サノフィ株式会社

オリプダーゼ アルファ（遺伝子組換え）

CTD 第二部 ー 非臨床概要

2.6.6 毒性試験の概要文

Total number of pages: 81

目　　次

表 目 次

図　目　次

略号と用語の定義

ADA： 抗薬物抗体、抗オリプダーゼ アルファ抗体（Anti-drug antibody）
ALP： アルカリホスファターゼ（Alkaline phosphatase）
ALT： アラニンアミノトランスフェラーゼ（Alanine aminotransferase）
ASMD： 酸性スフィンゴミエリナーゼ欠損症（Acid sphingomyelinase deficiency）
ASMKO： 酸性スフィンゴミエリナーゼノックアウト（Acid sphingomyelinase knockout）
AST： アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（Aspartate aminotransferase）
AUC： 曲線下面積（Area under the curve）
CL： クリアランス（Clearance）
C_{max}： 最高濃度（Maximum concentration）
DNA： デオキシリボ核酸（Deoxyribonucleic acid）
DPH： ジフェンヒドラミン（Diphenhydramine）
EDTA： エチレンジアミン四酢酸（Ethylenediamine tetra-acetic acid）
F0： 妊娠／授乳雌（Pregnant/lactating female）
F1： 出生児（Offspring）
GD： 妊娠日数（Gestation Day）
GGT： ガンマーグルタミルトランスフェラーゼ（Gamma-glutamyl transferase）
GLP： 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（Good Laboratory Practices）
H&E： ヘマトキシリン・エオジン（Hematoxylin and eosin）
HMW-rhASM： 高分子量体オリプダーゼ アルファ（High molecular weight-olipudase alfa）
HMWS： 高分子量体（High molecular weight species）
ICH： 医薬品規制調和国際会議（International council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use）
IP： 腹腔内（Intraperitoneal）
IV： 静脈内（Intravenous）
LD： 授乳日数（Lactation Day）
MRT： 平均滞留時間（Mean residence time）
NAC： N-アセチル L-システイン（N-acetyl L-cysteine）
NBF： 中性緩衝ホルマリン液（Neutral buffered formalin）
NOAEL： 無毒性量（No observable adverse effect level）
NOEL： 無影響量（No-observable-effect-level）
NZW： ニュージーランドホワイト（New Zealand White）

PND： 出生後日数（Postnatal day）
rhASM： 遺伝子組換えヒト酸性スフィンゴミエリナーゼ
SAA： 血清アミロイド A（serum amyloid A）
SAM： S-アデノシルメチオニン（S-adenosylmethionine）
SAP： 血清アミロイド P（Serum amyloid P）
SC： 皮下（Subcutaneous）
SD： Sprague-Dawley
$t_{1/2}$： 半減期（Half-life）
t_{max}： 最高濃度到達時間（Time to maximal concentration）
TK： トキシコキネティクス（Toxicokinetic）
TNF： 腫瘍壊死因子
TUNEL： 末端ウリジンデオキシヌクレオチド転移酵素ニック末端標識（Terminal uridine deoxynucleotidyl transferase nick end labeling）

1　まとめ

オリプダーゼ アルファ（遺伝子組み換え）（以下、オリプダーゼ アルファ）の非臨床毒性試験を実施し、本薬の臨床開発を支持するための包括的安全性評価を行った（表 1）。

オリプダーゼ アルファの非臨床試験は、医薬品規制調和国際会議（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」、ICH S7A「安全性薬理試験ガイドライン」、ICH S5A S5(R2)「医薬品毒性試験法ガイドラインの改定（[3]生殖発生毒性試験）」及び FDA ドラフトガイダンス「Investigational Enzyme Replacement Therapy Products: Nonclinical Assessment（治験用酵素補充治療薬：非臨床評価）（2015）」を踏まえて計画した。本資料を通して、一般名であるオリプダーゼ アルファ（国際一般名：Olipudase alfa）を使用しており、本申請に関する資料及び試験報告書では、GZ402665 又は遺伝子組換えヒト酸性スフィンゴミエリナーゼ（rhASM）と称されている。

In vivo 毒性試験に用いる動物種は、BALB/c マウス、C57BL/6 マウス、CD-1 マウス、Sprague Dawley（SD）ラット、ニュージーランドホワイト（NZW）ウサギ、ビーグル犬及びカニクイザルとした。これらの動物種は、それぞれの毒性試験で標準的に利用されていること、頑健な背景データベースがあること、並びに細胞にオリプダーゼ アルファを取り込みライソゾームへ輸送させるマンノース受容体及びマンノース-6-リン酸受容体が存在しているため薬理学的に意義があると考えられること、との事実に基づいて選択した。酸性スフィンゴミエリナーゼ欠損症（ASMD）患者への生涯投与を支持するための投与法は、単回投与から最長 6 か月間の隔週投与まで多岐に渡った。BALB/c マウス、C57BL/6 マウス、CD-1 マウス、SD ラット、NZW ウサギ、ビーグル犬及びカニクイザルで実施した試験において、オリプダーゼ アルファの忍容性は良好であり、有害な所見は特定されなかった。

オリプダーゼ アルファの毒性評価には、上記に示した標準的な非臨床試験動物種に加え、酸性スフィンゴミエリナーゼノックアウト（ASMKO）マウスモデルも用いた。ASMKO マウスモデルは、疾患の神経障害型と非神経障害型の中間的な表現型を有する ASMD の生化学的モデルであり、ヒト疾患における ASMD A/B 型の表現型に最も近く、ASMD の検討及び治療効果の評価に利用可能である(1)(2)。ASMKO マウスは臨床と同様の標的器官に蓄積した基質（すなわちスフィンゴミエリン）をオリプダーゼ アルファが減少させる作用を評価する予測モデルとして用いられており(3)、またオリプダーゼ アルファの安全性を評価するモデルとしても用いられている(4)。ASMKO マウスは Massachusetts 州にある Sanofi（旧 Genzyme Corporation）研究所付近の施設で作製され、動物は試験に使用するために研究所まで短距離の輸送が行われた。特記しない限り、試験開始時に 8～10 週齢の劣性ホモ $ASMKO^{-/-}$ マウスを用いた。このマウスモデルは、毒性作用が認められた唯一の動物種であった。

ICH ガイドラインの定義による重要な毒性試験は、1 試験を除き、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）を遵守して実施した。重要な試験であるマウスを用いた 13 週間試験 [redacted]

00262 試験] は保健医療当局の要請により実施したが、使用した ASMKO マウスは動物の脆弱性のため遠方の GLP 試験委託研究機関まで輸送することができなかったことから、既に GLP 体制を閉鎖していた Sanofi（旧 Genzyme）研究所にて非 GLP 下で実施した。ただし、当該試験は標準的社内手順に従って実施し、試験の信頼性に影響を及ぼすような不測の事態はなかった。試験実施中に記録された逸脱は軽微であり、試験の完全性及び解釈に有害な影響を及ぼさないと考えられた。

オリプダーゼ アルファの毒性試験の一覧を表 1に示す。

表 1 - 毒性試験プログラム

動物種又は試験系	試験の種類及び期間	オリプダーゼ アルファ投与量又は投与濃度	使用ロット（Process）	投与経路	投与頻度	試験番号
単回投与毒性試験						
BALB/c マウス	探索的単回 IV 投与（非 GLP）	0、4、8、12 mg/kg	[redacted] 初期製法*	IV ボーラス	単回投与	[redacted]-0032Pnp
BALB/c マウス	探索的単回 IV 投与（非 GLP）	0、4、8、12 mg/kg	[redacted] 初期製法*	IV ボーラス	単回投与	[redacted]-0024Pnp
C57BL/6 マウス	探索的単回 IV 投与（非 GLP）	無処置、75 mg/kg	[redacted] 初期製法*	IV ボーラス	単回投与	[redacted]-0976Pnp
Sprague Dawley ラット	単回 IV 投与（GLP）	0、3、10、30 mg/kg	[redacted] 初期製法*	IV ボーラス	単回投与	[redacted]025 ([redacted]-0622Pnp TK)
ASMKO マウス	探索的単回 IV 投与（非 GLP）	30 mg/kg	[redacted] 初期製法*	IV ボーラス	単回投与	[redacted]-0788Pnp
ASMKO マウス	探索的単回 IV 投与（非 GLP）	10、20 mg/kg	[redacted] 初期製法*	IV ボーラス	単回投与	[redacted]-0047Pnp
C57BL/6 マウス及び ASMKO マウス	探索的単回 IV 投与（非 GLP）	0、3、10 mg/kg	[redacted] 初期製法*	IV ボーラス	単回投与	[redacted]-0025Pnp
ASMKO マウス	探索的単回 IV 投与（非 GLP）	0、0.1、0.3、1 mg/kg	[redacted] 初期製法*	IV ボーラス	単回投与	[redacted]-0158Pnp
ASMKO マウス	探索的単回 IV 投与（非 GLP）	無処置、10、20、30 mg/kg	[redacted] 初期製法*	IV ボーラス	単回投与	[redacted]-0975Pnp
ASMKO 及び C57BL/6 マウス	探索的単回 IV 投与（非 GLP）	0、20 mg/kg	[redacted] 初期製法*	IV ボーラス	単回投与	[redacted]-1329

＊新薬承認情報提供時に置換

2.6.6 毒性試験の概要文
オリプダーゼ アルファ（遺伝子組換え）

動物種又は試験系	試験の種類及び期間	オリプダーゼ アルファ投与量又は投与濃度	使用ロット（Process）	投与経路	投与頻度	試験番号
ASMKO マウス	探索的単回 IV 投与（非 GLP）	無処置、3、10 mg/kg	[redacted]初期製法*	IV ボーラス	単回投与	[redacted]-0836Pnp
ASMKO マウス	探索的単回 IV 投与（非 GLP）	0、0.1、0.3 mg/kg	[redacted]初期製法*	IV ボーラス	単回投与	[redacted]-0060Pnp
ASMKO マウス	探索的単回 IV 投与（非 GLP）	140 mg/kg NAC（投与前） 20 mg/kg オリプダーゼ アルファ 70 mg/kg NAC（投与後 6 時間ごと）	[redacted]初期製法*	NAC – IP オリプダーゼ アルファ – IV ボーラス	単回投与	[redacted]-0870Pnp
ASMKO マウス	探索的単回 IV 投与（非 GLP）	20 mg/kg オリプダーゼ アルファ＋ 165 mg/kg SAM（n=12） 20 mg/kg オリプダーゼ アルファ＋ 140 mg/kg NAC、その後 70 mg/kg NAC（n=12）	[redacted]初期製法*	NAC、SAM – IP オリプダーゼ アルファ – IV ボーラス	単回投与	[redacted]-0839Pnp
ASMKO マウス	探索的単回 IV 投与（非 GLP）	無処置、10、20 mg/kg	[redacted]初期製法*	IV ボーラス	単回投与	[redacted]-0058Pnp
ASMKO マウス	探索的単回 SC 投与（非 GLP）	無処置、30 mg/kg	[redacted]初期製法*	SC	単回投与	[redacted]-0741Pnp
ASMKO マウス	単回 IV 投与（GLP）	0、0.03、0.1、0.3 mg/kg	[redacted]初期製法*	IV ボーラス	単回投与	[redacted]041
ビーグル犬	単回 IV 投与（GLP）	0、3、10、30 mg/kg	[redacted]初期製法*	IV ボーラス	単回投与	[redacted]026 [redacted]-0623Pnp TK)
反復投与毒性試験						
Sprague Dawley ラット	26 週間 IV 投与（GLP）	0、3、10、30 mg/kg	[redacted]初期製法*	IV ボーラス	QOW、26 週間	[redacted]027 [redacted]-0604Pnp TK)
ASMKO マウス	12 週間 IV 投与（GLP）	0、0.3、1.0、3.0 mg/kg	[redacted]初期製法*	IV ボーラス	QOW、12 週間	[redacted]005
ASMKO マウス	13 週間 IV 投与（GLP）	0、0.3、1、3 mg/kg	[redacted]初期製法*	IV ボーラス	QOW、12 週間	[redacted]031

＊新薬承認情報提供時に置換

2.6.6 毒性試験の概要文
オリプダーゼ アルファ（遺伝子組換え）

動物種又は試験系	試験の種類及び期間	オリプダーゼ アルファ投与量又は投与濃度	使用ロット（Process）	投与経路	投与頻度	試験番号
ASMKO マウス	探索的反復 IV 投与（非 GLP）	5 mg/kg	[redacted] 初期製法*	IV ボーラス	Q2H、6 時間	[redacted]-0506Pnp
ASMKO マウス	探索的反復 IV 投与（非 GLP）	1 日目：3 mg/kg 6 日目：0、20、30 mg/kg	[redacted] 初期製法*	IV ボーラス	1 及び 6 日目	[redacted]-0099Pnp
ASMKO マウス	探索的反復 IV 投与（非 GLP）	1 日目：3 mg/kg 8 日目：10 mg/kg 6 日目：30 mg/kg	[redacted] 初期製法*	IV ボーラス	1、6、8 日目	[redacted]-0505Pnp
ASMKO マウス	探索的反復 IV 投与（非 GLP）	1 日目：3 mg/kg 3 日目：20 mg/kg	[redacted] 初期製法*	IV ボーラス	1 及び 3 日目	[redacted]-1239Pnp
ASMKO マウス	探索的反復 IV 投与（非 GLP）	1、4、6、8 日目：3 mg/kg 11 日目：20 mg/kg	[redacted] 初期製法*	IV ボーラス	1、4、6、8、11 日目	[redacted]-0889Pnp
ASMKO マウス	探索的 13 週間 IV 投与（非 GLP）	1、3、5、7 日目：3 mg/kg 続いて 13 週間：3、10、30 mg/kg	[redacted] 初期製法*	IV ボーラス	1、3、5、7 日目 その後 QOW、13 週間	[redacted]-00262
ASMKO マウス	探索的反復 IV ボーラス投与（非 GLP）	3 mg/kg（用量漸増相）：オリプダーゼ アルファ QOD、毎週、QOW 20 mg/kg（投与相）：DPH	[redacted] 初期製法*	IV ボーラス	QOD、毎週、QOW	[redacted]-03293
カニクイザル	26 週間 IV 持続投与（GLP）	0、3、10 又は 30 mg/kg オリプダーゼ アルファ	[redacted] 初期製法*	IV 持続	QOW、26 週間	[redacted]007

＊新薬承認情報提供時に置換

動物種又は試験系	試験の種類及び期間	オリプダーゼ アルファ投与量又は投与濃度	使用ロット（Process）	投与経路	投与頻度	試験番号
生殖発生毒性試験						
CD-1 マウス	受胎能（GLP）	0、0、3.16、10、30 mg/kg	[redacted] 製法B*	IV ボーラス	交配前は隔日（雄 4 週間、雌 2 週間）、同居期間及び GD 7 まで	FER0510
CD-1 マウス	胚・胎児発生（GLP）	0、0、3、10、30 mg/kg	[redacted] 製法B*	IV ボーラス	GD 6～15 に 1 日 1 回	TER0694
CD-1 マウス	出生前及び出生後の発生（GLP）	0、0、3.16、10、30 mg/kg	[redacted] 製法B*	IV ボーラス	GD6～LD19/20 に隔日	DPN0380
NZW ウサギ	胚・胎児発生（GLP）	0、0、3、10、30 mg/kg	[redacted] 申請製法*	IV 持続	GD6～19 に 1 日 1 回	TER0698
その他の試験						
ヒト全血を用いた *in vitro* 溶血性試験	ヒト全血 1 時間曝露毒性試験（GLP）	1.1 mg/mL	[redacted] 初期製法*	NA	NA	[redacted]009
ASMKO マウス	探索的単回 IV 投与毒性試験（非 GLP）	20 mg/kg	[redacted] 初期製法*	IV ボーラス	単回投与	[redacted]-0372Pnp
ASMKO マウス	探索的単回 IV 投与毒性試験（非 GLP）	3、10 mg/kg	[redacted] 初期製法* [redacted] 製法A*	IV ボーラス	単回投与	[redacted]02784

略号：IV=静脈内、GLP=医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準、TK=トキシコキネティクス、NAC=N-アセチル-L-システイン、DPH=ジフェンヒドラミン、SAM=S-アデノシル-L-メチオニン、SC=皮下、IP=腹腔内、GD=妊娠日数、LD=授乳日数、QOD=隔日、QOW=隔週、Q2H=2 時間ごと、NA=該当せず

オリプダーゼ アルファは主に rhASM 単量体（約 76 kD）、及び少量のオリプダーゼ アルファの高分子量体オリプダーゼ アルファ（HMW-rhASM）で構成される。高分子量体（HMWS）のうち主なものは、見かけの分子量が 140 kD の、オリプダーゼ アルファのジスルフィド結合二量体に相当する分子である。高度に精製された調製液中に高分子量体の rhASM が認められることは、見かけの分子量が大きい組織由来酸性スフィンゴミエリナーゼ（170～290 kD）が存在し、これは緩衝液又は分析

＊新薬承認情報提供時に置換

条件に関連する可能性があるとの文献報告(5)(6)(7)に一致している。これらの製剤関連物質が及ぼす影響を評価する非臨床試験を実施した。

オリプダーゼ アルファは、20 mmol/L リン酸ナトリウム、5%精製白糖、100 mmol/L メチオニン、0.1 mmol/L エチレンジアミン四酢酸（EDTA）を含有する pH 6.5 の調製液として投与した。非臨床試験の際には、上記と同じ 20 mmol/L リン酸ナトリウム、5%精製白糖、100 mmol/L メチオニン、0.1 mmol/L EDTA を含有する溶媒（pH 6.5）でストック溶液を希釈した。オリプダーゼ アルファの初期ロット（ロット[redacted]及び[redacted]［初期製法*］）は、0.06%ポリソルベート 80 も含有する上述の調製液で希釈した。しかし、その他の全てのロット（[redacted]、[redacted]、[redacted]、[redacted]及び[redacted]）では溶媒からポリソルベート 80 を除いた。

単回及び反復投与毒性試験では、臨床投与経路である静脈内（IV）投与で評価した。また、1 件の試験では単回皮下（SC）投与で評価した。非臨床試験で評価した添加剤の濃度及びオリプダーゼ アルファの濃度は、臨床試験での濃度と同等又はそれ以上であった。

重要な毒性試験における用量は、入手可能なデータに基づいて設定した。高用量は、オリプダーゼ アルファの初期のバッチでは、オリプダーゼ アルファ濃度に基づく最大投与可能用量を設定し、その後のバッチでは、臨床で使用予定の高用量と比較して 10 倍の安全係数が得られる用量を設定した。予定最高臨床用量を低用量として設定した。

入手可能な場合は、雌雄同数の動物で評価した。ただし ASMKO マウスの試験では、マウスの齢、交尾能、繁殖計画（ヘテロ接合対ヘテロ接合）及び必要な動物数から、雌雄同数の動物で試験できないことがあった。

オリプダーゼ アルファへの過敏性反応が、マウス及びラットに反復投与したときに最も顕著に認められ、投与前後にジフェンヒドラミン（DPH）の腹腔内（IP）投与を要した。DPH が必要となる可能性のある重要な毒性試験では、しばしば DPH 対照群を追加した。この場合、DPH 対照群には生理食塩液の IV 投与と DPH の IP 投与、溶媒対照群には溶媒の IV 投与と生理食塩液の IP 投与を行い、被験物質投与群にはオリプダーゼ アルファの IV 投与及び DPH の IP 投与を行った。

ASMKO マウスの単回投与毒性試験では、オリプダーゼ アルファを 10 mg/kg 以上の用量で急速 IV ボーラス投与したところ死亡が生じた。一般状態所見（嗜眠、接触時冷感、移動を嫌がる）と合わせて病理組織学的検査で副腎に出血が認められたことから、低血圧性ショックが死因である可能性が示唆された。これらの所見は、蓄積したスフィンゴミエリンの異化代謝産物であるセラミド、スフィンゴシン及びスフィンゴシン 1-リン酸の血清中濃度の増加を伴って発現した。サイトカイン及び急性期タンパク質などの炎症性物質の血清中濃度も増加した。病理組織学的検査では肝臓及び副腎の双方で用量依存的な所見が観察され、肝臓及び副腎では限局的な壊死及びアポトーシスが、副腎では出血も認められた。同程度の用量のオリプダーゼ アルファを BALB/c マウス、C57BL/6 マウス、ラット、イヌ及びサルに投与しても毒性所見がみられなかったことから、ASMKO マウスで認められた用量依存的な毒性所見は基質の分解速度及び量に起因する可能性が示唆された。

ASMKO マウスで認められた毒性にスフィンゴミエリン異化代謝産物の急速な蓄積が関与するとの仮説を検証するため、また本動物種で毒性機序を探索するよう保健医療当局から要請があったことに

＊新薬承認情報提供時に置換

基づき、用量を徐々に増加させることによりスフィンゴミエリンの減少がより緩やかになり、オリプダーゼ アルファの高用量単回投与で認められた毒性が抑制されるか否かを検討する試験を実施した。ASMKO マウスに 3 mg/kg のオリプダーゼ アルファを隔日で 4 回 IV 投与し、その 72 時間後に 20 mg/kg を単回 IV 投与したところ、死亡は認められず、その他の毒性所見も重症度が低下した。また、本用法により血清中のサイトカイン及びセラミド濃度の上昇が抑制された。オリプダーゼ アルファ（3 mg/kg）を隔日ではなく週 1 回投与してから 20 mg/kg の用量をボーラス投与しても、オリプダーゼ アルファの忍容性は良好であった。さらに、ASMKO マウスに 3 mg/kg のオリプダーゼ アルファを隔日で 4 回 IV 投与した後、3、10 又は 30 mg/kg の用量を隔週で 13 週間（計 7 回）IV 投与した試験では、オリプダーゼ アルファの忍容性は良好であり、無毒性量（NOAEL）は 30 mg/kg であった。ASMKO マウスと ASMD 患者を対象とした臨床試験では用量漸増の方法に差があったものの（それぞれ隔日投与又は隔週投与）、ASMKO マウス及び臨床試験の結果から、用量漸増の忍容性はいずれも良好であることが示されている。

ASMKO マウスは一般毒性試験で使用する動物種の中で最も感受性が高いが、生殖発生毒性試験における ASMKO マウスの使用は、本モデルに固有の問題（同腹児数が少ない、出生児数が少ない、精子運動性が低い、精子の形態上の問題、2～4 か月齢までに運動失調及び神経系の欠陥）のためこのマウスを用いることができなかった。したがって、生殖毒性試験は CD-1 マウス及び NZW ウサギを用いて実施した。

CD-1 マウス及び NZW ウサギを用いた生殖発生毒性試験において、オリプダーゼ アルファは評価した最高用量（30 mg/kg）でも有害作用を及ぼさなかった。

要約すると、ASMKO マウス、CD-1 マウス、BALB/c マウス、C57BL/6 マウス、SD ラット、NZW ウサギ、ビーグル犬及びカニクイザルの毒性試験は、臨床で ASMD 患者に 3 mg/kg までのオリプダーゼ アルファを用量漸増法で投与しても安全であることを支持した。幼若動物を用いた毒性試験は、ASMKO マウスではこの試験に必要な評価が困難であるため実施しなかった。オリプダーゼ アルファは酵素補充療法の薬剤であるため、遺伝毒性、がん原性、薬物乱用性を評価する試験は必要とされなかった。生殖発生毒性試験で所見がみられなかったことから、妊娠可能な女性に対してもオリプダーゼ アルファの投与が支持される。

2　単回投与毒性試験

非臨床単回投与試験を、BALB/c マウス、C57BL/6 マウス、SD ラット、ビーグル犬及び ASMKO マウスなど複数の動物種で実施した。全体として、評価した全ての動物種でオリプダーゼ アルファ（75 mg/kg まで）の忍容性は良好であったが、ASMKO マウスでは 10 mg/kg 以上の単回投与により急性毒性が認められた。

2.1　げっ歯類－BALB/c マウス、C57BL/6 マウス及び SD ラット

2.1.1　BALB/c マウスを用いた探索的単回投与毒性試験

Module 2.6.7 [表 2.6.7.5]、[redacted]-0032Pnp 試験及び [redacted]-0024Pnp 試験

オリプダーゼ アルファ及びオリプダーゼ アルファ高分子量体を単回投与するときの最大耐量を決定するための探索的試験を実施した。

約 6～8 週齢の雄 BALB/c マウスを試験群（各群 5 匹）に無作為に割り付け、オリプダーゼ アルファ又は HMWS オリプダーゼ アルファを 0（溶媒対照）、4、8 又は 12 mg/kg の用量で単回 IV ボーラス投与した。後の試験ではより高い用量（30 mg/kg）を採用したが、開発初期段階においてオリプダーゼ アルファの濃度に基づく実施可能な最高用量は 12 mg/kg であった。

全例について、投与後に死亡及び病的状態の有無を観察した。血液学的検査及び血液生化学的検査用の血液を採取した。

これらの試験で死亡は認められず、血液学的検査及び血液生化学的検査の評価パラメータにおいて被験物質に関連する変化はなかった。オリプダーゼ アルファの最大耐量は、最高投与量（実施可能な最高用量）である 12 mg/kg であった。

2.1.2　C57BL/6 マウスを用いた探索的単回投与毒性試験

Module 2.6.7 [表 2.6.7.5]、[redacted]-0976Pnp 試験

ASMKO マウスの背景系統である正常な C57BL/6 マウスに高用量のオリプダーゼ アルファを単回投与したときの影響を検討する探索的試験を実施した。以前に C57BL/6 マウスにオリプダーゼ アルファを 10 mg/kg までの用量で単回投与したところ、評価したパラメータに基づくと毒性は認められなかった（Module 2.6.7 [表 2.6.7.5]、[redacted]-0025Pnp 試験参照）。

雌 C57BL/6 マウスを 2 群に分けた。第 1 群は無処置対照（1 匹）とし、第 2 群（5 匹）にはオリプダーゼ アルファを 75 mg/kg の用量で単回 IV ボーラス投与した。

試験期間中（8 日間）、死亡及び被験物質に関連する一般状態所見は認められなかった。したがって、一般状態所見に基づくと、C57BL/6 マウスにオリプダーゼ アルファを 75 mg/kg の用量で単回投与したときの忍容性は良好であった。

2.1.3 Sprague Dawley ラットを用いた単回投与毒性試験

Module 2.6.7 [表 2.6.7.5]、[redacted]025 試験

毒性試験の標準的な動物種である SD ラットを用いた GLP 適用単回投与急性毒性試験を実施し、オリプダーゼ アルファを IV 投与したときの安全性を評価した。

雌雄 SD ラットを 4 群（10 匹／性別／群）に分け、オリプダーゼ アルファを 0（溶媒対照）、3、10 又は 30 mg/kg の用量で単回 IV ボーラス投与した。投与 15 日後に全例を剖検した。

オリプダーゼ アルファの毒性評価項目は、生死、一般状態観察、体重、臨床病理学的検査（血液学的検査、血液凝固系検査及び血液生化学的検査は最終剖検前の 15 日目に全群から採取した試料を用いて評価）、トキシコキネティクス（TK）パラメータ（Module 2.6.7 [表 2.6.7.5]、[redacted]-0622Pnp 試験参照）及び解剖病理学的検査（肉眼観察、肉眼病変の病理組織学的検査及び器官重量）とした。

雌雄ラットにおける TK パラメータを表 2に示す。詳しい結果は Module 2.6.4 薬物動態の概要文の [4.1.7 項] にも記載する。血清中オリプダーゼ アルファ濃度は検討した用量それぞれで、IV ボーラス投与後の 1 日目に単相性の推移を示し、経時的に低下した。雌雄ラットの TK パラメータは、投与量で正規化した曲線下面積（AUC）、すなわち AUC／投与量から評価したところ線形性を示した。30 mg/kg までの用量を単回投与したときクリアランスは一次過程に従っていたことから、飽和のエビデンスはなかった。これらの評価から、投与を受けた動物は毒性評価が可能な量のオリプダーゼ アルファに曝露されていたことが確認された。

表 2 - オリプダーゼ アルファを雌雄 SD ラットに単回投与後のトキシコキネティクスパラメータ

（n=10/性/群、Mean±SD）

パラメータ	3 mg/kg 雌	3 mg/kg 雄	10 mg/kg 雌	10 mg/kg 雄	30 mg/kg 雌	30 mg/kg 雄
C_{max} (µg/mL)[a]	70.47 ± 7.76	78.80 ± 10.66	278.40 ± 42.09	260.53 ± 72.23	536.73 ± 45.12	562.73 ± 51.21
$t_{1/2\beta}$ (hr)	1.13 ± 0.60	1.54 ± 0.80	1.31 ± 0.56	1.53 ± 0.71	1.125 ± 0.44	2.69 ± 2.95
AUC (µg•hr /mL)	123.05 ± 7.05	*161.98 ± 27.91	473.12 ± 84.56	530.03 ± 80.93	967.78 ± 147.70	1711.32 ± 1096.05
AUC/投与量 (µg•hr/mL/mg/kg)	41.02 ± 2.35	53.99 ± 9.30	47.31 ± 8.46	53.00 ± 8.09	32.26 ± 4.92	57.04 ± 36.54

略号：C_{max}=最高血中濃度、$t_{1/2\beta}$=終末半減期、AUC=無限大時間まで外挿した血清中濃度-時間曲線下面積
*p < 0.05 ：3 mg/kg 雌との比較
a IV ボーラス投与

生死、体重、臨床病理学的検査、肉眼検査及び器官重量において、オリプダーゼ アルファに関連する変化はなかった。投与群のラットの肉眼病変において、被験物質に関連する病理組織学的変化はみられなかった。

以上、SD ラットにオリプダーゼ アルファを 3、10 又は 30 mg/kg の用量で IV ボーラス投与したときの無影響量（NOEL）は、検討した最高用量の 30 mg/kg であった。

2.2 げっ歯類－ASMKO マウス

2.2.1 ASMKO マウスを用いた 30 mg/kg 単回投与探索的毒性試験

Module 2.6.7 [表 2.6.7.5]、[redacted]-0788Pnp 試験

ASMKO マウスの肺におけるスフィンゴミエリン減少がデバルキング投与法（オリプダーゼ アルファを維持量投与前 1 週間に反復投与する漸増投与法）により改善するか否かを検討する探索的試験を実施した。

雌 ASMKO マウス 15 匹を 5 群に分け、スフィンゴミエリン濃度測定用の無処置対照群又はオリプダーゼ アルファ投与群のいずれかとして用いた（表 3）。本試験は当初反復投与試験としてデザインしたが、最終的な投与回数は 1 回のみであった。

表 3 - [redacted]-0788Pnp 試験の当初のデザイン

群番号	動物数 雄／雌	被験物質	投与量 (mg/kg)	用法	投与経路
1	0/3	NA	無処置対照	対照群、投与前に組織を採取	NA
2	0/3	NA	無処置対照	対照群、試験終了時に組織を採取	
3	0/3	オリプダーゼ アルファ	30、10、3 mg/kg	1 日目に 30 mg/kg 4 日目に 10 mg/kg 8 日目に 3 mg/kg 最終投与 24 時間後に剖検	IV
4	0/3		30、10、3 mg/kg	1 日目に 30 mg/kg 4 日目に 10 mg/kg 8 日目以降、3 mg/kg を毎週 8 週間 最終投与 72 時間後に剖検	
5	0/3		30、10、3 mg/kg	1 日目に 30 mg/kg 4 日目に 10 mg/kg 8 日目以降、3 mg/kg を隔週で 8 週間 最終投与 72 時間後に剖検	

略号：IV=静脈内、NA=該当せず

オリプダーゼ アルファの初回投与（30 mg/kg）24 時間後、オリプダーゼ アルファ投与群の全例が死亡して発見された（当初の試験デザインの第 3～5 群、すなわち修正後の試験デザインの第 1 群）。これらの所見について更に理解するため、無処置対照群（当初の試験デザインの第 1 及び 2 群）にオ

