目次

2.6.6.1　まとめ 3
2.6.6.2　単回投与毒性試験....5
2.6.6.3　反復投与毒性試験（トキシコキネティクスの評価を含む） 5
2.6.6.3.1　ラット 3 日間反復投与毒性試験（試験番号：1845/013） 5
2.6.6.3.2　イヌ用量漸増忍容性試験（試験番号：PR001-NCL-TX001） 7
2.6.6.3.3　イヌ 14 日間反復投与毒性試験（試験番号：PR001-NCL-TX002） 10
2.6.6.4　遺伝毒性試験....15
2.6.6.5　がん原性試験....16
2.6.6.6　生殖発生毒性試験....16
2.6.6.7　局所刺激性試験....16
2.6.6.8　その他の毒性試験....16
2.6.6.8.1　免疫原性試験....16
2.6.6.9　考察及び結論....17
2.6.6.10　図表 21
2.6.6.11　参考文献 22

略語等一覧

略語	英語	日本語
5-MeTHF	5-Methyltetrahydrofolic acid	5-メチルテトラヒドロ葉酸
ALP	Alkaline phosphatase	アルカリフォスファターゼ
ALT	Alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST	Aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC_{X-Y}	Area under the concentration-time curve from X to Y	投与 X 時間から Y 時間までの血中濃度－時間曲線下面積
BLQ	Below the limit of quantification	定量下限値未満
C_{max}	Maximum concentration	最高血中濃度
CPG2	Carboxypeptidase G2	カルボキシペプチダーゼ G2
DNA	Deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着法
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
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
HD-MTX	High Dose Methotrexate	大量メトトレキサート
ICH	International Conference for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
IgG	Immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IgM	Immunoglobulin M	免疫グロブリン M
LV	Leucovorin	ロイコボリン
MTD	Maximum Tolerated Dose	最大耐量
MTX	Methotrexate	メトトレキサート
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level	無毒性量
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development	経済協力開発機構
PGA	Pteroylmonoglutamic acid	プテロイルモノグルタミン酸
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
$t_{1/2}$	Time to half-life	半減期
t_{max}	Time of maximum observed concentration	最高血中濃度到達時間

2.6.6.1　まとめ

グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）（以下，「被験物質」）は，葉酸アナログであるメトトレキサート（MTX）を加水分解する作用を有し，大量メトトレキサート（HD-MTX）療法に伴って MTX 排泄遅延が生じて MTX 中毒となった患者に使用する解毒剤として単回静脈内投与を意図している．被験物質のヒトにおける静脈内投与による安全性を評価するために反復投与毒性試験を実施した．毒性試験の一覧を表 2.6.6.1-1 に示した．

表 2.6.6.1-1　毒性試験一覧

試験の種類及び期間	投与経路	動物種	GLP 適用	試験番号
3 日間＋10 日間（回復）	静脈内	ラット	適用	1845/013 （添付資料番号：4.2.3.2-1）
25 日間（漸増投与）	静脈内	イヌ	非適用	PR001-NCL-TX001 （添付資料番号：4.2.3.2-2）
14 日間	静脈内	イヌ	適用	PR001-NCL-TX002 （添付資料番号：4.2.3.2-3）

毒性試験に使用した動物種は Crl:WI（GLX／BRL／Han）IGSB ラット（以下，「ラット」）及びビーグル犬（以下，「イヌ」）の 2 種類を選択した．選択理由は，ラットはげっ歯類として，イヌは非げっ歯類として一般的に選択されるためである．被験物質の毒性試験として，ラット 3 日間反復投与毒性試験（試験番号：1845/013），イヌ用量漸増忍容性試験（試験番号：PR001-NCL-TX001）及びイヌ 14 日間反復投与毒性試験（試験番号：PR001-NCL-TX002）を実施した．なお，イヌ用量漸増忍容性試験及びイヌ 14 日間反復投与毒性試験は「ICH S6（R1）バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」（平成 24 年 3 月 23 日付け薬食審査発 0323 第 1 号）（以下，「医薬品規制調和国際会議（ICH）S6 ガイドライン」）に基づき短期投与であっても 2 週間までの反復投与毒性試験を実施することが適当と考えられるため実施した．被験物質の投与経路は，臨床予定経路である静脈内投与を採用した．ラット 3 日間反復投与毒性試験の低投与量は臨床予定用量である 50 U/kg/日，高投与量は臨床予定用量の 100 倍である 5,000 U/kg/日を設定した．イヌ 14 日間反復投与毒性試験の低投与量は 50 U/kg/日，中投与量及び高投与量はイヌ用量漸増忍容性試験成績を基に，500 及び 2,500 U/kg/日「最大耐量（MTD）」に設定した．

ラット 3 日間反復投与毒性試験は United Kingdom Statutory Instrument 1999 No.3106 及び経済協力開発機構（OECD）並びにイヌ 14 日間反復投与毒性試験は米国食品医薬品局（FDA）及び OECD の医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準じて実施した．局所刺激性はラット 3 日間反復投与毒性試験及びイヌ 14 日間反復投与毒性試験内で評価した．加えて，免疫原性はイヌ用量漸増忍容性試験及びイヌ 14 日間反復投与毒性試験内で評価した．単回投与毒性試験は実施していないが，ラット 3 日間反復投与毒性試験及びイヌ 14 日間反復投与毒性試験の初回投与「ラットでは最大 5,000 U/kg/日，イヌでは最大

2,500 U/kg/日（MTD）」から急性毒性を評価した．遺伝毒性試験は，被験物質が組換えタンパク質であり，デオキシリボ核酸（DNA），あるいは他の染色体物質と直接反応する可能性が極めて低いことから，ICH S6 ガイドラインに従い，実施しなかった．また，被験物質はMTX による毒性発現に対する救済処置として短期間(単回)投与することを想定しており，慢性的に使用される薬剤でないこと，加えて，上述したように遺伝毒性の懸念がないことから，「ICH-S1A 医薬品におけるがん原性試験の必要性に関するガイダンス」（平成 9 年 4 月 14 日付け薬食審査発第 315 号）を考慮し，がん原性試験は実施しなかった．また，生殖発生毒性試験は後述する理由（2.6.6.6 参照）により実施しなかった．

ラット 3 日間反復投与毒性試験は，50 U/kg/日及び 5,000 U/kg/日の被験物質を 3 日間連続して静脈内投与した後に，10 日間の回復期間を設けた．その結果，体重増加量の抑制傾向が投与 4 日目（投与初日を 1 日目とする）に認められたのみであり，忍容性は良好であると考えられた. 50 U/kg/日及び 5,000 U/kg/日のトキシコキネティクス(TK)成績を比較すると，被験物質の血漿中濃度は用量比を上回って増加していた．ラット 3 日間反復投与毒性試験における無毒性量（NOAEL）は 5,000 U/kg/日であると考えられた．

イヌ用量漸増忍容性試験は 50，500，1,000，2,500，3,750（雌のみ）又は 5,000 U/kg/日（雄のみ）の被験物質を間歇的「投与 1（投与初日），3，5，7，16（雄のみ）又は 23 日目（雌のみ）」に漸増静脈内投与した．その結果，3,750 U/kg/日投与において雌が瀕死したため，MTD は 2,500 U/kg/日と考えられた．

イヌ 14 日間反復投与毒性試験は，イヌ用量漸増忍容性試験に基づき 50，500，2,500 U/kg/日の被験物質を間歇的「投与 1（投与初日），3，5，7，9，11（雌の 500 及び 2,500 U/kg/日を除く），13 日目（雄の 500 及び 2,500 U/kg/日を除く）」に静脈内投与した．その結果，500 U/kg/日及び 2,500 U/kg/日群で死亡及び瀕死状態が認められた．これらの動物では，肛門部位からの赤い分泌物，運動失調，虚脱，軟便，嘔吐，赤色化（耳又は全身），努力性呼吸，過剰な流涎といった一般状態の変化が認められた．しかし，死亡の原因は特定できなかった．50 U/kg/日以上の投与で血小板数減少が認められたが，50 U/kg/日ではその程度は小さく，毒性学的な影響はないと考えられた．局所刺激性を投与部位の病理組織学的検査により検討を行ったところ，被験物質に関連した影響は認められず，局所の忍容性は良好であった．抗グルカルピダーゼ抗体の測定結果から被験物質を投与した全動物で投与 15 日までに抗グルカルピダーゼ抗体「免疫グロブリン G（IgG）及び免疫グロブリン M（IgM）」が陽性となり，イヌで免疫原性が認められた．イヌ 14 日間反復投与毒性試験における NOAEL は 50 U/kg/日であると考えられた．

ラット 3 日間反復投与毒性試験から，NOAEL は 5,000 U/kg/日と考えられ，その時の平均血漿中濃度は 139.5 U/mL であった．一方，臨床予定用量 50 U/kg/日投与時のヒトにおける最高血中濃度（C_{max}）は，腎機能が正常な被験者及び重度の腎機能障害を有する被験者対象の PR001-CLN-005 試験の血清中 C_{max} が，それぞれ 1.44 U/mL「酵素－基質分光法による値，酵素結合免疫吸着法（ELISA）では 1.35 U/mL」及び 1.21 U/mL（酵素－基質分光法による値，ELISA では 1.25 U/mL）であった．また，健康成人対象の PR001-CLN-010 試験の血清中

C_{max} は 1.31 U/mL（ELISA による値），国内第 I 相試験の血漿中 C_{max} は 1.20 U/mL（ELISA による値）であった．以上から，ラット 3 日間反復投与毒性試験では，ヒトの C_{max} の 100 倍程度の平均血漿中濃度で，投与の影響（雄の体重増加量の抑制傾向を除く）は観察されなかった．なお，ラット 3 日間反復投与毒性試験において，50 U/kg/日投与した際の平均血漿中濃度は 0.5 U/mL であった．

また，イヌ 14 日間反復投与毒性試験から，NOAEL は 50 U/kg/日と考えられ，その時の血漿中における投与 1 日目の C_{max} は 0.855～0.910 U/mL であった．この C_{max} の値は，臨床予定用量 50 U/kg/日投与時のヒトにおける C_{max} よりやや下回っていた．

2.6.6.2　単回投与毒性試験

被験物質に関する単回投与毒性試験は実施していないが，ラット 3 日間反復投与毒性試験及びイヌ 14 日間反復投与毒性試験の初回投与「ラットでは最大 5,000 U/kg/日，イヌでは最大 2,500 U/kg/日（MTD）」から評価した．被験物質初回投与後から次回投与までにおいて，ラット及びイヌ共に死亡例は認められなかった．

以上から，概略の致死量はラットで 5,000 U/kg/日超，イヌで 2,500 U/kg/日超と考えられた．

2.6.6.3　反復投与毒性試験（トキシコキネティクスの評価を含む）

2.6.6.3.1　ラット 3 日間反復投与毒性試験（試験番号：1845/013）

（添付資料：4.2.3.2-1）

本試験の目的は，ラットに被験物質を 3 日間連続して静脈内投与し，毒性を明らかにすること及び認められた変化について 10 日間の回復期間における回復性を評価することであった．

