NA	10.7	NA	10.6
Mean No. Resorptions	NA	0.7	NA	0.5	NA	0.6	NA	0.8
No. Dead Conceptuses	NA	0.0	NA	0.0	NA	0.0	NA	0.0
Mean % Post Implantation Loss	NA	10.99	NA	3.94	NA	5.53	NA	6.33
Treated Females								
No. Evaluated	NA	20	NA	20	NA	20	NA	20
Mean No. Estrous cycles/14 days	NA	3.5	NA	3.6	NA	3.4	NA	3.5
Mean No. Days Prior to Mating	NA	2.1	NA	2.2	NA	2.6	NA	2.9
No. of Females Sperm Positive	NA	20	NA	20	NA	20	NA	20
No. of Pregnant Females	NA	19	NA	18	NA	19	NA	15
No. with Total Resorption of Litter	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0
Mean No. Corpora Lutea	NA	13.2	NA	13.9	NA	14.1	NA	13.6
Mean No. Implantations	NA	11.5	NA	12.9	NA	13.1	NA	12.0
Mean % Preimplantation Loss	NA	13.54	NA	7.32	NA	6.89	NA	12.00
Mean No. Live Conceptuses	NA	11.0	NA	12.0	NA	11.8	NA	11.4

表 2.6.7.15.3-1 幼若ラット4週間投与試験（8週間回復性試験）（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**		**0.75**		**1.5**		**2.5**	
No. Evaluated [Main]	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12
No. Evaluated [Recovery/ Reproductive[b]]	M: 20	F: 20/20	M: 20	F: 20/20	M: 20	F: 20/20	M: 20	F: 20/20
Reproductive Function Assessment (cont.)								
Ovarian and Uterine Findings (cont.)								
Treated Females (cont.)								
Mean No. Resorptions	NA	0.5	NA	0.9	NA	1.2	NA	0.7
No. Dead Conceptuses	NA	0.0	NA	0.0	NA	0.0	NA	0.0
Mean % Post Implantation Loss	NA	4.40	NA	6.49	NA	9.06	NA	5.21
Organ Weights, Reproductive Subset (%)[d]								
Epididymis								
Absolute organ weight (g)	1.4396 g	NA	−5.5712	NA	−9.9093***	NA	−20.3918***	NA
Relative to Body Weight (%)	0.32051	NA	0.34070	NA	−7.39851*	NA	−12.43333***	NA
Relative to Brain Weight (%)	69.42474	NA	−3.81998	NA	−9.70159**	NA	−18.96994***	NA
Testis								
Absolute organ weight (g)	4.0389 g	NA	−8.3971**	NA	−12.8797***	NA	−19.4855***	NA
Relative to Body Weight (%)	0.89839	NA	−2.65172	NA	−10.29214***	NA	−11.19753***	NA
Relative to Brain Weight (%)	194.68355	NA	−6.69497*	NA	−12.55194***	NA	−17.97235***	NA

— no noteworthy findings/not present; Statistical test: ANOVA and Dunnett * p < 0.05, ** p < 0.01; *** p < 0.001; Dunn + = p < 0.05, ++ = p < 0.01, +++ p < 0.001.
For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

a. No claim of GLP compliance is made for plasma protein binding analysis.

b. Samples for toxicokinetic evaluation on PND4 (4 controls/sex and 8 rats/sex in Groups 2 and 3), PND12 and 31 (4 controls/sex and 10 rats/sex in Groups 2 and 3 per occasion).

c. 20 Naïve females (8-9 weeks old) were assigned to each group as untreated partners to treated males and necropsied on day13 post coitum; treated females were mated with proven breeder males (13 weeks old). 2-week mating period started on PND88.

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

e. Number of animals affected (number of observations).

f. Number of animals affected (number of eyes).