リプダーゼ アルファ 30 mg/kg を IV 投与し（修正後の試験デザインの第 2 群）、6 時間観察して一般状態を評価した。修正後の試験デザインを表 4に示す。

表 4 - ■-0788Pnp 試験の修正後のデザイン

群番号	動物数 雄／雌	被験物質	投与量 (mg/kg)	用法	投与経路
1	0/9	オリプダーゼ アルファ	30 mg/kg	単回投与	IV
2	0/6		30 mg/kg	単回投与	IV

略号： IV=静脈内

オリプダーゼ アルファ投与 3 時間後以降、第 2 群の 2 匹で速呼吸を伴う嗜眠がみられ、その後安楽殺した。オリプダーゼ アルファ投与 6 時間後までに、残りの 4 匹中 3 匹で嗜眠がみられ、安楽殺した。一般状態の毒性所見がみられなかった 1 匹も、オリプダーゼ アルファ投与 6 時間後に安楽殺した。1 匹で投与 6 時間後までに一般状態の毒性所見がみられなかった理由は不明である。これらの個体から血液生化学的検査用の血液を採取した。

血清生化学的パラメータを解析したところ、30 mg/kg のオリプダーゼ アルファを投与された動物の数匹でコレステロール並びにアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）が軽度に増加した（測定機器［Vet Ace Clinical Chemistry Analyzer］のリファレンス範囲との比較）。

以上、本試験条件下で ASMKO マウスに 30 mg/kg のオリプダーゼ アルファを IV 投与したところ忍容性がみられず、急性毒性及び死亡に至った。

2.2.2 ASMKO マウスを用いた 10 及び 20 mg/kg 単回投与探索的毒性試験

Module 2.6.7 [表 2.6.7.5]、■-0047Pnp 試験

ASMKO マウスを用いて 10 及び 20 mg/kg のオリプダーゼ アルファの急性毒性をみる探索的試験を実施した。先の試験では、ASMKO マウスに 30 mg/kg のオリプダーゼ アルファを IV ボーラス投与したところ、6 時間以内に死亡に至った（Module 2.6.7 [表 2.6.7.5]、■-0788Pnp 試験参照）。本試験では、より低用量のオリプダーゼ アルファが ASMKO マウスの生存に及ぼす影響を評価した。

雌マウス 4 匹（第 1 群、動物番号 1～4）に 20 mg/kg のオリプダーゼ アルファを IV ボーラス投与し、残りの雌 2 匹（第 2 群、動物番号 5 及び 6）に 10 mg/kg のオリプダーゼ アルファを投与した。

第 1 群（20 mg/kg）の動物番号 1 及び 2 は、オリプダーゼ アルファ投与 24 時間後に死亡して発見された。一方、同群の動物番号 3 及び 4 ではオリプダーゼ アルファ投与 15 及び 17 時間後に一般状態の毒性所見として重度の嗜眠が発現し、その後これらを安楽殺した。10 mg/kg のオリプダーゼ アルファを投与された個体（第 2 群）ではオリプダーゼ アルファ投与 15 及び 21 時間後に一般状態の毒性所見として軽度の嗜眠が発現し、その後これらを安楽殺した。

剖検において、いずれの個体でも肉眼所見はみられなかった。血液生化学的検査（非絶食下）パラメータを解析したところ、オリプダーゼ アルファ 10 及び 20 mg/kg 群ともに、コレステロール、ALT 及び AST が Vet Ace Clinical Chemistry Analyzer のリファレンス範囲に比べ軽度に増加した。

以上、本試験条件下で ASMKO マウスに 10 mg/kg のオリプダーゼ アルファを投与したところ、投与 15 時間後までに軽度の嗜眠が生じた一方で、20 mg/kg を投与したときには投与後 24 時間以内に軽度から重度の嗜眠及び死亡が生じた。すなわち、ASMKO マウスに 10 mg/kg 以上のオリプダーゼ アルファを単回投与したところ、忍容性はみられず急性毒性が生じた。

2.2.3 ASMKO マウス及び C57BL/6 マウス比較探索的単回投与毒性試験

Module 2.6.7 [表 2.6.7.5]、[redacted]-0025Pnp 試験及び [redacted]-0158Pnp 試験

ASMKO マウス及び C57BL/6 マウス（ASMKO マウスの背景系統）の探索的単回投与毒性試験を実施し、溶媒並びに 0.1、0.3、1.0、3.0 及び 10 mg/kg（8～16 匹／群）のオリプダーゼ アルファを単回急速 IV ボーラス投与したときの毒性を評価した。

雌雄 ASMKO マウス及び C57BL/6 マウスを各群 4～8 匹からなる 8 群に分けた。マウス（2～4 匹／群）を投与 24 及び 72 時間後に安楽殺した（表 5及び表 6）。

表 5 - [redacted]-0025Pnp 試験の試験デザイン

群番号	動物数 雄／雌	被験物質	投与量 (mg/kg)	系統	用法	投与経路
1	5/3	溶媒	0 mg/kg	C57BL/6	単回投与	IV
2	4/4	オリプダーゼ アルファ	3.0 mg/kg			
3	4/4		10.0 mg/kg			
4	4/4		20.0 mg/kg[a]			
5	3/3	溶媒	0 mg/kg	ASMKO		
6	4/4	オリプダーゼ アルファ	3.0 mg/kg			
7	4/4		10.0 mg/kg			
8	2/2		20.0 mg/kg[a]			

略号： IV=静脈内

a 第 7 群で早期死亡及び早期安楽死が生じたため、第 4 及び 8 群には 10 mg/kg を投与した。

表 6 - ■-0158Pnp 試験の試験デザイン

群番号	動物数 雄／雌	被験物質	投与量 (mg/kg)	系統	用法	投与経路
1	1/4	溶媒	0 mg/kg	ASMKO	単回投与	IV
2	2/6	オリプダーゼ アルファ	0.1 mg/kg			
3	0/8		0.3 mg/kg			
4	2/6		1.0 mg/kg			

略号： IV=静脈内

全例について死亡及び病的状態の有無を 1 日 1 回モニタリングした。投与前並びに投与 10 及び 60 分後には毒性徴候もモニタリングした。異常所見又は正常徴候を記録した。体重の個別値は投与前に 1 回と剖検前に記録した。各群の半数を投与 24 時間後に、残りの半数を投与 72 時間後に安楽殺した。剖検前に動物の体重を測定し臨床病理学的検査用の血液を採取した。肉眼所見を記録し、所定の組織を採取して保存し、顕微鏡観察した。

C57BL/6 マウスではいずれの個体にも顕著な病理学的所見及び一般状態所見はなかった。ASMKO マウスでは 10 mg/kg 群の 5 匹（雄 3 匹［動物番号 51、52、57］、雌 2 匹［動物番号 55、62］）で計画外死亡が生じ、これに先立ち一般状態所見としてしばしば軽度から重度の嗜眠がみられた。ASMKO マウスでは 3 及び 10 mg/kg 群で顕著な体重減少がみられた。臨床病理学的検査から、オリプダーゼ アルファを 1 mg/kg 以上の用量で投与された ASMKO マウスで、溶媒対照と比べ ALT（2 倍）、AST（7 倍）、胆汁酸（10 倍）及びコレステロール（2 倍）が用量依存的に増加した。

血清試料を用いて、炎症刺激に反応して発現する急性期タンパク質(8) であるマウス血清アミロイド A（SAA）及び血清アミロイド P（SAP）の分析を実施した。この結果、投与 24 時間後に SAA が統計学的有意（溶媒対照との比較で $p<0.05$）かつ用量依存的に増加し、投与 72 時間後までに溶媒対照群のレベルに戻る傾向がみられた（図 1）。SAP も同様に投与 24 時間後に統計学的有意に増加したが、用量依存性はみられなかった（図 2）。SAP の値は投与 72 時間後にも溶媒に比べ有意に増加していたが、この時点ではやや減少していた。

図 1 - ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを 3.0 又は 10.0 mg/kg の用量で投与後の SAA 値

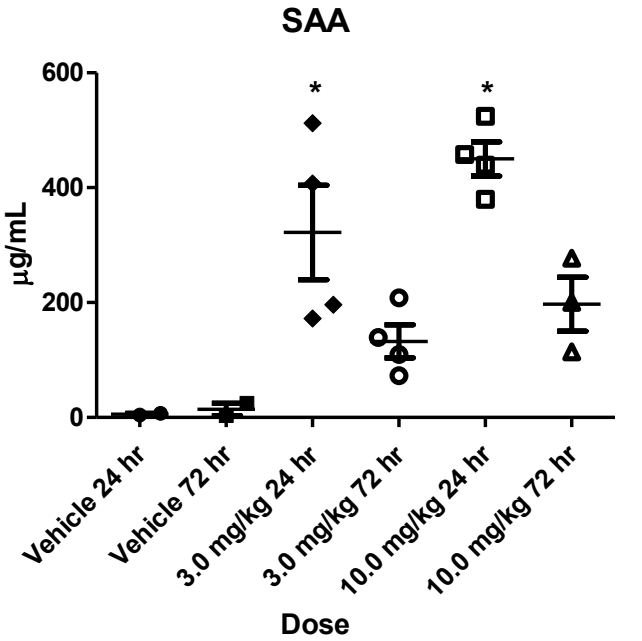
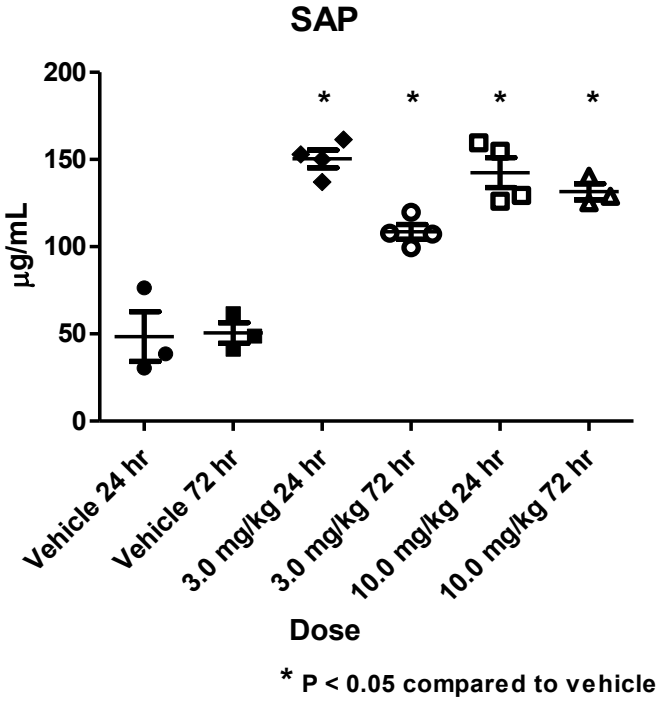


図 2 - ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを 3.0 又は 10.0 mg/kg の用量で投与後の SAP 値



さらに、病理組織学的評価から、オリプダーゼ アルファを投与されたASMKOマウスで、肝臓における肝細胞風船様変性並びに肝臓及び副腎におけるアポトーシスの発現頻度及び重症度が、溶媒を投与されたASMKOマウスに比べ用量依存的に増加した（1 mg/kg以上で肝細胞のアポトーシス及び風船様変性並びに副腎皮質の変性／壊死、0.3 mg/kg以上で副腎のアポトーシス、0.1 mg/kgで肝臓の炎症巣）。10 mg/kg群で副腎に出血がみられた。一般状態所見及び副腎の出血から、低血圧性ショックが死因である可能性が示唆された(9)。

本試験の結果、C57BL/6マウスにオリプダーゼ アルファを単回投与したときのNOAELは10 mg/kgであった。ASMKOマウスにオリプダーゼ アルファを単回投与したときのNOAELは0.3 mg/kgであった。

2.2.4 ASMKOマウスを用いたチオールベース抗酸化剤投与による探索的単回投与毒性試験

Module 2.6.7 [表 2.6.7.5]、[redacted]-0870Pnp試験及び[redacted]-0839Pnp試験

前述のとおり、ASMKOマウスに30又は20 mg/kgのオリプダーゼ アルファを単回IVボーラス投与する探索的試験を実施したところ、重度の急性毒性がみられた（2.2.1項及び2.2.2項；[redacted]-0788Pnp試験及び[redacted]-0047Pnp試験参照）。これらのことから、ASMKOマウスで毒性を検討する一連の追加試験を実施することとした。毒性の発現は急速で動物がショック状態であったことから、毒性発現時点で腫瘍壊死因子α（TNF-α）が関与すると仮定した。ASMKOマウスを用いた2件の単回投与試験を実施し、N-アセチルL-システイン（NAC）をオリプダーゼ アルファの前後に投与したときの影響及びS-アデノシルメチオニン（SAM）をオリプダーゼ アルファの後に投与したときの影響を評価し、ASMKOマウスでTNF-αを介した肝細胞死経路の一部であるグルタチオン枯渇がオリプダーゼ アルファにより生じる可能性について検討した。公表文献によると、ASMKOマウスにおいて、NAC（アセトアミノフェンによる毒性に対し使用される(10)）及びSAM (11)の投与はともに、ミトコンドリアのグルタチオン貯蔵を補充することでTNF-αによる毒性を中和し、これによりミトコンドリアが保護されること及び細胞死が抑制されることが示されている。

[redacted]-0870Pnp試験では、雌雄各1匹のASMKOマウスに140 mg/kgのNACをIP投与し、その30分後に20 mg/kgのオリプダーゼ アルファをIVボーラス投与した。オリプダーゼ アルファの投与6時間後に、70 mg/kgのNACをIP投与した。

[redacted]-0839Pnp試験では、雌雄ASMKOマウス（6匹／時点）に20 mg/kgのオリプダーゼ アルファを単回IVボーラス投与した。その30分後にまず140 mg/kgのNACをIP投与し、更に6時間後に第2回投与として70 mg/kgのNACをIP投与した。また、雌雄ASMKOマウス（6匹／時点）に20 mg/kgのオリプダーゼ アルファを単回IVボーラス投与し、その30分後から165 mg/kgのSAMを1時間ごとに8時間IP投与した（表7）。

表 7 - ■-0839Pnp 試験の試験デザイン

群番号	動物数 雄／雌	被験物質	投与量 (mg/kg)	用法	時点	投与経路
1	3/3	オリプダーゼ アルファ	20 mg/kg	単回投与	48 時間後	IV
		SAM	165 mg/kg	オリプダーゼ アルファ投与 30 分後から 165 mg/kg を最初の 8 時間は 1 時間ごと、その後 8 時間ごとに 24 時間まで投与		IP
2	3/3	オリプダーゼ アルファ	20 mg/kg	単回投与	72 時間後	IV
		SAM	165 mg/kg	オリプダーゼ アルファ投与 30 分後から 165 mg/kg を最初の 8 時間は 1 時間ごと、その後 8 時間ごとに 24 時間まで投与		IP
3	3/3	オリプダーゼ アルファ	20 mg/kg	単回投与	48 時間後	IV
		NAC	140、70 mg/kg	0 時点で 140 mg/kg、6 時間ごとに 48 時間まで 70 mg/kg		IP
4	3/3	オリプダーゼ アルファ	20 mg/kg	単回投与	72 時間後	IV
		NAC	140、70 mg/kg	0 時点で 140 mg/kg、6 時間ごとに 48 時間まで 70 mg/kg		IP

略号： IP=腹腔内、IV=静脈内、SAM=S-アデノシル-L-メチオニン、NAC=N-アセチルシステイン

オリプダーゼ アルファ投与 5～10 時間後、NAC 又は SAM のいずれかを投与したにもかかわらず全例で進行性の嗜眠が生じた。オリプダーゼ アルファ投与 10 時間後に全例を安楽殺した。

本試験条件下で、NAC 及び SAM は 20 mg/kg のオリプダーゼ アルファ投与による毒性を抑制しなかったことから、オリプダーゼ アルファによる毒性にグルタチオン枯渇は関与しないことが示唆された。

2.2.5 ヘテロ接合 ASMKO マウスを用いた探索的単回投与毒性試験

Module 2.6.7 [表 2.6.7.5]、■-0975Pnp 試験

ヘテロ接合 ASMKO$^{+/-}$マウスに 10、20 又は 30 mg/kg のオリプダーゼ アルファを単回投与したときの急性毒性を検討する探索的試験を実施した。本探索的試験では、ホモ接合 AMSKO$^{-/-}$マウスで急性毒性が生じた用量（2.2.1項及び2.2.2項；■-0788Pnp 試験及び ■-0047Pnp 試験参照）をヘテロ接合 ASMK $^{+/-}$マウスに投与すると毒性が変化するか否かを検討した。

雌雄のヘテロ接合 ASMKO$^{+/-}$マウスを各群 5 匹からなる 4 つの群に分けた。第 1 群は無処置対照とし、第 2、3 及び 4 群にはオリプダーゼ アルファをそれぞれ 10、20 及び 30 mg/kg の用量で単回 IV ボーラス投与した。投与後 10 日間マウスを観察した（表 8）。

表 8 - ■-0975Pnp 試験の試験デザイン

群番号	動物数 雄／雌	被験物質	投与量 (mg/kg)	用法	投与経路
1	3/2	NA	NA	NA	NA
2	4/1	オリプダーゼ アルファ	10 mg/kg	単回投与	IV（尾静脈）
3	4/1		20 mg/kg		
4	0/5		30 mg/kg		

略号： IV=静脈内、NA=該当せず

ヘテロ接合 ASMKO$^{+/-}$マウスにオリプダーゼ アルファを 30 mg/kg までの用量で投与しても死亡及び一般状態の毒性所見は生じなかった。一方、同じ用量を劣性ホモ接合 ASMKO$^{-/-}$マウスに投与すると、投与後 4～24 時間以内に死亡することが明らかにされている（2.2.2項参照）。

結論として、ヘテロ接合 ASMKO$^{+/-}$マウスにオリプダーゼ アルファの 30 mg/kg までの用量を投与しても毒性は発現しなかった。

2.2.6 ASMKO マウス及び C57BL/6 マウスを用いた探索的単回投与毒性試験－アポトーシスの評価

Module 2.6.7 [表 2.6.7.5]、■-1329Pnp 試験

本探索試験では ASMKO マウスでのオリプダーゼ アルファによる毒性の機序を調べるため、アポトーシス誘発の有無について検討した。C57BL/6 マウスに同じ用量を投与しても毒性が発現しなかったことから、このマウスを陰性対照に用いた。

雌雄の C57BL/6 マウス及び ASMKO マウス（8～10 週齢、各群 5 匹）にオリプダーゼ アルファ（20 mg/kg）又は溶媒を単回 IV ボーラス投与した。投与 2、6 又は 18 時間後に剖検を実施した。心臓、大動脈、脳、肝臓及び腸を採取及び処理し、ヘマトキシリン・エオジン（H&E）染色又はアポトーシス解析用に末端ウリジンデオキシヌクレオチド転移酵素ニック末端標識（TUNEL）染色した（表 9）。

表 9 - ■-1329Pnp 試験の試験デザイン

群番号	動物数 雄／雌	被験物質	投与量 (mg/kg)	系統	剖検時点	投与経路
1	2/3	溶媒	0 mg/kg	ASMKO	18 時間後	IV
2	3/2	オリプダーゼ アルファ	20 mg/kg		2 時間後	
3	2/3				6 時間後	
4	3/2				18 時間後	
5	3/2	溶媒	0 mg/kg	C57BL/6	18 時間後	
6	2/3	オリプダーゼ アルファ	20 mg/kg		2 時間後	
7	3/2				6 時間後	
8	2/3				18 時間後	

略号： IV=静脈内

オリプダーゼ アルファを投与された ASMKO マウスでは、肝臓内のアポトーシス細胞の割合が他の全ての群に比べ経時的（投与 2、6 及び 18 時間後）に増加した。心臓、大動脈及び肝臓でみられた内皮アポトーシスの程度はまれから軽微であり、統計学的有意な変化ではなく、器官機能を損なうほど重度ではなかった。オリプダーゼ アルファを投与された C57BL/6 マウスでアポトーシスの所見はなかった。

結論として、本試験条件下で、ASMKO マウスではオリプダーゼ アルファ投与後に肝臓でアポトーシスが認められたが、評価したその他の組織では有意な増加はなかった。オリプダーゼ アルファ投与により生じるアポトーシスの程度は、投与後にみられた一般状態所見の重症度に対して重要な役割を果たしてはいないと考えられた。

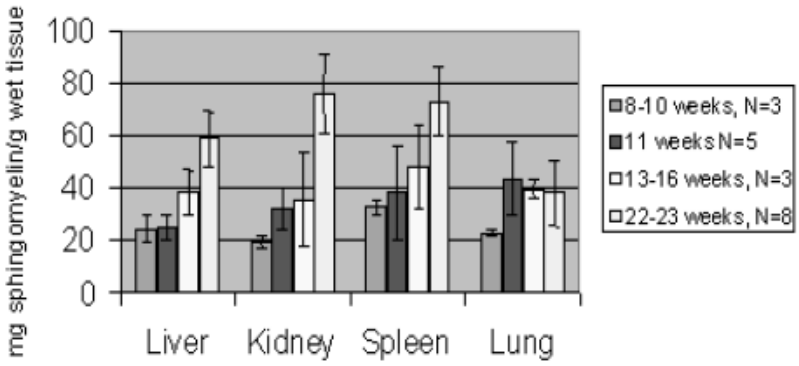
2.2.7 ASMKO マウスを用いた探索的単回投与毒性試験－週齢が毒性に及ぼす影響の評価

Module 2.6.7 [表 2.6.7.5]、■-0836Pnp 試験及び■-0060Pnp 試験

ASMKO マウスでスフィンゴミエリンの蓄積量が増加すると毒性が悪化するか否かをみる探索的試験を実施した。

従来、ASMKO マウスの試験では 8～10 週齢の動物を使用しているが、この週齢では未処置時の基質レベルが低い（図 3）。基質蓄積量と毒性との関連をより深く調べるため、25～28 週齢の ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを投与して毒性を観察した。

図 3 - 様々な週齢の ASMKO マウスから得た肝臓、腎臓、脾臓及び肺組織における未処置時のスフィンゴミエリン濃度



雄 ASMKO マウス 13 匹を 3 群に分け、第 1 及び 2 群（6 匹／群）にオリプダーゼ アルファをそれぞれ 3 及び 10 mg/kg の用量で単回 IV ボーラス投与し、第 3 群（1 匹）には投与せず対照とした（表 10；Module 2.6.7 [表 2.6.7.5]、[redacted]-0836Pnp 試験）。

表 10 - [redacted]-0836Pnp 試験の試験デザイン

群番号	動物数 雄／雌	被験物質	投与量 (mg/kg)	用法	投与経路
1	6/0	オリプダーゼ アルファ	3	単回投与	IV
2	6/0		10		
3	1/0	NA	無処置対照	NA	NA

略号： IV=静脈内、NA=該当せず

これらの高齢動物では、ASMKO マウスの病態により、全例で投与前に軽度の運動失調がみられた。

オリプダーゼ アルファ投与 23 時間後、第 1 群のマウスの一般状態は正常であった。第 2 群では全例が、投与 23 時間後に人道的に安楽殺されるか死亡して発見された。この発現時点は 8～10 週齢の ASMKO マウスに 10 mg/kg のオリプダーゼ アルファを投与した場合（53～72 時間後）より早期であった（2.2.3項、[redacted]-0025Pnp 試験参照）。

本試験の結果に基づくと、スフィンゴミエリン蓄積量が増加していることが知られる高齢の ASMKO マウスでは、スフィンゴミエリン蓄積量が少ない若齢マウスよりも早い時点でオリプダーゼ アルファの毒性が生じた。

次に、オリプダーゼ アルファによる毒性にスフィンゴミエリン蓄積量が及ぼす影響を更に評価するため、22～28 週齢の ASMKO マウスに低用量のオリプダーゼ アルファを投与し、病理組織学的解析を実施した（Module 2.6.7 [表 2.6.7.5]、[redacted]-0060Pnp 試験）。

ASMKO マウス 28 匹を 3 つの群に分けた。第 1 群（8 匹）には溶媒を、第 2 群（10 匹）と第 3 群（10 匹）にはそれぞれ 0.1 mg/kg と 0.3 mg/kg のオリプダーゼ アルファを IV ボーラス投与した。オリプダーゼ アルファ投与の 24 又は 72 時間後に剖検を実施し、病理組織学的解析用に組織（肝臓、脾臓、肺、心臓、腎臓及び副腎）を採取した（表 11）。

表 11 - [redacted]-0060Pnp 試験の試験デザイン

群番号	動物数 雄／雌	被験物質	投与量 (mg/kg)	剖検時点	投与経路
1	3/0	溶媒	0	24 時間後	IV
	2/3		0	72 時間後	
2	3/2	オリプダーゼ アルファ	0.1	24 時間後	
	2/3		0.1	72 時間後	
3	3/2		0.3	24 時間後	
	2/3		0.3	72 時間後	

略号： IV=静脈内

試験期間を通じて一般状態の毒性所見はみられなかった。肝臓の病理組織学的検査において、0.3 mg/kg のオリプダーゼ アルファを投与し 24 又は 72 時間後に剖検した個体で、溶媒又は 0.1 mg/kg のオリプダーゼ アルファを投与した個体に比べ、肝細胞の風船様変性病巣数の平均値が高かった。肝臓の炎症、副腎の出血及び副腎の壊死／アポトーシス病巣の数に、投与群間差及び評価時点間差はなかった。

本試験条件下で、22～28 週齢の ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを投与したところ、0.3 mg/kg 群のみで病理組織学的な影響がみられた。これらの所見は 8～10 週齢のマウスでみられたもの（2.2.3項、[redacted]-0158Pnp 試験参照）と同様である。したがって、22～28 週齢の ASMKO マウスではスフィンゴミエリン蓄積量が増加しているが、低用量（0.1 又は 0.3 mg/kg）投与後の毒性が 8～10 週齢の ASMKO マウスに比べて悪化することはなかった。

2.2.8 ASMKO マウスを用いた探索的単回投与毒性試験－脾臓摘出による評価

Module 2.6.7 [表 2.6.7.5]、[redacted]-0058Pnp 試験

本探索的試験では、脾臓を摘出した ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを単回投与したときの急性毒性を調べた。ASMKO マウスにおける高用量のオリプダーゼ アルファによる急性毒性は、基質の分解速度及び量に起因するとの仮説を立てた。先の試験から、ASMD に関連する基質であるスフィンゴミエリンが ASMKO マウスの脾臓に大量に貯蔵されていることが明らかにされている

（Module 2.6.3 薬理試験概要表 [表 2.6.3.2.1]、[redacted]-0110Pnp 試験、[redacted]-0428Pnp 試験及び [redacted]-0129Pnp 試験参照）。本試験では雄 ASMKO マウスの脾臓を摘出して基質（スフィンゴミエリン）蓄積量を減少させることで、高用量のオリプダーゼ アルファによる急性毒性から保護されるか否かを評価した。

Charles River Laboratories（Wilmington, Massachusetts, USA）で雄 ASMKO マウスの脾臓摘出術を施行した。試験開始前 2 週間、マウスを手術から回復させた。マウスを 3 群に分け、第 1 群（4 匹）は無処置対照とし、また第 2 群（8 匹）に 10 mg/kg、第 3 群（8 匹）に 20 mg/kg のオリプダーゼ アルファを IV ボーラス投与した（表 12）。オリプダーゼ アルファ投与後、全例で最長 96 時間にわたり一般状態の毒性所見が認められた。第 2 及び 3 群の一般状態所見を、第 1 群及び先の試験（2.2.2項及び 2.2.3項、それぞれ [redacted]-0047Pnp 及び [redacted]-0025Pnp 試験参照）で得られた背景データと比較した。

表 12 - [redacted]-0058Pnp 試験の試験デザイン

群番号	動物数 雄／雌	被験物質	投与量 (mg/kg)	投与経路
1	4/0	溶媒	無処置	IV
2	8/0	オリプダーゼ アルファ	10	
3	8/0		20	

略号： IV=静脈内

第 1 群の全例で一般状態は正常であった。10 mg/kg のオリプダーゼ アルファを投与された第 2 群では、試験期間中に軽微な一般状態所見がみられた。1（正常）から 5（死亡）の一般状態所見スコアのうち、48～96 時間後に 8 匹中 2 匹がスコア 2 であったのみで、全例が 96 時間後まで生存した。脾摘していない ASMKO マウスを用いた先の試験では、10 mg/kg のオリプダーゼ アルファ投与により 48～72 時間後までに半数のマウスが死亡した（2.2.3項、[redacted]-0025Pnp 試験参照）。

20 mg/kg のオリプダーゼ アルファを投与された第 3 群では、投与 24 時間後に全例の一般状態所見スコアが 2 又は 3 であった。24 時間後に 2 匹が安楽殺された。48 時間後までに更に 2 匹が死亡して発見されたが、残りのマウスのスコアは 3 であり、その後安楽殺された。脾摘していない ASMKO マウスを用いた先の試験では、20 mg/kg のオリプダーゼ アルファ投与により 24 時間後までに全例が死亡に至った（2.2.2項、[redacted]-0047Pnp 試験参照）。

本試験条件下で、雄 ASMKO マウスにおいて、オリプダーゼ アルファの既知の毒性用量を投与する前に脾臓を摘出したところ、投与量に応じて幾らかの保護作用がみられた。10 mg/kg の用量では、脾摘 ASMKO マウスは全例が 96 時間後まで生存し、致死からの保護作用がみられた。20 mg/kg の用量ではなお急性毒性が認められた。10 mg/kg 群で毒性から保護された若しくは毒性が遅延した理由は、脾摘によりスフィンゴミエリン蓄積量が全体的に減少したためと考えられる。

2.2.9 ASMKO マウスを用いた探索的単回投与毒性試験ー皮下投与による評価

Module 2.6.7 [表 2.6.7.5]、[redacted]-0741Pnp 試験

本探索的試験では、ASMKO マウスに 30 mg/kg のオリプダーゼ アルファを SC 投与したときの急性毒性を調べた。先の試験から、10～30 mg/kg のオリプダーゼ アルファを IV 投与すると嗜眠若しくは死亡に至ることが示されたため（2.2.1項及び2.2.2項、それぞれ ■-0788Pnp 及び ■-0047Pnp 試験参照）、本試験では投与経路が毒性に及ぼす影響を評価した。SC 投与は IV 投与に比べ最高濃度（C_{max}）への到達が遅延かつ低下するためスフィンゴミエリンの蓄積が減少する可能性がある。したがって、SC 投与により、オリプダーゼ アルファの IV 投与による毒性が抑制されると考えられた。

雌 ASMKO マウスを無処置対照（第 1 群、4 匹）とするか、30 mg/kg のオリプダーゼ アルファを SC 投与した（第 2 群、5 匹）（表 13）。動物の毒性徴候を 48 時間モニタリングした。病理組織学的評価用に肝臓、脾臓、腎臓、肺及び副腎を採取した。

表 13 - ■-0741Pnp 試験の試験デザイン

群番号	動物数 雄／雌	被験物質	投与量 (mg/kg)	用法	投与経路
1	0/4	NA	NA	NA	SC
2	0/5	オリプダーゼ アルファ	30	単回投与	

略号： NA=該当せず、SC=皮下

第 1 群（無処置）の一般状態は試験期間を通じて正常であった。第 2 群（オリプダーゼ アルファ投与）の一般状態観察では毒性所見として投与 24 時間後から軽度の嗜眠がみられた。第 2 群の動物では 48 時間後までに軽度から重度の嗜眠がみられ、1 匹が死亡した。