約 53 日齢の雌雄のラットを，表 2.6.6.3.1-1 のように割り付けた．低投与量を臨床予定用量である 50 U/kg/日，高投与量を臨床予定用量の 100 倍である 5,000 U/kg/日に設定した．対照群には被験物質の代わりに生理食塩液（0.9% NaCl）を投与した．被験物質を側方尾静脈に 3 mL/分の速度で 1 日 1 回，3 日間連続して投与し，その後 10 日間の回復期間を設けて回復性を観察した．なお，投与容量は体重を基に 5 mL/kg とした．観察及び検査項目は，死亡又は瀕死，一般状態，体重，摂餌量，血液学的検査，血液生化学的検査，器官重量，肉眼的観察，病理組織学的検査及び TK 分析とした．主試験及び回復期間を設けた動物は，それぞれ投与 4 日目（投与初日を 1 日目とする）及び 14 日目（回復期間終了翌日）に剖検した．また，TK 分析は，各投与量のサテライト動物から，投与 1 日目の投与後 10 分に採取した標本（血漿）を用いた．

表 2.6.6.3.1-1　ラット 3 日間反復投与毒性試験の試験デザイン

用量（U/kg/日）	投与速度（mL/分）	投与容量（mL/kg）	動物数（雌雄各）		
			主試験	回復	サテライト*
0	3	5	10	5	10
50			10	NA	10
5,000			10	5	10

NA：実施なし

＊：TK 評価のみ

引用元：4.2.3.2-1（1845/013）の ABSTRACT の Table から一部改変

本試験で死亡例は認められなかった．一般状態の変化は観察されず，被験物質投与後の影響は認められなかった．体重は，対照群と比較して投与 4 日目の 50 U/kg/日及び 5,000 U/kg/日の雄にのみ体重増加量の抑制傾向が認められた．しかし，摂餌量に変化がなかったことなどから原因は究明できなかった．摂餌量，血液学的検査，血液生化学的検査及び器官重量では，被験物質に関連した影響は認められなかった．肉眼的観察及び病理組織学的検査では，投与 4 日目及び 14 日目において，被験物質による局所又は全身性の所見は認められなかった．大半の器官及び組織に特記すべき所見はなく，おおむねこの系統と日齢の動物に認められる通常の所見と一致していた．また，投与部位に認められた病理組織学的所見は，対照群との間に炎症反応の差が認められず，静脈穿刺の影響と一致していた．投与 1 日目の投与後 10 分の採取標本（血漿）について行った TK 分析の結果を，表 2.6.6.3.1-2 に示した．対照群における被験物質の濃度は検出限界未満であった．50 U/kg/日投与群の平均血漿中濃度は 0.5 U/mL であり，5,000 U/kg/日投与群では 139.5 U/mL であった．この 2 つのデータを比較すると，用量が 100 倍になると平均血漿中濃度が約 279 倍であり，投与 10 分後の採取時点では被験物質の平均血漿中濃度は用量比を上回る増加を示した．

表 2.6.6.3.1-2　TK 成績（被験物質投与後 10 分の平均血漿中濃度）

用量（U/kg/日）	動物数（雌雄各）	平均血漿中濃度±標準偏差（雌雄，U/mL）
0	5	LOD 未満
50	5	0.5±0.052
5,000	5	139.5±17.7

LOD 未満：検出限界未満

引用元：4.2.3.2-1（1845/013）の INTERPRETATION の Toxicokinetics 及び Appendix 2 の Table 2 を改変

本試験の結論としては，50 U/kg/日及び 5,000 U/kg/日の被験物質をラットに 3 日間連続して静脈内投与した際の忍容性は良好であった．一般状態，摂餌量，血液学的検査，血液生化学的検査，器官重量，肉眼的観察及び病理組織学的検査の所見について，被験物質に関連し

た影響は認められなかった．50 U/kg/日及び 5,000 U/kg/日の雄にのみ体重増加量の抑制傾向が認められたが, 摂餌量に変化がなかったことから原因は究明できなかった. TK 分析では，投与 1 日目の投与後 10 分における，被験物質の平均血漿中濃度は用量比を上回る増加を示していた．局所刺激性は対照群と同様であり，差は認められなかった．

以上より，ラットに 50 U/kg/日及び 5,000 U/kg/日の被験物質を 3 日間連続して静脈内投与したとき，被験物質による毒性学的な影響は認められなかった．したがって，本試験の NOAEL は 5,000 U/kg/日と考えられた．

2.6.6.3.2　イヌ用量漸増忍容性試験（試験番号：PR001-NCL-TX001）

（添付資料：4.2.3.2-2）

本試験の目的は，イヌに被験物質を間歇的に 25 日間，漸増静脈内投与した際の毒性を評価すること及び MTD を求め，イヌ 14 日間反復投与毒性試験の用量を設定することであった．

少なくとも 6 ヵ月齢の雌雄のイヌ（雄 1 例，雌 1 例）を，表 2.6.6.3.2-1 のように割り付けた．合計 5 段階の用量を設け，50（1 回目投与），500（2 回目投与），1,000（3 回目投与），2,500（4 回目投与），3,750（5 回目投与，雌のみ）又は 5,000 U/kg/日（5 回目投与，雄のみ）と設定した．被験物質を投与濃度 941 U/mL で投与 1（投与初日），3，5，7，16（雄のみ）又は 23 日目（雌のみ）に 1 日 1 回，漸増静脈内投与した．なお，投与容量は投与量ごとに体重を基に決定した．観察及び検査項目は，死亡又は瀕死，一般状態，体重，摂餌量，血液学的検査，血液生化学的検査及び抗グルカルピダーゼ抗体分析とした．なお，血液学的検査及び血液生化学的検査は，投与 16，17（雄のみ）及び 23 日目（雌のみ）に実施した．イヌの血清中抗グルカルピダーゼ抗体は，標識したプロテイン A を二次検出薬として用いた ELISA によって行った．プロテイン A は IgG と IgM を両方検出できるが，この分析法では識別しなかった．カットオフ吸光度は 0.37 AU と設定し，これを超える標本を陽性，それ以下を陰性と判定した．標本は，投与 9（雌雄両方），17（雄のみ），23 日目（雌のみ）に採取した．

表 2.6.6.3.2-1　イヌ用量漸増忍容性試験の試験デザイン

投与日	1	3	5	7	16	23
雄 1 例「用量（U/kg/日）」	50*1	500*2	1,000*3	2,500*4	5,000*5	NA
雌 1 例「用量（U/kg/日）」					NA	3,750*6

NA：実施なし

＊1：投与濃度 941 U/mL，投与容量（四捨五入）0.05 mL/kg

＊2：投与濃度 941 U/mL，投与容量（四捨五入）0.53 mL/kg

＊3：投与濃度 941 U/mL，投与容量（四捨五入）1.1 mL/kg

＊4：投与濃度 941 U/mL，投与容量（四捨五入）2.6 mL/kg

＊5：投与濃度 941 U/mL，投与容量（四捨五入）5.3 mL/kg

＊6：投与濃度 941 U/mL，投与容量（四捨五入）4.0 mL/kg

引用元：4.2.3.2-2（PR001-NCL-TX001）の STUDY ABSTRACT の Table から一部改変

本試験において，投与 23 日目に 3,750 U/kg/日投与（5 回目投与）を行った雌が，投与後約 6 時間で瀕死となったため安楽死させた．一般状態は，雌雄共に 50（1 回目投与），500（2 回目投与），1,000（3 回目投与），2,500 U/kg/日（4 回目投与）投与後には異常が認められなかったが，雌雄共に 5 回目投与後に変化が認められた．5,000 U/kg/日投与（5 回目投与）を行った雄では，投与後 15 分以内に虚脱，自発運動の低下，軟便，赤色化（耳），努力性呼吸，眼の充血，投与後約 1 時間に嘔吐及び流涎増加が認められた．また，投与後 4 時間では，自発運動の低下のみ認められたが，投与後 12 時間には正常に回復した．一方，3,750 U/kg/日投与（5 回目投与）を行った雌では，投与後 15 分に虚脱，嘔吐，赤色化（全身），努力性呼吸，過剰な流涎，投与後 4 時間に軟便，過剰な流涎が認められた．その後，投与後約 6 時間で瀕死となったため安楽死させた．体重及び摂餌量では，被験物質に関連した影響は認められなかった．血液学的検査は，5,000 U/kg/日投与の雄で血液学的パラメータの変化は認められなかった．一方，投与前（投与 23 日目）と比較して，3,750 U/kg/日投与の雌では赤血球，ヘモグロビン及びヘマトクリットで試験施設における背景データを超えた増加が認められた．好中球数も増加傾向にあったが，背景データの範囲内であった．血液生化学的検査は，投与前（投与 16 日目）と比較して，5,000 U/kg/日投与の雄でアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）の背景データを超えた増加及びアルカリフォスファターゼ（ALP）の増加傾向が認められた．一方，投与前（投与 23 日目）と比較して，3,750 U/kg/日投与の雌では総タンパク，アルブミン，ALT，アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST），ALP，γ-グルタミルトランスフェラーゼ及びトリグリセリドの背景データを超えた増加が認められた（表 2.6.6.3.2-2 参照）．抗グルカルピダーゼ抗体分析は，5 回目投与後にあたる投与 17 日目（雄のみ）及び投与 23 日目（雌のみ）から採取した標本で，抗グルカルピダーゼ抗体陽性が認められた（表 2.6.6.3.2-3 参照）．

表 2.6.6.3.2-2　血液学的及び血液生化学的検査

検査項目		雄			雌			
		施設データ*	投与 16 日目（5,000 U/kg/日投与）	投与 17 日目	施設データ*	投与 16 日目（投与せず）	投与 23 日目（3,750 U/kg/日投与）	
			投与前	投与後 24 時間			投与前	投与後 6 時間
血液学的検査	赤血球（10^6/μL）	5.44～7.45	6.84	5.93	5.75～7.89	7.81	6.69	10.64
	ヘモグロビン（g/dL）	13.30～17.29	15.9	13.5	13.96～18.29	17.3	14.6	24.1
	ヘマトクリット（%）	38.71～51.99	49.3	41.5	41.25～55.32	52.9	44.4	73.4
	好中球（10^3/μL）	3.21～11.90	5.62	8.91	3.02～12.56	5.04	7.38	12.02
血液生化学的検査	総タンパク（g/dL）	4.95～6.25	5.4	5.2	4.89～6.10	5.9	5.5	7.0
	アルブミン（g/dL）	2.97～3.97	3.4	3.3	3.07～3.86	3.7	3.7	4.2
	アラニンアミノトランスフェラーゼ（U/L）	17.31～51.13	32	231	17.71～51.11	28	38	1,574
	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（U/L）	16.57～65.44	30	39	23.65～56.89	26	39	1,150
	アルカリフォスファターゼ（U/L）	41.26～202.42	107	158	49.01～169.20	93	87	177
	γ-グルタミルトランスフェラーゼ（U/L）	1.40～6.38	3	3	0.94～5.96	3	2	12
	トリグリセリド（mg/dL）	11.48～51.19	27	33	10.85～48.41	31	26	108