2.6.7.15.4 幼若ラット13週間投与試験（8週間回復性試験）

表 2.6.7.15.4-1 幼若ラット13週間投与試験（8週間回復性試験）

Test Article: Risdiplam

Report Title:	**A 13-Week Toxicity Study of RO7034067 by Oral Gavage in Juvenile Wistar Hannover Rats with a 8-Week Recovery Period**				
Species/Strain:	Rat/ Wistar Hannover Crl:WI (Han)	**Duration of Dosing:**	13 weeks (PND22–112)	**Location in CTD:**	4.2.3.5.4-4
		Duration of Postdose:	8 weeks (PND113–168)	**Report No. :**	1065114
Initial Age:	22 days	**Method of Administration:**	Oral (gavage), once daily	**GLP compliance:**	Yes [a]
Date of First Dose:	[redacted] 20[redacted]	**Vehicle/Formulation:**	10 mM ascorbic acid/0.01 mg/mL sodium thiosulfate pentahydrate, pH 3		
NOAEL:	**3 mg/kg/day**				
Special Features:	Weaning on day 21pp, toxicokinetics.				
Performed Examinations:	Mortality, clinical observations, food consumption, body weight, ophthalmoscopy, hematology, clinical chemistry, urinalysis, bone marrow cytology, organ weights, necropsy, histology, bone marrow micronucleus testing (see 2.6.7.9.3). In addition, specific parameters related to juvenile development, i.e. sexual maturation, behavioral performance (functional observation battery, motor activity, auditory startle habituation, 'Cincinnati' water maze), long bone tibia growth, immune function (T-dependent antibody response and lymphocyte phenotyping) and reproductive function (mating starting on PND112) including sperm assessment (concentration, motility, morphology)				

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**		**1**		**3**		**7.5**	
No. Evaluated [Main, subset A]	M:12	F:12	M:12	F:12	M:12	F:12	M:12	F:12
No. Evaluated [Recovery, subset B]	M:6	F:6	M:6	F:6	M:6	F:6	M:6	F:6
No. Evaluated [Reproductive/ Behavioral Assessment, subset C [b]]	M:20	F:20	M:20	F:20	M:20	F:20	M:20	F:20
No. Evaluated [Toxicokinetic on day PND22, subset D]	M:4	F:4	M:8	F:8	M:8	F:8	M:8	F:8
No. Evaluated [Toxicokinetic/ Immunotoxicity, subset E][c]	M:10/10	F:10/10	M:10/10	F:10/10	M:10/10	F:10/10	M:10/10	F:10/10
Toxicokinetics								
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng•h/mL)								
PND22	BLQ	BLQ	600 [d]	511 [d]	989	922	3150	3490
PND79	BLQ	BLQ	1610	1430	7080	7890	18600	19000
PND112	BLQ	BLQ	2010	1700	7160	7830	15900	17600
C_{max} (ng/mL)								
PND22	BLQ	BLQ	72.2 [d]	58.6 [d]	126	82.5	309	385
PND79	BLQ	BLQ	147	130	754	801	1850	1580
PND112	BLQ	BLQ	170	189	759	725	1500	1300

表 2.6.7.15.4-1 幼若ラット13週間投与試験（8週間回復性試験）（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**		**1**		**3**		**7.5**	
No. Evaluated [Main, subset A]	M:12	F:12	M:12	F:12	M:12	F:12	M:12	F:12
No. Evaluated [Reproductive/ Behavioral Assessment, subset C [b]]	M:20	F:20	M:20	F:20	M:20	F:20	M:20	F:20
Noteworthy Findings								
Terminal Kill								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Hematology								
No.Evaluated [PND79, subset C]	9	10	10	9	10	10	10	10
No.Evaluated [PND113, subset A]	11	8	12	10	12	11	12	12
White blood cell count (10^9/L)								
PND79	9.384	6.560	9.534	7.694	10.117	7.961	12.574*	10.203***
Lymphocyte count (10^9/L)								
PND79	8.004	5.432	8.012	6.443	8.521	6.832	10.545*	8.699***
Basophil count (10^9/L)								
PND79	0.094	0.044	0.080	0.063	0.103	0.065	0.174**	0.105***
Neutrophil count (10^9/L)								
PND79	0.998	0.830	1.091	0.929	1.128	0.777	1.441**	1.084
PND113	1.188	0.945	1.118	0.967	1.447	0.941	1.633	1.023
Mean corpuscular volume (fL)								
PND79	54.08	52.81	53.38	53.40	52.56	52.11	51.31*	51.70
PND113	52.21	54.41	51.47	53.13	51.48	52.28	49.62**	50.98**
Mean corpuscular hemoglobin (pg)								
PND79	19.71	19.41	19.41	19.43	19.01	19.21	18.46*	19.10
PND113	18.06	18.60	17.58	18.45	17.78	18.19	16.95*	17.62*
Red blood cell distribution width (%)								
PND79	10.51	10.13	10.53	9.98	10.60	10.05	11.15*	10.62
PND113	11.94	10.76	11.89	10.77	12.17	11.11	13.68***	12.16***