病理組織学的検査では、肝細胞の変性、肝臓の炎症及び肝臓の炎症病巣がみられた。これらの所見の程度は ASMKO マウスを用いたオリプダーゼ アルファの他の試験（2.2.3項、■-0025Pnp 試験参照）と同様であった。30 mg/kg を SC 投与したときにみられた副腎の病変は、■-0025Pnp 試験で 10 mg/kg の用量を IV 投与したときに比べやや軽度であった。ただし、30 mg/kg を IV 投与したとき（2.2.1項、■-0788Pnp 試験参照）、副腎の病変はみられず、これは IV 投与動物の急死、すなわち組織病変が発現する時間がなかった結果であると考えられる。

以上、本試験条件下で ASMKO マウスに 30 mg/kg のオリプダーゼ アルファを SC 投与したところ、一般状態の毒性所見及び病理組織学的所見を伴う急性毒性が生じた。これらは先に IV 投与された動物でみられた所見と同様であった。ただし、30 mg/kg のオリプダーゼ アルファを IV 投与したときには 6 時間以内に急性毒性が発現した（■-0788Pnp 試験）ことと比較すると、毒性の発現がやや遅かった（投与 24～48 時間後）。

2.2.10 ASMKO マウスを用いた単回投与毒性試験

Module 2.6.7 [表 2.6.7.5]、■041 試験

ASMKO マウスを用いた GLP 適用単回投与急性毒性試験を実施し、単回 IV ボーラス投与後のオリプダーゼ アルファの安全性を評価した。

雌雄 ASMKO マウスを体重に基づき 10 匹／性別／群からなる 4 群に割り付けた。第 1 群には溶媒を投与し、第 2～4 群にはオリプダーゼ アルファをそれぞれ 0.03、0.1 又は 0.3 mg/kg の用量で IV ボーラス投与した。5 匹／性別／群を投与 24 時間後に剖検し、残りの 5 匹／性別／群を投与 72 時間後に剖検した（表 14）。

表 14 - ■041 試験の試験デザイン

群番号	動物数 雄／雌		被験物質	投与量 (mg/kg)	用法	投与経路
	24 時間後	72 時間後				
1	5/5	5/5	溶媒	0	単回投与	IV
2	5/5	5/5	オリプダーゼ アルファ	0.03		
3	5/5	5/5		0.1		
4	5/5	5/5		0.3		

略号： IV=静脈内

死亡及び病的状態の有無を 1 日 2 回観察した。さらに、体重、臨床病理学的検査（血液学的検査及び血液生化学的検査）、剖検及び病理組織学的検査のパラメータを評価した。

オリプダーゼ アルファに関連する一般状態所見及び死亡はみられなかった。体重は、いずれの測定時点（24 及び 72 時間後）でも、溶媒投与動物とオリプダーゼ アルファ投与動物との間で統計学的有意差はなかった。

血液学的検査及び血液生化学的検査のパラメータにおいて、被験物質に関連する変化はなかった。統計学的有意な変化が認められたが、背景対照範囲内であり、用量依存性はなく、検体試料の品質不良に起因していた。

剖検において、いずれの時点（24 及び 72 時間後）でもオリプダーゼ アルファに関連する所見はなかった。病理組織学的検査において、0.3 mg/kg 群で 24 時間後に肝臓の炎症病巣が統計学的有意に増加した。72 時間後には炎症病巣の有意でない増加が認められたが、これはある 1 匹での変化に大きく起因していた。この組織学的変化はごく軽度であるため、重要な臨床検査所見であることを示唆するような血液生化学的検査の変化（AST、ALT）を伴うものではなかった。その他の病理組織学的変化は全ての群間で認められ、統計学的有意性がなかった。

肉眼検査、血液生化学的検査、血液学的検査、一般状態観察及び体重のパラメータにおいてオリプダーゼ アルファに関連する変化がなかったことに基づき、ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを IV ボーラス投与したときの NOEL は 0.1 mg/kg であった。病理組織学的所見として肝臓の炎症病巣がごく軽度増加したが、これに関連した、重要な臨床所見であることを示唆するような肝酵素の増加がなかったことから、ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを IV 投与したときの NOAEL は、最高用量である 0.3 mg/kg であった。

2.3 非げっ歯類

2.3.1 ビーグル犬を用いた単回投与毒性試験

Module 2.6.7 [表 2.6.7.5]、[redacted]026 試験

ビーグル犬を用いた GLP 適用単回投与急性毒性試験を実施し、オリプダーゼ アルファの安全性を評価した。

約 7～8 か月齢の雌雄イヌを体重に基づき雌雄各 4 匹からなる 4 群に無作為に割り付けた。オリプダーゼ アルファを 0（溶媒対照）、3、10 及び 30 mg/kg（それぞれ第 1～4 群）の用量で単回 IV ボーラス投与した後、2 週間の観察期間を設けた。

安全性薬理パラメータを評価するため、毎日の一般状態観察に加えて、詳細観察（血圧、心拍数、呼吸数及び直腸体温を含む）、身体検査、心電図検査及びパルスオキシメトリーを実施した。その他、体重、摂餌量、臨床病理学的検査、剖検、病理組織学的検査及び TK パラメータを評価した。

雌雄イヌにおける TK パラメータを表 15に示す。詳しい結果は Module 2.6.4 [4.1.8 項] にも記載する。本試験条件下では雌雄の差は認められなかった。30 mg/kg までの用量を単回投与したときクリアランスは一次過程に従っていたことから、飽和のエビデンスはなかった。これらの評価から、投与を受けた動物は毒性評価が可能な量のオリプダーゼ アルファに曝露されていたことが確認された。

表 15 - オリプダーゼ アルファを雌雄ビーグル犬に単回投与後のトキシコキネティクスパラメータ
（n=10/性/群、Mean±SD）

パラメータ	3 mg/kg 雌	3 mg/kg 雄	10 mg/kg 雌	10 mg/kg 雄	30 mg/kg 雌	30 mg/kg 雄
C_{max} (µg/mL)[a]	60.75 ± 8.66	55.42 ± 4.77	176.83 ± 55.94	140.42 ± 28.07	479.92 ± 53.32	427.75 ± 86.27
$t_{1/2\beta}$ (hr)	10.04 ± 3.79	5.61 ± 2.14	6.04 ± 1.81	6.01 ± 2.96	4.52 ± 1.86	9.58 ± 4.11
AUC (µg•hr /mL)	310.70 ± 99.86	228.98 ± 42.60	772.85 ± 106.08	845.20 ± 323.45	1664.59 ± 414.02	2495.79± 806.04
AUC/投与量 (µg•hr/mL/mg/kg)	103.57± 33.29	76.33 ± 14.20	77.29 ± 10.61	84.52 ± 32.35	55.49 ± 13.80	83.19 ± 26.87

略号：C_{max}=最高血中濃度、$t_{1/2\beta}$=終末半減期、AUC=無限大時間まで外挿した血清中濃度-時間曲線下面積
a IV ボーラス投与

過敏性反応（自発運動の低下、横臥位、鼻口部の腫脹、結膜の赤色化）が投与直後に第 1 群（溶媒対照）でみられ、10 mg/kg 群の雄 1 匹を除く全群の残りの全ての個体に対し DPH（1 mg/kg）を予防的に投与した。投与 24 時間後に、過敏性反応は消失し一般状態は正常となった。対照群でも過敏性反応が発現したため、これらの反応には溶媒中のポリソルベート 80 が関与すると結論した。ポリソルベート 80 をイヌに 10 mg/kg の高用量で投与すると、ヒスタミンが放出され低血圧が生じることが

知られている(12)(13)。本試験で溶媒を介して投与されたポリソルベート 80 の用量は約 5 mg/kg であった。

3 又は 10 mg/kg 群の雄で投与 2 時間後に収縮期血圧が著しく低下した。投与 24 時間後までに、全ての値が対照群と同程度となった。雌では同様の傾向は生じなかった。30 mg/kg 群又は雌では血圧の著しい低下がみられなかったこと、また 24 時間後までに回復したことから、被験物質に明らかに関連する影響ではないと考えられる。

体重、摂餌量、体温、呼吸数、心電図及び酸素飽和度において、被験物質に関連する影響はなかった。

剖検、臨床病理学的検査及び病理組織学的検査において被験物質に関連する所見はなかった。

投与 24 時間後までに全例が正常となったこと、また体重、摂餌量、体温、呼吸数、心電図及び酸素飽和度において被験物質に関連する影響がなかったこと、さらに、血圧、臨床病理学的検査及び解剖病理学的検査の所見は明らか又は持続性でなかったことから、ビーグル犬にオリプダーゼ アルファを単回 IV 低速ボーラス投与したときの NOAEL は、最高用量である 30 mg/kg であった。

3　反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

非臨床反復投与毒性試験を、複数の動物種、すなわち SD ラット、カニクイザル及び ASMKO マウスで実施した。全体として、SD ラット及びカニクイザルでオリプダーゼ アルファの忍容性は良好であった。ASMKO マウスでは、オリプダーゼ アルファを用量漸増法で投与したときの忍容性は良好であった。

3.1　げっ歯類ーSprague Dawley ラット

3.1.1　Sprague Dawley ラットを用いた 26 週間反復投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

Module 2.6.7 [表 2.6.7.7.C]、[redacted]027 試験

GLP 適用反復投与毒性試験において、SD ラットに 0、3、10 及び 30 mg/kg のオリプダーゼ アルファを隔週で 26 週間 IV ボーラス投与した後、4 週間の回復期間を設けた。

約 6～8 週齢の雌雄ラットを 5 群に割り付けた。溶媒投与群及び投薬群には雌雄各 15 匹、生理食塩液対照群には雌雄各 5 匹を割り付けた（表 16）。

表 16 - [redacted]027 試験の試験デザイン

群番号	動物数		被験物質	投与量 (mg/kg)	生理食塩液／DPH	用法	投与経路
	投与終了後剖検 雄／雌	回復期間後剖検 雄／雌					
1	5/5	0/0	生理食塩液	0	生理食塩液[a]	2 週間に 1 回、26 週間	IV
2	10/10	5/5	溶媒	0	DPH[a]		
3	10/10	5/5	オリプダーゼ アルファ	3.	DPH[a]		
4	10/10	5/5		10	DPH[a]		
5	10/10	5/5		30	DPH[a]		

略号：IV=静脈内、DPH=ジフェンヒドラミン塩酸塩

a 第 2 回投与（15 日目）から第 8 回投与（99 日目）まで、全例に対し前治療としてジフェンヒドラミン塩酸塩（DPH）を静脈内投与した。また 10 mg/kg/回投与群の雌 1 匹に対し、オリプダーゼ アルファ投与に対するアレルギー反応とみられる症状を減弱するため、治療的に 15 日目に DPH を投与した。DPH の投与量は、第 2 回から第 6 回投与時は 5.0 mg/kg、第 7 回投与時は 2.5 mg/kg、第 8 回投与時は 1.25 mg/kg とし、第 9 回以降は投与しなかった。

全例に対し、死亡及び病的状態の有無をモニタリングした。投与日には 1 日 2 回並びに各投与の約 5、10、30、60 及び 120 分後、非投与日は 1 日 1 回モニタリングした。

そのほかに、体重、摂餌量、眼科学的検査、臨床病理学的パラメータ（血液生化学的検査、血液学的検査及び尿検査）、剖検所見、病理組織学的所見、器官重量、TK パラメータ及び抗オリプダーゼ アルファ抗体（ADA）を評価した。また、肝臓組織を用いてオリプダーゼ アルファ濃度を分析した。

雌雄ラットにおける TK パラメータを表 17、表 18、表 19に示す。詳しい結果は Module 2.6.4 [4.2.1 項] にも記載する。雌雄ラットともに、曝露量は群間（3～30 mg/kg）で用量比を下回り、投与量の増加が 10 倍であったのに対し曝露量の増加は 7 倍であった。3 及び 30 mg/kg 群の雄では、85 日目及び 183 日目のオリプダーゼ アルファの C_{max} 及び AUC が雌に比べ統計学的有意に高かった。これはこの用量においてばらつきが大きかったことによると考えられた。これらの評価から、投与を受けた動物は毒性評価が可能な量のオリプダーゼ アルファに曝露されていたことが確認された。

85 日目及び 183 日目の投与前値は全て検出限界未満であったことから、オリプダーゼ アルファを 3、10 及び 30 mg/kg の用量で隔週反復投与した後の血中濃度は持続しないとの結論が裏付けられる。

表 17 - 1 日目：オリプダーゼ アルファを雌雄 SD ラットに反復投与後のトキシコキネティクス パラメータ（n=5/性/群、Mean±SD）

パラメータ	3 mg/kg 雌	3 mg/kg 雄	10 mg/kg 雌	10 mg/kg 雄	30 mg/kg 雌	30 mg/kg 雄
C_{max} (µg/mL)[a]	75.15 ± 15.25	70.18 ± 21.21	122.74 ± 19.62	123.56 ± 36.80	540.63 ± 141.30	568.17 ± 110.49
$t_{1/2\beta}$ (hr)	0.63 ± 0.13	0.72 ± 0.24	0.63 ± 0.17	0.86 ± 0.27	0.76 ± 0.47	0.75 ± 0.67
AUC (µg•hr /mL)	130.39 ± 7.77	123.30 ± 6.12	184.88 ± 47.66	235.26 ± 66.78	643.35 ± 91.29	679.32 ± 147.88
AUC/投与量 (µg•hr/mL/mg/kg)	43.46 ± 2.59	41.10 ± 2.04	18.49 ± 4.77	23.53 ± 6.68	21.45 ± 3.04	22.64 ± 4.93

略号：C_{max}=最高血中濃度、$t_{1/2\beta}$=終末半減期、AUC=無限大時間まで外挿した血清中濃度-時間曲線下面積
a IV ボーラス投与

表 18 - 85 日目（7 回目投与）：オリプダーゼ アルファを雌雄 SD ラットに反復投与後の
トキシコキネティクスパラメータ（n=5/性/群、Mean±SD）

パラメータ	3 mg/kg 雌	3 mg/kg 雄	10 mg/kg 雌	10 mg/kg 雄	30 mg/kg 雌	30 mg/kg 雄
C_{max} (µg/mL)[a]	64.99 ± 6.34	91.81 ± 8.12	215.75 ± 27.73	226.83 ± 48.13	701.29 ± 33.91	880.90 ± 87.25
$t_{1/2\beta}$ (hr)	0.51 ± 0.12	0.60 ± 0.11	0.91 ± 0.56	1.43 ± 1.33	1.22 ± 0.63	1.49 ± 0.47
AUC (µg•hr /mL)	101.64 ± 10.27	160.29 ± 24.81	398.99 ± 119.87	541.47 ± 269.99	1255.71 ± 267.42	1871.77 ± 188.44
AUC/投与量 (µg•hr/mL/mg/kg)	33.88 ± 3.42	53.43 ± 8.27	39.90 ± 11.99	54.15 ± 27.00	41.86 ± 8.91	62.39 ± 6.28

略号：C_{max}=最高血中濃度、$t_{1/2\beta}$=終末半減期、AUC=無限大時間まで外挿した血清中濃度-時間曲線下面積
a IV ボーラス投与

表 19 - 183 日目（13 回目投与）：オリプダーゼ アルファを雌雄 SD ラットに反復投与後の
トキシコキネティクスパラメータ（n=5/性/群、Mean±SD）

パラメータ	3 mg/kg 雌	3 mg/kg 雄	10 mg/kg 雌	10 mg/kg 雄	30 mg/kg 雌	30 mg/kg 雄
C_{max} (µg/mL)[a]	96.29 ± 15.98	134.91 ± 11.17	191.75 ± 36.98	253.48 ± 54.56	521.89 ± 137.58	810.04 ± 99.62
$t_{1/2\beta}$ (hr)	1.45 ± 0.08	1.78 ± 0.25	1.50 ± 0.76	0.71 ± 0.31	1.48 ± 0.53	1.30 ± 0.12
AUC (µg•hr /mL)	143.84 ± 19.07	230.94 ± 24.50	386.93 ± 114.04	449.14 ± 151.65	1121.97 ± 175.06	1689.73 ± 285.73
AUC/投与量 (µg•hr/mL/mg/kg)	47.95 ± 6.36	76.98 ± 8.17	38.69 ± 11.40	44.91 ± 15.17	37.40 ± 5.84	56.32 ± 9.52

略号：C_{max}=最高血中濃度、$t_{1/2\beta}$=終末半減期、AUC=無限大時間まで外挿した血清中濃度-時間曲線下面積
a IV ボーラス投与

肝臓試料を用いたオリプダーゼ アルファ濃度の分析を、投与期間の動物では最終投与 24 時間後、回復期間の動物では最終投与 28 日後の試料で実施した。第 3～5 群から最終投与 24 時間後に採取した肝臓中のオリプダーゼ アルファ濃度は雌雄で同程度であり、用量依存性に増加した。第 3～5 群から最終投与 28 日後に採取した肝臓におけるオリプダーゼ アルファ濃度は雌雄ともに第 2 群と同程度であった。本試験で評価した用量及び時点において、肝臓におけるオリプダーゼ アルファ残留の徴候はなかった。

試験期間中に 5 匹の計画外死亡があった。30 mg/kg 群の雄では採血予定時点から 24 時間以内に 3 匹が死亡した（71、81 及び 85 日目）。各個体の死因は不明であったが、投与が間接的に影響した可

能性は除外できない。10 mg/kg 群の雌 1 匹は、29 日目の DPH 及び被験物質投与後まもなく死亡した。この死亡は中用量群の 1 匹に発現した変化であり、高用量群で同様の死亡が生じなかったことから、投与には関連しないと考えられた。溶媒対照群の雌 1 匹の死亡は腎臓の梗塞及び炎症によると判断した。これらの病変を有する個体は 1 匹のみであったことから、死亡は溶媒に関連しないと考えられた。

3 週目（15 日目、第 2 回投与）の獣医師の評価から、第 4 群の雌 1 匹で被験物質投与に対する過敏性反応が示唆された。試験計画書に従い、本個体に DPH を治療投与し、以後はその他の全ての動物に DPH を予防投与した。

試験期間中の一般状態所見として、痙攣が第 2 群（雌 1 匹）、3 群（雄 1 匹）、4 群（雄 2 匹）及び 5 群（雄 2 匹）でそれぞれ 85、29、99、並びに 15 及び 85 日目に散見され、自発運動の低下が第 4 群の雌 1 匹で 141 日目に発現した。全例で回復し再発は認められなかった。痙攣は、溶媒対照群の 1 匹を含めランダムに発現したことから投与に関連しないと考えられた。自発運動の低下は投与に関連すると考えられたが、毒性ではないと考えられた。これらの所見は、ヒト組換えタンパク質をげっ歯類に投与したときに予想される過敏性反応の特徴を示している。

臨床病理学的検査（血液生化学的検査、血液学的検査及び尿検査）は、全例について第 6 回投与 1 週間後及び 184 日目又は 212 日目の剖検前に実施した。いずれの評価パラメータにおいても投与に関連する所見はなかった。眼科学的検査において、投与に関連する所見はなかった。

10 及び 30 mg/kg 群の雄ラットで、投与期間中の平均体重増加量がごく軽度増加し、これに対応してこれらのラットで投与期間中の摂餌量が増加した。これらの群の雌では投与が体重増加量に及ぼす影響はなく、雌の平均摂餌量に差はなかった。回復期間中の体重増加量に投与群間差はなかった。

器官重量において、投与に関連して、30 mg/kg 群の雄で投与終了後剖検時の肝臓、前立腺及び甲状腺／上皮小体重量の絶対値若しくは相対値の平均値が第 1 群に比べ統計学的有意に高かった。これは 30 mg/kg 群の雄で投与終了後剖検時の体重が高いことに関連した可能性がある。これらの組織において、剖検及び病理組織学的検査で関連する所見はみられなかった。

剖検及び病理組織学的検査において、ラットにオリプダーゼ アルファを隔週に 1 回 26 週間反復 IV 投与しても重要な所見はみられなかった。

毒性評価に加え、血清中 ADA を 1、85 及び 183 日目に分析した。1 日目にはいずれの群からも ADA は検出されなかった。85 日目には第 3 群の 2/10 匹、第 4 群の 6/10 匹及び第 5 群の 2/10 匹から ADA が検出された。183 日目には第 3 群の 3/10 匹、第 4 群の 5/10 匹及び第 5 群の 2/9 匹から ADA が検出された。ADA 反応は雌雄で同程度であり、これに関連する過敏性反応及び曝露量の減少はみられなかった。

肝臓中オリプダーゼ アルファ濃度は、第 3～5 群の最終投与 24 時間後の値は雌雄で同程度であり用量依存性であった。最終投与 28 日後のオリプダーゼ アルファ濃度は、3、10 及び 30 mg/kg 群の雄では対照群と同程度であった。3、10 及び 30 mg/kg 群の雌では群間で同程度であり対照群（第 2 群）の値をわずかに上回った。これらのオリプダーゼ アルファ濃度は対照群との間に有意差があったものの、雄の値と同程度であり、生物学的意義はないと考えられた。本試験で評価した用量及び時点において、肝臓における著しいオリプダーゼ アルファ残留の徴候はなかった。

結論として、雌雄 SD ラットにオリプダーゼ アルファを 3、10 又は 30 mg/kg の用量で 2 週間に 1 回、26 週間（計 14 回）IV 投与したときの忍容性は良好であり、NOAEL は検討した最高用量である 30 mg/kg であった。

3.2 げっ歯類－ASMKO マウス

3.2.1 ASMKO マウスを用いた 12 週間反復投与毒性試験及び 4 週間回復性試験（1）

Module 2.6.7 [表 2.6.7.7.A]、[redacted]005 試験

GLP 適用反復投与毒性試験において、雌雄 ASMKO マウスに 0、0.3、1 及び 3 mg/kg のオリプダーゼ アルファを隔週に 1 回、12 週間（計 7 回）IV ボーラス投与した。

動物を 4 つの群に分けた。雄では第 1 群の 3 匹及び第 2～4 群の 4 匹、雌では第 1 群の 3 匹及び第 2～4 群の 2 匹を最終投与 24 時間後（98 日目）に剖検した。また、第 1 及び 4 群の雌雄各 3 匹を 4 週間の回復期間後（126 日目）に剖検した（表 20）。

表 20 - [redacted]005 試験の試験デザイン

群番号	動物数		被験物質[a]	投与量 (mg/kg)	系統	用法	投与経路
	投与終了後剖検 雄／雌	回復期間後剖検 雄／雌					
1	3/3	3/3	溶媒	0	ASMKO	隔週、12 週間	IV
2	4/2	0/0	オリプダーゼ アルファ	0.3			
3	4/2	0/0		1			
4	4/2	3/3		3			

略号： IV=静脈内

a 第 2 回投与（14 日目）以降、第 4 群（3 mg/kg）のマウスで嗜眠及び速呼吸を含む過敏性反応の徴候が発現した。治療のため 5 mg/kg のジフェンヒドラミン（DPH）を IV 投与した。全ての個体で投与内容が一様となるよう、第 2 回投与後に全てのマウスに DPH を投与した。第 3 回投与（28 日目）から第 7 回投与まで、投与約 5 分前に DPH を予防的に腹腔内投与した。第 4 群のその他の数匹で軽度から中等度の嗜眠を含む過敏性反応の徴候が発現したため、DPH の IV 投与を追加した。

全例に対し、死亡及び病的状態の有無を 1 日 2 回観察し、また毒性徴候について各投与日の投与前に 1 回、投与直後並びに投与約 10 及び 60 分後に観察した。

そのほかに、体重、摂餌量、臨床病理学的パラメータ（血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査）、剖検所見及び病理組織学的所見を評価した。また、肝臓組織を採取しオリプダーゼ アルファ濃度を分析した。最終投与 24 時間後に血清試料を採取し、ADA 濃度を測定した。

試験期間中に死亡はみられなかった。

投与に関連する一般状態所見はオリプダーゼ アルファ投与に関連する過敏性反応の徴候（嗜眠及び速呼吸）が主であり、第 4 群（3 mg/kg）で第 2 回投与直後（14 日目）から最終投与（98 日目）ま

で散見された。これらの所見は他のいずれの投与群でもみられなかった。これは予想外の所見ではなく、ヒトタンパク質をマウスに反復投与したときにしばしば発現する。オリプダーゼ アルファ投与に関連するその他の重要な一般状態所見はなかった。臨床病理学的検査（血液生化学的検査、血液学的検査、尿検査及び尿生化学的検査）は投与終了後剖検例の全例で最終投与 24 時間後（98 日目）に、また回復期間後剖検例の全例で最終投与 28 日後（126 日目）に実施した。血液学的検査、尿検査及び尿生化学的検査パラメータにおいて、投与に関連する毒性作用はなかった。血清中アルカリホスファターゼ（ALP）の統計学的有意かつ用量依存的な減少が投与期間終了時にみられたが、投与 4 週間後（回復期間終了時）までに回復した。この減少の機序は不明である。ALP の一時的な減少は投与に関連すると考えられるが、骨又は腸における ALP アイソザイムの減少を示すような体重増加量（骨成長を反映）の変化若しくは骨又は腸の組織学的変化がなかったことから毒性学的意義はない。血清中コレステロールの用量増加に伴う増加傾向がみられ、3 mg/kg 群（第 4 群）における増加は統計学的有意差があった。コレステロールの増加は投与に関連すると考えられたが、一時的であること、増加の程度が小さいこと、回復期間終了時までにベースラインレベルに戻ったことから臨床的な意義がある可能性は低い。

体重において、被験物質に関連した臨床的意義がある変化はなかった。

器官重量において、第 2、3 及び 4 群における肝臓の体重比重量が溶媒対照群（第 1 群）に比べ統計学的有意に低かった（表 21）。投与群における体重比重量の減少は、オリプダーゼ アルファ投与による基質濃度の減少を示す可能性が最も高い。オリプダーゼ アルファ投与マウスにおいて、これに関連した肝酵素（ALT、AST）濃度の変化及び病理組織学的所見の発現はなかった。

表 21 - オリプダーゼ アルファ又は溶媒を隔週 12 週間投与し 4 週間回復させた ASMKO マウスの肝臓の体重比重量

投与終了後剖検	肝臓／体重比 (平均 ± SD)	回復期間後剖検	肝臓／体重比 (平均 ± SD)
第 1 群 溶媒対照	0.070 ± 0.005	第 1 群 溶媒対照	0.066 ± 0.007
第 2 群 0.3 mg/kg オリプダーゼ アルファ	0.052 ± 0.006[a]	NA	NA
第 3 群 1 mg/kg オリプダーゼ アルファ	0.052 ± 0.006[a]	NA	NA
第 4 群 3 mg/kg オリプダーゼ アルファ	0.056 ± 0.004[a]	第 4 群 3 mg/kg オリプダーゼ アルファ	0.059 ± 0.004

略号：SD=標準偏差、NA=該当せず
a p≤0.005

剖検において、投与終了後及び回復期間後のいずれにおいてもオリプダーゼ アルファに関連する肉眼所見はなかった。

投与に関連した病理組織学的所見として、1 及び 3 mg/kg のオリプダーゼ アルファを投与された ASMKO マウス（それぞれ第 3 及び 4 群）で投与終了後の肝臓の実質内に炎症病巣がみられた。3 mg/kg のオリプダーゼ アルファを投与し 4 週間回復させた群ではこの変化はみられなかった。投与終了後及び回復期間後のいずれにおいても、関連する血清中 ALT、AST 及びビリルビンの変化はなかった。そのため、この変化に毒性学的意義がある可能性は低いと考えられる。

オリプダーゼ アルファ投与全群（第 2～4 群）で投与終了後に副腎皮質の変性／アポトーシス（軽微から軽度）が用量依存的かつわずかに増加した。高用量を投与し（3 mg/kg、第 4 群）4 週間回復させたところ、この病理組織学的変化はいずれの個体にもみられなかった（0/5 匹）。この変化は可逆性であると思われるが、本反復投与試験の最高用量群（3 mg/kg）における副腎皮質の変性／アポトーシスの平均スコアはわずか 0.6（最大スコアは 4）であったことから、毒性学的意義はないと考えられる。また、このスコアは ASMKO マウスを用いた単回投与急性毒性試験（2.2.3項、[redacted]-0025Pnp 試験参照）で同じ用量を投与したときのスコア（2.6）よりも大幅に低い。

最終投与 24 時間後又は 4 週間の回復期間後に肝臓、脾臓及び肺を採取し、スフィンゴミエリン濃度を生化学的に測定した（表 22）。検討した全ての組織でスフィンゴミエリンの枯渇効果がみられ、1 及び 3 mg/kg 群ではその程度が大きかった。回復試験群において、オリプダーゼ アルファ最終投与 4 週間後の肝臓及び脾臓中のスフィンゴミエリン濃度は穏やかに増加したが、ベースラインレベルには戻っていなかった。肺中スフィンゴミエリン濃度は最終投与 4 週間後にベースラインレベルまで増加した。

表 22 - ASMKO マウスに 0.3、1 又は 3 mg/kg のオリプダーゼ アルファを隔週 12 週間投与後の組織中スフィンゴミエリン濃度（[redacted]-0813Pnp 試験／[redacted]005 試験）

群	動物数	被験物質	投与量 (mg/kg)	肝臓 (mg SPM/g 組織の湿重量)	脾臓 (mg SPM/g 組織の湿重量)	肺 (mg SPM/g 組織の湿重量)
1	6	溶媒対照	0	91.48 ± 13.80	67.35 ± 14.94	33.96 ± 6.48
	6（4 週間回復）			108.43 ± 13.79	76.54 ± 13.38	27.09 ± 7.10
2	6	オリプダーゼ アルファ	0.3	2.33 ± 4.04	11.58 ± 3.03	23.00 ± 3.13
3	5		1	5.57 ± 8.01	0.83 ± 1.66	13.41 ± 2.83
4	5		3	6.25 ± 7.74	0.00 ± 0.00	14.34 ± 7.11
	6（4 週間回復）			31.76 ± 9.70	13.68 ± 3.44	29.19 ± 3.87

略号：SPM=スフィンゴミエリン
平均 ± 標準偏差を示す。

表 23に示す結果から、最終投与 24 時間後に測定した ADA 抗体価は用量の増加とともに高値となり発現率も増加することが分かる。最終投与 28 日後、投与全例で ADA が検出された（表 24）。本

試験条件下で、ASMKO マウスに ADA が存在し、その濃度は用量反応性であり最終投与 28 日後にも検出された。

表 23 - 最終投与 24 時間後における抗オリプダーゼ アルファ抗体価の個別値

第 1 群 (溶媒)		第 2 群 (0.3 mg/kg)		第 3 群 (10 mg/kg)		第 4 群 (3 mg/kg)	
動物番号	抗体価	動物番号	抗体価	動物番号	抗体価	動物番号	抗体価
1	200	13	200	19	1600	25	12800
2	< 200	14	200	20	< 200	26	> 716800
3	200	15	< 200	21	12800	27	NA
4	< 200	16	< 200	22	800	28	12800
5	< 200	17	< 200	23	NA	29	800
6	< 200	18	< 200	24	200	30	89600

略号：NA=該当せず
注：動物番号 23 及び 27 はノックアウトマウスではないとみられたため最終的な計算には使用しなかった。

表 24 - 最終投与 28 日後における抗オリプダーゼ アルファ抗体価の個別値

第 1 群 (溶媒)		第 4 群 (3 mg/kg)	
動物番号	抗体価	動物番号	抗体価
7	< 200	31	819200
8	400	32	25600
9	200	33	204800
10	< 200	34	819200
11	200	35	204800
12	< 200	36	1600

肝臓組織中オリプダーゼ アルファ濃度を最終投与 24 時間後及び 28 日後に測定したところ、最終投与 24 時間後の第 3 群（4/5 匹）及び第 4 群（1/5 匹）でのみ検出された。最終投与 28 日後には肝臓中オリプダーゼ アルファ濃度は検出できなかった。