＊：試験施設における背景データ「5～8 ヵ月齢の雌雄（雄の例数：110 例，雌の例数：105 例）」

引用元：4.2.3.2-2（PR001-NCL-TX001）の APPENDIX 7，8，9 の Table から改変

表 2.6.6.3.2-3　イヌの血清中抗グルカルピダーゼ抗体分析

性別	標本採取時点（投与日）	吸光度測定値（AU）	抗グルカルピダーゼ抗体の有無
雄	9	0.195	陰性
	17	1.306	陽性
雌	9	0.151	陰性
	23	1.231	陽性

引用元：4.2.3.2-2（PR001-NCL-TX001）の APPENDIX 6 の Table 6 から一部改変

本試験の結論としては，雌雄共に 50，500，1,000 及び 2,500 U/kg/日を漸増静脈内投与した際に，一般状態に異常が認められなかったことから，忍容性は良好であった．しかし，3,750 U/kg/日（5 回目投与，雌のみ）及び 5,000 U/kg/日（5 回目投与，雄のみ）投与後，虚脱，自発運動の低下，軟便，嘔吐，赤色化，努力性呼吸，過剰な流涎又は流涎増加などが認められた．同様に，血液学的及び血液生化学的パラメータの変化も認められた．一方，全投与群で，体重及び摂餌量には被験物質に関連した影響は認められなかった．なお，免疫原性の評価結果により，雌雄共に 5 回目投与後に，抗グルカルピダーゼ抗体の存在が確認された．

以上より，イヌに被験物質を間歇的に 25 日間，漸増静脈内投与した際の MTD は 2,500 U/kg/日と考えられた．

2.6.6.3.3 イヌ 14 日間反復投与毒性試験（試験番号：PR001-NCL-TX002）

（添付資料：4.2.3.2-3）

本試験の目的はイヌに被験物質を間歇的に 14 日間，静脈内投与し，その毒性を用量（毒性量及び無毒性量を含む）及び時間と関連づけて評価することであった．

少なくとも 4 ヵ月齢の雌雄のイヌを，表 2.6.6.3.3-1 のように割り付けた．低投与量を臨床予定用量である 50 U/kg/日，中投与量及び高投与量はイヌ用量漸増忍容性試験結果から，500 及び 2,500 U/kg/日に設定した．対照群には被験物質の代わりに生理食塩液（0.9% NaCl）を投与した．被験物質を投与濃度 941 U/mL で，投与 1（投与初日），3，5，7，9，11（雌の 500 及び 2,500 U/kg/日を除く）並びに 13 日目（雄の 500 及び 2,500 U/kg/日を除く）に 1 日 1 回，静脈内投与した．なお，投与容量は投与量ごとに体重を基に決定した．観察及び検査項目は，死亡又は瀕死，一般状態，体重，摂餌量，体温，身体検査，眼科学的検査，心電図検査，血液学的検査，血液生化学的検査，尿検査，器官重量，肉眼的観察，病理組織学的検査，TK 分析及び抗グルカルピダーゼ抗体分析とした．試験終了まで生存した動物は投与 15 日目で，試験中に死亡又は瀕死した動物はその時点で剖検した．抗グルカルピダーゼ抗体分析はイヌ用量漸増忍容性試験と同様に，標識したプロテイン A を二次検出薬として用いた ELISA によって行った．プロテイン A は IgG と IgM を両方検出できるが，この分析法では識別しなかった．カットオフ吸光度は 0.305 AU と設定し，これを超える標本を陽性，それ以下を陰性と判定した．

試験期間中の標本採取及び測定日程を表 2.6.6.3.3-2 に示した．心電図検査は投与開始前及び投与 13 日目に測定した．TK 分析は投与 1 日目及び投与 13 日目の被験物質投与前，投与後 5 分，15 分，30 分，45 分，1，2，4，8，12，24 及び 48 時間に測定した．ただし，心電図検査及び TK 分析において，500 及び 2,500 U/kg/日の雄は被験物質を投与したのが投与 11 日目だったため測定しなかった．血液学的検査及び血液生化学的検査については，投与開始前，投与 12 日目及び 14 日目（雌のみ）に実施した．抗グルカルピダーゼ抗体分析は投与 1（投与直前），8 及び 15 日目に実施した．

本試験において，TK 分析は標本（血漿）中の被験物質濃度の測定を[redacted]（以下，「[redacted]」）で，測定値の解析を[redacted]（以下，「[redacted]」）で実施した．なお，TK 分析は United Kingdom Statutory Instrument 1999 No.3106 及び OECD の GLP に準じて実施した．抗グルカルピダーゼ抗体分析は[redacted]で実施した．

表 2.6.6.3.3-1　イヌ 14 日間反復投与毒性試験の試験デザイン

用量（U/kg/日）	投与濃度（U/mL）	投与容量*（mL/kg）	動物数	
			雄	雌
0	0	2.7	3	3
50	941	0.05	3	3
500	941	0.53	3	3
2,500	941	2.7	3	3

＊：投与容量は四捨五入している．

引用元：4.2.3.2-3（PR001-NCL-TX002）の STUDY ABSTRACT の Table から一部改変

表 2.6.6.3.3-2　試験期間中の標本採取及び測定日程

観察及び検査項目	投与開始前	投与 1 日目	投与 8 日目	投与 12 日目	投与 13 日目	投与 14 日目	投与 15 日目
心電図検査	雄 雌	—	—	—	雄*1 雌	—	—
血液学的検査*2	雄 雌	—	—	雄 雌	—	雌*3	—
血液生化学的検査*2	雄 雌	—	—	雄 雌	—	雌*3	—
トキシコキネティクス分析	—	雄 雌	—	—	雄*1 雌	—	—
抗グルカルピダーゼ抗体分析*4	—	雄 雌	雄 雌	—	—	—	雄 雌

－：該当事項なし

＊1：対照群及び 50 U/kg/日のみ測定した．

＊2：上記の日程に加えて，投与 11 日目の瀕死動物 2 例（雄のみ）から，標本を採取した．

＊3：2,500 U/kg/日のみ測定した．

＊4：上記の日程に加えて，投与 11 日目の 2 例（雄）及び投与 13 日目の 4 例（雌）の瀕死動物から標本を採取した．

引用元：4.2.3.2-3（PR001-NCL-TX002）の MATERIALS AND METHODS から改変

本試験では 500 及び 2,500 U/kg/日において，試験中に 7 例の死亡又は瀕死が認められた．詳細を表 2.6.6.3.3-3 に示した．雄では投与 11 日目（6 回目投与）に死亡が 2,500 U/kg/日で 1 例，瀕死が 500 U/kg/日で 1 例及び 2,500 U/kg/日で 1 例認められた．雌では投与 13 日目（6 回目投与）に瀕死が 500 U/kg/日で 3 例及び 2,500 U/kg/日で 1 例に認められた．これらの死亡又は瀕死動物は被験物質に関連したものと考えられた．

表 2.6.6.3.3-3　6 回目投与後の死亡又は瀕死の概要

用量（U/kg/日）	性別	動物数	投与日	発見時の状態
500	雄	1	11	瀕死
	雌	3	13	瀕死
2,500	雄	1	11	死亡
		1		瀕死
	雌	1	13	瀕死

引用元：4.2.3.2-3（PR001-NCL-TX002）の RESULTS の Table 1 から一部改変

一般状態は，投与群及び対照群で投与期間を通じて赤色化（耳，腹部又は全身）が認められたが，2,500 U/kg/日で発現頻度が高かった．2,500 U/kg/日の雄 1 例で投与 9 日目（5 回目投与）の投与後約 15 分に運動失調及び努力性呼吸が認められた．一方，2,500 U/kg/日の雌 2 例では投与 3 日目（2 回目投与）及び投与 5 日目（3 回目投与）に軟便又は水様便が認められた．死亡又は瀕死動物 7 例の直前に認められていた一般状態の変化としては，赤色化（耳又は全身），軟便，肛門部位からの赤い分泌物，運動失調，虚脱，嘔吐，努力性呼吸，流涎増加又は過剰な流涎などがあった．死亡又は瀕死動物の一般状態の変化は雄では投与 11 日目，雌では投与 13 日目（6 回目投与）の投与後 15 分から認められた．これらの所見は被験物質に関連するものと考えられた．なお，2,500 U/kg/日の雄 1 例で投与 3 日目（2 回目投与）の投与後 15 分，1，2 及び 4 時間に眼の充血が認められた．しかし，他の用量では認められなかったことから，被験物質に関連した変化ではないと考えられた．

体重，摂餌量，体温，身体検査，眼科学的検査，尿検査及び器官重量では，いずれの投与群でも被験物質に関連した影響は認められなかった．

心電図検査は，投与 13 日目の 50 U/kg/日（7 回目投与）の雌雄では QT 間隔又は QTcF 間隔に対する対照群との有意な差は認められず，被験物質に関連した影響は認められなかった．同様に，2,500 U/kg/日（6 回目投与）の雌 2 例でも投与開始前と比較して，被験物質に関連した影響は認められなかった．なお，投与 13 日目の 500 及び 2,500 U/kg/日の雄は被験物質を投与したのが投与 11 日目だったため測定しなかった．

血液学的検査は，対照群と比較して，投与 12 日目の 50 U/kg/日（6 回目投与の翌日）の雄で血小板に有意な減少が認められた．しかし，その程度は小さく，毒性学的な影響はないと考えられた．また，500 及び 2,500 U/kg/日（6 回目投与の翌日）の雄でも血小板の減少が認められた．投与開始前と比較して投与 14 日目の 2,500 U/kg/日（6 回目投与の翌日）の雌で

は，血小板及びリンパ球の減少が認められた．投与 11 日目に瀕死となった 500 及び 2,500 U/kg/日（6 回目投与）の雄 2 例では，投与開始前と比較してヘモグロビン及びヘマトクリットの増加並びに血小板及び好中球の減少が認められた．これらの所見は被験物質に関連するものと考えられた．一方，投与 12 日目の 500 及び 2,500 U/kg/日（5 回目投与の 3 日後）の雌では変化は認められなかった．なお，500 及び 2,500 U/kg/日の雌は投与 11 日目に被験物質の投与を行わなかった．

血液生化学的検査は，対照群と比較して，投与 12 日目の 500 U/kg/日（6 回目投与の翌日）の雄でトリグリセリドの軽度な増加が認められた．その中の 1 例で ALT，AST 及び ALP の著しい増加が認められた．2,500 U/kg/日（6 回目投与の翌日）の雄では，トリグリセリドの軽度な増加及び ALT の増加が認められた．また，投与開始前と比較して投与 14 日目の 2,500 U/kg/日（6 回目投与の翌日）の雌で，ALT の増加が認められた．その中の 1 例では AST の増加も認められた．これらの変化は被験物質に関連するものと考えられた．投与 11 日目に瀕死となった 500 及び 2,500 U/kg/日（6 回目投与）の雄 2 例では，投与開始前と比較して総ビリルビン，尿素窒素，クレアチニン，ALT，AST，ALP，γ-グルタミルトランスフェラーゼ及びトリグリセリドの増加が認められた．また，これらの変化は被験物質に関連するものあるいは一般状態の悪化によると考えられた．一方，投与 12 日目の 50 U/kg/日（6 回目投与の翌日）では，被験物質に関連した変化は認められなかった．加えて，投与 12 日目の 500 及び 2,500 U/kg/日（5 回目投与の 3 日後）の雌でも変化は認められなかった．なお，500 及び 2,500 U/kg/日の雌は投与 11 日目に被験物質の投与を行わなかった．