表 2.6.7.15.4-1 幼若ラット13週間投与試験（8週間回復性試験）（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**		**1**		**3**		**7.5**	
No. Evaluated [Main, subset A]	M:12	F:12	M:12	F:12	M:12	F:12	M:12	F:12
No. Evaluated [Reproductive/ Behavioral Assessment, subset C [b]]	M:20	F:20	M:20	F:20	M:20	F:20	M:20	F:20
Terminal Kill (cont.)								
Clinical Chemistry								
No.Evaluated [PND79, subset C]	10	10	10	10	10	10	10	10
No.Evaluated [PND113, subset A]	12	12	12	12	12	12	12	12
Potassium (10^9/L)								
PND79	5.41	5.36	5.41	5.31	5.13	5.03	5.15	4.58**
PND113	4.58	4.20	4.46	4.05	3.96***	3.74**	3.93***	3.38***
Total protein (g/dL)								
PND79	6.70	6.77	6.66	6.91	6.82	6.60	6.63	6.56
PND113	5.68	5.88	5.63	5.85	5.58	5.77	5.49	5.55*
Albumin (10^9/L)								
PND79	4.42	4.74	4.34	4.86	4.51	4.55	4.34	4.61
PND113	3.89	4.34	3.85	4.29	3.81	4.18	3.78	3.99**
Immunophenotyping[c]								
No.Evaluated [PND113, subset A]	9	8–10	10	10–11	10	10–11	10	10
Total T lymphocytes (CD3+) (cells/µL)								
Absolute	2828.592	2422.856	−6	−8	19	27	31*	46*
Relative	55.300	59.419	1	−3	5	4	9	19**
Helper T lymphocytes (CD3+/CD4+) (cells/µL)								
Absolute	2133.791	1855.616	−7	−9	15	22	29*	38
Relative	41.922	45.421	0	−3	2	1	7	13
Cytotoxic T lymphocytes (CD3+/CD8a+) (cells/µL)								
Absolute	805.966	651.375	−2	−5	30	37	37	59
Relative	15.569	15.926	3	−1	13	11	13	29*

表 2.6.7.15.4-1 幼若ラット13週間投与試験（8週間回復性試験）（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**		**1**		**3**		**7.5**	
No. Evaluated [Main, subset A]	M:12	F:12	M:12	F:12	M:12	F:12	M:12	F:12
Terminal Kill (cont.)								
Organ Weights[e]								
No. Evaluated [subset A]	12	12	12	12	12	12	12	12
Kidney								
Absolute organ weight (g)	2.4776g	1.5778g	−1	−8	11	−1	15	12*
Relative to body weight (%)	0.6411	0.7043	1	−2	5	1	21++	16***
Relative to brain weight (%)	124.2599	85.7820	−1	−7	12	1	15	12*
Gross Pathology								
No. Evaluated [subset A]	12	12	12	12	12	12	12	12
Testis								
Abnormal soft consistency	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Pale focus	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Epididymis								
Abnormal soft consistency	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Adrenal gland								
Dark discoloration	0	0	1	0	7	4	10	8
Histopathology								
No. Evaluated [subset A]	12	12	12	12	12	12	12	12
Testis								
Degeneration/necrosis, seminiferous tubule								
Minimal	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Mild	0	NA	0	NA	0	NA	2	NA
Sperm granuloma								
Moderate	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Epididymis								
Oligo/ aspermia								
Moderate	0	NA	0	NA	0	NA	2	NA
Severe	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA

表 2.6.7.15.4-1 幼若ラット13週間投与試験（8週間回復性試験）（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	0 (Control)		1		3		7.5	
No. Evaluated [Main, subset A]	M:12	F:12	M:12	F:12	M:12	F:12	M:12	F:12
Terminal Kill (cont.)								
Histopathology (cont.)								
No. Evaluated [subset A]	12	12	12	12	12	12	12	12
Cecum								
Single cell necrosis; epithelial								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	0
Colon								
Single cell necrosis; epithelial								
Minimal	0	0	0	0	0	0	2	2
Duodenum								
Single cell necrosis; epithelial								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	0
Ileum								
Single cell necrosis; epithelial								
Minimal	0	0	0	0	0	0	9	4
Mild	0	0	0	0	0	0	1	0
Jejunum								
Single cell necrosis; epithelial								
Minimal	0	0	0	0	0	0	6	2
Kidney								
Tubular dilatation								
Minimal	2	2	3	2	3	4	3	4
Mild	0	1	0	0	0	0	4	3