以上、ASMKO マウスに 3 mg/kg までのオリプダーゼ アルファを隔週 12 週間反復 IV 投与したときの忍容性は良好であり、投与に関連する毒性所見はみられなかった。本試験の成績に基づき、本試験での ASMKO マウスにおける NOAEL は 3 mg/kg であった。

3.2.2 ASMKO マウスを用いた 13 週間反復投与毒性試験及び 4 週間回復性試験（2）

Module 2.6.7 [表 2.6.7.7.B]、[redacted]031 試験

保健医療当局の要請に従い、第二の AMSKO マウスを用いた重要な反復投与毒性試験として、各群の動物数を 20 匹／性別／群に増加して実施した。

雌雄 ASMKO マウスを 20 匹／性別／群からなる 5 つの群に分けた。第 1 及び 2 群には溶媒を、第 3～5 群には 0.3、1 又は 3 mg/kg のオリプダーゼ アルファをそれぞれ隔週に 1 回 13 週間、計 7 回 IV ボーラス投与した。第 2 回投与以降、溶媒（第 1 群）又はオリプダーゼ アルファ（第 2～5 群）の投与前にそれぞれ生理食塩液又は DPH を投与した。最終投与 1 及び 4 週間後にそれぞれ 10 匹／性別／群を安楽殺した（表 25）。

表 25 - [redacted]031 試験の試験デザイン

群番号	動物数		被験物質	投与量 (mg/kg)	DPH (mg/kg)	用法	被験物質の投与経路
	投与終了後剖検 雄／雌	回復期間後剖検 雄／雌					
1	10/10	10/10	溶媒	0	生理食塩液[a]	隔週、13 週間	IV
2	10/10	10/10		0	DPH[a]		
3	10/10	10/10	オリプダーゼ アルファ	0.3	DPH[a]		
4	10/10	10/10		1	DPH[a]		
5	10/10	10/10		3	DPH[a]		

略号：IV=静脈内、DPH=ジフェンヒドラミン塩酸塩

a 第 2 回投与以降、5 mg/kg の DPH 又は 0.9%生理食塩液を 1 mL/kg の容量で腹腔内（IP）投与した。第 3 回投与後に過敏性反応の徴候がみられたため、第 4 回投与時は 10 mg/kg の DPH 又は 0.9%生理食塩液を 2 mL/kg の容量で投与した。残りの投与時（第 5～7 回）は 20 mg/kg の DPH 又は 0.9%生理食塩液を 4 mL/kg の容量で投与した。
試験期間中、数匹で過敏性反応を示す軽度から中等度の嗜眠が認められたため、オリプダーゼ アルファ投与後に DPH（レスキュー用量）を再度投与（IV 又は IP）した。このレスキュー投与はオリプダーゼ アルファ投与後 1 時間以内に実施した。

計画外死亡は計 10 匹で、全群及び雌雄にわたり死亡の発現率は同程度であった。死亡は、マウスでよくみられる自然発生性の原因（水腎症、心房血栓症／破裂）又は DPH 投与でも予防できなかった過敏性反応に関連するか、若しくは原因が特定できなかった。

死因が容易に明らかにされなかった死亡例は、試験群間でランダムに認められており、剖検及び病理組織学的検査で毒性のエビデンスがみられなかったため、オリプダーゼ アルファ投与の影響ではなく自然発生性の病因又は脱水の可能性があると考えられた。

一般状態所見は、オリプダーゼ アルファ反復投与後の過敏性反応を示す嗜眠が主であった。嗜眠の所見は第 5 群（3 mg/kg）の全例ではなく数匹で、第 2～7 回投与の直後に認められた。嗜眠は、第 4 群（1 mg/kg）では数匹のみでみられ、第 3 群（0.3 mg/kg）では認められなかった。

平均体重及び 1 週間の平均体重変化を雌雄両性について解析した。平均体重は、試験期間のいずれの時点でも、またいずれの投与群の雌雄でも、第 1 群（溶媒）と比べて統計学的有意差はなかった。平均体重変化は、第 4 及び 5 群の雌（それぞれ 1 及び 3 mg/kg）で 99 日目から 106 日目にかけて統計学的有意に増加した。体重変化はまた、第 3 群（0.3 mg/kg）の雄で 36 日目から 43 日目にかけて統計学的有意に減少した。これらの変化は統計学的に有意であったが、一時的なものであり群間で一貫した変化ではなかったことから、被験物質投与に関連しないと考えられた。

摂餌量を雌雄両性について解析した。雄では、試験期間中の摂餌量（定量的）において統計学的に有意な変化はなかった。雌では第 4 群（1 mg/kg）で 92 日目に、また第 5 群（3 mg/kg）で 43、99 及び 106 日目に摂餌量が統計学的有意に増加した。しかし、摂餌量増加の所見の性質は一時的であるため、被験物質投与に関連しないと考えられた。

眼科学的検査で全試験群に病変がみられたが、生存中の正常な角膜露出、先天的な影響若しくは外傷など様々な原因に関連すると考えられた。特異的でオリプダーゼ アルファ投与に起因する毒性を示唆する病変パターンはなかった。

血液学的検査及び血液生化学的検査において、それぞれ 0.3、1 及び 3 mg/kg を投与された ASMKO マウスで投与に関連する毒性作用はなかった。臨床病理学的評価でみられたいくつかの所見は、人為的と考えられたこと、又は関連する病理組織学的所見がなかったことから、生理学的及び毒性学的意義はないと判断した。AST 及び ALP の低下はこれらのマウスにおける疾患進行の抑制に起因する可能性が最も高く、これに関連して病理組織学的検査において肝臓でスフィンゴミエリンが減少した。

オリプダーゼ アルファ投与マウスで器官重量の絶対値並びに体重比及び脳重量比重量で差がみられたが、これらは雌のみに発現した変化又は用量依存性がない変化のいずれかであった。したがって、これらの差は毒性学的意義がないと考えられた。投与群で肝重量及び肝臓の脳重量比重量が減少したことは、オリプダーゼ アルファ投与によるスフィンゴミエリン濃度の減少を示している可能性が最も高い。病理組織学的検査において、オリプダーゼ アルファ投与マウスで肝毒性を示す所見はなかった。

剖検所見については、発現率が群間で同程度である、用量反応関係がない、又は自然発生性のバックグラウンド変化を示すものであったことから、被験物質に関連しないと考えられた。

病理組織学的検査において、ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを隔週に 1 回 13 週間 IV ボーラス投与後の毒性を示す変化はなかった。みられた影響は全て、病理学的なスフィンゴミエリン蓄積の低下に起因するものであった。4 週間の回復期間後、一部の組織（副腎皮質束状帯、肝臓、腎臓及び骨髄）でスフィンゴミエリンの蓄積が回復した。回復期間後に遅延毒性のエビデンスはみられなかった。

ADA 抗体価は、投与終了後剖検（最終投与 1 週間後）時には第 3 群（0.3 mg/kg）の 1 匹のみで検出された。第 4 群（1 mg/kg）の 10 匹及び第 5 群（3 mg/kg）の 17 匹でも ADA が検出された。抗体価の程度は用量とともに上昇し、全群で雌雄同程度であった。回復期間後剖検時、第 3 群の 2 匹及び第 4 群の 9 匹で依然として ADA が検出された。第 5 群では全例で抗体価が検出された。対照群の各 1 匹（第 1 群では回復期間後剖検時、第 2 群では投与終了後剖検時）でも抗体価が検出された。

病理組織学的検査の結果から、全ての用量において肝臓及び脾臓といった標的器官を含むいくつかの組織で基質のクリアランスが示されたことから、ADA によりオリプダーゼ アルファの薬理学的活性が損なわれないことが示唆された。

本試験条件下で、雌雄 ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを隔週に 1 回 13 週間 IV 投与したところ忍容性は良好であり、NOAEL は 3 mg/kg であった。

3.2.3 ASMKO マウスを用いた探索的反復投与毒性試験－用法の評価

ASMKO マウスを用いた探索的反復投与試験を実施し、用量漸増法への変更によりスフィンゴミエリン濃度減少を調節すると、オリプダーゼ アルファを 10 mg/kg 以上の用量で投与したときの毒性が軽減されるか否かを調べた。

3.2.3.1 ASMKO マウスにおける 2 時間ごと 6 時間投与の評価

Module 2.6.7 [表 2.6.7.6]、[redacted]-0506Pnp 試験

先の試験から、10 mg/kg 以上のオリプダーゼ アルファを単回 IV 投与すると毒性が発現することが示された（2.2.2項及び2.2.3項、それぞれ[redacted]-0047Pnp 及び[redacted]-0025Pnp 試験参照）。本探索的試験は、時間をかけて定量のオリプダーゼ アルファを投与すると先の試験で認められた毒性が緩和されるか否かを評価した。

雌 ASMKO マウス（10 匹）に対し、5 mg/kg のオリプダーゼ アルファを 2 時間ごとに計 4 回 IV ボーラス投与した（6 時間の総投与量は 20 mg/kg）（表 26）。

表 26 - [redacted]-0506 試験の試験デザイン

群番号	動物数 雄／雌	被験物質	投与量 (mg/kg)	用法	投与経路
1	0/10	オリプダーゼ アルファ	5 mg/kg	5 mg/kg を 2 時間ごと、 計 4 回	IV

略号：IV=静脈内

4 回オリプダーゼ アルファ投与の直前及び直後に実施した一般状態観察では、全ての投与回で全例が正常であったが、初回投与 24 時間後に複数の動物が死亡して発見された。

本試験条件下で、雌 ASMKO マウスに 5 mg/kg のオリプダーゼ アルファを 2 時間ごとに 6 時間、計 20 mg/kg 投与したところ、20 mg/kg の用量を単回 IV ボーラス投与したとき（2.2.2項、[redacted]-0047Pnp 試験参照）と同様、急性毒性が生じた。

3.2.3.2 AMSKO マウスにおける 5 又は 7 日間隔投与（3 mg/kg、その後 10、20 又は 30 mg/kg）の評価

Module 2.6.7 [表 2.6.7.6]、[redacted]-0099Pnp 試験及び[redacted]-0505Pnp 試験

本探索試験ではまず、基質濃度を低下させたときに 10 mg/kg 以上のオリプダーゼ アルファ投与による毒性が軽減するか否かを検討した（Module 2.6.7 [表 2.6.7.6]、[redacted]-0099Pnp 試験）。

先の試験（Module 2.6.3 [表 2.6.3.2.1]、[redacted]-0428Pnp 試験及び [redacted]-0110Pnp 試験参照）から、ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを 1 及び 5 mg/kg の用量で単回投与すると肝臓及び脾臓中のスフィンゴミエリン濃度が低下し、投与約 5 日後までにほぼバックグラウンドレベルまで下がることが明らかにされている。高用量のオリプダーゼ アルファ投与による毒性が、大量に蓄積された基質の速やかな分解によるものであれば、高用量の投与前に低用量を投与すると、基質濃度が徐々に低下することで毒性作用が軽減される可能性がある。

雌雄 ASMKO マウスを 3 群に分けた。第 1 群（2 匹）には 1 日目に 3 mg/kg のオリプダーゼ アルファを、6 日目に溶媒を IV ボーラス投与した。第 2 及び 3 群（各群 4 匹）には 1 日目に 3 mg/kg のオリプダーゼ アルファを、6 日目にそれぞれ 20 及び 30 mg/kg のオリプダーゼ アルファを IV ボーラス投与した（表 27）。第 2 回投与の 24 時間後に動物を安楽殺し、血液生化学的検査用の血液及び病理組織学的検査用の所定の組織（肝臓、副腎、脾臓、肺、腎臓、膵臓、脳、心臓、小腸及び下行大動脈）を採取した。

表 27 - [redacted]-0099Pnp 試験の試験デザイン

群番号	動物数 雄／雌	被験物質	投与量	用法	投与経路
1	0/2	オリプダーゼ アルファ／溶媒	3mg/kg オリプダーゼ アルファ（1 日目） 溶媒（6 日目）	1 日目に低用量、6 日目に高用量又は溶媒	IV
2	2/2	オリプダーゼ アルファ	3 mg/kg オリプダーゼ アルファ（1 日目） 20 mg/kg オリプダーゼ アルファ（6 日目）		
3	2/2		3 mg/kg オリプダーゼ アルファ（1 日目） 30 mg/kg オリプダーゼ アルファ（6 日目）		

略号：IV=静脈内

試験期間を通じて、投与に関連する一般状態所見及び死亡はなかった。

第 1 群で胆汁酸の平均値が第 2 及び 3 群に比べ著しく高かったが、第 2 及び 3 群の方が高いわけではなかったことからオリプダーゼ アルファに関連しないと考えられた。

第 2 及び 3 群で AST、ALT 及びコレステロールの平均値が第 1 群に比べわずかに高かった。変化の程度が小さいことから、この増加には毒性学的意義がないと思われる。

3 mg/kg のオリプダーゼ アルファを投与後に溶媒を投与された動物（第 1 群）の肝臓で、肝細胞若しくはクッパー細胞のランダムな風船様変性、及び実質におけるランダムなアポトーシス細胞巣が発

現した。これらに伴いしばしば異好性白血球による炎症病巣がみられた。これらの所見は、20 mg/kg オリプダーゼ アルファ投与動物で風船様変性が減少した点を除き、20 mg/kg 群と 30 mg/kg 群（それぞれ第 2 群及び第 3 群）とで概して類似していた。

第 1 群では副腎のみに所見（皮質束状帯の軽度な変性及びアポトーシス並びに髄質細胞の腫脹）が発現した。副腎皮質の変性及びアポトーシスは、第 3 群（30 mg/kg）に比べ第 2 群（20 mg/kg）で同程度に発現した。副腎皮質の出血及びうっ血は、第 2 及び 3 群で用量依存的かつごく軽度に増加した。

20 及び 30 mg/kg のオリプダーゼ アルファを投与されたそれぞれ第 2 群及び第 3 群の数匹で、比較的大きい肺静脈に境界明瞭な異好性白血球がみられた。これはわずかな変化であり意義は不明である。

本試験の成績から、オリプダーゼ アルファの既知の毒性用量（20 又は 30 mg/kg）を投与する前に、スフィンゴミエリン蓄積を減少させることが知られている、薬理学的に意義のある低用量（3 mg/kg）のオリプダーゼ アルファを投与したところ、20 mg/kg 以上のオリプダーゼ アルファ単回投与による死亡を防ぐことができるといえる。

[redacted]-0099Pnp 試験で検討した用量漸増法の成績が良好であったことから、追加の探索的試験（Module 2.6.7 [表 2.6.7.6]、[redacted]-0505Pnp 試験）を実施した。この試験は、用量漸増法で 30 mg/kg のオリプダーゼ アルファの投与が可能である場合、肺におけるスフィンゴミエリンの枯渇が亢進するか否かを調べた。雌 ASMKO マウスに対し、1 日目に 3 mg/kg のオリプダーゼ アルファを、その後 6、8 及び 11 日目に 30 mg/kg のオリプダーゼ アルファを IV ボーラス投与した（表 28）。

表 28 - [redacted]-0505Pnp 試験の当初の試験デザイン

群番号	動物数 雄／雌	被験物質	投与量 (mg/kg)	用法	投与経路
1	0/6	NA	0	非投与	NA
2	0/6	オリプダーゼ アルファ	3	1 日目に単回投与	IV
3	0/6		3、30	1 日目に 3 mg/kg、 6、8、11 日目に 30 mg/kg	IV

略号：IV=静脈内、NA=該当せず

試験 8 日目の投与前に第 3 群の 6 匹中 4 匹が死亡して発見され、その他の 2 匹は重度の嗜眠がみられ病的状態であった。これらの動物はその後安楽殺した。一般状態所見として、嗜眠、移動を嫌がる及び接触時冷感がみられた。これらの所見から、肺中スフィンゴミエリン濃度の解析が実施できなかった。

これらの所見に基づき、第 2 群に対し 8 及び 11 日目に 10 mg/kg のオリプダーゼ アルファを投与した（表 29、修正後試験デザインを参照）。

表 29 - ■-0505Pnp 試験の修正後試験デザイン

群番号	動物数 雄／雌	被験物質	投与量 (mg/kg)	用法	投与経路
1	0/6	NA	0	非投与	NA
2	0/6	オリプダーゼ アルファ	3、10	1 日目に 3 mg/kg、 8、11 日目に 10 mg/kg	IV
3	0/6		3、30	1 日目に 3 mg/kg、 6 日目に 30 mg/kg	IV

略号：IV=静脈内、NA=該当せず

10 日目に第 2 群の 1 匹で重度の嗜眠及び病的状態がみられ、安楽殺した。11 日目の投与前に第 2 群の 5 匹中 3 匹で中等度の嗜眠がみられた。このため、本群の生存例 5 匹全てに投与し、その 4 時間後に安楽殺を行い、以降の評価は実施しなかった。

血液生化学的検査において、選択的剖検した第 3 群の 2 匹で、オリプダーゼ アルファに関連する変化として血清中 ALP の低下及びガンマーグルタミルトランスフェラーゼ（GGT）の軽度な増加がみられた。ALP の低下はごく軽度であったため毒性学的意義はないと考えられた。病理組織学的検査で認められた肝臓における肝細胞の風船様変性（腫脹した肝細胞により毛細胆管の圧迫をきたす）は、GGT 濃度増加の理由である可能性がある。

安楽殺された第 3 群の 2 匹でみられたオリプダーゼ アルファに関連するその他の病理組織学的所見として、1 匹で腎尿細管壊死が生じた。これは血圧低下の結果生じた可能性がある。また 2 匹ともに副腎に出血及び壊死がみられたが、先の試験（2.2.3項、■-0025Pnp 試験参照）に比べ軽度であった。2 匹ともに、肝臓に肝細胞の風船様変性及び炎症病巣並びに中心静脈の限局性血管炎がみられた。血管炎は血管壁の好中球浸潤及びフィブリノイド壊死を特徴としていた。血管炎の原因は不明である。

以上、本試験条件下で、オリプダーゼ アルファを 3 mg/kg の用量で投与し、5 日後に 30 mg/kg の用量で投与したところ、30 mg/kg の単回投与 48 時間後に毒性が認められた。また、オリプダーゼ アルファを 3 mg/kg の用量で投与し、8 日後に 10 mg/kg の用量で投与したところ、10 mg/kg の単回投与 48～72 時間後に毒性が認められた。これらの毒性のために肺中スフィンゴミエリン濃度は測定しなかった。

3.2.3.3 AMSKO マウスを用いた 3 日間間歇投与（3 mg/kg、その後 20 mg/kg）の評価

Module 2.6.7 [表 2.6.7.6]、■-1239Pnp 試験

この試験の目的は、先の試験（Module 2.6.3 [表 2.6.3.3.1]、■-1009Pnp 試験参照）の結果を確認することであった。先の試験では、オリプダーゼ アルファを漸増初回用量として 3 mg/kg 投与し、試験 3 日目に既知の毒性用量（20 mg/kg）を投与したところ、全てのマウスが生存した。この用法を選択した理由は、ASMKO マウスでスフィンゴミエリンの枯渇が最大となるのは 7 日目であるが、3 日

目でも既に著しいスフィンゴミエリン濃度の低下がみられるためである（Module 2.6.3 [表 2.6.3.2.1]、[redacted]-0110Pnp 試験参照）。

雄 5 匹及び雌 3 匹の ASMKO マウスに対し、オリプダーゼ アルファを 1 日目に 3 mg/kg、3 日目に 20 mg/kg の用量で IV ボーラス投与した。2 週間にわたり毒性徴候を毎日観察した（表 30）。

表 30 - [redacted]-1239Pnp 試験の試験デザイン

群番号	動物数 雄／雌	被験物質	投与量 (mg/kg)	用法	投与経路
1	5/3	オリプダーゼ アルファ	3、20	1 日目に 3 mg/kg、3 日目に 20 mg/kg	IV

略号：IV=静脈内

試験期間中、動物は活発かつ機敏であり反応も良好であった。本試験で一般状態の毒性所見がなかったこと及び先の試験（[redacted]-1009Pnp 試験）から、オリプダーゼ アルファを 3 mg/kg の用量で投与してから 3 日後に 20 mg/kg の用量で投与する用量漸増法を用いると、20 mg/kg の単回ボーラス投与で認められた急性毒性（2.2.2項、[redacted]-0047Pnp 試験参照）の抑制がみられた。

3.2.3.4 ASMKO マウスを用いた 11 日間用量漸増投与（3 mg/kg を隔日で 4 回投与後 20 mg/kg 投与）の評価

Module 2.6.7 [表 2.6.7.6]、[redacted]-0889Pnp 試験

本探索的試験では、ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを反復漸増投与したときに、10 mg/kg 以上を単回投与したときの毒性が軽減されるか否かを検討した。

6 匹の雌 ASMKO マウスに対し、オリプダーゼ アルファを 1、4、6 及び 8 日目に 3 mg/kg、その後 11 日目（3 mg/kg の最終投与 72 時間後）に 20 mg/kg の用量で IV ボーラス投与した。4 匹を最終投与 96 時間後に、2 匹を最終投与 7 日後に剖検した（表 31）。一般状態を毎日観察した。肝臓、脾臓、腎臓、肺及び副腎を採取し、病理組織学的評価を実施した。

表 31 - [redacted]-0889Pnp 試験の試験デザイン

群番号	動物数 雄／雌	被験物質	投与量 (mg/kg)	用法	投与経路
1	0/6	オリプダーゼ アルファ	3、20	1、4、6、8 日目に 3 mg/kg、11 日目に 20 mg/kg	IV

略号：IV=静脈内

試験期間中の一般状態は正常であり、死亡はみられなかった。

病理組織学的評価の結果、これらの個体の肝臓に極めて少数の炎症細胞塊がみられ、1 匹の副腎で好中球性炎症の小型病巣がみられた。肝臓の中心静脈周囲に存在及び中心静脈を遊走する白血球がし

ばしばみられたが、血管炎の組織学的特徴はみられなかった。血圧低下を示唆する病変（副腎皮質の壊死、腎尿細管壊死）はいずれの個体にもみられなかった。

本試験の成績から、オリプダーゼ アルファを既知の毒性用量で投与する前に、用量漸増法で 3 日ごとに 3 mg/kg の用量で投与したところ、以前に 20 mg/kg の単回投与により認められた毒性が抑制された。

3.2.3.5 ASMKO マウスに隔日投与後に隔週 13 週間投与（3、10 又は 30 mg/kg）した用量漸増法の評価

Module 2.6.7 [表 2.6.7.6]、[redacted]-00262 試験

3.2.3.4項と同様の用量漸増法で ASMKO マウスに投与する探索的試験を更に 1 試験実施した。ただし本試験では、ASMKO マウスに対し、3 mg/kg のオリプダーゼ アルファを 2 日ごと 4 回投与後に、3 mg/kg（4 匹／性別）、10 mg/kg（8 匹／性別）又は 30 mg/kg（8 匹／性別）の用量で 2 週間ごとに 13 週間投与した。

雌雄 ASMKO マウスに対し、1、3、5 及び 7 日目に 3 mg/kg のオリプダーゼ アルファを投与した（用量漸増相）。9 日目以降は隔週で 13 週間（計 7 回）、オリプダーゼ アルファを 3、10 又は 30 mg/kg の用量で投与した（維持投与相）。オリプダーゼ アルファは IV ボーラス投与した。各群の一部（第 1 群は 2 匹／性別、第 2 及び 3 群は 4 匹／性別）から投与前並びに投与 1 回目（9 日目）、4 回目（51 日目）及び 7 回目（93 日目）の投与 5 分後及び 4 時間後に採血し、オリプダーゼ アルファの最高曝露量（5 分後）及び血中セラミド濃度（4 時間後）を測定した。各群の残りの個体（第 1 群は 2 匹／性別、第 2 及び 3 群は 4 匹／性別）から投与前並びに投与 1 回目（9 日目）、4 回目（51 日目）及び 7 回目（93 日目）の投与 4 及び 24 時間後に採血し、血中バイオマーカープロファイル（4 時間後）並びに急性期タンパク質及び肝酵素濃度（24 時間後）を解析した（表 32）。

表 32 - [redacted]-00262 試験の試験デザイン

群番号	動物数 雄／雌	被験物質	投与量 (mg/kg)	用法[a]	投与経路
1	4/4	オリプダーゼ アルファ	3	1、3、5 及び 7 日目に 3 mg/kg 9 日目以降の隔週 13 週間は 3 mg/kg	静脈内
2	8/8		3、10	1、3、5 及び 7 日目に 3 mg/kg 9 日目以降の隔週 13 週間は 10 mg/kg	
3	8/8		3、30	1、3、5 及び 7 日目に 3 mg/kg 9 日目以降の隔週 13 週間は 30 mg/kg	

a 投与相の初回投与以降の各投与の前に 20 mg/kg の DPH を IP 投与した。DPH を前投与しても過敏性反応を示した個体には再度 DPH（10 mg/kg）を投与した。

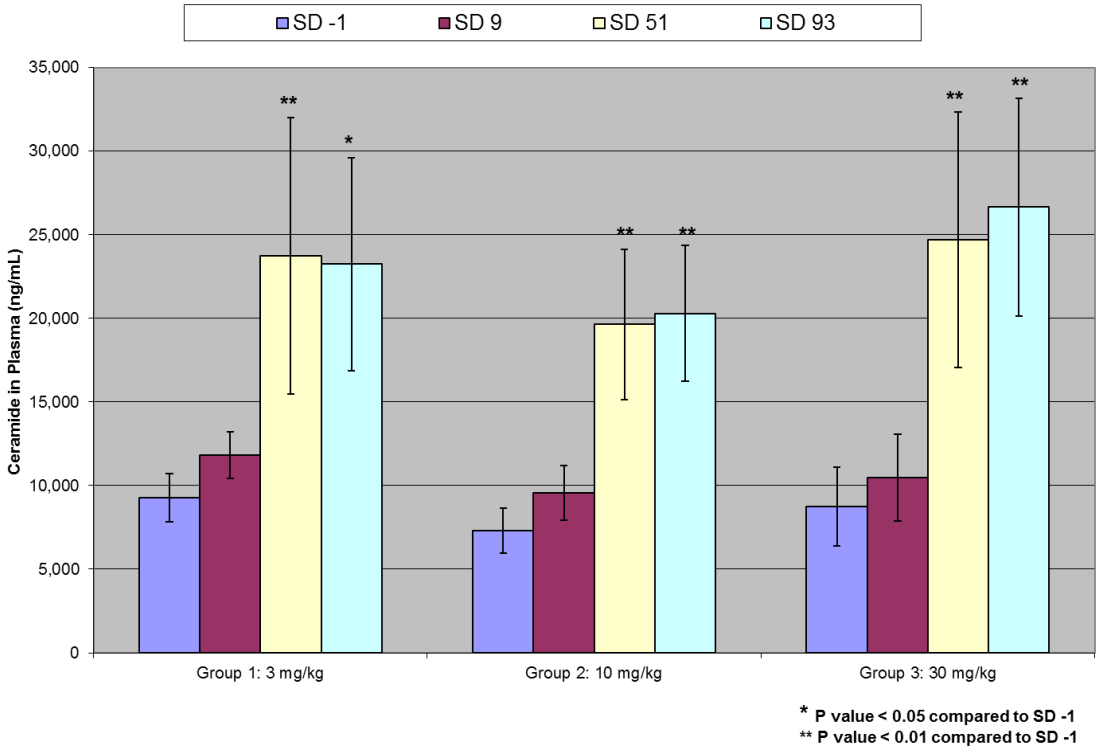
ヒトタンパク質をマウスに投与するとアナフィラキシー反応が生じる可能性があるため、維持投与相の初回投与以降の被験物質投与後に、各個体についてアナフィラキシーの徴候（不穏、噛む動作、顔を擦る、蕁麻疹、浮腫、嗜眠及び被毛の汚れなど）を綿密に観察した。

100 日目に全例を CO_2 にて安楽殺した。その後、臨床病理学的検査及び免疫原性解析用の血液を心穿刺により採取した。採血後、全例について剖検を実施した。一部の組織（肝臓、脾臓、腎臓及び肺）を、病理組織学的検査用は 10%中性緩衝ホルマリン液（NBF）中で保存し、スフィンゴミエリン蓄積量分析（MetaMorph 分析）用は 2%グルタルアルデヒド／2%パラホルムアルデヒド中で保存した。

第 1 群では、9、51 及び 93 日目のオリプダーゼ アルファ投与 5 分後に採取した血清試料でオリプダーゼ アルファ濃度の用量依存的な増加が認められた。しかし、第 2 及び 3 群では 51 及び 93 日目の血清中オリプダーゼ アルファ濃度が 9 日目よりも減少した。これは ADA が存在したためである可能性がある（測定は実施していない）。血清中オリプダーゼ アルファ濃度が低下したが全ての時点でオリプダーゼ アルファの曝露量は依然として十分であったことから、全ての用量で毒性評価が可能であると判断した。

オリプダーゼ アルファ投与マウスでの－1 日目並びに 9、51 及び 93 日目の投与 4 時間後における平均血漿中セラミド濃度を以下の図 4に示す。

図 4 - ASMKO マウスにおける平均血漿中セラミド濃度



これらの成績から、51 日目以降に全ての群で血漿中セラミド濃度が投与前値に比べ有意に増加し、これが 93 日目まで持続することが分かった。同じ時点での血漿中セラミド濃度を群間で比較したときに著しい差はないことから、この増加は用量反応性でないことが示唆された。血漿中セラミド濃度は 51 日目と 93 日目とで同程度であり、既知の毒性濃度を下回っていた。

MetaMorph 分析の結果、ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを反復投与すると、腎臓のスフィンゴミエリン蓄積量が用量依存的に減少し、脾臓及び肝臓では全ての群でスフィンゴミエリン蓄積量がほぼ完全に減少したことから、検討した全ての用量でクリアランス効果があることが示された。

しかし肺中スフィンゴミエリン蓄積量については、ASMKO マウスに rhASM を 10 又は 30 mg/kg の用量で反復投与しても 3 mg/kg 投与時に比べ著しい減少は生じなかった。病理組織学的にはクリアランスが認められなかったものの、第 2 及び 3 群の雄並びに第 3 群の雌で肺重量が著しく減少したことから、これらの用量でスフィンゴミエリンのクリアランスが生じたことが示唆された。全ての群で標準偏差が大きく著しいばらつきがあったことから、肺からの試料採取が不均一であったことが示唆され、その試料採取の不均一のためにスフィンゴミエリン減少について意義ある評価ができなかった可能性がある。

体重、器官重量の絶対値、体重比及び脳重量比、急性期タンパク質、サイトカイン並びにその他の分析対象において、試験期間中に統計学的有意な変化がいくつかみられた。ただし、これらはいずれも用量依存的ではなく、高用量の単回投与時に比べて軽度であったか、オリプダーゼ アルファの薬理活性に関連することが知られていない再現性のない変化であるため、毒性学的な意義はないと考えられた。血液生化学的パラメータ、血液学的検査値及び肝酵素値において、試験期間中のいずれの時点でも有意差はなかった。

死亡数は全群を通じて同程度であった。早期死亡が計 6 匹（雄 5 匹及び雌 1 匹）認められた。死因は全て、手技に関連する合併症又は偶発的所見であった。

本試験で最終剖検時に評価した病理組織学的検査（肝臓、脾臓、腎臓及び肺）から、オリプダーゼ アルファ投与に関連する毒性変化はみられなかった。

本試験の成績に基づくと、雌雄 ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを用量漸増投与相の後で隔週 1 回 13 週間 IV 投与したときの NOAEL は 30 mg/kg であった。