肉眼的観察は，所見の大半が死亡又は瀕死動物例で認められた．最も高頻度に認められた所見は，耳，肺，胆嚢及び投与部位の変色並びに消化管粘膜の赤色化であった．これらの所見は被験物質に関連したものと考えられた．なお，試験終了まで生存した 500 U/kg/日の雄 1 例で，肝臓の変色が認められた．

病理組織学的検査は，対照群と被験物質投与群の間で投与部位の出血又は炎症の程度に顕著な差は認められなかった．投与部位以外の所見に関しては，試験終了まで生存した動物に被験物質に関連した所見は認められなかった．なお，血液生化学的検査で ALT，AST 及び ALP の著しい増加が認められた 500 U/kg/日の雄 1 例では，肝臓に軽度の慢性炎症及び軽微な鉱質沈着が認められた．また，ALT 及び AST の増加が認められた 2,500 U/kg/日の雌 1 例では，肝臓に軽微の単核細胞浸潤が認められたが，この所見は対照群の雄 1 例でも同様に認められた．しかし，試験終了まで生存した動物の何例かに認められた胆嚢漿膜下の軽度な出血に関しては，投与との関連は不明であった．一方，死亡又は瀕死した動物で最も多く認められた所見は，様々な部位のうっ血又は出血であり，具体的には消化管，肺，胆嚢，最終投与を行った投与部位で認められた．出血のいずれも血球崩壊色素を伴っていなかったことから，投与部位を除くうっ血及び出血の所見は，死亡又は瀕死における血圧の変化及び血管の弛緩に関連していると考えられた．なお，死亡又は瀕死の原因は，病理学的検査では特定できなかった．

投与 1 日目及び投与 13 日目の投与群の血漿について行った TK 分析の結果を表 2.6.6.3.3-4 に示した．ただし，500 及び 2,500 U/kg/日の雄は被験物質を投与したのが投与 11 日目だったため，投与 13 日目の測定は行わなかった．投与 1 日目には全投与群で定量可能な全身曝露が認められた．全身曝露量は用量の増加に伴って増加し，性差は認められなかった．C_{max} は，50～2,500 U/kg/日の範囲で用量依存的に増加した．最高血中濃度到達時間（t_{max}）は，全投与群の大半で投与後 0.0830 時間（5 分，初回採血時点）であった．一方，投与 0 時間から 48 時間までの血中濃度－時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-}48h}$）は 50 U/kg/日投与群と 500 U/kg/日投与群を比較した際には用量比を上回る曝露量の増加が認められたが，500 U/kg/日投与群と 2,500　U/kg/日投与群を比較した際には用量比を上回るまでには至らなかった．各投与群における投与後の被験物質の血中動態は，基本的に一相性の消失が認められた．血中濃度半減期（$t_{1/2}$）は 500 U/kg/日で雌雄それぞれ 4.33 及び 4.56 時間，2,500 U/kg/日で 5.34 及び 6.01 時間であった．50，500 及び 2,500 U/kg/日投与後のそれぞれ 8，24 及び 48 時間までに，全動物が定量下限値未満（BLQ）（＜0.131 U/mL）に減少した．なお，投与 13 日目で得られた TK 成績は少数であったため，評価することはできなかった．

表 2.6.6.3.3-4　TK 成績（雌雄各 n＝3）

投与日	用量（U/kg/日）	性別	$AUC_{0\text{-}48h}$（U･h/mL）	C_{max}（U/mL）	t_{max}（h）	$t_{1/2}$（h）
1	50	雄	1.73	0.910	0.139	NC
		雌	1.09	0.855	0.0830	NC
	500	雄	39.5	8.68	0.0830	4.56
		雌	41.5	10.2	0.0830	4.33
	2,500	雄	200	42.3	0.139	6.01
		雌	224	43.2	0.0830	5.34
13	50	雄	0.654*1	0.190*2	0.0830*1	NC
		雌	1.47*3	0.629	0.0830	NC
	500	雄	NS	NS	NS	NS
		雌	NC	5.30	0.0830	NC
	2,500	雄	NS	NS	NS	NS
		雌	310*3	42.2	0.0830	5.15*3

NS：標本を採取していない，NC：算出せず

＊1：1 例のデータ

＊2：3 例のデータを用いて算出したが，3 例の値はそれぞれ 0.569，BLQ 及び BLQ であり，BLQ を「0」とみなして C_{max} の平均値を算出した．

＊3：2 例のデータ

引用元：4.2.3.2-3（PR001-NCL-TX002）の RESULTS の Table 2 及び APPENDIX 15 の Table 1.1～1.6 から一部改変

投与 1（投与直前），8（4 回目投与の翌日），15 日目（50 U/kg/日の雌雄は 7 回目投与の 2 日後，500 及び 2,500 U/kg/日の雄は 6 回目投与の 4 日後並びに 500 及び 2,500 U/kg/日の雌は 6 回目投与の 2 日後）の抗グルカルピダーゼ抗体分析の結果を表 2.6.6.3.3-5 に示した．その結果，全被験物質投与群で投与 15 日目までに抗グルカルピダーゼ抗体の存在が確認された．

表 2.6.6.3.3-5　イヌの血清中抗グルカルピダーゼ抗体分析

用量（U/kg/日）	性別	投与 1 日目	投与 8 日目	投与 15 日目*
対照	雄	0／3	0／3	0／3
	雌	0／3	0／3	0／3
50	雄	0／3	1／3	3／3
	雌	0／3	0／3	3／3
500	雄	0／3	1／3	3／3
	雌	0／3	0／3	3／3
2,500	雄	0／3	2／3	2／2
	雌	0／3	0／3	3／3

x／x：陽性の動物数／各群雌雄別の動物数

＊：試験中に死亡した 2,500 U/kg/日の雄 1 例は標本を採取していない．また，瀕死例は瀕死時点（投与 11 日目又は投与 13 日目）に採取し，投与 15 日目の結果に表示した．

引用元：4.2.3.2-3（PR001-NCL-TX002）の RESULTS の Table 3 から一部改変

本試験の結論としては，500 及び 2,500 U/kg/日において，6 回目投与後に 7 例の死亡又は瀕死が認められた．また，死亡又は瀕死例は一般状態の変化，血液学的及び血液生化学的パラメータの変化を伴っていた．6 回目投与後の 50 U/kg/日の雄に血小板の減少が認められたが，その程度から毒性としての影響は少ないと考えられた．なお，免疫原性の評価結果により，雌雄共に投与 15 日目（50 U/kg/日の雌雄は 7 回目投与の 2 日後，500 及び 2,500 U/kg/日の雄は 6 回目投与の 4 日後，500 及び 2,500 U/kg/日の雌は 6 回目投与の 2 日後）までに，抗グルカルピダーゼ抗体の存在が確認された．

以上より，本試験の NOAEL は 50 U/kg/日であると考えられた．

2.6.6.4　遺伝毒性試験

遺伝毒性試験は実施していない．被験物質は組換えタンパク質であり，DNA，あるいは他の染色体物質と直接反応する可能性が極めて低いと考えられる．

2.6.6.5　がん原性試験

がん原性試験は実施していない．被験物質はMTXによる毒性発現に対する救済処置として短期間（単回）投与することを想定しており，慢性的に使用される薬剤でない．加えて，被験物質は組換えタンパク質であり，遺伝毒性の懸念がないと考えられる．

2.6.6.6　生殖発生毒性試験

グルカルピダーゼは催奇形性が認められているMTX[1)]を大量に投与し，その結果，予後不良で生命を脅かす疾患，且つ重篤な死亡リスクがある中毒症状を示した患者に使用されることから，生殖発生毒性試験は実施していない．

ただし，被験物質は薬理作用により葉酸を分解し，葉酸欠乏を生じる可能性があり，母体の葉酸が欠乏した場合，胎児の神経管閉鎖障害や無脳症が生じるとの報告がある[2)]．葉酸欠乏による受胎能や胎児への有害作用についての文献は多く存在し，葉酸欠乏のリスクを評価するための十分な情報があると考えられるため，2.6.6.9 項の考察にて葉酸欠乏のリスクを公表文献から評価した．

なお，添付文書には“治療上のベネフィットがリスクに勝ると考えられる場合にのみ被験物質を投与すること”と記載する予定である．

2.6.6.7　局所刺激性試験

局所刺激性は，ラット3日間反復投与毒性試験及びイヌ14日間反復投与毒性試験の結果から評価した．ラット（50及び5,000 U/kg/日）及びイヌ（50，500及び2,500 U/kg/日）で，投与部位に認められた病理組織学的所見（炎症反応）は，対照群と全投与群との間に差が認められなかった．

以上から，被験物質の局所刺激性はなかった．

2.6.6.8　その他の毒性試験

2.6.6.8.1　免疫原性試験

免疫原性は，イヌ用量漸増忍容性試験及びイヌ14日間反復投与毒性試験の結果から評価した．被験物質はタンパク質であるため，抗原性を示すことが予想される．イヌ用量漸増忍容性試験では，5回目投与後にあたる，投与17日目（雄のみ）及び投与23日目（雌のみ）に採取した標本で抗グルカルピダーゼ抗体陽性が認められた．同様に，イヌ14日間反復投与毒性試験でも，4回目投与の翌日にあたる投与8日目で少数に抗グルカルピダーゼ抗体の存在が認められ始め，6回目（500及び2,500 U/kg/日）又は7回目（50 U/kg/日）投与後にあたる投与15日目までに，被験物質を投与した全例で抗グルカルピダーゼ抗体の存在が認められた．

以上から，複数回投与以降には，2試験の全例で被験物質の免疫原性が認められた．

2.6.6.9 考察及び結論

ラット 3 日間反復投与毒性試験は，50 U/kg/日及び 5,000 U/kg/日の被験物質を 3 日間連続して静脈内投与した後に, 10 日間の回復期間を設けた. その結果, 50 U/kg/日及び 5,000 U/kg/日の忍容性は良好であると考えられた．唯一認められた影響は，投与 4 日目（投与初日を 1 日目とする）の 50 U/kg/日及び 5,000 U/kg/日の雄に認められた対照群と比較した際の体重増加量の抑制傾向であった．しかし，摂餌量に変化がなかったことなどから原因は究明できなかった.

一方，イヌ用量漸増忍容性試験及びイヌ 14 日間反復投与毒性試験では，それぞれ主に 5 回目投与以降及び 6 回目投与以降に被験物質に関連していると考えられる毒性変化が認められた.