表 2.6.7.15.4-1 幼若ラット13週間投与試験（8週間回復性試験）（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**		**1**		**3**		**7.5**	
No. Evaluated [Reproductive/ Behavioral Assessment, subset C [b]]	M:20	F:20	M:20	F:20	M:20	F:20	M:20	F:20
Terminal Kill (cont.)								
Male Reproductive Assessment								
No. Evaluated [subset C]	20	0	20	0	20	0	20	0
Gross pathology								
Testis								
Abnormal soft consistency	0	NA	0	NA	0	NA	2	NA
Pale focus	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Small	0	NA	0	NA	0	NA	2	NA
Epididymis								
Small	0	NA	0	NA	0	NA	2	NA
Sperm evaluation								
Spermatozoa count (mio/g)	621.498	NA	586.706	NA	644.176	NA	452.164**	NA
Sperm motility (%)	87.0	NA	79.9	NA	85.4	NA	51.8^{+++}	NA
Cauda epididymis weight (g)	0.22617	NA	0.22545	NA	0.22368	NA	0.19387**	NA
Morphology								
Abnormalities	7.63±3.79	NA	5.58±2.58	NA	7.95±4.34	NA	20.92±21.84	NA
Spermatozoa with head separated from flagellum	10.7±6.7	NA	7.5±4.2	NA	12.0±7.0	NA	33.8±39.9	NA
Spermatozoa with misshapen head	1.8±2.3	NA	1.2±1.0	NA	1.7±1.8	NA	3.2±3.6	NA

表 2.6.7.15.4-1 幼若ラット13週間投与試験（8週間回復性試験）（続）

Test Article: Risdiplam

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Control)**		**1**		**3**		**7.5**	
No. Evaluated [Recovery, subset B]	M:6	F:6	M:6	F:6	M:6	F:6	M:6	F:6
Postdose Evaluation								
Immunophenotyping[e]								
No. Evaluated [Day113, subsetB]	5	6	6	5	5	6	6	5
Cytotoxic T lymphocytes (CD3+/CD8a+) (cells/µL)								
Absolute	989.622	731.945	−20	5	−16	−21	15	−7
Relative	15.644	16.367	−5	−2	0	−3	20	2
Histopathology								
No. Evaluated [subset B]	6	6	6	6	6	6	6	6
Testis								
Degeneration/necrosis, seminiferous tubule								
Minimal	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Kidney								
Tubular dilatation								
Minimal	0	0	0	0	0	1	2	3

— no noteworthy findings/not present; Statistical test: ANOVA and Dunnett * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; Dunn + = $p < 0.05$, ++ = $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$.
For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

a. No claim of GLP compliance is made for toxicokinetic analysis of tissues.

b. 20 Naïve females were assigned to each group as untreated partners to treated males; treated females were mated with proven breeder males.

c. Samples for toxicokinetic evaluations on PND79 and 112 (4 controls/sex and 8 rats/sex in Groups 2, 3, and 4 per occasion). Samples for immunotoxicology and/or bioanalysis at end of dosing period or end of recovery period (10 rats/sex/occasion).

d. Formulation administered on PND22 did not meet the acceptance criteria, the actual dose administered was 1.57 mg/kg and was used for calculations of toxicokinetic parameters.

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

2.6.7.16 局所刺激性試験

該当試験なし。

2.6.7.17 その他の毒性試験

2.6.7.17.1 *In vitro* 眼毒性試験

表 2.6.7.17.1-1 *In vitro* 眼毒性試験

Test Article: Risdiplam

Test system or Species/Strain	Method of Administration	Treatment Duration	Dose (mg/kg) / concentration	Sex and No. per group	Noteworthy Findings	Location in CTD [Report No.]
Retinal pigment epithelial cells (ARPE19 cell line)	*In vitro*	Incubation for 0.5, 24 or 48h, performed in quadruplicates	0.39 – 50 µg/mL	NA	Cell viability was affected in proliferating cells when incubated with risdiplam for 24 h and in non-proliferating cells for 168 h. Impaired lysosomal function with a bell shaped dose-response curve (between 1.56–12.5 µg/mL) and a maximum response at around 3.13 µg/mL to a similar extent after 24 h and 48 h. The increase was comparable to chloroquine, a drug which is known to cause lysosomal dysfunction in the RPE and retina. The structural analogues, RO6889953 and RO6893915 also increased lysosomal mass starting at 24h after treatment. Dose-dependent accumulation of autophagosomes at 48 h of treatment at 3.12-25.0 µg/mL. At a concentration of 25 µg/mL, the level of accumulated autophagosomes was comparable to chloroquine, a known inhibitor of autophagic flux leading to an accumulation of autophagosomes. The structural analogue RO6893915 induced accumulation autophagosomes 48 h after treatment at 25 and 50 µg/mL, but not RO6889953. No effect on phagocytosis/oxidative stress. The effects are considered likely due to physicochemical properties of risdiplam as pharmacologically inactive compounds with physicochemical properties comparable to risdiplam are triggering to some extent similar phenotypes in RPE cells *in vitro*.	4.2.3.7.3-1 [1066986]