3.2.3.6 ASMKO マウスに隔日、毎週及び隔週投与後に 20 mg/kg の用量を投与した用量漸増法の評価

Module 2.6.7 [表 2.6.7.6]、12-03293 試験

最終的な探索的用量漸増投与試験として、ASMKO マウスを用いて用量漸増投与のタイミングを評価した。

雌雄 ASMKO マウスを 4 つの群に分け、表 33に記載のとおりオリプダーゼ アルファを IV ボーラス投与した。

表 33 - ■-03293 試験の試験デザイン

群番号	動物数 雄／雌	被験物質[a]	投与量 (mg/kg)	用法	投与経路
1	4/3	オリプダーゼ アルファ	3、20	1、3、5 及び 7 日目に 3 mg/kg 9 日目に 20 mg/kg	静脈内
2	4/3			1、8、16 及び 22 日目に 3 mg/kg 29 日目に 20 mg/kg	
3	3/4			1、16、29 及び 43 日目に 3 mg/kg 57 日目に 20 mg/kg	
4	0/1		NA	NA	NA

略号： NA=該当せず

a ヒトタンパク質をマウスに投与すると過敏症反応が生じる可能性があるため、第 1 群では初回投与以降、第 2 群では 3 回目の漸増投与（16 日目）以降、第 3 群では 2 回目の漸増投与（16 日目）以降の各投与の際に、全ての個体に 20 mg/kg の DPH を IP 投与した。

用量漸増投与のみの場合と用量漸増投与後に投与相（20 mg/kg 投与）を設けた場合とでバイオマーカー値に差があるか否かを調べるため、第 1、2 及び 3 群の 3 匹は投与相へ移行せずにそれぞれ 9、29 及び 57 日目に安楽殺し、各群の残りの個体は 20 mg/kg のオリプダーゼ アルファを投与してから 3 日後（それぞれ 12、32 及び 60 日目）に安楽殺した。第 4 群の無処置マウスは 32 日目に安楽殺した。安楽殺の後に全ての個体から、血液生化学的検査、セラミド濃度及びサイトカイン／急性期タンパク質の分析用の血液を心穿刺により採取した。採血後に全ての個体について剖検を実施し、組織（副腎、脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、卵巣、脾臓及び精巣）を採取して、病理組織学的検査用に 10%NBF 中で保存した。全例の肝臓及び脾臓の一部は、スフィンゴミエリン蓄積量分析（MetaMorph 分析）用に 2%グルタルアルデヒド／2%パラホルムアルデヒド中で保存した。全例の肝臓及び脾臓の更に別の一部を採取し、代替法（Amplex Red アッセイ）によるスフィンゴミエリン蓄積量分析用に-60°C 以下で保存した。

肝臓及び脾臓中のスフィンゴミエリン蓄積量は、MetaMorph 分析及び Amplex Red アッセイともに、第 1 及び 2 群に用量漸増投与した場合に著しく減少した。用量漸増投与後に投与相（20 mg/kg）を追加したところ、第 2 群のみで脾臓中スフィンゴミエリン濃度が更に減少した。第 3 群に用量漸増投与したところ、肝臓及び脾臓中のスフィンゴミエリン蓄積量は減少したが第 1 及び 2 群に比べ軽度であった。ただし、用量漸増投与後に投与相を追加すると、肝臓及び脾臓ともにスフィンゴミエリン蓄積量は第 1 及び 2 群と同程度に著しく減少した。

オリプダーゼ アルファを投与された第 3 群で計画外死亡が 2 匹みられた。16 日目（2 回目の用量漸増投与日）にみられた計画外死亡は、一般状態所見に基づくと重度の過敏性反応に起因すると思われた。しかし、60 日目（57 日目の 20 mg/kg オリプダーゼ アルファ投与 3 日後）に発現した死亡は、

これまでにみられたオリプダーゼ アルファによる毒性発現時期に比べ遅かったが、オリプダーゼ アルファ投与関連であった可能性がある。

血液生化学的検査の評価では、ALT、AST、ALP、総ビリルビン及びコレステロールにおいてオリプダーゼ アルファに関連する変化はなかった。GGT の結果は、技術上の問題のため解釈できなかった。またセラミド濃度において、用法の違いによる有意差はなかった。

急性期タンパク質を分析したところ、第 1 群に比べ第 2 及び 3 群で統計学的有意ないくつかの変化が、用量漸増投与（それぞれ 29 及び 57 日目）及び用量漸増後に投与相を設けた場合（それぞれ 32 及び 60 日目）ともに認められた。しかしこれらの変化の大半（SAP を除く）は用量依存的ではない、その他の試験での高用量単回投与時に比べ軽度である、又は 3 mg/kg の単回投与時と同程度であった。オリプダーゼ アルファを毎週（第 2 群）及び隔週（第 3 群）投与された群では隔日（第 1 群）投与された群に比べ用量漸増投与後に SAP 濃度が統計学的有意に増加した。このことから、用量漸増投与と投与相との間隔を長くすると、[redacted]-0025Pnp 試験及び[redacted]-0158Pnp 試験（2.2.3項参照）と同様に急性期タンパク質が増加することが示唆される。

肝臓及び脾臓中のスフィンゴミエリン蓄積量は、第 1 及び 2 群に用量漸増投与した場合に著しく減少した。用量漸増投与後に投与相（20 mg/kg）を追加したところ、第 2 群のみで脾臓中スフィンゴミエリン濃度が更に減少した。第 3 群に用量漸増投与したところ、肝臓及び脾臓中のスフィンゴミエリン蓄積量は減少したが第 1 及び 2 群に比べ軽度であった。ただし、用量漸増投与後に投与を追加すると、肝臓及び脾臓ともにスフィンゴミエリン蓄積量は第 1 及び 2 群と同程度に著しく減少した。

病理組織学的検査において、第 3 群に対し用量漸増投与後に投与相を追加したところ、雄 1 匹及び雌 2 匹で、副腎皮質の急性壊死（オリプダーゼ アルファを 10 mg/kg 超の用量で投与後に報告されたとおり、急性血液量減少性ショックに一致）がみられた。用量漸増投与後に投与相を追加した 3 匹（第 2 群の 2 匹及び第 3 群の早期死亡例 1 匹）では、肝臓の門脈及び門脈周囲領域に細動脈の再重複がみられた。このような血管病変はマウスではまれであるが、他の動物種では門脈低潅流に関連して最もよくみられ、先天的又は後天的な血管異常により生じる。これは系統に関連した先天的な病変である可能性が最も高い。しかし、このマウスモデルで更なる特徴付けを行わなければ、被験物質により誘発された病変である可能性は完全には除外できない。

脾臓、腎臓、肺、主気管支、心臓、脳、卵巣及び精巣では、被験物質に関連する病理組織学的所見はなかった。病理組織学的所見はいずれも系統又は加齢に伴う偶発的所見であり毒性学的意義はないと考えられた。

本試験条件下で、ASMKO マウスにおいて重大な毒性を発現することなく、オリプダーゼ アルファを 3 mg/kg で隔日又は毎週投与してから 20 mg/kg を投与する用量漸増法を行うことが可能であった。一方、オリプダーゼ アルファの用量 3 mg/kg を隔週で用量漸増投与してから高用量を投与することは可能であったが、本群の 1 匹が死亡し、病理組織学的所見は先に高用量のオリプダーゼ アルファ投与により認められた毒性に一致していた。このことから、ASMKO マウスにおいて隔週投与用法は他の用法ほど忍容性が良好ではないことが示唆された。

3.3 非げっ歯類

3.3.1 カニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

Module 2.6.7 [表 2.6.7.7. D]、[redacted]007 試験

GLP 適用反復投与毒性試験において、カニクイザルに 0、3、10 及び 30 mg/kg のオリプダーゼ アルファの 30 分間 IV 持続投与を隔週で 26 週間実施し（13 回投与）、4 週間の回復期間を設けた。

雌雄のサルを表 34（動物数／群は脚注[b]参照）に示すとおり 5 つの群に割り付けた。動物に、移動型ポンプ装置及び被験物質リザーバー並びに頚静脈への静脈アクセスを付けたジャケットを装着させ、非拘束下で投与した。血管アクセスポートが故障した場合、拘束用ボックスを用いて伏在静脈から投与した。最終投与の約 1 週間後（8 日後）に、対照群の雄 3 匹及び雌 4 匹並びに第 2、3 及び 4 群の 4 匹／性別を剖検し、残りの個体（対照群の 2 匹／性別、第 2 及び 3 群の 3 匹／性別並びに第 4 群の雄 3 匹及び雌 2 匹）は 4 週間の回復期間終了まで試験を継続した。第 5 群の雄 1 匹は回復期間終了時に剖検した（表 34）。

表 34 - [redacted]007 試験の試験デザイン

群番号	動物数[b]		被験物質	投与量 (mg/kg)	用法	投与経路
	投与終了後剖検 雄／雌	回復期間後剖検 雄／雌				
1	3/4	2/2	溶媒	0 mg/kg	隔週、26 週間	IV
2	4/4	3/3	オリプダーゼ アルファ	3 mg/kg		
3	4/4	3/3		10 mg/kg		
4	4/4	3/2		30 mg/kg		
5[a]	1/0	0/0	溶媒	0 mg/kg	隔週、5 週間	

略号：IV=静脈内

a 第 1 群の雄である動物番号 I61776 は、修理不能なカテーテル機能不全のため 29 日目（第 3 回投与）で投与をやめ、第 5 群として新たな動物番号（I62480）を付与し、以降は投与しなかった。ただし、その他の全てのパラメータは第 1 群のその他の個体と同じスケジュールで評価した。

b 計画剖検時まで生存した動物の数を示す。

毒性評価は、生死、一般状態観察（摂餌量の定性評価を含む）、体重、身体検査所見、眼科学的検査所見、臨床病理学的評価及び病理組織学的評価に基づき実施した。

TK 用の血液試料採取を、1、71 及び 169 日目（それぞれ第 1、6 及び 13 回投与）の投与後の数時点並びに 141 日目（第 11 回投与）の投与終了約 15 分後に実施した。

雌雄サルの TK パラメータ結果を表 35、表 36及び表 37に示す。詳しい結果は Module 2.6.4 [4.2.2 項]（[redacted]007 試験）にも記載する。オリプダーゼ アルファの初回投与後における TK は用量比例性ではなく、用量の増加とともに最終相の消失半減期は延長しクリアランスは低下した。初回投与後の最終相の消失半減期は、雌雄合算の平均値で 3 mg/kg では 8.40 時間、30 mg/kg では 13.39 時間であった。

1 日目のオリプダーゼ アルファの平均曝露量は、第 2 群（3 mg/kg）で 202.42 µg•hr/mL、第 3 群（10 mg/kg）で 987.65 µg•hr/mL、第 4 群（30 mg/kg）で 3712.16 µg•hr/mL であった。71 日目及び 169 日目のオリプダーゼ アルファの TK は初回投与後とは異なった。各用量で、71 日目及び 169 日目のオリプダーゼ アルファの曝露量は初回投与後に比べ 30%から 50%低値であった。オリプダーゼ アルファの反復投与後における曝露量の変化は、クリアランスの増加及び消失半減期の短縮によるものであった。オリプダーゼ アルファ曝露量の低下は ADA 抗体価の上昇による可能性が示唆される。

表 35 - 1 日目：3、10 又は 30 mg/kg のオリプダーゼ アルファを雌雄カニクイザルに初回投与後のトキシコキネティクスパラメータ（n=6~7/性/群、Mean±SD）

パラメータ	3 mg/kg 雌	3 mg/kg 雄	10 mg/kg[a] 雌	10 mg/kg[a] 雄	30 mg/kg 雌	30 mg/kg 雄
C_{max} (µg/mL)[b]	41.84 ±5.63	46.21 ± 7.10	254.66 ± 25.00	252.57 ± 26.47	690.64 ± 70.08	721.89 ± 114.39
$t_{1/2\beta}$ (hr)	8.16 ± 2.19	8.65 ± 2.19	11.20 ± 3.04	12.44 ± 2.80	14.19 ± 3.46	12.59 ± 2.15
AUC (µg•hr /mL)	186.84 ± 21.59	217.99 ± 45.34	936.15 ± 110.62	1039.15 ± 187.73	3589.51 ± 255.27	3834.81 ± 513.45
AUC/投与量 (µg•hr/mL/mg/kg)	62.28 ± 7.20	72.66 ± 15.11	93.62 ± 11.06	103.92 ± 18.77	119.65 ± 8.51	127.83 ± 17.12

略号：C_{max}=最高血中濃度、$t_{1/2\beta}$=終末半減期、AUC=無限大時間まで外挿した血清中濃度-時間曲線下面積

a n=6/性

b IV 持続投与、30 分間

表 36 - 71 日目（6 回目投与）：3、10 又は 30 mg/kg のオリプダーゼ アルファを雌雄カニクイザルに反復投与後のトキシコキネティクスパラメータ（n=7/性/群、Mean±SD）

パラメータ	3 mg/kg 雌	3 mg/kg 雄	10 mg/kg 雌	10 mg/kg 雄	30 mg/kg 雌	30 mg/kg 雄
C_{max} (µg/mL)[a]	32.78 ± 8.62	38.94 ± 5.45	199.68 ± 62.87	194.54 ± 32.53	1214.74 ± 791.93	625.54 ± 97.59
$t_{1/2\beta}$ (hr)	6.76 ± 5.52	4.90 ± 3.29	8.06 ± 1.88	7.86 ± 3.28	4.93 ± 2.05	5.85 ± 1.28
AUC (µg•hr /mL)	113.93 ± 64.75	122.20 ± 64.05	701.29 ± 153.44	726.31 ± 248.77	2703.09 ± 308.02	2724.63 ± 394.36
AUC/投与量 (µg•hr/mL/mg/kg)	37.98 ± 21.58	40.73 ± 21.35	70.13 ± 15.34	72.63 ± 24.88	90.10 ± 10.27	90.82 ± 13.15

略号：C_{max}=最高血中濃度、$t_{1/2\beta}$=終末半減期、AUC=無限大時間まで外挿した血清中濃度-時間曲線下面積

a IV 持続投与、30 分間

表 37 - 169 日目（13 回目投与）：3、10 又は 30 mg/kg のオリプダーゼ アルファを雌雄カニクイザルに反復投与後のトキシコキネティクスパラメータ（n=6~7/性/群、Mean±SD）

パラメータ	3 mg/kg 雌	3 mg/kg 雄	10 mg/kg 雌	10 mg/kg 雄	30 mg/kg[a] 雌	30 mg/kg 雄
C_{max} (μg/mL)[b]	26.80 ± 11.69	33.29 ± 9.36	216.81 ± 70.73	200.63 ± 44.93	728.83 ± 148.04	707.09 ± 153.05
$t_{1/2\beta}$ (hr)	2.75 ± 2.40	3.68 ± 3.88	6.34 ± 4.99	10.09 ± 7.12	4.77 ± 1.64	7.86 ± 4.00
AUC (μg•hr /mL)	97.59 ± 81.36	98.81 ± 71.38	601.84 ± 283.70	741.21 ± 317.13	2344.14 ± 837.70	2434.22 ± 837.04
AUC/投与量 (μg•hr/mL/mg/kg)	32.53 ± 27.12	32.94 ± 23.79	60.18 ± 28.37	74.12 ± 31.71	78.14 ± 27.92	81.07 ± 27.90

略号：C_{max}=最高血中濃度、$t_{1/2\beta}$=終末半減期、AUC=無限大時間まで外挿した血清中濃度-時間曲線下面積

a n=6/雌

b IV 持続投与、30 分間

試験期間中に 3 匹の計画外死亡が発現した。これらは偶発的な肢の骨析に起因しており、取扱い手技に関連すると思われた。オリプダーゼ アルファに関連する死亡はいずれの投与群でも認められなかった。

投与期間中及び回復期間中の一般状態観察において、投与に関連する影響はなかった。投与期間中、30 mg/kg/回群で対照群に比べ嘔吐の発現率（雄 2/7 匹及び雌 2/7 匹）及び摂餌なし（雄 3/7 匹）の発現率が高かった。これらは散発的で、影響を受けた動物での発現頻度が低かったことから投与に関連しないと考えられた。その他の一般状態所見（糞の変化、皮膚の所見）も、発現が散発的及び明らかな用量反応性がなかったことから投与に関連しないと考えられた。

眼科学的検査において、オリプダーゼ アルファ投与動物に所見はみられなかった。

臨床病理学的データ（血液学的検査、血液凝固系検査、血液生化学的検査及び尿検査のパラメータ）に概して特筆すべき点はなく、群間で同程度であった。臨床病理学的パラメータでいくつか有意差が認められたが、差の程度が小さい、用量反応性がない、若しくは 8 日目の投与前にも差が認められた（有意差あり又はなし）ことから、オリプダーゼ アルファ投与による偶発的なものであると考えられた。

体重、体重増加量、器官重量、剖検及び病理組織学的検査において、投与に関連する影響はなかった。

投与部位及びカテーテル留置部位の病理組織学的検査では、血管内膜の線維化、内腔の線維化（血管内腔内に留置したカテーテル周囲に形成された血栓に由来する線維性腫瘤）、血管内膜肥厚、マクロファージ由来内皮新生、肉芽腫、及び肉芽腫性炎症又は化膿性炎症が認められた。これらの所見は留置カテーテルを用いる試験で予想されるものであり、その発現率及び重症度に及ぼす投与の影響はなかった。病理組織学的検査でみられた炎症性病変、線維性病変又は血管病変は特に腎臓、肺、

心臓及び肝臓に存在した。これらの病変は静脈内カテーテルの留置に起因するものと考えられ、発現率及び重症度に及ぼす投与の影響はなかった。

ADA 濃度は、オリプダーゼ アルファの 3、10 又は 30 mg/kg 投与群で 29 日目（第 3 回投与後）から検出された。ADA 抗体価は反復投与により全体として増加傾向を示し、第 7 回と第 13 回投与の間で抗体価が最も高かった。最終投与後（169 日目）には、第 2 群（3 mg/kg）の全例、第 3 群（10 mg/kg）の 13/14 匹及び第 4 群（30 mg/kg）の全例で抗体価が検出された。第 1 群（溶媒）では試験期間を通じて ADA は検出されなかった。

本試験条件下でいずれの用量でも投与に関連する所見がみられなかったことから、雌雄カニクイザルにオリプダーゼ アルファを 2 週間ごと、26 週間 IV 投与したときの NOAEL は、検討した最高用量である 30 mg/kg/回であった。

4　遺伝毒性試験

オリプダーゼ アルファの非臨床安全性評価プログラムは ICH S6「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」を考慮し計画された。オリプダーゼ アルファは、原薬の構造（組換えヒトタンパク質）、その不純物プロファイル及び最終製剤中の添加剤に基づくと遺伝毒性及び変異原性がないと予想される。添加剤は全て一般的に使用されており、適切な薬局方に適合している。ICH S6 に基づき、オリプダーゼ アルファの変異原性を評価する試験は必要ないと判断し、遺伝毒性試験は実施しなかった。

5　がん原性試験

ICH S6「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」には、バイオ医薬品においては、がん原性に対する懸念がある場合を除き、標準的ながん原性試験は不要であると記載されている。ICH S6 ガイダンスが反映された EMA/CHMP/ICH/731268/1998 には「バイオ医薬品の製品特有のがん原性評価の必要性については、臨床対象集団及び投与期間の観点から判断すべきである（ICH S1A ガイドライン参照）」と記載されている。さらに、FDA の産業界向けガイダンス「Investigational enzyme replacement therapy products: nonclinical assessment（酵素補充療法用治験薬：非臨床評価）」（2019 年）では、酵素補充療法（ERT）の薬剤の販売承認を支持するためのがん原性試験は通常必要ないと考えられている。

以下の点に基づきオリプダーゼ アルファにがん原性はないと考えられるため、申請者は更なる評価は必要ないと判断している。

- ラット及びサルでの 6 か月反復投与試験並びに ASMKO マウスでの 3 か月反復投与試験を含むオリプダーゼ アルファのいずれの非臨床毒性試験においても、腫瘍性所見若しくは非腫瘍性の増殖所見はみられなかった。
- オリプダーゼ アルファは DNA と反応する可能性の低いヒト酸性スフィンゴミエリナーゼの組換えタンパク質である。
- 最終製剤の構造は変異原性及びがん原性を示唆する構造を持っていない。
- げっ歯類では DPH を併用投与しても過敏性反応がみられるため、オリプダーゼ アルファを長期投与したときに忍容性が得られる可能性が低い。したがって、げっ歯類を用いた長期試験は実施できないと考えられる。
- 酸性スフィンゴミエリナーゼと腫瘍増殖又はがんとの関係に関する公表文献の調査を行った結果、該当する報告は見出されなかった。加えて、オリプダーゼ アルファのファーマコビジランス安全性報告データベースの調査でも悪性新生物に関連する報告はなかった。

以上、本薬はヒト組換えタンパクであることと、毒性試験結果、及び利用可能なデータベースの調査結果から、科学的根拠の重要度（weight-of-evidence）に基づく評価として、オリプダーゼ アルファによりがんのリスクが増加するという示唆はないと結論した。さらに、げっ歯類に一生涯投与すると重大な過敏性反応が生じる可能性があるため、がん原性試験で意義のある結果が得られない。したがって、申請者は、オリプダーゼ アルファの非臨床がん原性試験は必要ないと判断した。

6　生殖発生毒性試験

オリプダーゼ アルファの生殖発生毒性を評価する非臨床試験を実施した。試験は CD-1 マウス及び NZW ウサギを用いて実施した。これらは生殖及び発生への影響を評価するための標準的な動物種である。

最も感受性の高い動物種は ASMKO マウスであるが、生殖面で本モデル固有の問題（同腹児が少ない、一腹あたりの児の数が少ない、精子運動性が低い、精子の形態上の問題、生存児は 2～4 か月齢までに運動失調及び神経系の欠陥が生じる）があること、加えて、本モデルの頑健な背景対照データベースがなく得られたデータの解釈が困難であることから、生殖毒性試験にこのマウスを用いることができなかった。

幼若動物を用いた毒性試験は実施していない。正常動物を用いた幼若動物毒性試験では、既に実施した毒性試験で得られている以上の新たな情報は得られないと考えられる。ASMKO マウスは最も感受性の高い動物モデルであるが、生殖機能及び神経学的な欠陥があるため(14)(15)、幼若動物毒性試験には使用できない。ASMKO マウスでは、同腹児数の減少、出生児数の減少、精子運動性の低下及び精子形態の問題といった生殖系の欠陥が報告されており、並びに体格が小さくコレステロール濃度の増加も認められる。ASMKO マウスは 2～4 か月齢までに運動失調及び神経学的障害を発症し、6～8 か月齢で死亡する。オリプダーゼ アルファは血液脳関門を通過しないため（Module 2.6.4 [6.1.1 項]参照）、バックグラウンドとしての神経行動学的異常を、被験物質投与群も対照群も同程度示すことが予想される。これらの異常と、結果として生じる嗜眠及び最終的に死亡に至る点を合わせると、ASMKO の表現型と評価されるべき毒性との識別を困難にするため、神経行動学的評価は適切に実施できないと考えられる。

6.1　げっ歯類－正常マウス

6.1.1　雌雄 CD-1 マウスを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

Module 2.6.7 [表 2.6.7.12 A]、FER0510 試験

本 GLP 適用受胎能試験では、雌雄 Crl:CD1(ICR)（CD-1）マウスに 0、3.16、10.0 及び 30.0 mg/kg のオリプダーゼ アルファを隔日で IV ボーラス投与した。本試験の目的は、雌雄 CD-1 マウスに同居前、交配期間中及び着床期間にかけてオリプダーゼ アルファを投与したときの受胎能及び生殖への影響を検討することであった。本試験は、ICH S5(R2)に示されるステージ A 及び B に一致するようデザインした。

雄マウスに対し、同居 28 日前から同居期間中及び試験 49～53 日目の安楽殺まで被験物質又は対照物質を隔日に 1 回投与した。雌マウスに対し、同居 15 日前から同居期間中及び妊娠（GD）7 日まで被験物質又は対照物質を隔日に 1 回投与した（表 38）。

表 38 - FER0510 試験の試験デザイン

群番号	被験物質	投与量 (mg/kg/回)	濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	投与経路	動物数	
						雄	雌
1	対照[a]/生理食塩液[b]	0	0	8.1/4	IV[c]/ IP[b]	25	25
2	対照[a]/ DPH[d]	0/20	0/5	8.1/4	IV[c]/ IP[e]	25	25
3	オリプダーゼ アルファ/ DPH[d]	3.16/20	0.39/5	8.1/4	IV[c]/ IP[e]	25	25
4	オリプダーゼ アルファ/ DPH[d]	10.0/20	1.23/5	8.1/4	IV[c]/ IP[e]	25	25
5	オリプダーゼ アルファ/ DPH[d]	30.0/20	3.70/5	8.1/4	IV[c]/ IP[e]	25	25

略号：IV=静脈内、IP=腹腔内、DPH=ジフェンヒドラミン塩酸塩

a 20 mmol/L リン酸ナトリウム、5%精製白糖、100 mmol/L メチオニン、0.1 mmol/L EDTA（pH 6.5）を IV 投与。

b 生理食塩液を IP 投与。

c IV ボーラス投与。

d ジフェンヒドラミン塩酸塩

e DPH のみ IP 投与（対照物質又は被験物質投与の 10～20 分前）。

投与容量は直近の体重に基づき調整した。第 2～5 群には、第 2 回投与以降の被験物質投与 10～20 分前に DPH を IP 投与した。全てのマウスが確実に同じ投与を受けるよう、第 1 群には対照物質投与の 10～20 分前に生理食塩液を IP 投与した。

本試験では、生死、一般状態観察、体重、体重変化、摂餌量、性周期評価、交配及び受胎能、雄生殖能評価（精子の運動性及び濃度）、卵巣及び子宮の評価、剖検所見、器官重量並びに病理組織学的検査を評価した。

雄では、3.16、10.0 及び 30.0 mg/kg 群でそれぞれ 7、4 及び 0 匹が投与後に死亡して発見された。これらの死亡は投与後 3 時間以内に発現し、しばしば一般状態の毒性所見を伴った（例外として、10.0 mg/kg 群の 1 匹では試験 23 日目の投与前に死亡して発見された）。投与後の死亡時点と、一般状態の毒性所見を伴ったことから、これらの死亡はオリプダーゼ アルファ投与に対する過敏性反応に起因すると考えられた。投与群の雄における過敏性反応に起因する一般状態所見がみられたのは概して死亡例のみであり、自発運動の低下、振戦、身体の痙攣、運動失調、接触時冷感及び努力性呼吸が生じた。計画剖検時まで生存した個体の一般状態所見として、30.0 mg/kg 群で活動性の亢進、運動失調、自発運動の低下、振戦、努力性呼吸及び異常発声が発現した。これらはオリプダーゼ アルファ投与に対する過敏性反応に起因すると考えられた。雄の体重、体重増加量及び摂餌量において、オリプダーゼ アルファによる影響は、評価したいずれの用量でも認められなかった。交配所要日数、交尾率、受胎率及び器官重量においてオリプダーゼ アルファに関連する影響はなく、剖検所見はみられなかった。精子パラメータ（左精巣上体尾部の精子運動性及び精巣上体尾部の精子濃度）においてオリプダーゼ アルファに関連する変化はみられず、精巣と精巣上体の病理組織学的検査ではいずれの用量でもオリプダーゼ アルファに関連する所見はなかった。

雌では、3.16、10.0 及び 30.0 mg/kg 群でそれぞれ 6、4 及び 1 匹が投与後に死亡して発見された。これらの死亡はオリプダーゼ アルファ投与 21 分後から 1 時間 29 分後に発現した。一般状態の毒性所見を伴ったこと又は死亡時点から、これらの死亡はオリプダーゼ アルファ投与に対する過敏性反応に関連すると考えられた。投与群の雌において一般状態所見がみられたのは概して死亡発見例又は計画外安楽殺例のみであり、自発運動の低下、自発運動の亢進、身体の筋攣縮、運動失調、接触時冷感及び努力性呼吸が認められた。これらはオリプダーゼ アルファ投与に対する過敏性反応に起因すると考えられた。雌の体重、体重増加量及び摂餌量において、30 mg/kg までの用量でオリプダーゼ アルファの影響は認められなかった。交配所要日数、交尾率、受胎率、器官重量並びに卵巣及び子宮のパラメータにおいて、オリプダーゼ アルファに関連する影響はみられなかった。いずれの用量でも病理組織学的所見はみられなかった。

以上、オリプダーゼ アルファを投与しても、雌雄マウスの交配及び受胎能若しくは GD 7 に評価した雌マウスの帝王切開パラメータ及び同腹児パラメータへの影響はなかった。これらの結果から、父動物及び母動物に対するオリプダーゼ アルファの NOAEL は、検討した最高用量である 30 mg/kg であった。

6.1.2 CD-1 マウスを用いた胚・胎児発生に関する毒性試験

Module 2.6.7 [表 2.6.7.13 A]、TER0694 試験

胚・胎児発生に関する GLP 適用毒性試験において、雌 Crl:CD1(ICR)（CD-1）マウスに 0、3、10 及び 30 mg/kg のオリプダーゼ アルファを IV ボーラス投与した。本試験の目的は、ICH ガイドライン S5(R2) に準拠した試験デザインにおいて、オリプダーゼ アルファが妊娠 CD-1 マウス及び胚・胎児の発生に及ぼす影響を評価することであった。さらに、妊娠雌におけるオリプダーゼ アルファの TK パラメータを測定した。

被験物質であるオリプダーゼ アルファ及び溶媒対照物質（20 mmol/L リン酸ナトリウム、5%精製白糖、100 mmol/L メチオニン、0.1 mmol/L EDTA［pH 6.5］）を 0、3、10 及び 30 mg/kg/日の用量で GD 6～15 に 1 日 1 回、外側尾静脈から IV ボーラス投与した（表 39）。

表 39 - TER0694 試験の試験デザイン

群番号	被験物質	投与量 (mg/kg/日)	濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	投与経路	動物数	
						主試験	TK/ADA 試験相[d]
1	対照[a]/生理食塩液[b]	0	0	7.7/4	IV[c]/IP[b]	25	5
2	対照[a]/DPH[e]	0/20	0/5	7.7/4	IV[c]/IP[f]	25	5
3	オリプダーゼ アルファ/ DPH[e]	3	0.39	7.7/4	IV[c]/IP[f]	25	20
4	オリプダーゼ アルファ/ DPH[e]	10	1.30	7.7/4	IV[c]/IP[f]	25	20
5	オリプダーゼ アルファ/ DPH[e]	30	3.90	7.7/4	IV[c]/IP[f]	25	20

略号：IV=静脈内、IP=腹腔内、DPH=ジフェンヒドラミン塩酸塩、TK=トキシコキネティクス、ADA=抗薬物抗体

a 20 mmol/L リン酸ナトリウム、5%精製白糖、100 mmol/L メチオニン、0.1 mmol/L EDTA（pH 6.5）を IV 投与。

b 生理食塩液を IP 投与。

c IV ボーラス投与。

d TK 及び ADA 測定用動物は TK/ADA 評価のみに用いた。

e ジフェンヒドラミン塩酸塩ー第 3 群では GD 14 に過敏性反応（活動性の低下）がみられたため、残りの全例（第 1～5 群）の残りの投与期間において、対照物質又は被験物質の投与時に DPH 又は生理食塩液を IP 投与した。

f DPH は IP 投与（対照物質又は被験物質投与の 10～20 分前）。

本試験で評価した母動物パラメータ及び項目は次の通り：生死、一般状態観察、体重、妊娠子宮重量、体重増加量、摂餌量、肉眼観察並びに卵巣及び子宮の検査。胎児の検査項目は、外観、性別、体重並びに内臓検査及び骨格検査であった。

TK 試験相に割り付けられた全ての母動物から、GD 12 の投与約 0、2 分及び 10 分並びに 1、2、4、8 及び 24 時間後に TK 及び ADA 評価用の血液試料を採取した。