イヌ用量漸増忍容性試験は 50，500，1,000，2,500，3,750（雌のみ）又は 5,000 U/kg/日（雄のみ）の被験物質を間歇的「投与 1（投与初日），3，5，7，16（雄のみ）又は 23 日目（雌のみ）」に漸増静脈内投与した. その結果, 雌雄共に 1～4 回目投与に当たる 50～2,500 U/kg/日の忍容性は良好であった．しかし，5 回目投与に当たる 3,750 U/kg/日（雌のみ）及び 5,000 U/kg/日（雄のみ）の投与後に，虚脱，自発運動の低下，軟便，嘔吐，赤色化，努力性呼吸, 過剰な流涎又は流涎増加などといった一般状態の変化が認められた. なお, 5,000 U/kg/日投与を行った雄は投与後 12 時間で正常に回復したが，3,750 U/kg/日投与を行った雌は投与後約 6 時間で瀕死となった．また，血液学的及び血液生化学的パラメータにも 5 回目投与後に，後述する変化が認められた.

イヌ 14 日間反復投与毒性試験は，50，500，2,500 U/kg/日の被験物質を間歇的「投与 1（投与初日），3，5，7，9，11（雌の 500 及び 2,500 U/kg/日を除く），13 日目（雄の 500 及び 2,500 U/kg/日を除く）」に静脈内投与した．その結果，主に 6 回目投与後の 500 U/kg/日及び 2,500 U/kg/日で一般状態の変化が認められ，死亡が 2,500 U/kg/日で 1 例（雄），瀕死が 2,500 U/kg/日で 2 例（雄 1 例，雌 1 例）並びに 500 U/kg/日で 4 例（雄 1 例，雌 3 例）認められた．死亡又は瀕死動物 7 例は 6 回目投与後 15 分から赤色化（耳又は全身），軟便，肛門部位からの赤い分泌物，運動失調，虚脱，嘔吐，努力性呼吸，流涎増加又は過剰な流涎などの一般状態の変化が認められた．血液学的及び血液生化学的パラメータに 6 回目投与後に後述するような変化が認められた．肉眼的観察は，所見の大半が死亡又は瀕死動物で認められた．最も高頻度に認められた所見は，耳，肺，胆嚢及び投与部位の変色並びに消化管粘膜の赤色化であった．病理組織学的検査は，試験終了まで生存した動物では，被験物質に関連した所見は認められなかった．ただし，被験物質投与群の胆嚢漿膜下に軽度の出血が認められたが，被験物質との関連については不明であった．なお，死亡又は瀕死の原因は，病理学的検査では特定できなかった.

血液学的検査では，イヌ用量漸増忍容性試験で投与 23 日目の 3,750 U/kg/日投与の雌（投与後 6 時間の検査値）に赤血球，ヘモグロビン及びヘマトクリットの増加が認められた．この動物は投与後 15 分より嘔吐及び過剰な流涎，投与後 4 時間より軟便及び過剰な流涎の持続が認められたことから，脱水による循環血液の濃縮による可能性が考えられた.

イヌ 14 日間反復投与毒性試験で，対照群と比較して，投与 12 日目の 50 U/kg/日の雄で血小板の有意な減少が認められた．同様に，500 及び 2,500 U/kg/日の雄，投与 14 日目の 2,500 U/kg/日の雌及び投与 11 日目に瀕死となった 500 及び 2,500 U/kg/日の雄 2 例でも血小板の減少が認められた．なお，50 U/kg/日投与で認められた血小板の減少は変化の程度が小さかったため，毒性的な影響は少ないと考えられた．

血液生化学的検査では，イヌ用量漸増忍容性試験で ALT，AST 及び ALP の増加が認められたが，同様の変化はイヌ 14 日間反復投与毒性試験の 500 U/kg/日又は 2,500 U/kg/日投与でも認められた．また，イヌ 14 日間反復投与毒性試験の肉眼的観察及び病理組織学的検査では，軽微又は軽度の肝臓での所見が認められた．しかし，これら肝臓で認められた病理組織学的所見と ALT，AST 及び ALP の増加との関連性については一致したものではなかった．

イヌでは上記に挙げた毒性徴候が認められたが，ラット 3 日間反復投与毒性試験では類似した毒性徴候は認められなかった．イヌのみで毒性徴候が認められた原因は不明であるが，抗体産生による免疫反応による可能性が考えられた．すなわち，被験物質により引き起こされた毒性所見は主に免疫反応によるものだったためと考えられる．イヌ用量漸増忍容性試験及びイヌ 14 日間反復投与毒性試験は抗グルカルピダーゼ抗体分析を行っており，イヌ用量漸増忍容性試験は 5 回目投与以降，イヌ 14 日間反復投与毒性試験は 4 回目投与以降から少数で存在が認められ始め，6 回目又は 7 回目投与以降には全例で確認された．加えて，イヌ用量漸増忍容性試験及びイヌ 14 日間反復投与毒性試験では，それぞれ主に 5 回目投与以降及び 6 回目投与以降の投与後 15 分から毒性所見が認められ，最終的には死亡又は瀕死例も認められた．

また，イヌで認められた毒性徴候は葉酸欠乏も影響していた可能性を無視することはできない．被験物質は薬理作用として MTX を分解するが，MTX が葉酸アナログであることから被験物質が葉酸も分解する可能性がある [3]．葉酸欠乏した際のラットへの影響に関しては，Chanarin らによる 6 週齢のアルビノラットに，葉酸欠乏飼料（葉酸添加なし，スルファニルアミドを添加）を与えた結果として，9 週目に被毛粗剛や眼の充血及びヘマトクリットの減少が認められたという報告がある [4]．ラット 3 日間反復投与毒性試験でも被験物質によって葉酸が減少した可能性が考えられるが，報告されている所見は認められなかった．

なお，ラット 3 日間反復投与毒性試験では，上述したように毒性がほとんど認められていないが，以下 2 点からラットを毒性評価に用いる動物として選択したことは不適切でないと思われる。1）被験物質の単回投与でも抗薬物抗体が発現する可能性はあるものの，抗体価の上昇にはある程度の期間が必要で，本試験のような 3 日間のみの反復投与においては，薬物抗体発現による毒性評価への影響は考えにくいこと，2）多くの動物において葉酸欠乏症が知られており，被験物質を投与した際にイヌ及びラットでも葉酸欠乏による毒性が発現する可能性があるが，ラットの短期間の投与ではそれが明確ではなかったと考えられる．

局所刺激性は，ラット 3 日間反復投与毒性試験及びイヌ 14 日間反復投与毒性試験で評価した．ラット（50 及び 5,000 U/kg/日）及びイヌ（50，500 及び 2,500 U/kg/日）では，投与部

位に認められた病理組織学的所見は対照群との間に炎症反応の発現に差が認められなかった．以上から，被験物質の局所刺激性はなく，忍容性は良好と考えられた．

TK 分析は，ラット 3 日間反復投与毒性試験において，臨床予定用量である 50 U/kg/日の平均血漿中濃度は 0.5 U/mL であり，5,000 U/kg/日では 139.5 U/mL であった．この 2 つのデータを比較すると，用量が 100 倍に対して平均血漿中濃度は約 279 倍になった．つまり，投与 10 分後の採取時点では被験物質の平均血漿中濃度は用量比を上回る増加を示した．一方，イヌ 14 日間反復投与毒性試験において，投与 1 日目には全投与群で定量可能な全身曝露が認められた．全身曝露量は用量の増加に伴って増加し，性差は認められなかった．C_{max} は，50～2,500 U/kg/日の範囲で用量依存的に増加した．t_{max} は，全投与群の大半で投与後 0.0830 時間（5 分，初回採血時点）であった．$AUC_{0\text{-}48h}$ は 50 U/kg/日投与群と 500 U/kg/日投与群を比較した際には用量比を上回る曝露量の増加が認められたが，500 U/kg/日投与群と 2,500 U/kg/日投与群を比較した際には用量比を上回るまでには至らなかった．各投与量における投与後の被験物質の血中動態は，基本的に一相性の消失が認められた．$t_{1/2}$ は 500 U/kg/日で雌雄それぞれ 4.33 及び 4.56 時間，2,500 U/kg/日で 5.34 及び 6.01 時間であった．なお，50，500 及び 2,500 U/kg/日投与後のそれぞれ 8，24 及び 48 時間までに，全動物が BLQ に減少した．投与 13 日目で得られた TK 成績は少数であったため，評価することはできなかった．

生殖発生毒性について，被験物質による生殖器への影響に関しては，ラット 3 日間反復投与毒性試験及びイヌ 14 日間反復投与毒性試験において，影響は認められないと判断した．すなわち，ラット 3 日間反復投与毒性試験で生殖器に認められた変化は，50 U/kg/日の雄で前立腺重量の減少傾向（対照群：0.374 g，50 U/kg/日：0.297 g），50 U/kg/日の雌 1 例で小型卵巣並びに対照群及び 5,000 U/kg/日の雄 1 例で精巣精細管の萎縮であった．また，子宮の病理組織学的検査で各ステージの性周期像が認められた．一方，イヌ 14 日間反復投与毒性試験で生殖器に認められた変化は，対照群，50 U/kg/日，500 U/kg/日及び 2,500 U/kg/日の雄全例の精巣未成熟（少なくとも 4 ヵ月齢で投与開始）のみであった．これらの諸変化は，用量依存性がなく，対照群にも認められたことから被験物質との関連性はないものと判断した．

なお，被験物質は葉酸を分解する可能性があり，葉酸が欠乏した際には一般毒性や生殖発生毒性が生じることが知られている．一般毒性に関しては，上述したラットへの影響の他に，Mohanty らによって，性成熟したアカゲザルの雌に半合成の葉酸欠乏液体飼料を 1 日 2 回与えた結果として，卵巣の顆粒膜細胞の枯渇を伴った閉鎖卵胞及び嚢胞性卵胞の増加，細胞周期の G1 期の顕著な延長が認められたという報告がある [5)]．

生殖発生に関しては，ヒトで母体に葉酸欠乏症があると胎児の神経管閉鎖障害や無脳症を引き起こし，二分脊椎及び髄膜瘤が生じるとの報告がある [2)]．そのため，葉酸欠乏による受胎能や胎児への有害作用についての文献が多く存在する．葉酸欠乏が生殖発生にどのような影響を及ぼすかについて，公表文献による報告を以下に示した．Grace らは 50 日齢の Sprague-Dawley ラットの雌に交配前 7 週間から妊娠期間中，葉酸欠乏飼料（葉酸添加な

し．1%のスクシニルスルファチアゾールを添加）又は葉酸添加飼料（1 kg あたり 2 mg の葉酸を添加．1%のスクシニルスルファチアゾールを添加）を与えた[6]．また，妊娠 11 日目に 2 回，1 kg あたり 2.5 g のエタノール「20%（w/v）」を胃内投与した．なお，エタノール投与群の対照として，同カロリー量のスクロース「35%（w/v）」を同じ投与方法で投与した. その結果, 妊娠動物での着床数は, 葉酸欠乏飼料／エタノール投与群（以下,「DE 群」），葉酸欠乏飼料／スクロース投与群（以下，「DC 群」），葉酸添加飼料／エタノール投与群（以下，「SE 群」）及び葉酸添加飼料／スクロース投与群（以下，「SC 群」）で，それぞれ 12.0±0.9，12.3±1.3，13.8±0.8 及び 12.8±0.8 であり，葉酸欠乏による着床数の影響はなかった．しかし，胎児生存数／着床数（%）は，DE 群，DC 群，SE 群及び SC 群でそれぞれ 8.3，26.5，91.3 及び 94.1 であり，葉酸欠乏飼料群において高い胎児死亡が見られた．また，葉酸欠乏飼料群では，胎児の体重増加抑制が起こっていた「DE 群，DC 群，SE 群及び SC 群の体重（g）は，それぞれ 2.22±0.32，2.7±0.28，3.44±0.38 及び 3.48±0.08」．なお，生存していた胎児のいずれにおいても，外見的な奇形は見当たらなかったことを報告している．