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

2.6.7.17.2 ヒト/カニクイザル iPS 細胞への影響

表 2.6.7.17.2-1 ヒト/カニクイザル iPS 細胞への影響

Test Article: Risdiplam

Test system or Species/Strain	Method of Administration	Treatment Duration	Dose (mg/kg) / concentration	Sex and No. per group	Noteworthy Findings	Location in CTD [Report No.]
Monkey and human induced pluripotent stem cells (Nutley, clone 8 and IMI-Neo, clone 1)	*In vitro*	Incubation for 24 h	0.64 –10000 nM	NA	**Effect on cell cycle of iPSCs:** Concentration-dependent increase in G2 and S arrest in monkey iPSCs and human iPSCs, respectively. **FoxM1 regulation:** Concentration dependent down-regulation of FoxM1: IC_{50}=155 nM in monkey iPSCs and 114 nM in human iPSCs.	4.2.3.7.3-2 [1067264]

iPSCs=induced pluripotent stem cells; for standard abbreviations, see List of Abbreviations.

2.6.7.17.3 マウス線維芽細胞株を用いた *in vitro* 光毒性試験

表 2.6.7.17.3-1 マウス線維芽細胞株を用いた *in vitro* 光毒性試験

Test Article: Risdiplam

Test system or Species/Strain	Method of Administration	Treatment Duration	Dose (mg/kg) / concentration	Sex and No. per group	Noteworthy Findings	Location in CTD [Report No.]
Balb/c 3T3 mouse fibroblasts	*In vitro*	1h Incubation with test item prior to irradiation (UV-A, 5 J/cm^2)	0.004 – 9 µg/mL	NA	Risdiplam was tested to be non-phototoxic up to its maximum solubility of 9 µg/mL. IC_{50} for UVA irradiated cells was 3.56 µg/mL. IC_{50} for UVA non-irradiated cells was >9 µg/mL. The resulting −UVA/+UVA discrimination factor for phototoxicity was approx. 2.5.	4.2.3.7.7-1 [1063018]

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

2.6.7.17.4 マウス皮膚感作性試験

表 2.6.7.17.4-1 マウス皮膚感作性試験

Test Article: Risdiplam

Species/Strain	Method of Administration	Sex/ No./ per group	Dose (mg/kg)[a]	Dose Volume[b] (mg/kg/day)	Noteworthy Findings	Location in CTD [Report No.]
Mouse/ CBA/J (Local lymph node assay)	Dermal (ear) daily for 3 days	F/5/ group	0 1.7 5 8.4	25 µL/ear	There was no evidence for skin irritation or sensitization (without and with oral or dermal challenge) of the clinical formulation. There were no signs of irritation visible on the ears and there were no relevant changes in ear weights or in the draining lymph nodes adjacent to the ears (size, weights and proliferation) in any of the dosed groups, compared to controls.	4.2.3.7.7-2 [1087553]
	Dermal (ear) daily for 3 days, followed by oral gavage on day 5	F/9/ group	0 / 3 8.4 / 3	25 µL/ear and 4 mL/kg orally		
	Oral gavage for 3 days, followed by dermal (ear) application on day 5	F/9	3 / 8.4	4 mL/kg orally and 25 µL/ear		

Toxicokinetics on day 3 of administration

Dose (mg/kg/day)	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	$AUC_{0\text{-last}}$ (ng·h/mL)
Risdiplam:			
8.4 (dermal)	397	3	3550
3 (oral)	339	1	2650
Metabolite M1 (RO7112063):			
8.4 (dermal)	69.9	3	589
3 (oral)	63.4	1	293

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

a Dermal dose levels correlate to 0, 1-, 3- and 5-fold of the intended clinical dose. The oral dose correlated to the intended clinical dose.

b Application of dried clinical solution in vehicle (Elix water) and 1% pluronic L92 was added as penetration enhancer.