オリプダーゼ アルファに関連する死亡はなかった。本試験では 12 件の計画外剖検が発生し、うち早産が 1 匹、早期死亡が 11 件（主試験用動物 9 匹及び TK 評価用サテライト動物 2 匹）であった。第 1 群（対照群）の雌 1 匹（TK 評価用サテライト動物）が GD 12 に死亡して発見された。その他、3 mg/kg/日群の雌 10 匹が GD 12～16 に死亡して発見されたが、これらは過敏性反応に関連する可能性があった。第 4 群（10 mg/kg/日群）の雌 1 匹が計画安楽殺日に出産した。第 1 群（対照群）及び早産動物はいずれも余剰動物の雌に置き換えた。早期死亡及び過敏性反応に起因しないと考えられる早産はオリプダーゼ アルファに関連しないと考えられた。その理由は次の通り：1) 発現が用量依存的でなかった、2) 死亡は対照群でも発現した、3) 実験動物供給者のミスに起因した（供給者が未妊娠マウスではなく妊娠雌マウスを提供した）。その他の全ての個体は GD 18 の計画安楽殺まで生存した。

オリプダーゼ アルファに関連する一般状態所見は、GD 14～16 に 3、10 及び 30 mg/kg/日群（それぞれ 4、4 及び 7 匹）で活動性の低下がみられたのみであった。これはオリプダーゼ アルファ投与後に予想される過敏性反応に起因していた。

母動物の体重、体重増加量及び摂餌量において、対照群と比較してオリプダーゼ アルファはいずれの用量でも影響を及ぼさなかった。

GD 13 にオリプダーゼ アルファ投与動物の 16/58 匹（28%）で弱い免疫原性反応が認められた。抗体反応陽性が第 3 群（3 mg/kg）の 9/19 匹で認められ、抗体価は 1:100～1:800 の範囲であった。第 4 群（10 mg/kg）では、4/20 匹で ADA が陽性であり、抗体価は全て 1:100 であった。第 5 群（30 mg/kg）では、3/20 匹で ADA が陽性であり、抗体価は全て 1:100 であった。ADA の発現の有無は投与後 24 時間の血清中オリプダーゼ アルファ濃度（C_{24h}）に影響を及ぼしており、抗体が陽性であった個体では最大 73%減少した。ただし、この結果を解釈する際には、ADA の陽性例が少数であったこと及び C_{24h} のばらつきが大きかったことに注意する必要がある。

妊娠雌マウスにおける TK パラメータ測定結果を表 40に示す。詳しい結果は Module 2.6.4 [4.2.3 項]（TER0694 試験）にも記載する。複合血清中濃度プロファイルに基づくと、妊娠 CD-1 マウスで血清中濃度が最高となったのは 0.033～0.166 時間後（投与後の初回又は 2 回目の試料採取時点）であった。C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24}$ はいずれもほぼ用量に比例して増加した。用量が 10 倍（3 mg/kg/日から 30 mg/kg/日）になると、C_{max} は 11.6 倍、$AUC_{0\text{-}24}$ は 11.0 倍に増加した。これらの結果から、最大 30 mg/kg を妊娠 CD-1 マウスへ反復投与した際のオリプダーゼ アルファの毒性及び安全性について評価するに足る十分な曝露量が得られたことが示された。

表 40 - 妊娠 CD-1 マウスに 3、10 又は 30 mg/kg のオリプダーゼ アルファを 7 回投与後の TK パラメータ（n=2~17/時点、Mean）

パラメータ	3 mg/kg (n=4~17/時点)	10 mg/kg (n=2~15/時点)	30 mg/kg (n=2~16/時点)
t_{max} (h)	0.166	0.0333	0.0333
C_{max} (µg/mL)[a]	35.2	176	409
$AUC_{0\text{-}24}$ (µg•hr/mL)	83.1	278	916

略号： C_{max}=最高濃度、t_{max}=最高濃度到達時間、$AUC_{0\text{-}24}$ =0～24 時間の血清中濃度-時間曲線下面積
a IV ボーラス投与

剖検時、母動物に肉眼所見はみられなかった。

妊娠子宮重量並びに卵巣及び子宮のパラメータ（黄体、着床部位、同腹児数、胚・胎児の生存、胎児の体重及び胎児の性別）において、オリプダーゼ アルファに関連する影響はなかった。オリプダーゼ アルファに関連する胎児の外表、内臓及び骨格の奇形や変異もみられなかった。

結論として、妊娠 CD-1 マウスの GD 6～15 に 3、10 又は 30 mg/kg のオリプダーゼ アルファを 1 日 1 回 IV 投与しても死亡はみられず、母動物の体重、体重増加量、摂餌量、胚・胎児の生存及び胎児

の体重への影響はなく、胎児の外表、内臓及び骨格の奇形や変異も発現しなかった。母動物への影響は、3 mg/kg 以上の用量で過敏性反応に起因した活動性低下（この結果 GD 14 及び 15 に DPH を投与）の発現率が増加したことのみであった。これらのデータに基づき、母動物及び発生に関するオリプダーゼ アルファの NOAEL は、最高用量として検討した 30 mg/kg（このときの $AUC_{0\text{-}24}$ は 916 µg•hr/mL）であった。

6.1.3 CD-1 マウス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毒性試験

Module 2.6.7 [表 2.6.7.14]、DPN0380 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 GLP 適用毒性試験において、雌 Crl:CD1(ICR) マウスに 0、3.16、10 及び 30 mg/kg のオリプダーゼ アルファを IV ボーラス投与した。本試験の目的は、ICH 三極調和ガイドライン S5(R2)に一致した試験デザインで、オリプダーゼ アルファが CD-1 マウスの妊娠／授乳雌（F0）及び性成熟までの子（F1）の発達に及ぼす毒性作用を検出することであった。

F0 世代の雌マウスに対照物質（第 1 及び 2 群）又は被験物質（第 3～5 群）を、推定妊娠 6 日（GD 6）から産後 19 又は 20 日（授乳［LD］19 又は 20 日、出産した個体）又は GD 22（出産しなかった個体）まで隔日に 1 回、外側尾静脈から IV ボーラス投与した。分娩中の母動物には、次の計画投与日まで被験物質又は対照物質を投与しなかった。すなわち、GD 17 又は 19 に出産した個体若しくは分娩中のため GD 18 に投与しなかった個体には次の投与を LD 1 に実施した。GD 18 に投与後出産した個体には次の投与を LD 2 に実施した（表 41）。

表 41 - DPN0380 試験の試験デザイン

群番号	被験物質	投与量 (mg/kg/日)	濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	投与経路	動物数
1	対照[a]/生理食塩液[b]	0	0	8.1/4	IV[c]/ IP[b]	25
2	対照[a]/DPH[d,e]	0/20	0/5	8.1/4	IV[c]/ IP[b]	25
3	オリプダーゼ アルファ/ DPH[d,e]	3.16/20	0.39/5	8.1/4	IV[c]/ IP[b]	25
4	オリプダーゼ アルファ/ DPH[d,e]	10/20	1.23/5	8.1/4	IV[c]/ IP[b]	25
5	オリプダーゼ アルファ/ DPH[d,e]	30/20	3.70/5	8.1/4	IV[c]/ IP[b]	25

略号：IV=静脈内、IP=腹腔内、DPH=ジフェンヒドラミン塩酸塩

a 20 mmol/L リン酸ナトリウム、5%精製白糖、100 mmol/L メチオニン、0.1 mmol/L EDTA（pH 6.5）を IV 投与。

b 生理食塩液を IP 投与。

c IV ボーラス投与。

d ジフェンヒドラミン塩酸塩－第 2～5 群には、第 2 回投与以降の対照物質又は被験物質投与 10～20 分前に DPH を投与した。全てのマウスが確実に同じ投与を受けるよう、第 1 群には対照物質投与 10～20 分前に生理食塩液を IP 投与した。

e DPH のみ IP 投与（対照物質又は被験物質投与の 10～20 分前）。

F1 世代（子）には被験物質若しくは対照物質の調製液を直接投与しておらず、母動物の妊娠中に曝露（子宮内曝露）されたか授乳期に母乳を介して曝露された可能性がある。

F0 世代で評価したパラメータは次の通り：生死、一般状態観察、体重、体重増加量、自然分娩の観察、母動物の観察、卵巣及び子宮の評価並びに剖検時の肉眼観察。

F1 世代で評価したパラメータは次の通り：生死、一般状態観察、体重、体重増加量、摂餌量、性成熟、行動評価（モリス水迷路、運動活性及び聴覚性驚愕馴化）、生殖能、剖検所見、雄生殖器の器官重量並びに卵巣及び子宮の評価。

F0 世代のマウスでは第 1～5 群でそれぞれ 1、0、5、0 及び 2 匹が安楽殺又は死亡して発見された。投与群で、これらの死亡は投与 1～2 日以内に発現し、しばしば一般状態の毒性所見として自発運動の亢進又は低下、接触時冷感、円背位、中等度の脱水（皮膚緊張に基づく）、四肢の蒼白化及び身体腫脹を伴った。投与後の死亡時点及び一般状態の毒性所見の性質から、これらの死亡はオリプダーゼ アルファ投与に対する過敏性反応に起因すると考えられた。

妊娠期間及び授乳期間中の F0 世代雌の体重及び体重増加量において、10 mg/kg 以上の用量でオリプダーゼ アルファの影響はみられなかった。3.16 mg/kg 群で、妊娠中の投与期間（GD 6～18）及び妊娠期間全体（GD 0～18）での母動物の平均体重増加量が 0 mg/kg 群（第 2 群）に比べ低値であり、後者の期間では統計学的に有意となった。本群の一般状態所見に基づくと、体重の低値は本群で認められたオリプダーゼ アルファ投与に対する過敏性反応に起因すると考えられる。

30 mg/kg 群（第 5 群）で、死産児を有する母動物数（5 匹）が他の群（第 1～4 群でそれぞれ 0、1、2 及び 3 匹）に比べ増加した。さらに、本群の母動物 2 匹の子は全死亡又は一般状態所見のため LD 5～21 の間に安楽殺された。30 mg/kg 群では出生後（PND）5～7 日目及び 11～14 日目の期間において出生児の生存率が有意に減少した。出生児死亡は、オリプダーゼ アルファに対する過敏性反応が母動物の出産及び哺育に影響したためと考えられた。さらに、3.16 mg/kg 群では PND 15～18 及び 19～21 の期間に出生児の生存率が有意に減少した。出生児生存率の減少は 1 匹の母動物に起因していた。この個体では PND 15～18 に 7 匹の子が死亡し、PND 19～21 に一般状態所見（喘ぎ呼吸）に起因して 6 匹が死亡又は安楽殺された。出産した母動物の数、妊娠期間、出産母動物あたりの平均着床部位数、妊娠率（生存児が 1 匹以上みられた母動物の数／妊娠マウスの数）、同腹児数、生存率、一腹あたりの子の性比及び重量測定時の生存同腹児数は 3 つのオリプダーゼ アルファ投与群の間で同程度であり、対照群である第 2 群と比べ有意差はみられなかった。

F1 世代雌マウスにおいて、離乳後期間中の死亡はなかった。F1 世代雄マウスにおいて、3.16 mg/kg 群の 2 匹が一般状態の毒性所見により PND 23 に安楽殺された。これらの毒性所見は自発運動の低下、眼瞼下垂、脱水（皮膚緊張に基づく）、接触時冷感、低姿勢及び身体の削痩であった。これらの個体でみられた一般状態所見に基づくと、死亡と、オリプダーゼ アルファを妊娠期間及び授乳期間中に曝露したことの間に関連がある可能性は除外できなかった。本群の別の雄 1 匹は PND 119 に死亡して発見された。この雄でみられた一般状態所見はオリプダーゼ アルファに関連しないと考えられた尾の弯曲のみであり、死因は不明であった。

オリプダーゼ アルファを 30 mg/kg までの用量で母動物に投与したとき、F1 世代の雌雄マウスにおいて、次の項目への影響はなかった：離乳後、同居前及び妊娠期間中の一般状態観察、体重、体重増加量及び摂餌量；性成熟；神経行動学的パラメータ（自発運動、聴覚性驚愕馴化又はモリス水迷路）；交配及び受胎のパラメータ；剖検所見；器官重量及び剖検時体重比重量；帝王切開及び同腹児パラメータ。

結論として、母動物に関するオリプダーゼ アルファの NOAEL は、最高用量である 30 mg/kg であった。母動物の生殖並びに子の生存及び発達に関する NOAEL も 30 mg/kg であった。F1 世代の雌雄出生児で評価した生殖発生パラメータのいずれにおいてもオリプダーゼ アルファに関連する影響はなかった。

6.2　非げっ歯類－NZW ウサギ

6.2.1　NZW ウサギを用いた胚・胎児発生に関する毒性試験

Module 2.6.7 [表 2.6.7.13 B]、TER0698 試験

胚・胎児発生に関する GLP 適用毒性試験において、雌 NZW ウサギに 0、3、10 及び 30 mg/kg のオリプダーゼ アルファを IV 持続投与した。本試験の目的は、ICH 三極調和ガイドライン S5(R2)に一致した試験デザインで、オリプダーゼ アルファが妊娠ウサギ並びに胚及び胎児の発生に及ぼす影響を評価することであった。さらに、オリプダーゼ アルファの TK パラメータを測定した。

妊娠雌 NZW ウサギ 125 匹を、5 つの主要試験用量群（第 1 群～第 5 群）に 25 匹ずつ無作為に割り付けた。DPH が使用されたときを想定して、その際に対照として DPH 投与を行うための二つ目の対照群（第 2 群）を設定した。さらに 15 匹の雌ウサギを、TK サンプル採血の目的で、5 つの用量群（第 1 群～第 5 群）に 3 匹ずつ無作為に割り付けた。妊娠雌にオリプダーゼ アルファ 0、0、3、10 及び 30 mg/kg/日、又は対照物質を GD 6～19 まで 1 日 1 回、約 10 分間持続静注した。ウサギにおいて過敏症反応が認められた場合、DPH 10 mg/kg/日を投与可能としたが、最終的に使用されなかった。投与容量は 7.7 mL/kg であり、直近の体重測定結果に基づいて毎日調整された（表 42）。

表 42 - TER0698 試験の試験デザイン

群番号	被験物質	投与量 (mg/kg/日)	濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	投与経路	動物数	
						主試験	TK/ADA 試験群
1	対照[a]	0	0	7.7	IV[b]	25	3
2	対照[a]	0	0	7.7	IV[b]	25	3
3	オリプダーゼ アルファ	3	0.39	7.7	IV[b]	25	3
4	オリプダーゼ アルファ	10	1.30	7.7	IV[b]	25	3
5	オリプダーゼ アルファ	30	4.00	7.7	IV[b]	25	3

略号：IV=静脈内、IP=腹腔内、DPH=ジフェンヒドラミン塩酸塩、TK=トキシコキネティクス、ADA=抗薬物抗体

a 被験物質対照：20 mmol/L リン酸ナトリウム、5%精製白糖、100 mmol/L メチオニン、0.1 mmol/L EDTA、注射用精製水（USP）、pH 6.5

b 10 分間持続 IV 投与

評価項目は、母動物の生死、一般状態、体重及び体重変化、摂餌量、肉眼的剖検所見、卵巣及び子宮の検査、胎児の性別及び体重、外表、内臓及び骨格検査、トキシコキネティクスパラメータ及び ADA であった。

TK 試験に割り付けた雌から、GD 12 の投与前（0 時間）、投与 2 及び 10 分後、投与 1、2、4、8 及び 24 時間後に採血し、血清中オリプダーゼ アルファ濃度及び動態を測定した。

また、TK 試験群の雌から GD 6 の投与前（0 時間）及び GD 12 の投与 24 時間後に採血し、血清中 ADA の有無を測定した。

いずれの投与量においても、オリプダーゼ アルファに関連した流産や死亡は認められなかった。早期流産は、0（対照 2）、3、10 及び 30 mg/kg/日投与群のそれぞれ 4 匹、3 匹、3 匹及び 2 匹で GD 19 から GD 26 の間に認められ、その後安楽死させた。また 10 mg/kg/日投与群の 1 匹が帝王切開予定日に早期分娩した。これらの流産及び早産は、1) 対照群で発生した、2) 用量依存性ではなかった、3) 投与開始前又は投与開始時から投与期間とその後まで継続した体重減少と摂餌量の顕著な低下に続発したことから、オリプダーゼ アルファとは無関係であると考えられた。

3、10 及び 30 mg/kg/日投与群では、オリプダーゼ アルファに関連した一般状態変化が認められた。被毛疎剛が、GD 6 から帝王切開予定日まで 1 回以上観察された。

投与期間中、母動物の平均体重増加量は大きくばらついた。投与期間中 GD6～10 の母動物平均体重変化量は対照群で 54.0g の増加であったのと比較して 3 mg/kg/日で-12.6 g であり、10 及び 30 mg/kg/日群では対照群のそれぞれ 100%及び 88%であった。GD 16～20 間では母動物の平均体重変化は 3 及び 30 mg/kg/日投与群でそれぞれ-29.6g 及び-5.5g であった。3 mg/kg/日投与群では、投与期間の開始時及び終了時に体重減少が認められたため、母動物の平均体重が全体的に減少し、GD 6～20

及び GD 6～29 間で対照群の 28%及び 74%であった。10 及び 30mg/kg/日投与群では、対照群と比較した GD 6～20 及び GD 6～29 母動物平均体重変化量が、それぞれ 109%及び 79%、並びに 107%及び 104%であった。

また、母動物の平均摂餌量も投与期間中のばらつきが大きかった。GD 6 から GD 20 の間における 3、10 及び 30 mg/kg/日投与群の母動物平均摂餌量は、対照群のそれぞれ 78%、91%及び 97%であった。3 及び 10 mg/kg/日群における投与期間内の平均摂餌量は、GD 6 から GD 20 までの全集計間隔で対照群の 72%～92%までの低下がみられた。30 mg/kg/日の GD 13～16 及び GD 16～20 における平均摂餌量低下は、それぞれ対照群の 84～91%であった。投与期間終了後は改善がみられたものの、3、10 及び 30 mg/kg/日群の平均摂餌量は低下したままであり、GD 6～29 の間の平均摂餌量は対照群のそれぞれ 90、90 及び 95%であった。母動物の平均摂餌量低下は、摂餌量低下のみられた期間の多くで対応する平均体重増加量の変化が認められなかったか、又は用量依存性ではなかったことから、オリプダーゼ アルファには関連しないと考えられた。

試験した全ての投与量（3、10、30 mg/kg/日）の妊娠雌全例で、全検体採取期間中、血中オリプダーゼ アルファの曝露が確認された。GD 12 においてオリプダーゼ アルファ投与妊娠雌 7 匹中 6 匹が ADA 陽性を示したが、ADA の結果と GD 12 でのオリプダーゼ アルファ曝露との間に明らかな相関はなかった。t_{max} は、全ての母動物において、IV 持続投与終了後 2 分又は 10 分のいずれかであった。平均血中オリプダーゼ アルファ曝露量は 3～30 mg/kg の用量増加に比例して増加した（表 43）。平均半減期は 3、10 及び 30 mg/kg/日でそれぞれ 6.36、8.00 及び 8.91 時間であった。平均クリアランス値は 3、10 及び 30 mg/kg/日でそれぞれ 5.13、5.01 及び 4.73 mL/hr/kg であった。分布容積の平均値は 3、10 及び 30 mg/kg/日でそれぞれ 46.1、58.0 及び 60.8 mL/kg であった。

表 43 - 妊娠 NZW ウサギにオリプダーゼ アルファ 3、10 又は 30 mg/kg を 7 回投与後のトキシコキネティクスパラメータ（n=2～3/時点、Mean）

パラメータ	3 mg/kg (n=3)	10 mg/kg (n=2)	30 mg/kg (n=2)
$t_{1/2}$ (h)	6.36	8.00	8.91
C_{max} (µg/mL)[a]	114	370	1180
AUC_{0-24} (µg*h/mL)	598	2000	6350

略号: C_{max}＝最高血中濃度、$t_{1/2\beta}$＝終末半減期、AUC_{0-24}＝0～24 時間の血清中濃度-時間曲線下面積、hr＝時間
a IV 持続投与

オリプダーゼ アルファ投与妊娠雌の 7 匹中 6 匹は GD 12 で ADA 陽性結果を示したが、ADA の結果と GD 12 でのオリプダーゼ アルファ曝露との間に明らかな相関はなかった。平均血中オリプダーゼ アルファ曝露量は 3～30 mg/kg の用量増加に比例して増加した。

剖検時の肉眼的観察所見や、卵巣・子宮パラメータ又は同腹児の観察において、いずれの投与量でもオリプダーゼ アルファ投与の影響は認められなかった。オリプダーゼ アルファの投与は、胎児の外表、内臓、又は骨格の変異と奇形の発生率に影響しなかった。骨化数は全投与群で同程度であった。

以上、妊娠 NZW 雌ウサギにオリプダーゼ アルファを 0（対照 1）、0（対照 2）、3、10 及び 30 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回、約 10 分間の持続静注により投与した。いずれの投与量においても、母動物の体重、体重増加量及び摂餌量にオリプダーゼ アルファに関連した影響は認められなかった。母動物の平均体重増加量及び平均摂餌量は、いずれの用量群でも大きく変動し、3 mg/kg/日群では投与期間及び投与期間終了後で低下がみられた。3 mg/kg/日群では、投与期間の開始時及び終了時に体重減少が認められたため、母動物の平均体重が投与中から投与終了後期間の全体を通して低値であったが、それ以外の用量群では認められなかった。対照群を含むほとんどの群で流産が観察されたが、これらの事象は、投与開始前又は投与開始時から投与期間及び投与終了後の期間を通して継続した体重減少及び顕著な摂餌量減少に続発したものと考えられた。したがって、オリプダーゼ アルファの母動物に対する NOAEL は 30 mg/kg/日（$AUC_{0\text{-}24}$ は 6350 µg•hr/mL、C_{max} は 1180 µg/mL）であった。

胚・胎児生存率及び胎児体重にオリプダーゼ アルファに関連した影響は認められず、いずれの投与量においてもオリプダーゼ アルファに関連した胎児の外表、内臓及び骨格異常は認められなかった。したがって、発生に対する NOAEL は 30 mg/kg/日であった。

7　局所刺激性試験

局所刺激性評価として、カニクイザルを用いた反復投与毒性試験（3.3.1項、[redacted]007 試験参照）の中で IV 持続投与部位の肉眼観察及び病理組織学的評価を実施した。オリプダーゼ アルファ投与に関連する所見は認められなかった。

8　その他の毒性試験

オリプダーゼ アルファは脳血液関門を通過しないため、薬物乱用性の評価は実施していない。

8.1　ヒト全血を用いた *in vitro* 血液適合性試験

Module 2.6.7 [表 2.6.7.17]、[redacted]009 試験

オリプダーゼ アルファのヒト全血赤血球に対する溶血性を *in vitro* で検討した。本試験は生理学的 pH でオリプダーゼ アルファが赤血球の形質膜に存在する内因性スフィンゴミエリンを加水分解して膜崩壊を引き起こすか否かを調べるために実施した。

手順は O'Leary らの方法に従った(16)。

本 *in vitro* 試験の投与条件下では、1.1 mg/mL の濃度でオリプダーゼ アルファの溶血活性は陰性であった。

8.2　オリプダーゼ アルファのロット比較試験

8.2.1　ASMKO マウスを用いた探索的単回投与毒性試験－オリプダーゼ アルファのロット比較

Module 2.6.7 [表 2.6.7.17]、[redacted]-0372Pnp 試験

Module 2.6.7 [表 2.6.7.17]、[redacted]-02784 試験

オリプダーゼ アルファの 初期製法* 複数ロットの毒性プロファイルを比較する探索的毒性試験を実施した。この比較試験は、同じ製造プロセスによるロット間のばらつきを排除するために実施した。

ASMKO マウス雌 7 匹に 20 mg/kg のオリプダーゼ アルファのロット [redacted] を単回 IV ボーラス投与した（[redacted]-0372Pnp 試験）。オリプダーゼ アルファのロット [redacted] をこの用量で投与すると 24 時間以内に死亡をきたすことが以前の試験で明らかにされている（2.2.2項、[redacted]-0047Pnp 試験参照）。

オリプダーゼ アルファ投与 15 時間後、マウスの一般状態において毒性所見が発現した。7 匹中 3 匹で重度の嗜眠、2 匹で軽度の嗜眠がみられた。これらの所見はオリプダーゼ アルファ投与 17 時間後にもみられ、4 匹を人道的に安楽殺した。オリプダーゼ アルファ投与 22 時間後に残りの 3 匹で軽度の嗜眠がみられ、その後これらを安楽殺した。剖検時の肉眼所見として、副腎の腫大／腫脹及び赤色化が認められた。一般状態の毒性所見並びに肉眼所見である副腎の腫大／腫脹及び赤色化は、オリプダーゼ アルファのロット [redacted] を 20 mg/kg の用量で投与した後（2.2.2項、[redacted]-0047Pnp 試験参照）に認められた所見に一致していた。

本試験条件下で、ロット [redacted] のオリプダーゼ アルファを 20 mg/kg の用量で投与したところ、ロット [redacted] と同様の毒性（軽度から重度の嗜眠及び副腎の肉眼所見）が発現した。

＊新薬承認情報提供時に置換

同様の試験で、HMWS-オリプダーゼ アルファ含量が 10%未満（8.3%）であるロット [redacted] の ASMKO マウスにおける毒性プロファイルを、HMWS-オリプダーゼ アルファ含量が 10%超（11.0%）であるロット [redacted] と比較した（[redacted]-02784 試験）。

雌雄 ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファ（ロット [redacted] 又は [redacted]）を 3 又は 10 mg/kg の用量で IV ボーラス投与した。第 1 及び 3 群（各群 8 匹）にはロット [redacted] をそれぞれ 3 及び 10 mg/kg の用量で投与した。第 2 及び 4 群（各群 8 匹）にはロット [redacted] をそれぞれ 3 及び 10 mg/kg の用量で投与した（表 44）。

表 44 - [redacted]-02784 試験の試験デザイン

群番号	動物数 雄／雌	被験物質／ロット	投与量 (mg/kg)	用法	投与経路
1	4/4	オリプダーゼ アルファ/ ロット [redacted]	3	単回投与	IV
2	4/4	オリプダーゼ アルファ/ ロット [redacted]			
3	4/4	オリプダーゼ アルファ/ ロット [redacted]	10		
4	4/4	オリプダーゼ アルファ/ ロット [redacted]			

略号：M=雄、F=雌、IV=静脈内

4 日目に生存例全例を CO_2 にて安楽殺した。その後、全ての群からセラミド、血液生化学的検査及びサイトカイン／急性期タンパク質測定用（げっ歯類の Multi-Analyte プロファイル）の血液を採取した。採血の後、全例について剖検を実施した。一部の組織は病理組織学的解析用として 10%NBF 中で保存した。第 1 及び 2 群のみの肝臓及び脾臓の一部はスフィンゴミエリン蓄積量分析（MetaMorph 画像分析）用として 2%グルタルアルデヒド／2%パラホルムアルデヒド中で保存した。

ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファ（ロット [redacted] 及び [redacted]）を 10 mg/kg の用量で投与したところ（それぞれ第 3 及び 4 群）、死亡が発現することが示された。第 1 及び 2 群（3 mg/kg）で死亡は発現せず、第 3 群と 4 群（10 mg/kg）との間で発現は同程度であった。早期死亡例は計 12 匹であり、このうち 5 匹は第 3 群（ロット [redacted] を 10 mg/kg）、7 匹は第 4 群（ロット [redacted] を 10 mg/kg）であった。

血液生化学的検査パラメータの成績によると有意差はみられなかったが、例外として第 2 群（ロット [redacted] を 3 mg/kg）の ALT は第 1 群（ロット [redacted] を 3 mg/kg）に比べ統計学的に高値であった。この所見は、2 匹で ALT が軽度に増加したためであったが、肝臓切片の病理組織学的検査において関連する所見はみられなかった。したがって、この所見は生理学的及び毒性学的な意義がないと考えられた。3 mg/kg のオリプダーゼ アルファを投与したときのセラミド及びげっ歯類 Multi-Analyte アレイ中の分析対象物において、ロット [redacted] と [redacted] の間で有意差は認められなかった。第 3 及び

4 群では生存例が少数であったため、血液生化学的検査パラメータ、セラミド及びげっ歯類 Multi-Analyte アレイに関する統計解析は実施できなかった。

ASMKO マウスに 3 mg/kg のオリプダーゼ アルファを投与してスフィンゴミエリン蓄積量を組織学的及び生化学的に評価したところ、いずれもロット [redacted]（第 1 群）とロット [redacted]（第 2 群）とで同程度であった。3 mg/kg の用量で、オリプダーゼ アルファのロット SM078（第 1 群）とロット [redacted]（第 2 群）の病理組織学的所見は同様であり、最も顕著な病変は副腎皮質の急性壊死及びうっ血（異栄養性鉱質沈着の有無を問わない）であり、発現率は 100%であった。肝臓の病理像は 2 群間で同様であった。10 mg/kg の用量では、ロット [redacted]（第 3 群）とロット [redacted]（第 4 群）を投与されたマウスで死亡率が高かったため、生存例がそれぞれ 3 匹及び 1 匹と少数となり、意義のある比較ができなかった。

本試験の条件及び成績から、オリプダーゼ アルファを単回 IV 投与したときの毒性プロファイルは、HMWS 含量が 10%未満（8.3%）のロット（ロット [redacted]）と HMWS 含量が 10%超（11.0%）のロット（ロット [redacted]）で同様であった。

9　考察及び結論

BALB/c マウス、C57BL/6 マウス、CD-1 マウス、SD ラット、ビーグル犬、NZW ウサギ及びカニクイザルを用いて毒性試験を実施した。毒性試験に用いる動物種は、対応する種類の試験でこれらの野生型が標準的に利用されている、強固な背景データベースがある、並びに評価した全ての種は細胞にオリプダーゼ アルファを取り込ませライソゾームへ輸送させるマンノース受容体及びマンノース-6-リン酸受容体が存在しているため薬理学的に意義があると考えられる、との事実に基づいて選択した。ASMD 患者への生涯投与を支持するため、投与法は単回投与、用量漸増投与から最長 6 か月間の隔週投与まで様々であった。BALB/c マウス、C57BL/6 マウス、CD-1 マウス、NZW ウサギ、SD ラット、ビーグル犬及びカニクイザルを用いて実施した試験で、オリプダーゼ アルファの忍容性は良好であり毒性所見は特定されなかった。

ASMKO マウスを用いた毒性試験も実施した。ASMKO マウスはヒト ASMD の表現型と生化学的及び生理学的に類似している。ASMKO マウスに単回投与すると 10 mg/kg 以上の用量で急性毒性所見が発現すること、他の種では 30 mg/kg まで毒性がみられないことから、ASMKO マウスは毒性試験の動物種として最も感度が高いと考えられた。評価した他の非臨床動物種では、オリプダーゼ アルファの投与量及び曝露量が同程度でも毒性所見がみられないことから、ASMKO マウスで認められた被験物質関連毒性は基質の分解速度及び量に起因することが示唆された。

重要な毒性試験における用量は、得られたデータに基づいて設定した。高用量として、オリプダーゼ アルファの初期のバッチでは、オリプダーゼ アルファ濃度に基づく最大投与可能量を設定し、その後のバッチでは、臨床で使用予定の高用量と比較して 10 倍の安全係数が得られる用量を設定した。重要な毒性試験の低用量には臨床最高用量を選択した。