さらに，Nelson らは，3〜4 ヵ月齢の Long-Evans ラット（以下，「LE ラット」）の雌に，1%のスクシニルスルファチアゾールを混餌させた飼料（以下，「SST 飼料」）からプテロイルモノグルタミン酸（PGA）（葉酸は狭義にはプテロイルモノグルタミン酸を指す[2]）を欠乏させたものを交配当日のみ与え，さらに別の LE ラットの雌に PGA 欠乏 SST 飼料を 1 ヵ月，2 ヵ月又は 3 ヵ月与え，その後可能な限り早く交配させた[7]．その結果，交配当日のみ PGA 欠乏 SST 飼料を与えた LE ラットの生殖は阻害されなかったが，交配 1 ヵ月前から PGA 欠乏 SST 飼料を与えた LE ラットでは，僅かに生殖が阻害された（産子数と出生時の体重の僅かな低値を伴った胚吸収や早期死産が起こった）．また，交配 2 ヵ月前から PGA 欠乏 SST 飼料を与えた LE ラットは，生殖行動に著しい混乱をきたし，着床数中の胚吸収数の割合（%）が約半数になり，平均産子数が著しく減少した．交配 3 ヵ月前から PGA 欠乏 SST 飼料を与えた LE ラットは，交配 2 ヵ月前から PGA 欠乏 SST 飼料を与えた LE ラットの生殖阻害と同程度だったことを報告している．

Nelson らが行った別の試験では，3〜4 ヵ月齢の LE ラットの雌に PGA 欠乏飼料（1%のスクシニルスルファチアゾールと 0.5%の PGA アンタゴニストである x-メチル-PGA を含む）を，妊娠 14 日目までの様々な期間に 24，48 又は 72 時間与えた[8]．その結果，PGA 欠乏飼料を妊娠 7（着床時期）〜12 日目までに 48 時間にわたって与えると，胎児死亡や胎児異常が 70〜100%になった．異常は，神経系，眼球系，骨格系，呼吸器系，心血管系，泌尿生殖器系，横隔膜及び体壁といった複数の器官系に発生した．一方，PGA 欠乏飼料を着床時期後の 24 時間又は着床時期前の 72 時間に与えても，胎児の発達に影響はなかった．PGA 欠乏飼料を与えた母動物は，胎児死亡や胎児異常に関わらず，体重は増加し，良好な健康状態だったことを報告している．

以上の結果から，妊娠前や妊娠期間中の葉酸欠乏は，母動物の生殖能などに様々な異常をもたらし，胚・胎児の異常を生じさせることが示された．一方，母動物に葉酸欠乏飼料が 1

日のみ与えられた場合は，胎児に影響がなく，葉酸の欠乏している期間が 1 日の場合には，生殖発生に影響しないと考えられた．

臨床使用では被験物質は単回投与を意図されており，被験物質が葉酸を分解し，葉酸欠乏を生じさせるとしても一時的なものと考えられる．加えて，被験物質投与前後に 2 時間以上空けてロイコボリン（LV）による還元型葉酸の補充も行われる．また，臨床試験及び市販後データ（2.5.5.7 参照）において，「妊娠，産褥および周産期の状態」，「生殖系および乳房障害」に分類される有害事象・副作用は報告されなかった．

一連の毒性試験の結論としては，ラット 3 日間反復投与毒性試験から，被験物質の NOAEL は 5,000 U/kg/日と考えられ，その時の平均血漿中濃度は 139.5 U/mL であった．一方，臨床予定用量 50 U/kg/日投与時のヒトにおける C_{max} は，腎機能が正常な被験者及び重度の腎機能障害を有する被験者対象の PR001-CLN-005 試験の血清中 C_{max} が，それぞれ 1.44 U/mL（酵素－基質分光法による値，ELISA では 1.35 U/mL）及び 1.21 U/mL（酵素－基質分光法による値，ELISA では 1.25 U/mL）であった．また，健康成人対象の PR001-CLN-010 試験の血清中 C_{max} は 1.31 U/mL（ELISA による値），国内第 I 相試験の血漿中 C_{max} は 1.20 U/mL（ELISA による値）であった．以上から，ラット 3 日間反復投与毒性試験では，ヒトの C_{max} の 100 倍程度の平均血漿中濃度で検討され，投与の影響は観察されなかった．ただし，原因は究明できなかったが，体重増加量の抑制傾向が認められた．なお，ラット 3 日間反復投与毒性試験において，被験物質を 50 U/kg/日投与した際の平均血漿中濃度は 0.5 U/mL であった．また，イヌ 14 日間反復投与毒性試験から，NOAEL は 50 U/kg/日と考えられ，その時の血漿中の C_{max} は 0.855～0.910 U/mL であった．この C_{max} の値は，臨床予定用量 50 U/kg/日投与時のヒトにおける C_{max} よりやや下回った．また，一般状態に異常が認められなかった投与 1 日目の 500 及び 2,500 U/kg/日投与群「赤色化（雌雄各 1 例）及び唾液分泌の増加（雄 1 例）を含む」の C_{max} はそれぞれ 8.68～10.2 及び 42.3～43.2 U/mL であった．この C_{max} の値は，臨床予定用量 50 U/kg/日投与時のヒトにおける C_{max} と比較して，それぞれ約 7 倍及び約 33 倍であった．なお，国内第 I 相試験では，ラット及びイヌの NOAEL での投与量に対して，それぞれ 1/250 及び 2/5 に相当する 20 U/kg/日を初回投与量として設定し，第 1 コホートの 20 U/kg/日の安全性が確認された後に，50 U/kg/日を第 2 コホートに投与して安全性を確認する増量デザインであった．国内第 I 相試験の安全性の結論としては，最大の解析対象集団（FAS）の 16 名中 11 名（68.8%）に有害事象が認められたが，全ての被験者で用量制限毒性（DLT）の発現は認められず，死亡，重篤な有害事象及び他の重要な有害事象も認められなかった（2.7.6.1.2.6.6 参照）．

2.6.6.10　図表

本文中に含めた．

2.6.6.11 参考文献

1） ファイザー株式会社. メソトレキセート® 点滴静注液 200mg/1000mg インタビューフォーム. 2020 年 12 月改訂（第 19 版）.

2） 厚生労働省. 「日本人の食事摂取基準（2015 年版）」策定検討会報告書 ビタミン（水溶性ビタミン） 6 葉酸. 2015, 215-219.

3） Sherwood RF, Melton RG, Alwan SM, et al. Purification and properties of carboxypeptidase G_2 from *Pseudomonas* sp. strain RS-16. Use of a novel triazine dye affinity method. Eur J Biochem. 1985, 148(3), 447-453.

4） Chanarin I, Smith GN, Wincour V. Development of Folate Deficiency in the Rat. Br J Haematol. 1969, 16(1), 193-195.

5） Mohanty D, Das KC. Effect of Folate Deficiency on the Reproductive Organs of Female Rhesus Monkeys: a Cytomorphological and Cytokinetic Study. J Nutr. 1982, 112(8), 1565-1576.

6） Lin GW-J. FOLATE DEFICIENCY AND ACUTE ETHANOL TREATMENT ON PREGNANCY OUTCOME IN THE RAT. Nutrition Research. 1988, 8(10), 1151-1160.

7） Nelson MM, Evans HM. Reproduction in the Rat on Purified Diets Containing Succinylsulfathiazole. Proc Soc Exp Biol Med. 1947, 66(2), 289-291.

8） Nelson MM, Wright HV, Asling CW, et al. Multiple congenital abnormalities resulting from transitory deficiency of pteroylglutamic acid during gestation in the rat. J Nutr. 1955, 56(3), 349-369.

目次

2.6.7.1　毒性試験：一覧表.....2
2.6.7.2　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表.....3
2.6.7.3　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧.....4
2.6.7.4　毒性試験：使用ロット.....6
2.6.7.5　単回投与毒性試験.....7
2.6.7.6　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験.....7
2.6.7.7　反復投与毒性試験：重要な試験.....8
2.6.7.7.1　反復投与毒性試験：ラット 3 日間反復投与毒性試験.....8
2.6.7.7.2　反復投与毒性試験：イヌ 14 日間反復投与毒性試験.....12
2.6.7.8　*In Vitro*　遺伝毒性試験.....22
2.6.7.9　*In Vivo*　遺伝毒性試験.....22
2.6.7.10　がん原性試験.....23
2.6.7.11　生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験.....23
2.6.7.12　生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験.....23
2.6.7.13　生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験.....23
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.....23
2.6.7.15　局所刺激性試験.....23

2.6.7.1 毒性試験：一覧表

一覧表（次頁に続く）

被験物質：グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）

試験の種類	動物種／系統	投与方法	投与期間	用量（U/kg/日）*1	GLP 適用	実施施設	試験番号	記載箇所
単回投与毒性試験	実施していない.							4.2.3.1-1 4.2.3.1-2
反復投与毒性試験	Crl:WI（GLX／BRL／Han）IGSB ラット	静脈内	3 日間（1 日 1 回）＋10 日間（回復）	0，50，5,000	適用	[redacted]（英国）	1845/013	4.2.3.2-1
	ビーグル犬	静脈内	25 日間「投与 1，3，5，7，16（雄），23 日目（雌）に 1 日 1 回」	50，500，1,000，2,500*2，3,750（雌）又は 5,000（雄）	非適用（予備試験）	[redacted]（米国）	PR001-NCL-TX001	4.2.3.2-2
	ビーグル犬	静脈内	14 日間「投与 1，3，5，7，9，11（雌の 500 及び 2,500 U/kg/日を除く），13 日目（雄の 500 及び 2,500 U/kg/日を除く）に 1 日 1 回」	0，50，500，2,500	適用	[redacted]（米国）	PR001-NCL-TX002	4.2.3.2-3
遺伝毒性試験	実施していない.							
がん原性試験	実施していない.							

＊1：用量の下線部は NOAEL を示す.