ASMKO マウスで認められた毒性にスフィンゴミエリン異化代謝産物の急速な蓄積が関与するとの仮説を検証するため、また毒性機序を探索するよう保健医療当局から要請があったことに基づき、用量を徐々に増加させることでスフィンゴミエリンの減少がより緩やかになり、オリプダーゼ アルファの高用量単回投与で認められた毒性が抑制されるか否かを検討する反復投与試験を実施した。ASMKO マウスに 3 mg/kg のオリプダーゼ アルファを隔日で 4 回 IV 投与し、その 72 時間後に 20 mg/kg を単回 IV 投与したところ、死亡は認められず、その他の毒性所見も重症度が低下した。また、本漸増投与法により血清中のサイトカイン及びセラミド濃度の上昇が抑制された。オリプダーゼ アルファ（3 mg/kg）を隔日ではなく週 1 回用量漸増投与してから 20 mg/kg の用量をボーラス投与しても、オリプダーゼ アルファの忍容性は良好であった。さらに、ASMKO マウスに 3 mg/kg のオリプダーゼ アルファを隔日で 4 回投与した後、3、10 又は 30 mg/kg の用量を隔週で 13 週間（計 7 回）投与した試験では、オリプダーゼ アルファの忍容性は良好であり、NOAEL は 30 mg/kg であった。これらの試験から、ASMKO マウスモデルに高用量を単回投与後に認められた急性毒性には、スフィンゴミエリン代謝物の急速な蓄積が関連することが支持された。ASMKO マウスと ASMD 患者を対象

とした臨床試験では用量漸増の方法に差があったものの（それぞれ隔日投与又は隔週投与）、ASMKO マウス及び臨床試験の結果から、用量漸増の忍容性はいずれも良好であることが示されている。

CD-1 マウス及び NZW ウサギを用いた生殖発生毒性試験において、オリプダーゼ アルファは評価した最高用量（30 mg/kg）でも毒性作用を示さなかった。

幼若動物を用いた毒性試験は、ASMKO マウスではこの試験に必要な評価が困難であるため実施しなかった。オリプダーゼ アルファは酵素補充療法の薬剤であるため、遺伝毒性、がん原性、薬物乱用に関する試験は必要とされない。

結論として、適切な ICH 及び国際ガイドライン文書に基づき実施したオリプダーゼ アルファの非臨床試験は、臨床開発プログラムの実施及びオリプダーゼ アルファを ASMD 患者の治療薬として製造販売承認申請することを支持している。

10　図表

図表は本文中に示した。

参 考 文 献

1. Horinouchi K, Erlich S, Perl D, Ferlinz K, Bisgaier CL, Sandhoff K, et al. Acid sphingomyelinase deficient mice: a model of types A and B Niemann-Pick disease. Nat Genet. 1995;10:288-93.
2. Dhami R, He X, Gordon R, Schuchman E. Analysis of the lung pathology and alveolar macrophage function in the acid sphingomyelinase-deficient mouse model of Niemann-Pick disease. Lab Invest. 2001;81:987-99.
3. Miranda SR, He X, Simonaro CM, Gatt S, Dagan A, Desnick RJ, et al. Infusion of recombinant human acid sphingomyelinase into Niemann-Pick disease mice leads to visceral, but not neurological, correction of the pathophysiology. FASEB. 2000; 14:1988-95.
4. Murray JM, Thompson AM, Vitsky A, Hawes M, Chuang WL, Pacheco J, et al. Nonclinical safety assessment of recombinant human acid sphingomyelinase (rhASM) for the treatment of acid sphingomyelinase deficiency: the utility of animal models of disease in the toxicological evaluation of potential therapeutics. Mol Genet Metab.2015;114: 217-25.
5. Jones C, Shankaran P, Davidson D, Poulos A, Callahan J. Studies on the structure of sphingomyelinase: amino acid composition and heterogeneity on isoelectric focusing. Biochem J. 1983;209:291-7.
6. Pentchev P, Brady R, Gal A, Hibbert S. The isolation and characterization of sphingomyelinase from human placental tissue. Biochim Biophys Acta. 1977;488:312-21.
7. Yamanaka T, Suzuki K. Acid sphingomyelinase of human brain: purification to homogeneity. J Neurochem. 1982;38:1753-64.
8. Watterson C, Lanevschi A, Horner J, Louden C. A comparative analysis of acute-phase proteins as inflammatory biomarkers in preclinical toxicology studies: implications for preclinical to clinical translation. Toxicol Pathol. 2009 Jan; 37:28-33.
9. Nyska A, Maronpot RR. Adrenal Gland. In: Maronpot RR, Boorman GA, Gaul BW, editors. Pathology of the Mouse: Reference and Atlas. Cache River Press, Vienna, IL. 1999. p. 509-36.
10. Sener, G, Sehirli, AO, Ayanoglu-Dulger, G. Protective effects of melatonin, vitamin E and N-acetylcysteine against acetaminophen toxicity in mice: a comparative study. J Pineal Res. 2003;35:61-8.
11. Mari, M, Colell, A, Morales, A, Pañeda C, Varela-Nieto I, García-Ruiz C, et al. Acidic sphingomyelinase downregulates the liver specific methionine adenosyltransferase 1A, contributing to tumor necrosis factor induced lethal hepatitis. J Clin Invest. 2004;113:895-904.
12. Varma RK, Kaushal R, Junnarkar AY, Thomas GP, Naidu MU, Singh PP, et al. Polysorbate 80: a pharmacological study. Arzneimittelforschung. 1985;35:804-8.
13. Masini E, Planchenault J, Pezziardi F, Gautier P, Gagnol JP. Histamine-releasing properties of Polysorbate 80 in vitro and in vivo: correlation with its hypotensive action in the dog. Agents Actions. 985;16:470-7.

14. Butler A, Gordon RE, Gatt S, Schuchman EH. Sperm abnormalities in heterozygous acid sphingomyelinase knockout mice reveal a novel approach for the prevention of genetic diseases. Am J Pathol. 2007;170:2077-88.
15. Otala M, Pentikainen MO, Matikainen T, Suomalainen L, Hakala JK, Perez GI, et al. Effects of acid sphingomyelinase deficiency on male germ cell development and programmed cell death. Biol Reprod. 2005;72:86-96.
16. O'Leary R, Watkins W, Guess W. Comparative chemical and toxicological evaluation of residual ethylene oxide in sterilized plastics. J Pharm. Sci. 1969;58:1007-10.

サノフィ株式会社

オリプダーゼ アルファ（遺伝子組換え）

CTD 第二部 ― 非臨床概要

2.6.7 毒性試験概要表

Total number of pages: 63

目　　次

表　目　次

1　毒性試験一覧表

表 2.6.7.1 - Toxicology Tabulated Summary – Overview - Study Program

Test Article: Olipudase alfa

Species (Strain)	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location
Single-Dose Toxicity							
Mouse (BALB/c)	IV Bolus	Single dose	0, 4, 8, 12	No	Genzyme Corporation, Framingham, MA, USA	[[redacted]-0032Pnp]	4.2.3.1-1
Mouse (BALB/c)	IV Bolus	Single dose	0, 4, 8, 12	No	Genzyme Corporation, Framingham, MA, USA	[[redacted]-0024Pnp]	4.2.3.1-2
Mouse (ASMKO)	IV Bolus	Single dose	30 *a*	No	Genzyme Corporation, Framingham, MA, USA	[[redacted]-0788Pnp]	4.2.3.1-3
Mouse (ASMKO)	IV Bolus	Single dose	10, 20	No	Genzyme Corporation, Framingham, MA, USA	[[redacted]-0047Pnp]	4.2.3.1-4
Mouse (ASMKO and C57BL/6)	IV Bolus	Single dose	0, 3, 10 *b*	No	Genzyme Corporation, Framingham, MA, USA	[[redacted]-0025Pnp]	4.2.3.1-5
Mouse (ASMKO)	IV Bolus	Single dose	0, 0.1, 0.3, 1.0	No	Genzyme Corporation, Framingham, MA, USA	[[redacted]-0158Pnp]	4.2.3.1-6
Mouse (ASMKO)	IV Bolus	Single dose	0, 0.1, 0.3	No	Genzyme Corporation, Framingham, MA, USA	[[redacted]-0060Pnp]	4.2.3.1-7
Mouse (ASMKO)	IV Bolus	Single dose	0, 3, 10	No	Genzyme Corporation, Framingham, MA, USA	[[redacted]-0836Pnp]	4.2.3.1-8
Mouse (C57BL/6)	IV Bolus	Single dose	0, 75	No	Genzyme Corporation, Framingham, MA, USA	[[redacted]-0976Pnp]	4.2.3.1-9

Species (Strain)	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location
Mouse (ASMKO)	IV Bolus	Single dose	0, 10, 20, 30	No	Genzyme Corporation, Framingham, MA, USA	[[redacted]-0975Pnp]	4.2.3.1-10
Mouse (ASMKO and C57BL/6)	IV Bolus	Single dose	0, 20	No	Genzyme Corporation, Framingham, MA, USA	[[redacted]-1329]	4.2.3.1-11
Mouse (ASMKO)	IV Bolus	Single dose	0, 0.03, 0.1, 0.3	Yes	Genzyme Corporation, Framingham, MA, USA	[[redacted]041]	4.2.3.1-12
Mouse (ASMKO)	IV Bolus (olipudase alfa) IP (NAC)	Single dose	20 [d]	No	Genzyme Corporation, Framingham, MA, USA	[[redacted]-0870Pnp]	4.2.3.1-13
Mouse (ASMKO)	IV Bolus (olipudase alfa) IP (SAM and NAC)	Single dose	20 [e]	No	Genzyme Corporation, Framingham, MA, USA	[[redacted]-0839Pnp]	4.2.3.1-14
Mouse (ASMKO)	IV Bolus	Single dose	0, 10, 20	No	Genzyme Corporation, Framingham, MA, USA	[[redacted]-0058Pnp]	4.2.3.1-15
Mouse (ASMKO)	SC	Single dose	0, 30	No	Genzyme Corporation, Framingham, MA, USA	[[redacted]-0741Pnp]	4.2.3.1-16
Rat (Sprague-Dawley)	IV Bolus	Single dose	0, 3, 10, 30	Yes	[redacted], USA	[[redacted]025] [[redacted]-0622Pnp]	4.2.3.1-17 4.2.3.1-18
Dog (beagle)	IV Bolus	Single dose	Olipudase alfa: 0, 3, 10, 30 DPH: 1 [f]	Yes	[redacted], USA	[[redacted]026] [[redacted]-0623Pnp]	4.2.3.1-19 4.2.3.1-20
Repeat-Dose Toxicity							
Mouse (ASMKO)	IV Bolus	6 days (2 doses) [g]	3/0, 3/20, 3/30 [g]	No	Genzyme Corporation, Framingham, MA, USA	[[redacted]-0099Pnp]	4.2.3.2-1
Mouse (ASMKO)	IV Bolus	6 or 8 days (2 doses) [h]	0, 3/10, 3/30 [h]	No	Genzyme Corporation, Framingham, MA, USA	[[redacted]-0505Pnp]	4.2.3.2-2

2.6.7 毒性試験概要表
オリプダーゼ アルファ（遺伝子組換え）

Species (Strain)	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location
Mouse (ASMKO)	IV Bolus	1 day (4 doses)	20 (5 mg/kg every 2h)	No	Genzyme Corporation, Framingham, MA, USA	[[redacted]-0506Pnp]	4.2.3.2-3
Mouse (ASMKO)	IV Bolus	3 days (2 doses) [i]	3/20[i]	No	Genzyme Corporation, Framingham, MA, USA	[[redacted]-1239Pnp]	4.2.3.2-4
Mouse (ASMKO)	IV Bolus	11 days (5 doses) [j]	3/20 [j]	No	Genzyme Corporation, Framingham, MA, USA	[[redacted]-0889Pnp]	4.2.3.2-5
Mouse (ASMKO)	IV Bolus	13 weeks (7 doses) [k]	Olipudase alfa: 3/3, 3/10, 3/30 [k] DPH: 20	No	Genzyme Corporation, Framingham, MA, USA	[[redacted]-00262]	4.2.3.2-6
Mouse (ASMKO)	IV Bolus	9, 29, or 57 days (5 doses) [l]	Olipudase alfa: 0, 3/20 DPH: 20 mg/kg [l]	No	Genzyme Corporation, Framingham, MA, USA	[[redacted]-03293]	4.2.3.2-7
Mouse (ASMKO)	IV Bolus	12 weeks (7 doses)	0, 0.3, 1.0, 3.0	Yes	Genzyme Corporation, Framingham, MA, USA	[[redacted]005]	4.2.3.2-8
Mouse (ASMKO)	IV Bolus	13 weeks (7 doses)	0, 0.3, 1, 3	Yes	Genzyme Corporation, Framingham, MA, USA	[[redacted]031]	4.2.3.2-9
Rat (Sprague-Dawley)	IV Bolus	26 weeks (14 doses)	0, 0, 3, 10, 30	Yes	[redacted]	[[redacted]027] [[redacted]-0604Pnp]	4.2.3.2-10 4.2.3.2-11
Monkey (cynomolgus)	IV Infusion	26 weeks (13 doses)	0, 3, 10, 30	Yes	[redacted]	[[redacted]007]	4.2.3.2-12
Genotoxicity: Not applicable							
Fertility and Early Embryonic Development							

Species (Strain)	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location
Mouse (Crl:CD1(ICR))	IV Bolus (GZ402665) or IP (Saline and DPH)	M: once every other day beginning 28 days before cohabitation, during cohabitation and continuing until euthanasia F: once every other day beginning 15 days before cohabitation, during cohabitation and continuing until GD7	GZ402665/ DPH: 0/0, 0/20, 3.16/20, 10/20, 30/20	Yes	[redacted], USA	[FER0510]	4.2.3.5.1-1
Embryo-Fetal Development							
Mouse (Crl:CD1(ICR))	IV Bolus (GZ402665) or IP (Saline and DPH)	GD6 to GD15	GZ402665/ DPH: 0/0, 0/20, 3/20, 10/20, 30/20	Yes	[redacted], USA	[TER0694]	4.2.3.5.2-1
Rabbit (NZW)	IV Infusion (GZ402665)	GD6 to GD19	GZ402665: 0, 0, 3, 10, 30	Yes	[redacted], USA	[TER0698]	4.2.3.5.2-2
Prenatal and Postnatal Development							
Mouse (Crl:CD1(ICR))	IV Bolus (GZ402665) or IP (Saline and DPH)	GD6 to LD20	GZ402665/DPH: 0/0, 0/20, 3.16/20, 10/20, 30/20	Yes	[redacted], USA	[DPN0380]	4.2.3.5.3-1

Species (Strain)	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location
Local Tolerance: Not applicable							
Other Toxicity Studies							
Human whole blood	In Vitro	Not applicable	1.1 mg/mL	Yes	[redacted], USA	[redacted009]	4.2.3.7.7-1
Mouse (ASMKO)	IV Bolus	Single dose	20	No	Genzyme Corporation, Framingham, MA, USA	[redacted-0372Pnp]	4.2.3.1-21
Mouse (ASMKO)	IV Bolus	Single dose	3, 10 *c*	No	Genzyme Corporation, Framingham, MA, USA	[redacted-02784]	4.2.3.1-22

Abbreviations: IV: Intravenous; IP: Intraperitoneal; NAC: N-Acetyl-L-cysteine; SAM: S-Adenosyl-L-methionine; SC: subcutaneous; ASKMO: Acid Sphingomyelinase Knock-Out Mice; GLP: Good Laboratory Practices; NA: not applicable; DPH: diphenhydramine hydrochloride; GD: gestation day; M: male; F: female

a Intended dosing was Group 1 and 2: undosed control group; Group 3: 30 mg/kg Day 1, 10 mg/kg Day 4, 3 mg/kg Day 8; Group 4: 30 mg/kg Day 1, 10 mg/kg Day 4, 3 mg/kg weekly for 8 weeks beginning on Day 8; Group 5: 30 mg/kg Day 1, 10 mg/kg Day 4, 3 mg/kg every other week for 8 weeks beginning on Day 8; however, 24 hours following the initial 30 mg/kg administration of olipudase alfa, all mice in rhASM treated groups were found dead (Groups 3-5).

b Groups 1 and 5 received vehicle control; Groups 2 and 6 received 3 mg/kg olipudase alfa; Groups 3, 4, 7 and 8 received 10 mg/kg olipudase alfa

c two different lots of olipudase alfa (Lot [redacted] with <10% (8.3%) HMWS and Lot [redacted] with >10% (11.0%) HMWS).

d 140 mg/kg of NAC followed 30 minutes later with 20 mg/kg of olipudase alfa. NAC was administered twice following the initial administration, 6 hours apart.

e Groups 1 and 2: 20 mg/kg of olipudase alfa followed by 165 mg/kg of SAM, hourly for the first 8 hours then every 8 hours for 2 more doses (starting 30 minutes post olipudase alfa dose). Groups 3 and 4: 20 mg/kg of olipudase alfa followed by 140 mg/kg of NAC followed by 70 mg/kg NAC every 6 hours for 48 hours.

f Due to signs of hypersensitivity, diphenhydramine (1 mg/kg) was administered prophylactically to all animals given 10 or 30 mg/kg with the exception of one male given 10 mg/kg).

g Group 1: 3 mg/kg Day 1 followed by 0 mg/kg Day 6, Group 2: 3 mg/kg Day 1 followed by 20 mg/kg Day 6, and Group 3: 3 mg/kg Day 1 followed by 30 mg/kg Day 6

h Group 1: no treatment, Group 2: 3 mg/kg Day 1 followed by 10 mg/kg Day 8, and Group 3: 3 mg/kg Day 1 followed by 30 mg/kg Day 6

i 3 mg/kg Day 1 followed by 20 mg/kg Day 3

j 3 mg/kg every other day (Days 1, 4, 6, 8) for a total of four doses, followed by 20 mg/kg at Day 11

k All groups received 3 mg/kg on Days 1, 3, 5, 7 (Debulking Phase). Then 3, 10, or 30 mg/kg beginning on Day 9 (Treatment Phase) and continuing every other week for 13 weeks (7 doses). DPH (20 mg/kg) was administered (IP)10-20 minutes prior to dosing olipudase alfa to prevent possible anaphylactic reactions. In the event that animals demonstrated a hypersensitivity reaction post-test article administration, despite DPH pre-treatment, a second dose of DPH was administered IP at 10 mg/kg.

l Group 1: 3 mg/kg every other day on Days 1, 3, 5, and 7 followed by 20 mg/kg on Day 9. Group 2: 3 mg/kg once weekly on Days 1, 8, 16, and 22 followed by 20 mg/kg on Day 29. Group 3: 3 mg/kg every other week on Days 1, 16, 29 and 43 followed by 20 mg/kg on Day 57. Group 4: 0 mg/kg served as an undosed control. All mice received 20 mg/kg diphenhydramine (DPH) intraperitoneally prior to the first 20 mg/kg dose in Group 1, the third 3 mg/kg dose in Group 2, and the 3 mg/kg debulking dose in Group 3, and each dose thereafter.

2　トキシコキネティクス試験の一覧表

表 2.6.7.2 - Overview of Toxicokinetics Studies

Test Article: Olipudase alfa

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (mg/kg/day)	GLP Compliance	Study Number	Location
Single-Dose Toxicity						
	Rat	IV (bolus)	0, 3, 10, 30	Yes	[[redacted]025] [[redacted]-0622Pnp]	4.2.3.1-17 4.2.3.1-18
	Dog	IV (bolus)	Olipudase alfa: 0, 3, 10, 30 DPH: 1 [a]	Yes	[[redacted]026] [[redacted]-0623Pnp]	4.2.3.1-19 4.2.3.1-20
Repeat-Dose Toxicity						
13 weeks (7 doses)	Mouse	IV (bolus)	Olipudase alfa: 3/3, 3/10, 3/30 [b] DPH: 20	No	[[redacted]-00262]	4.2.3.2-6
26 weeks (14 doses)	Rat	IV (bolus)	0, 0, 3, 10, 30	Yes	[[redacted]027] [[redacted]-0604Pnp]	4.2.3.2-10 4.2.3.2-11
26 weeks (13 doses)	Monkey	IV infusion	0, 3, 10, 30	Yes	[[redacted]007]	4.2.3.2-12
Genotoxicity – not applicable						
Carcinogenicity – not applicable						
Reproductive and Developmental Toxicity						
Embryo-Fetal Development	Mouse	IV bolus (GZ402665) or IP (saline and DPH)	GZ402665/ DPH: 0/0, 0/20, 3/20, 10/20, 30/20	Yes	[TER0694]	4.2.3.5.2-1

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (mg/kg/day)	GLP Compliance	Study Number	Location
Embryo-Fetal Development	Rabbit	IV infusion (GZ402665)	GZ402665: 0, 0, 3, 10, 30	Yes	[TER0698]	4.2.3.5.2-2

Local Tolerance – not applicable

Other Toxicity Studies – not applicable

Abbreviations: IV: intravenous; GLP: Good Laboratory Practices

a Due to signs of hypersensitivity, diphenhydramine (1 mg/kg) was administered prophylactically to all animals given 10 or 30 mg/kg with the exception of one male given 10 mg/kg).

b All groups received 3 mg/kg on Days 1, 3, 5, 7 (Debulking Phase). Then 3, 10, or 30 mg/kg beginning on Day 9 (Treatment Phase) and continuing every other week for 13 weeks (7 doses). DPH (20 mg/kg) was administered (IP)10-20 minutes prior to dosing olipudase alfa to prevent possible anaphylactic reactions. In the event that animals demonstrated a hypersensitivity reaction post-test article administration, despite DPH pre-treatment, a second dose of DPH was administered IP at 10 mg/kg

3　トキシコキネティクス試験成績の一覧

表 2.6.7.3 - Toxicokinetics – Overview of Toxicokinetics Data

Test Article: Olipudase alfa

Biweekly Dose (mg/kg/dose)	Mouse	Steady-State AUC (µg•h/mL) Rat		Rabbit	Dog		Monkey		Human	Clinical Safety Margin (Based on AUC)[g]
	M/F combined or F	M	F	F	M	F	M	F		
Human dose 3 mg/kg	-	-	-	-	-	-	-	-	607[g]	-
3/3	46.65 [a]	-	-	-	-	-	-	-	-	Not determined
3/10	211.0 [a]	-								Not determined
3/30	617.9 [a]	-	-	-	-	-	-	-	-	Not determined
3	83.1 [d]	162 [b] 231 [c]	123 [b] 144 [c]	598 [d]	229 [e]	311 [e]	99 [f]	97 [f]	-	No safety margin No safety margin
10	278 [d]	530 [b] 449 [c]	473 [b] 387 [c]	2000 [d]	845 [e]	773 [e]	741 [f]	602 [f]	-	No safety margin – 3.3x
30	916 [d]	1711 [b] 1690 [c]	968 [b] 1122 [c]	6350 [d]	2496 [e]	1665 [e]	2434 [f]	2344 [f]	-	1.5x – 10x 1.9x – 2.8x

Abbreviations: M: male; F: female; AUC: area under the concentration versus time curve GD: gestation day
All data from single dose and repeat dose GLP and non-GLP studies from last collection period as indicated.

a Day 93, mean serum concentrations (µg/mL) from male and female combined at 5 minutes post-dose. Source of data – nonGLP Study [[redacted]-00262]; All groups received 3 mg/kg on Days 1, 3, 5, 7 (Debulking Phase). Then 3, 10, or 30 mg/kg beginning on Day 9 (Treatment Phase) and continuing every other week for 13 weeks (7 doses).

b Day 1 $AUC_{0\text{-}inf}$ - Source of data - Single dose GLP Study [[redacted]025] and [[redacted]-0622Pnp]

c Day 183 $AUC_{0\text{-}inf}$ - Source of data - Repeat dose GLP study [[redacted]027] and [[redacted]-0604Pnp]

d GD12 $AUC_{0\text{-}24}$ - Source of data - Embryofetal toxicity GLP study [TER0694] and [TER0698]; pregnant mice and rabbits, respectively

2.6.7 **毒性試験概要表**

オリプダーゼ アルファ（遺伝子組換え）

e Day 1 $AUC_{0\text{-}inf}$ - Source of data – Single dose GLP Study [[redacted]026] and [[redacted]-0623Pnp]

f Day 169 $AUC_{0\text{-}last}$ - Source of data - Repeat dose GLP Study [[redacted]007]

g Based on the human steady state $AUC_{0\text{-}\tau}$ at the target dose of 3.0 mg/kg of 607 ± 120 µg*h/mL (Section 3.1 of Module 2.7.2)

4　毒性試験使用ロット

表 2.6.7.4 - Toxicology Drug Substance

Test Article: Olipudase alfa

Batch or Lot No.	Manufacturing Process	Concentration (mg/mL)	% Purity			Study No.	Type of Study	Location
			By SDS-PAGE Non Reduced	By SDS-PAGE Reduced	By HPLC			
[redacted]	初期製法*	1.1	NA	NA	NA	[redacted-0032Pnp]	Single dose mouse	4.2.3.1-1
[redacted]	初期製法*	3.95	NA	NA	NA	[redacted-0024Pnp]	Single dose mouse	4.2.3.1-2
[redacted]	初期製法*	5.1	NA	NA	NA	[redacted-0788Pnp]	Single dose mouse	4.2.3.1-3
						[redacted-0047Pnp]	Single dose mouse	4.2.3.1-4
						[redacted-0099Pnp]	Repeat dose mouse	4.2.3.2-1
[redacted]	初期製法*	3.6	NA	99.1	98.0	[redacted-1329]	Single dose mouse	4.2.3.1-11
						[redacted-0870Pnp]	Single dose mouse	4.2.3.1-13
						[redacted-0839Pnp]	Single dose mouse	4.2.3.1-14
						[redacted-0025Pnp]	Single dose mouse	4.2.3.1-5
						[redacted-0158Pnp]	Single dose mouse	4.2.3.1-6
						[redacted-0975Pnp]	Single dose mouse	4.2.3.1-10
						[redacted-0836Pnp]	Single dose mouse	4.2.3.1-8
						[redacted005]	12-week mouse	4.2.3.2-8
						[redacted-0058Pnp]	Single dose mouse	4.2.3.1-15
						[redacted-0741Pnp]	Single dose mouse	4.2.3.1-16
						[redacted-0505Pnp]	Repeat dose mouse	4.2.3.2-2
						[redacted-0506Pnp]	Repeat dose mouse	4.2.3.2-3
						[redacted-0889Pnp]	Repeat dose mouse	4.2.3.2-5
[redacted]	初期製法*	4.2	NA	97.6	97.9	[redacted-0060Pnp]	Single dose mouse	4.2.3.1-7
						[redacted-0976Pnp]	Single dose mouse	4.2.3.1-9

＊新薬承認情報提供時に置換

2.6.7 毒性試験概要表
オリプダーゼ アルファ（遺伝子組換え）

Batch or Lot No.	Manufacturing Process	Concentration (mg/mL)	% Purity			Study No.	Type of Study	Location
			By SDS-PAGE Non Reduced	By SDS-PAGE Reduced	By HPLC			
[redacted]	初期製法*	4.2	NA	97.6	97.9	[redacted041]	Single dose mouse	4.2.3.1-12
						[redacted-02784]	Single dose mouse	4.2.3.1-22
						[redacted-1239Pnp]	Repeat dose mouse	4.2.3.2-4
						[redacted031]	13-week mouse	4.2.3.2-9
						[redacted-00262]	13-week mouse	4.2.3.2-6
						[redacted-03293]	Repeat dose mouse	4.2.3.2-7
[redacted]	初期製法*	3.7	NA	98.6	96.9	[redacted025]	Single dose rat	4.2.3.1-17
						[redacted-0622Pnp]		4.2.3.1-18
						[redacted026]	Single dose dog	4.2.3.1-19
						[redacted-0623Pnp]		4.2.3.1-20
						[redacted027]	Repeat dose rat	4.2.3.2-10
						[redacted-0604Pnp]		4.2.3.2-11
[redacted]	初期製法*	4.0	NA	>98.0	97.7	[redacted-0372Pnp]	Single dose mouse	4.2.3.1-21
						[redacted007]	26-week monkey	4.2.3.2-12
[redacted]	初期製法*	3.9	NA	>98.0	97.9	[redacted007]	26-week monkey	4.2.3.2-12
[redacted]	製法A*	4.1	NA	97.1	96.5	[redacted-02784]	Single dose mouse	4.2.3.1-22
[redacted]	製法B*	3.7	NA	98.8 [a]	96.1	[FER0510]	Fertility and early embryonic development mouse	4.2.3.5.1-1
		3.7	NA	99 [a]	97.2	[DPN0380]	Prenatal and Postnatal Development mouse	4.2.3.5.3-1
[redacted]	申請製法*	4.0	NA	NA	NA	[TER0698]	Embryo-fetal development rabbit	4.2.3.5.2-2
[redacted]	製法B*	4.1	NA	97.4	96.1	[TER0694]	Embryo-fetal development mouse	4.2.3.5.2-1
[redacted]	初期製法*	1.1	NA	NA	NA	[redacted009]	in vitro hemolysis	4.2.3.7.7-1

Abbreviations: NA: not applicable; SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; HPLC: high performance liquid chromatography

a CE-SDS Reduced

＊新薬承認情報提供時に置換

5　単回投与毒性試験

表 2.6.7.5 - Single-Dose Toxicity

Test Article: Olipudase alfa

Species/Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Nonlethal Dose (mg/kg)	Approximate Lethal Dose (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Mouse (BALB/c)	IV (bolus)	0, 4, 8, 12	5M	12	Not determined	The NOAEL of olipudase alfa administered as a single IV injection to BALB/c mice was 12 mg/kg.	[redacted]-0032Pnp]	4.2.3.1-1
Mouse (BALB/c)	IV (bolus)	0, 4, 8, 12	5M	12	Not determined	The NOAEL of a single administration HMW-olipudase alfa related species was > 12 mg/kg.	[redacted]-0024Pnp]	4.2.3.1-2
Mouse (ASMKO)	IV (bolus)	30 [a]	9 or 6F	Not determined	30	30 mg/kg of olipudase alfa administered IV to ASMKO mice resulted in acute toxicity and death.	[redacted]-0788Pnp]	4.2.3.1-3

2.6.7 毒性試験概要表
オリプダーゼ アルファ（遺伝子組換え）

Species/Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Nonlethal Dose (mg/kg)	Approximate Lethal Dose (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Mouse (ASMKO)	IV (bolus)	10, 20	2 or 4F	10	20	10 mg/kg olipudase alfa resulted in mild lethargy by 15 hours post olipudase alfa administration. 20 mg/kg olipudase alfa resulted in mild to severe lethargy and death within 24 hours post olipudase alfa administration. Based on these results, doses above 10 mg/kg of olipudase alfa administered IV in ASMKO mice are considered toxic.	[redacted]-0047Pnp]	4.2.3.1-4

2.6.7 毒性試験概要表
オリプダーゼ アルファ（遺伝子組換え）

Species/Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Nonlethal Dose (mg/kg)	Approximate Lethal Dose (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Mouse (ASMKO and C57BL/6)	IV (bolus)	0, 3 or 10 [b]	2 to 5M / 2 to 4F	C57BL/6 mice: 10 ASMKO mice: not determined	>10 mg/kg.in C57BL/6 mice 10 mg/kg in ASMKO mice	5 unscheduled deaths happened in the ASMKO 10 mg/kg group (3 males and 2 females). Significant body weight changes were observed in 3 and 10 mg/kg dose groups in ASMKO and 10 mg/kg C57BL/6 mice. Dose-responsive increases in the following were observed in ASMKO mice: - Hepatocellular ballooning degeneration and apoptosis, liver inflammatory foci - Adrenal cortical degeneration/ apoptosis/necrosis - ALT, AST, bile acids, and cholesterol Adrenal haemorrhage in ASMKO 10 mg/kg Increased SAA and SAP in ASMKO 3 and 10 mg/kg NOAEL in C57BL/6 mice was >10 mg/kg. NOAEL in ASMKO mice was not determined.	[redacted]-0025Pnp]	4.2.3.1-5