＊2：最大耐量

一覧表（続き）

被験物質：グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）

試験の種類	動物種／系統	投与方法	投与期間	用量（U/kg/日）	GLP 適用	実施施設	試験番号	記載箇所
生殖発生毒性試験	実施していない.							
局所刺激性試験	実施していない.							4.2.3.6-1 4.2.3.6-2

2.6.7.2　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表

トキシコキネティクス試験の一覧表

被験物質：グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）

試験の種類	試験系	投与方法	用量（U/kg/日）	GLP 適用	試験番号	記載箇所
ラット 3 日間反復投与毒性試験	ラット	静脈内	0，50，5,000	適用	1845/013	4.2.3.2-1
イヌ 14 日間反復投与毒性試験	イヌ	静脈内	0，50，500，2,500	適用	PR001-NCL-TX002	4.2.3.2-3

2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧

トキシコキネティクス試験成績の一覧（次頁に続く）

被験物質：グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）

AUC（U･h/mL）*1

用量（U/kg/日）	イヌ				ヒト*2			
	PR001-NCL-TX002*3				PR001-CLN-005 試験*3		PR001-CLN-010 試験*4	CPG2-PI 試験*4
	$AUC_{0\text{-}48h}$				$AUC_{0\text{-}t}$*5		$AUC_{0\text{-}tz}$*5	$AUC_{0\text{-}24h}$
	投与 1 日目		投与 13 日目		腎機能正常	腎機能障害		
	雄	雌	雄	雌				
20	－	－	－	－	－	－	－	4.25
50	1.73	1.09	0.654*6	1.47*7	8.61	7.56	9.67	9.84
500	39.5	41.5	NS	NC	－	－	－	－
2,500	200	224	NS	310*7	－	－	－	－

－：該当事項なし，NS：標本を採取していない，NC：算出せず

＊1：ラット（1845/013）は AUC を算出していない．

＊2：AUC は投与 1 回目の値を用いて以下の式から算出「AUC（μg･h /mL）×比活性（U/mg）×0.001（mg/μg）」．なお，比活性は[redacted] U/mg（PR001-CLN-005 試験），[redacted] U/mg（PR001-CLN-010 試験），[redacted] U/mg（CPG2-PI 試験）

＊3：酵素ー基質分光法による測定値

＊4：ELISA による測定値

＊5：被験物質投与後，最終定量可能時点までの血清中濃度から算出．各試験の測定時間はそれぞれ，96 時間（PR001-CLN-005）及び 26 時間（PR001-CLN-010）．

＊6：1 例のデータ

＊7：2 例のデータ

トキシコキネティクス試験成績の一覧（続き）

被験物質：グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）

血中濃度（U/mL）

用量（U/kg/日）	ラット	イヌ				ヒト*1			
	平均血漿中濃度（投与後 10 分）	C_{max}							
	1845/013*2	PR001-NCL-TX002*2				PR001-CLN-005 試験*2		PR001-CLN-010 試験*3	CPG2-PI 試験*3
		投与 1 日目		投与 13 日目					
	雌雄	雄	雌	雄	雌	腎機能正常	腎機能障害		
20	－	－	－	－	－	－	－	－	0.505
50	0.5	0.910	0.855	0.190*4	0.629	1.44	1.21	1.31	1.20
500	－	8.68	10.2	NS	5.30	－	－	－	－
2,500	－	42.3	43.2	NS	42.2	－	－	－	－
5,000	139.5	－	－	－	－	－	－	－	－

－：該当事項なし，NS：標本を採取していない

＊1：C_{max} は投与 1 回目の値を用いて以下の式から算出「C_{max}（μg/mL）×比活性（U/mg）×0.001（mg/μg）」．なお，比活性は■ U/mg（PR001-CLN-005 試験），■ U/mg（PR001-CLN-010 試験），■ U/mg（CPG2-PI 試験）

＊2：酵素－基質分光法による測定値

＊3：ELISA による測定値

＊4：3 例のデータを用いて算出したが，3 例の値はそれぞれ 0.569，BLQ（＜0.131 U/mL）及び BLQ であり，BLQ は「0」とみなして C_{max} の平均値を算出した．

2.6.7.4 毒性試験：使用ロット

使用ロット

被験物質：グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）

ロット番号	純度（%）	規格設定された不純物[*1]		試験番号	試験の種類
規格[*2]	[redacted]%	残留 DNA：[redacted] pg/mg	宿主細胞由来タンパク質：[redacted]%	－	－
[redacted]	[redacted]*3 [redacted]*4	[redacted]	[redacted]	1845/013	ラット 3 日間反復投与毒性試験
[redacted]	[redacted]*3 [redacted]*4	[redacted]	[redacted]	PR001-NCL-TX001 PR001-NCL-TX002	イヌ用量漸増忍容性試験及びイヌ 14 日間反復投与毒性試験

－：該当事項なし

＊1：[redacted]

＊2：[redacted]

＊3：[redacted]

＊4：[redacted]

2.6.7.5 単回投与毒性試験

実施していないが，ラット 3 日間反復投与毒性試験及びイヌ 14 日間反復投与毒性試験の初回投与後「ラットでは最大 5,000 U/kg/日，イヌでは最大 2,500 U/kg/日（MTD）」から次回投与までにおいて，ラット及びイヌ共に死亡例は認められなかった．以上から，概略の致死量はラットで 5,000 U/kg/日超，イヌで 2,500 U/kg/日超と考えられた．

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

重要な試験以外の試験

被験物質：グルカルピダ―ゼ（遺伝子組換え）

動物種／系統	投与方法	投与期間	用量（U/kg/日）	性別（動物数）	最大耐量（U/kg/日）	特記すべき所見	試験番号
ビ―グル犬	静脈内	25 日間（投与 1，3，5，7，16（雄），23 日目（雌）に 1 日 1 回）	50，500，1,000，2,500，3,750（雌）又は 5,000（雄）	雄（1 例） 雌（1 例）	2,500	3,750 U/kg/日及び 5,000 U/kg/日の忍容性は不良であり，虚脱，自発運動の低下，軟便，嘔吐，赤色化，努力性呼吸，過剰な流涎又は流涎増加などが認められた．血液学的及び血液生化学的パラメ―タの変化も認められた．雌雄共に 3,750 U/kg/日及び 5,000 U/kg/日投与後（5 回目投与）に，抗グルカルピダ―ゼ抗体の存在が確認された（免疫原性の評価に使用）．	PR001-NCL-TX001

2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験

2.6.7.7.1 反復投与毒性試験：ラット 3 日間反復投与毒性試験

ラット 3 日間反復投与毒性試験（次頁に続く）

被験物質：グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）

報告書の標題：Voraxaze （Carboxypeptidase G2）: 3 Day Intravenous Administration Toxicity Study in the Rat with a 10 Day Recovery Period

動物種／系統：Crl:WI（GLX／BRL／Han）IGSB ラット　投与期間：3 日間　試験番号：1845/013

開始時の年齢：約 53 日齢　投与後期間：10 日間　記載箇所：4.2.3.2-1

初回投与日：20[redacted] 年[redacted] 月[redacted] 日　投与方法：静脈内投与　GLP 適用：適用

特記事項：なし　溶媒／製剤：生理食塩液（0.9% NaCl）

無毒性量：5,000 U/kg/日

用量 （U/kg/日）	0（対照）	50	5,000
動物数（例）*	雄：5，雌：5	雄：5，雌：5	雄：5，雌：5
トキシコキネティクス：投与後 10 分の平均血漿中濃度（U/mL）			
投与 1 日目	LOD 未満	0.5	139.5

LOD 未満：検出限界未満

＊：サテライト群で測定

ラット 3 日間反復投与毒性試験（続き）

被験物質：グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）

用量（U/kg/日）	0（対照）		50		5,000	
動物数（例）	雄：10	雌：10	雄：10	雌：10	雄：10	雌：10
特記すべき所見						
死亡及び安楽死（例）	0	0	0	0	0	0
一般状態	－	－	－	－	－	－
体重（g）＊	－1.9	－5.1	－10.5	－7.9	－5.0	－5.8
摂餌量	－	－	－	－	－	－
血液学的検査	－	－	－	－	－	－
血液生化学的検査	－	－	－	－	－	－
器官重量	－	－	－	－	－	－
剖検所見（例）						
肺						
変色	1	0	1	0	2	1
胃						
粘膜退色	2	0	1	4	0	1
大腸						
粘膜赤色化	1	0	1	0	0	0

―：特記事項なし

＊： 投与 1 日目と投与 4 日目を比較した，体重の変化量

ラット 3 日間反復投与毒性試験（続き）

被験物質：グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）

用量（U/kg/日）	0（対照）		50		5,000	
動物数（例）	雄：10	雌：10	雄：10	雌：10	雄：10	雌：10
剖検所見（例）						
腎臓						
退色	2	1	2	0	0	1
顎下リンパ節						
肥大	1	1	1	0	0	0
病理組織学的検査（例）						
眼						
網膜の杆状体錐状体層における細胞破砕物	1	0	0	0	4	0
肺						
肉芽腫	0	0	3	0	2	1
炎症性細胞巣	7	9	7	9	8	9
泡沫細胞出現	0	1	2	0	0	2
胃						
粘膜びらん／潰瘍	0	0	0	0	1	0
大腸						
うっ血／出血	1	1	0	0	2	1
浮腫	0	2	1	1	1	0

ラット 3 日間反復投与毒性試験（続き）

被験物質：グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）

用量（U/kg/日）	0（対照）		50		5,000	
動物数（例）	雄：10	雌：10	雄：10	雌：10	雄：10	雌：10
病理組織学的検査（例）						
腎臓						
水腎症	2	2	2	1	1	1
鉱質沈着	3	0	1	3	1	3
硝子滴	7	0	7	0	6	0
顎下リンパ節						
リンパ組織過形成	1	4	1	5	3	4
投与部位						
炎症	3	5	5	5	8	7
出血	4	5	6	6	4	6
回復期間終了後						
動物数（例）	雄：5	雌：5	雄：0	雌：0	雄：5	雌：5
特記すべき所見	－	－	NA	NA	－	－

－：特記事項なし，NA：実施なし

2.6.7.7.2　反復投与毒性試験：イヌ 14 日間反復投与毒性試験

イヌ 14 日間反復投与毒性試験（次頁に続く）

被験物質：グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）

報告書の標題：FOURTEEN-DAY REPEATED DOSE TOXICITY STUDY OF VORAXAZE™ ADMINISTERED VIA INTRAVENOUS INJECTION TO BEAGLE DOGS

動物種／系統：ビーグル犬　　投与期間：14 日間　　試験番号：PR001-NCL-TX002

開始時の年齢：4 ヵ月齢　　投与後期間：なし　　記載箇所：4.2.3.2-3

初回投与日：20[redacted] 年 [redacted] 月 [redacted] 日　　投与方法：静脈内投与　　GLP 適用：適用

特記事項：なし　　溶媒／製剤：生理食塩液（0.9% NaCl）

無毒性量：50 U/kg/日

用量（U/kg/日）	0（対照）		50		500		2,500	
動物数（例）	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3
トキシコキネティクス								
$AUC_{0\text{-}48h}$（U･h/mL）								
投与 1 日目	BLQ	BLQ	1.73	1.09	39.5	41.5	200	224
投与 13 日目	BLQ	BLQ	0.654*1	1.47*2	NS	NC	NS	310*2
C_{max}（U/mL）								
投与 1 日目	BLQ	BLQ	0.910	0.855	8.68	10.2	42.3	43.2
投与 13 日目	BLQ	BLQ	0.190*3	0.629	NS	5.30	NS	42.2

NS：標本を採取していない，NC：算出せず，BLQ：定量下限未満（＜0.131 U/mL）

＊1：1 例のデータ

＊2：2 例のデータ

＊3：3 例のデータを用いて算出したが，3 例の値はそれぞれ 0.569，BLQ 及び BLQ であり，BLQ は「0」とみなして C_{max} の平均値を算出した．

イヌ 14 日間反復投与毒性試験（続き）

被験物質：グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）

用量（U/kg/日）	0（対照）		50		500		2,500	
動物数（例）	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3
特記すべき所見								
抗グルカルピダーゼ抗体分析（例）*1								
投与 1 日目	0	0	0	0	0	0	0	0
投与 8 日目	0	0	1	0	1	0	2	0
投与 15 日目*2	0	0	3	3	3	3	2	3
死亡及び安楽死（例）	0	0	0	0	1	3	2	1
一般状態（例）								
赤色化（耳，腹部又は全身）	2	1	1	0	2	3	3	3
軟便	0	0	0	0	2	0	3	1
水様便	0	0	0	0	0	0	0	1
肛門部位からの赤い分泌物	0	0	0	0	1	0	2	0
運動失調	0	0	0	1	1	1	2	1
虚脱	0	0	0	0	2	3	2	2
嘔吐	0	0	0	0	3	2	3	1

＊1：免疫原性の評価に使用

＊2：試験中に死亡した 2,500 U/kg/日の雄 1 例は標本を採取していない．また，瀕死例は瀕死時点（投与 11 日目又は投与 13 日目）に採取し，投与 15 日目の結果に表示した．

イヌ 14 日間反復投与毒性試験（続き）

被験物質：グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）

用量（U/kg/日）	0（対照）		50		500		2,500	
動物数（例）	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3
一般状態（例）								
努力性呼吸	0	0	0	0	1	0	2	0
流涎増加	0	0	0	0	1	0	3	0
流涎過剰	0	0	0	0	0	0	1	0
眼の充血	0	0	0	0	0	0	1	0
体重	－	－	－	－	－	－	－	－
摂餌量	－	－	－	－	－	－	－	－
体温	－	－	－	－	－	－	－	－
身体検査	－	－	－	－	－	－	－	－
眼科学的検査	－	－	－	－	－	－	－	－
心電図検査	－	－	－	－	－	－	－	－

－：特記事項なし

イヌ 14 日間反復投与毒性試験（続き）

被験物質：グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）

用量（U/kg/日）	0（対照）		50		500		2,500	
動物数（例）	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3
血液学的検査								
ヘモグロビン（g/dL）								
投与 11 日目	NS	NS	NS	NS	22.00*1	NS	20.40*1	NS
投与 12 日目	14.17	15.03	13.53	14.43	12.05*2	15.47	13.90*1	14.73
投与 14 日目	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	13.55*2
ヘマトクリット（%）								
投与 11 日目	NS	NS	NS	NS	69.90*1	NS	66.10*1	NS
投与 12 日目	43.83	45.80	41.33	44.07	36.45*2	46.83	42.70*1	45.00
投与 14 日目	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	42.00*2
血小板（10^3/uL）								
投与 11 日目	NS	NS	NS	NS	204.0*1	NS	107.0*1	NS
投与 12 日目	421.0	308.3	319.0※	393.3	268.5*2	284.3	237.0*1	312.0
投与 14 日目	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	258.5*2

NS：標本を採取していない，※：対照群と有意差あり（$p < 0.05$）

＊1：1 例のデータ

＊2：2 例のデータ

イヌ 14 日間反復投与毒性試験（続き）

被験物質：グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）

用量（U/kg/日）	0（対照）		50		500		2,500	
動物数（例）	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3
血液学的検査								
好中球（10^3/uL）								
投与 11 日目	NS	NS	NS	NS	4.280*1	NS	3.190*1	NS
投与 12 日目	7.073	8.253	5.650※	7.360	8.785*2	7.137	8.440*1	7.247
投与 14 日目	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	7.090*2
リンパ球（10^3/uL）								
投与 11 日目	NS	NS	NS	NS	3.490*1	NS	2.120*1	NS
投与 12 日目	3.120	4.137	2.917	3.097	2.750*2	3.087	3.800*1	3.743
投与 14 日目	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	2.410*2
血液生化学的検査								
総ビリルビン（mg/dL）								
投与 11 日目	NS	NS	NS	NS	0.30*1	NS	0.40*1	NS
投与 12 日目	0.20	0.13	0.17	0.17	0.15*2	0.10	0.10*1	0.13
投与 14 日目	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.15*2

NS：標本を採取していない，※：対照群と有意差あり（$p < 0.05$）

＊1：1 例のデータ

＊2：2 例のデータ

イヌ 14 日間反復投与毒性試験（続き）

被験物質：グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）

用量（U/kg/日）	0（対照）		50		500		2,500	
動物数（例）	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3
血液生化学的検査								
尿素窒素（mg/dL）								
投与 11 日目	NS	NS	NS	NS	26.0*1	NS	30.0*1	NS
投与 12 日目	13.0	18.3	15.0	14.0※※	17.5*2	13.7※※	15.0*1	17.3
投与 14 日目	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	18.5*2
クレアチニン（mg/dL）								
投与 11 日目	NS	NS	NS	NS	1.20*1	NS	1.10*1	NS
投与 12 日目	0.50	0.63	0.57	0.60	0.50*2	0.63	0.70*1	0.60
投与 14 日目	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.45*2
ALT（U/L）								
投与 11 日目	NS	NS	NS	NS	439.0*1	NS	262.0*1	NS
投与 12 日目	34.0	32.7	44.0	32.3	2010.5*2*3	36.0	280.0*1	40.7
投与 14 日目	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	264.0*2*4

NS：標本を採取していない，※※：対照群と有意差あり（$p < 0.01$）

＊1：1 例のデータ

＊2：2 例のデータ

＊3：標準偏差が 2,788.1

＊4：標準偏差が 270.1

イヌ 14 日間反復投与毒性試験（続き）

被験物質：グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）

用量（U/kg/日）	0（対照）		50		500		2,500	
動物数（例）	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3
血液生化学的検査								
AST（U/L）								
投与 11 日目	NS	NS	NS	NS	318.0*1	NS	292.0*1	NS
投与 12 日目	36.0	40.0	37.0	38.7	606.5*2*3	36.3	41.0*1	41.7
投与 14 日目	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	44.5*2
ALP（U/L）								
投与 11 日目	NS	NS	NS	NS	287.0*1	NS	358.0*1	NS
投与 12 日目	137.7	135.0	119.0	136.7	202.0*2	110.3	129.0*1	140.0
投与 14 日目	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	139.0*2
γ-グルタミルトランスフェラーゼ（U/L）								
投与 11 日目	NS	NS	NS	NS	5.0*1	NS	4.0*1	NS
投与 12 日目	3.7	2.3	2.7	3.3	3.0*2	3.0	3.0*1	3.7
投与 14 日目	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	1.5*2

NS：標本を採取していない

＊1：1 例のデータ

＊2：2 例のデータ

＊3：標準偏差が 794.1

イヌ 14 日間反復投与毒性試験（続き）

被験物質：グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）

用量（U/kg/日）	0（対照）		50		500		2,500	
動物数（例）	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3
血液生化学的検査								
トリグリセリド（mg/dL）								
投与 11 日目	NS	NS	NS	NS	103.0*1	NS	52.0*1	NS
投与 12 日目	18.3	25.0	14.7	14.7	28.0*2	18.3	30.0*1	19.7
投与 14 日目	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	25.0*2
尿検査	－	－	－	－	－	－	－	－
器官重量	－	－	－	－	－	－	－	－
剖検所見（例）								
肺								
変色	0	0	0	0	1	0	2	0
胃								
粘膜赤色化	0	0	0	0	1	0	2	1
小腸								
粘膜赤色化	0	0	0	0	1	2	2	1
大腸								
粘膜赤色化	0	0	0	0	1	0	2	1

－：特記事項なし，NS：標本を採取していない

＊1：1 例のデータ

＊2：2 例のデータ

イヌ 14 日間反復投与毒性試験（続き）

被験物質：グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）

用量（U/kg/日）	0（対照）		50		500		2,500	
動物数（例）	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3
剖検所見（例）								
胆のう								
赤色化	0	0	0	0	0	0	1	0
耳*1								
変色	NA	NA	NA	NA	NA	2	2	1
投与部位*2								
変色	0	0	0	0	1	3	2	1
病理組織学的検査（例）								
肺								
炎症	1	1	2	3	1	0	0	1
うっ血	0	0	0	0	1	0	1	0
出血	0	0	0	0	0	0	1	1
胃								
うっ血	0	0	0	0	1	0	1	0
出血	0	0	0	0	0	0	1	0

NA：実施なし

＊1：500 U/kg/日の雌及び 2,500 U/kg/日の雄は 2 例のデータ，2,500 U/kg/日の雌は 1 例のデータ

＊2：500 U/kg/日の雄は 1 例のデータ，2,500 U/kg/日の雄及び雌は 2 例のデータ

イヌ 14 日間反復投与毒性試験（続き）

被験物質：グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）

用量（U/kg/日）	0（対照）		50		500		2,500	
動物数（例）	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3
病理組織学的検査（例）								
小腸								
うっ血	0	0	0	0	1	2	1	1
出血	0	0	0	0	0	0	1	0
大腸								
うっ血	1	0	0	0	1	1	1	1
出血	0	0	1	1	1	0	1	2
胆のう								
出血	0	0	1	1	1	3	2	2
精巣								
未熟	3	NA	3	NA	3	NA	3	NA
リンパ節								
出血	0	0	0	0	1	2	1	0

NA：実施なし

イヌ 14 日間反復投与毒性試験（続き）

被験物質：グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）

用量（U/kg/日）	0（対照）		50		500		2,500	
動物数（例）	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3
病理組織学的検査（例）								
耳*1								
炎症	NA	NA	NA	NA	NA	1	2	1
うっ血	NA	NA	NA	NA	NA	2	1	0
出血	NA	NA	NA	NA	NA	0	1	0
投与部位*2								
炎症	1	2	1	1	0	1	1	0
出血	2	1	0	2	1	3	2	1

NA：実施なし

＊1：500 U/kg/日の雌及び 2,500 U/kg/日の雄は 2 例のデータ，2,500 U/kg/日の雌は 1 例のデータ

＊2：500 U/kg/日の雄は 1 例のデータ，2,500 U/kg/日の雄及び雌は 2 例のデータ

2.6.7.8 *In Vitro* 遺伝毒性試験

実施していない.

2.6.7.9 *In Vivo* 遺伝毒性試験

実施していない.

2.6.7.10 がん原性試験

実施していない.

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

実施していない.

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

実施していない.

2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

実施していない.

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

実施していない.

2.6.7.15 局所刺激性試験

ラット 3 日間反復投与毒性試験及びイヌ 14 日間反復投与毒性試験の結果から評価した．グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）の局所刺激性はなく，忍容性は良好であった.