2.6.7 毒性試験概要表
オリプダーゼ アルファ（遺伝子組換え）

Species/Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Nonlethal Dose (mg/kg)	Approximate Lethal Dose (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Mouse (ASMKO)	IV (bolus)	0, 0.1, 0.3, 1	1 to 2M / 4 to 8F	1	>1	Increased creatine kinase, AST, and cholesterol at 1.0 mg/kg Dose-responsive increases in the following were observed: - Hepatocellular ballooning degeneration and apoptosis, liver inflammatory foci - Adrenal cortical degeneration/ apoptosis/necrosis NOAEL in ASMKO mice was 0.3 mg/kg.	[redacted]-0158Pnp]	4.2.3.1-6
Mouse (ASMKO, 22-28 week old)	IV (bolus)	0, 0.1, 0.3	5M / 3-5F	0.3	Not determined	In 22 to 28-week-old ASMKO mice, the highest dose of olipudase alfa at which histological effects did not differ from vehicle control was 0.1 mg/kg. Findings in this study were similar to those in ASMKO mice at 8-10 weeks of age, suggesting that the increased substrate levels present in 22 to 28-week-old ASMKO mice do not increase toxicity	[redacted]-0060Pnp]	4.2.3.1-7

2.6.7 毒性試験概要表
オリプダーゼ アルファ（遺伝子組換え）

Species/Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Nonlethal Dose (mg/kg)	Approximate Lethal Dose (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Mouse (ASMKO, 25-28 week old)	IV (bolus)	0 (untreated), 3, 10	6M (1M in control group)	3	10	Twenty-three hours post dose, all 10 mg/kg animals were mildly/severely lethargic or dead. All animals at 3 mg/kg survived to their intended time points with no observable adverse effects. Older ASMKO mice, that are known to have an increased substrate load, may succumb to olipudase alfa mediated toxicity at an earlier timepoint than mice of a younger age.	[redacted]-0836Pnp]	4.2.3.1-8
Mouse (C57BL/6)	IV (bolus)	0, 75	5F (1F in control group)	75	Not determined	C57BL/6 mice dosed with 75 mg/kg of olipudase alfa are not susceptible to the enzymatic toxicity compared with ASMKO mice.	[redacted]-0976Pnp]	4.2.3.1-9
Mouse (ASMKO)	IV (bolus)	0, 10, 20, 30	5M and/or F	30	Not determined	Heterozygote ASMKO mice do not experience toxicity in response to olipudase alfa at doses of 10-30 mg/kg in contrast to homozygous recessive ASMKO mice.	[redacted]-0975Pnp]	4.2.3.1-10

Species/Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Nonlethal Dose (mg/kg)	Approximate Lethal Dose (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Mouse (ASMKO and C57BL/6)	IV (bolus)	0, 20	5M and/or F	20	Not determined	Apoptosis was observed in the liver of ASMKO mice following IV administration of olipudase alfa. There were no statistically significant differences in apoptotic observations in the aorta, heart, brain, and intestine. When present, endothelial apoptosis in heart, aorta, and liver were rare to minimal and not of sufficient severity to impair organ function.	[[redacted]-1329]	4.2.3.1-11
Mouse (ASMKO)	IV (bolus)	0, 0.03, 0.1, 0.3	10M / 10 F	0.3	Not determined	NOEL was 0.1 mg/kg. NOAEL was 0.3 mg/kg based on mild and reversible findings of degeneration and inflammation in the liver. No changes in clinical chemistry (AST, ALT) associated with liver findings.	[[redacted]041]	4.2.3.1-12
Mouse (ASMKO)	IV bolus (olipudase alfa) IP (NAC)	Olipudase alfa: 20 NAC [f]: 140	1M / 1F	20 c	Not determined	At 10 hours post-olipudase alfa dose all mice showed progressive lethargy similar to observations of previous mice dosed with 20 mg/kg alone. All mice were euthanized 10 hours post-olipudase alfa dose. NAC did not prevent the toxicity associated with administration of 20 mg/kg olipudase alfa to ASMKO mice	[[redacted]0870Pnp]	4.2.3.1-13

Species/Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Nonlethal Dose (mg/kg)	Approximate Lethal Dose (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Mouse (ASMKO)	IV bolus (olipudase alfa) IP (SAM and NAC)	Olipudase alfa: 20[d] NAC: 70, 140 SAM [f]: 165	3M / 3F	20	Not determined	At 5-10 hours post-olipudase alfa dose all mice in all dose groups showed progressive lethargy similar to observations of previous mice dosed with 20 mg/kg alone. All mice were euthanized 10 hours post-olipudase alfa dose. SAM and NAC did not prevent the toxicity associated with administration of 20 mg/kg olipudase alfa to ASMKO mice	[redacted]-0839Pnp]	4.2.3.1-14

2.6.7 毒性試験概要表
オリプダーゼ アルファ（遺伝子組換え）

Species/Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Nonlethal Dose (mg/kg)	Approximate Lethal Dose (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Mouse (ASMKO)	IV (bolus)	0, 10, 20	4 or 8M	10	20	Removing the spleen from male ASMKO mice prior to receiving a known toxic dose of rhASM resulted in some protective effects depending on the dose administered. At 10 mg/kg, splenectomy appears to have protected the ASMKO mice from lethality since all animals survived out to 96 hours, and this dose had previously been identified as the LD50 at 48-72 hours. At 20 mg/kg, toxicity was still observed with all animals either dead or requiring euthanasia by 48 hours. However, the toxicity does appear to be somewhat delayed since previous studies indicated that 20 mg/kg rhASM resulted in death within 24 hours of administration. This protection and/or delay in toxicity may be due to an overall decrease in substrate burden or it could also result directly from spleen removal, if the spleen itself plays a critical role in the mechanism of toxicity.	[redacted]-0058Pnp]	4.2.3.1-15

2.6.7 毒性試験概要表
オリプダーゼ アルファ（遺伝子組換え）

Species/Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Nonlethal Dose (mg/kg)	Approximate Lethal Dose (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Mouse (ASMKO)	SC	0, 30	4 to 5F	Not determined	30	Subcutaneous administration of olipudase alfa at 30 mg/kg in ASMKO mice resulted in acute toxicity with clinical and histological findings similar to that observed previously. However the toxicity was delayed compared to IV administration of 30 mg/kg of olipudase alfa, which produces acute toxicity within 6 hours. This may reflect the delay in reaching Cmax with SC administration	[redacted] 0741Pnp]	4.2.3.1-16
Rat (Sprague-Dawley)	IV (bolus) 20 mmol/L sodium phosphate, 5 % sucrose (w/v), 0.06% Polysorbate 80, 0.1 mmol/L EDTA, and 0.1 M L-Methionine, pH 6.5 / solution)	0, 3, 10, 30	10M / 10F	30	Not determined	No adverse toxic effects were observed. NOEL was 30 mg/kg.	[redacted]025] [redacted]- 0622Pnp]	4.2.3.1-17 4.2.3.1-18

2.6.7 毒性試験概要表
オリプダーゼ アルファ（遺伝子組換え）

Species/Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Nonlethal Dose (mg/kg)	Approximate Lethal Dose (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Dog (beagle)	IV (bolus) (20 mmol/L sodium phosphate, 5% sucrose (w/v), 0.06% Polysorbate 80, 0.1 mmol/L EDTA, and 0.1 M L-Methionine, pH 6.5 / solution)	Olipudase alfa: 0, 3, 10, 30 DPH: 1 [e]	4M / 4F	30	Not determined	No significant pathological findings were noted. Hypersensitivity reactions observed in control animals immediately after dosing include the following: - Hypoactivity and recumbent posture - Muzzles swollen - Eyes developed red conjunctivae Animals with hypersensitivity reactions, as well as all remaining test article animals, were treated with diphenhydramine. All animals recovered over the 2-week recovery period. No effects on blood pressure, rectal body temperature, or respiration rate were observed. NOAEL was >30 mg/kg.	[[redacted]026] [[redacted]-0623Pnp]	4.2.3.1-19 4.2.3.1-20

Species/Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Nonlethal Dose (mg/kg)	Approximate Lethal Dose (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study Number	Location

Abbreviations: IV: Intravenous; IP: Intraperitoneal; NAC: N-Acetyl-L-cysteine; SAM: S-Adenosyl-L-methionine; SC: subcutaneous; ASKMO: Acid Sphingomyelinase Knock-Out Mice; DPH: diphenhydramine hydrochloride; M: male; F: female; NOAEL: no-observed-adverse-effect-level; NOEL: no-observed-effect-level; AST: aspartate aminotransferase; ALT; alanine aminotransferase

a Intended dosing was Group 1 and 2: undosed control group; Group 3: 30 mg/kg Day 1, 10 mg/kg Day 4, 3 mg/kg Day 8; Group 4: 30 mg/kg Day 1, 10 mg/kg Day 4, 3 mg/kg weekly for 8 weeks beginning on Day 8; Group 5: 30 mg/kg Day 1, 10 mg/kg Day 4, 3 mg/kg every other week for 8 weeks beginning on Day 8; however, 24 hours following the initial 30 mg/kg administration of rhASM, all mice in rhASM treated groups were found dead (Groups 3-5).

b Groups 1 and 5 received vehicle control;, Groups 2 and 6 received 3 mg/kg olipudase alfa; Groups 3, 4, 7 and 8 received 10 mg/kg olipudase alfa

c 140 mg/kg of NAC followed 30 minutes later with 20 mg/kg of olipudase alfa. NAC was administered twice following the initial administration, 6 hours apart.

d Groups 1 and 2: 20 mg/kg of olipudase alfa followed by 165 mg/kg of SAM, hourly for the first 8 hours then every 8 hours for 2 more doses starting 30 minutes post olipudase alfa dose. Groups 3 and 4: 20 mg/kg of olipudase alfa followed by 140 mg/kg of NAC followed by 70 mg/kg NAC every 6 hours for 48 hours.

e Due to signs of hypersensitivity, diphenhydramine (1 mg/kg) was administered prophylactically to all animals given 10 or 30 mg/kg with the exception of one male given 10 mg/kg).

f NAC and SAM have shown in published reports to replenish glutathione stores and protect mice from known toxicity caused from TNF alpha induced increases in ceramide and acetaminophen.

6　反復投与毒性試験 - 重要な試験以外の試験

表 2.6.7.6 - Repeat-Dose Toxicity - Nonpivotal Studies

Test Article: Olipudase alfa

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/ dose)	Gender and No. per Group	NOAEL (mg/kg/day)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Mouse (ASMKO)	IV (bolus)	6 days (2 doses) [a]	3/0, 3/20, 3/30 [a]	2 or 4 M/F	Not applicable	Clinical observations were normal in all groups at 24 hours post second dose. No significant changes in clinical pathology were noted at 24 hours post second dose. The livers of animals treated with only 3mg/kg of olipudase alfa exhibited random ballooning degeneration of hepatocytes and/or Kupffer cells and random foci of apoptotic cells in the parenchyma. The only adrenal present for examination of the animals treated with only 3mg/kg of olipudase alfa exhibited mild cortical degeneration and apoptosis in the zona fasciculata and medullary cell swelling. Pre-dosing with 3 mg/kg 5 days prior to dosing with 20 or 30 mg/kg resulted in no additional toxicity observed at sacrifice 24 hours post second dose compared to treatment with 3 mg/kg followed by vehicle.	[[redacted]-0099Pnp]	4.2.3.2-1

2.6.7 毒性試験概要表
オリプダーゼ アルファ（遺伝子組換え）

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/ dose)	Gender and No. per Group	NOAEL (mg/kg/day)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Mouse (ASMKO)	IV (bolus)	6 or 8 days (2 doses) [b]	0, 3/10, 3/30 [b]	6 F	Not applicable	Prior to dosing with 30 mg/kg (Group 3), 4/6 animals were found dead and the other 2/6 animals were severely lethargic and moribund and were subsequently euthanized. Group 2 was administered 10 mg/kg of rhASM on Day 8. One animal was found severely lethargic and moribund on Day 10 and was euthanized. Prior to dosing Group 2 on Day 11, 3/5 animals were found moderately lethargic. All animals in this group were dosed and subsequently euthanized 4 hours after dosing. Histopathological examinations were only conducted in the remaining Group 3 (3/30 mg/kg). Noteworthy findings were observed in the liver, kidney, and adrenal gland. In the liver, hepatocellular degeneration and inflammatory foci and localized vasculitis with neutrophilic infiltration and fibrinoid necrosis in the central veins of the liver in 2/2 mice were noted. In the kidney, renal tubular necrosis was observed in 1/2 mice. In the adrenal gland hemorrhage and cortical necrosis were minimal in both animals.	[[redacted]-0505Pnp]	4.2.3.2-2

2.6.7 毒性試験概要表
オリプダーゼ アルファ（遺伝子組換え）

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/ dose)	Gender and No. per Group	NOAEL (mg/kg/day)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Mouse (ASMKO)	IV (bolus)	1 day (4 doses)	20 (5 mg/kg every 2h)	10 F	Not applicable	Administration 5 mg/kg olipudase alfa every 2 hours for a total dose of 20 mg/kg over 6 hours resulted in acute toxicity. This dosing regimen resulted in the death of all animals within 24 hours of the first administration, similar to a single bolus IV administration of 20 mg/kg of olipudase alfa	[[redacted]-0506Pnp]	4.2.3.2-3
Mouse (ASMKO)	IV (bolus)	3 days	3/20 [c]	5M/3F	Not applicable	Animals appeared bright, alert and responsive throughout the duration of the study. Based on a lack of adverse clinical observations, it is concluded that a dose escalation regimen of olipudase alfa at 3 mg/kg followed three days later with olipudase alfa at 20 mg/kg, prevented the acute toxicity observed when a single bolus dose of 20 mg/kg was administered.	[[redacted]-1239Pnp]	4.2.3.2-4
Mouse (ASMKO)	IV (bolus)	11 days (5 doses) [d]	3/20 [d]	6F	Not applicable	All mice appeared clinically normal for the duration of the study. All mice survived to their designated time points. Histopathology: • Very few inflammatory clusters in liver • A small focus of neutrophil inflammation in the adrenal gland of 1 mouse • Leukocytes around central veins • No evidence of vasculitis, adrenal cortical necrosis, or renal tubular necrosis in any animal	[[redacted]-0889Pnp]	4.2.3.2-5

2.6.7 毒性試験概要表
オリプダーゼ アルファ（遺伝子組換え）

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/ dose)	Gender and No. per Group	NOAEL (mg/kg/day)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Mouse (ASMKO)	Olipudase alfa: IV (bolus) DPH: IP	13 weeks (11 doses) [e]	Olipudase alfa: 3/10, 3/10, 3/30 [e] DPH: 20	4 to 8M/ 4 to 8F	≥30 mg/kg	Mortality was similar across all groups and were considered unrelated to test article. There were a total of 6 early deaths observed including 5 males and 1 female. No toxicologically significant treatment-related effects on body weight, organ weight, organ to body weight ratio, organ to brain weight ratio, acute phase protein levels, cytokines, or other biomarker levels were seen in animals treated with olipudase alfa. No significant changes were observed in clinical chemistry, hematology, or liver function tests. No histopathological evidence of toxicity related to olipudase alfa administration was seen. IV administration of olipudase alfa to ASMKO mice QOW for 13 weeks following a debulking dosing phase resulted in a NOAEL of ≥30 mg/kg in male and female ASMKO mice.	[[redacted]-00262]	4.2.3.2-6

2.6.7 毒性試験概要表
オリプダーゼ アルファ（遺伝子組換え）

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/ dose)	Gender and No. per Group	NOAEL (mg/kg/day)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Mouse (ASMKO)	Olipudase alfa: IV (bolus) DPH: IP	9, 29, or 57 days (5 doses) [f]	Olipudase alfa: 0, 3/20 DPH: 20 mg/kg [f]	3 to 4 M/ 1 to 4 F	Not applicable	Under the conditions of this study, olipudase alfa can be administered as debulking dose of 3 mg/kg in ASMKO mice either QOD or weekly prior to a treatment dose of 20 mg/kg. While olipudase alfa debulking doses could be administered QOW prior to a high-dose treatment, the death of one mouse in this group and the histopathology consistent with previously observed toxicity of high dose olipudase alfa suggest that this dosing regimen may not be as well tolerated as the other dosing regimens.	[[redacted]-03293]	4.2.3.2-7

Abbreviations: ASMKO: acid sphingomyelinase knock-out mice; IV: intravenous; IP: intraperitoneal; DPH: diphenhydramine; NOAEL: no-observed-adverse-effect-level, M: male, F: female; QOW: every other week; QOD: every other day

a Group 1: 3 mg/kg Day 1 followed by 0 mg/kg Day 6, Group 2: 3 mg/kg Day 1 followed by 20 mg/kg Day 6, and Group 3: 3 mg/kg Day 1 followed by 30 mg/kg Day 6

b Group 1: no treatment, Group 2: 3 mg/kg Day 1 followed by 10 mg/kg Day 8, and Group 3: 3 mg/kg Day 1 followed by 30 mg/kg Day 6

c 3 mg/kg Day 1 followed by 20 mg/kg Day 3

d 3 mg/kg every other day (Days 1, 4, 6, 8) for a total of four doses, followed by 20 mg/kg at Day 11

e All groups received 3 mg/kg on Days 1, 3, 5, 7 (Debulking Phase). Then 3, 10, or 30 mg/kg beginning on Day 9 (Treatment Phase) and continuing every other week for 13 weeks (7 doses). DPH (20 mg/kg) was administered (IP)10-20 minutes prior to dosing olipudase alfa to prevent possible anaphylactic reactions. In the event that animals demonstrated a hypersensitivity reaction post-test article administration, despite DPH pre-treatment, a second dose of DPH was administered IP at 10 mg/kg.

f Group 1: 3 mg/kg every other day on Days 1, 3, 5, and 7 (Debulking Phase) followed by 20 mg/kg on Day 9 (Treatment Phase). Group 2: 3 mg/kg once weekly on Days 1, 8, 16, and 22 followed by 20 mg/kg on Day 29 (Treatment Phase). Group 3: 3 mg/kg every other week on Days 1, 16, 29 and 43 followed by 20 mg/kg on Day 57 (Treatment Phase). All mice received 20 mg/kg diphenhydramine (DPH) intraperitoneally prior to the first Treatment Phase dose in Group 1, the third debulking dose in Group 2, and the second debulking dose in Group 3, and each dose thereafter.

7　反復投与毒性試験

表 2.6.7.7 A - Repeat-Dose Toxicity - 12-Week Mouse Study

Report Title: Effect of repeated intravenous administration of recombinant human acid sphingomyelinase to acid sphingomyelinase knock-out mice with a four week recovery period		
Species/Strain: Mouse (ASMKO)	**Duration of Dosing:** 12 weeks	**Test Article (Batch):** Olipudase alfa ([redacted])
Initial Age: approximately 9 weeks	**Duration of Post-Dose:** 4 weeks	**Study No.:** [[redacted]005]
Date of First Dose: [redacted]to [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** IV; once every other week (7 doses)	**Location:** 4.2.3.2-8
Vehicle/Formulation: 20 mmol/L sodium phosphate, 5% sucrose, 100 mmol/L methionine, 0.1 mmol/L EDTA at a pH of 6.5/ solution		**GLP Compliance:** Yes
Special Features: Main study animals (6/sex/group) were euthanized 24 hours following the final dose. Recovery animals (6/sex/group in control and 3.0 mg/kg/dose groups) were euthanized 28 days after the final dose.		
No Observed Adverse Effect Level: 3.0 mg/kg in male and female ASMKO mice		

Dose (mg/kg/day/dose)	**0 (Vehicle Control)/DPH[a]**		**0.3/DPH[a]**		**1.0/DPH[a]**		**3.0/DPH[a]**	
Number of Animals on Study (Main Study)	**M: 6**	**F: 6**	**M: 4**	**F: 2**	**M: 4**	**F: 2**	**M: 7**	**F: 5**
Mortality - There were no unscheduled deaths in this study								
Clinical observations								
hypersensitivity including lethargy and rapid breathing	-	-	-	-	-	-	+	+
Serum antibody analysis (number positive/total number of samples)								
24 hours post final dose	2/6		2/6		5/6		5/6	
28 days post final dose (recovery)	3/6		NA		NA		6/6	

表 2.6.7.7 A - Repeat-Dose Toxicity - 12-Week Mouse Study (continued)

Report Title: Effect of repeated intravenous administration of recombinant human acid sphingomyelinase to acid sphingomyelinase knock-out mice with a four week recovery period

Dose (mg/kg/dose)	**0 (Vehicle Control) /DPH[a]**		**0.3/DPH[a]**		**1.0/DPH[a]**		**3.0/DPH[a]**	
Number of Animals on Study (Main Study)	**M: 6**	**F: 6**	**M: 4**	**F: 2**	**M: 4**	**F: 2**	**M: 7**	**F: 5**
Liver Persistence (number positive/total number of samples)								
24 hours post final dose	ND		ND		4/5		1/5	
28 days post final dose (recovery)	ND		NA		NA		ND	
There were no adverse or toxicologically relevant effects on body weight, hematology, urinalysis or urine chemistry parameters.								
Serum Chemistry (Terminal Sacrifice)								
alkaline phosphatase (U/L)	173		101 *		100 *		86 *	
cholesterol (mg/dL)	90		102		118		126 *	
Organ Weights (Terminal Sacrifice)	0.070		0.052 *		0.052 *		0.056 *	
liver to body weight ratio								
Gross Pathology (Terminal Sacrifice) (incidence/number of animals observed)								
Spleen – discoloration, dark, red	0/3	1/3	0/4	2/2	2/4	0/1	2/3	0/2
Seminal vesicle - unilateral or bilateral dark or tan discoloration	1/3	-	2/4	-	3/4	-	1/3	

表 2.6.7.7 A - Repeat-Dose Toxicity - 12-Week Mouse Study (continued)

Report Title: Effect of repeated intravenous administration of recombinant human acid sphingomyelinase to acid sphingomyelinase knock-out mice with a four week recovery period

Dose (mg/kg/dose)	**0 (Vehicle Control) /DPH[a]**		**0.3/DPH[a]**		**1.0/DPH[a]**		**3.0/DPH[a]**	
Number of Animals on Study (Main Study)	**M: 6**	**F: 6**	**M: 4**	**F: 2**	**M: 4**	**F: 2**	**M: 7**	**F: 5**
Histopathology (LM – Terminal Sacrifice)								
liver – increased inflammatory foci per section within the hepatic parenchyma	-		-		+		+	
adrenal gland – cortical degeneration/apoptosis	0/6		1/6		1/5		2/5	
bone marrow (sternum and femur) – decreased number of large foamy cells and erythroid hypoplasia	-		+		+		+	
Histopathology (LM – Recovery Sacrifice)								
bone marrow (sternum and femur) Erythroid hypoplasia correlated with anemia	+		-		-		-	

Conclusions: Repeated administration of rhASM to ASMKO mice up to 3 mg/kg every other week for 12 weeks as an intravenous injection resulted in mild dose responsive and reversible histopathological changes in the liver and adrenal and a dose responsive and reversible increase in total serum cholesterol. In conclusion, based on the reversibility and mild dose responsive findings, intravenous administration of rhASM to ASMKO mice once every other week for 12 weeks (7 doses) at 0.3, 1.0 or 3.0 mg/kg/dose resulted in a no-observable-adverse-effect-level (NOAEL) of 3.0 mg/kg in male and female ASMKO mice.

Abbreviations: M: male, F: female, IV: intravenous; DPH: diphenhydramine, IP: intraperitoneally; LM: light microscopy, -: finding not present; +: finding present; * :statistically significant (T-test)

a Beginning with the second dose (Day 14), mice at 3 mg/kg exhibited signs of hypersensitivity including lethargy and rapid breathing. DPH was administered at 5 mg/kg; IV. To ensure that all animals were treated uniformly, all mice were administered a dose of DPH after their second treatment. Beginning with the third dose (Day 28) and continuing through the seventh dose, mice received a prophylactic injection of DPH, administered IP, approximately five minutes prior to dosing. Several mice in Group 4 showed additional signs of hypersensitivity including mild to moderate lethargy, and were treated with additional doses of intravenous DPH. Animals responded to the DPH treatment within 15 to 30 minutes with improved activity levels.

表 2.6.7.7 B - Repeat-Dose Toxicity - 13-Week Mouse Study with a 4-Week Recovery Period

Report Title: rhASM: 13-week multiple dose intravenous injection toxicity study in acid sphingomyelinase knock-out mice with a 4-week recovery		
Species/Strain: Mouse (ASMKO)	**Duration of Dosing:** 13 weeks	**Test Article (Batch):** Olipudase alfa ([redacted])
Initial Age: 8 to 13 weeks	**Duration of Post-Dose:** 4 weeks	**Study No.:** [[redacted]031]
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** IV; once every 2 weeks (7 doses)	**Location:** 4.2.3.2-9
Vehicle/Formulation: 20 mmol/L sodium phosphate, 5% sucrose, 100 mmol/L methionine, 0.1 mmol/L EDTA at a pH of 6.5/ solution		**GLP Compliance:** Yes
Special Features: Main study animals (10/sex/group) were euthanized 1 week following the final dose. Recovery animals (10/sex/group) were euthanized 4 weeks after the final dose		
No Observed Adverse Effect Level: 3.0 mg/kg in male and female ASMKO mice		

Dose (mg/kg/dose)	**0 (Vehicle Control)**		**0 (Vehicle Control)/DPH**		**0.3 / DPH[a]**		**1.0 / DPH[a]**		**3.0 / DPH[a]**	
Number of Animals on Study (Main Study)	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**
Noteworthy Findings:										
Anti-ASM Antibody Analysis (no. of positives/total no. samples)										
Terminal	0/19		1/20		1/20		10/20		17/20	
Recovery	1/17		0/17		2/19		9/19		16/16	
Died or Killed Moribund [b]	1 (D -7)	1 (D 15)	1 (D -1)	1 (D 1)	0	1 (D 65)	1 (D 88)	0	3 (D 15, 32, 32)	1 (D 79)
Clinical Observations (no. of animals with observation/total no. animals)										
Lethargy (mild to moderate, at 10 and/or 60 min postdosing at Dose 2-7)	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	2/20	0/20	18/20	18/20

There were no toxicologically significant effects on body weight, food consumption, ophthalmic examinations, hematology, serum chemistry, organ weight, macroscopic or microscopic observations.

表 2.6.7.7 B - Repeat-Dose Toxicity - 13-Week Mouse Study with a 4-Week Recovery Period (continued)

Report Title: rhASM: 13-week multiple dose intravenous injection toxicity study in acid sphingomyelinase knock-out mice with a 4-week recovery

Conclusions: Intravenous administration of rhASM to ASMKO mice once every other week for 13 weeks resulted in a no-observable-adverse-effect-level (NOAEL) of > 3.0 mg/kg in male and female ASMKO mice.

Abbreviations: M: male, F: female, DPH: diphenhydramine, IP: intraperitoneal, IV: intravenous

a 5 mg/kg DPH (IP) or 0.9% Saline (IP) was administered beginning with the second dose at a dose volume of 1 mL/kg. Due to signs of hypersensitivity following the third dose, on the first dosing day of the fourth dose animals received 10 mg/kg DPH or 0.9% Saline at a dose volume of 2 mL/kg. For all remaining doses animals received 20 mg/kg DPH or 0.9% Saline at a dose volume of 4 mL/kg.

b Death in one male at 1.0 mg/kg rhASM was attributed to atrial thrombosis/rupture, a spontaneous condition in mice. Death of one control female (vehicle article/DPH) was associated with hydronephrosis, also a spontaneous condition in mice. The cause of death in 2 males at 3.0 mg/kg rhASM, was most likely a result of a severe hypersensitivity reaction following administration of rhASM that could not be prevented with DPH administration. Hydronephrosis was also noted in one of the 3.0 mg/kg rhASM males whose death was most likely the result of hypersensitivity. The cause of death for the remaining six early death animals was not apparent upon gross or microscopic examinations. However, during the course of the study, it became apparent that several mice had difficulties using the water bottles, and that these deaths may be therefore attributed to dehydration, as the deaths occurred prior to study initiation or were noted within the first weeks of study start. The small numbers of these deaths, their random distribution across groups, and the absence of gross or microscopic evidence of toxicity, were considered indicative of spontaneous etiology or possible dehydration rather than an effect of test article administration.

表 2.6.7.7 C - Repeat-Dose Toxicity - 26-Week Rat Study with a 4-Week Recovery Period

Report Title: 26-week intravenous injection chronic toxicity study with recombinant human acid sphingomyelinase (rhASM) in rats with a 4-week recovery period

Species/Strain: Rat (Sprague-Dawley)	**Duration of Dosing:** 26 weeks	**Test Article (Batch):** Olipudase alfa ([redacted])
Initial Age: approximately 7 weeks	**Duration of Post-Dose:** 4 weeks	**Study No.:** [[redacted]027] and [[redacted]-0604Pnp]
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** IV; once every 2 weeks (14 doses)	**Location:** 4.2.3.2-10 and 4.2.3.2-11
Vehicle/Formulation: 20 mM sodium phosphate, 5% sucrose, 0.06% Polysorbate 80, 0.1 mM EDTA, and 0.1 M L-Methionine at a pH of 6.5 / solution		**GLP Compliance:** Yes

Special Features: The terminal sacrifice for the first 5 rats/sex at 3 to 30 mg/kg/dose (i.e., rats used for toxicokinetic blood collection) occurred on Day 185, and for the second 5 rats/sex in at 3 to 30 mg/kg/dose as well as the saline control rats on Day 184. The remaining rats in the vehicle control and 3 to 30 mg/kg/dose groups were used to assess recovery and were sacrificed on Day 212 (after the 4-week recovery period). Samples of liver were collected at scheduled sacrifices for determination of tissue test article concentrations (reported separately in [[redacted]-0604Pnp]).

No Observed Adverse Effect Level: 30 mg/kg/dose

Dose (mg/kg/dose)		**0 (Saline Control)**		**0 (Vehicle Control)/DPH[a]**		**3 / DPH[a]**		**10 / DPH[a]**		**30 / DPH[a]**	
Number of Animals on Study (Main Study)		**M: 5**	**F: 5**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**
Toxicokinetics											
AUC_{0-inf} (µg.h/mL)	**Day 1**	NA	NA	NA	NA	123	130	235	185	679	643
	Day 85	NA	NA	NA	NA	160	102	541	399	1872	1256
	Day 183	NA	NA	NA	NA	231	144	449	387	1690	1122
C_{max} (µg/mL)	**Day 1**	NA	NA	NA	NA	70	75	124	123	568	541
	Day 85	NA	NA	NA	NA	92	65	227	216	881	701
	Day 183	NA	NA	NA	NA	135	96	253	192	810	522
Anti-ASM Antibody Analysis (no. of positives/total no. samples)											
	Day 1	NA	NA	NA	NA	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Day 85	NA	NA	NA	NA	1/5	1/5	4/5	2/5	0/5	2/5
	Day 183	NA	NA	NA	NA	2/5	1/5	3/5	2/5	0/4	2/5

表 2.6.7.7 C - Repeat-Dose Toxicity - 26-Week Rat Study with a 4-Week Recovery Period (continued)

Report Title: 26-week intravenous injection chronic toxicity study with recombinant human acid sphingomyelinase (rhASM) in rats with a 4-week recovery period

Dose (mg/kg/dose)	**0 (Saline Control)**		**0 (Vehicle Control)/DPH[a]**		**3 / DPH[a]**		**10 / DPH[a]**		**30 / DPH[a]**	
Number of Animals on Study (Main Study)	**M: 5**	**F: 5**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**
Liver rhASM Analysis, mean (µg rhASM/g wet tissue)										
Terminal	NA		0.21	0.15	0.57	0.57	0.83	0.89	2.31	2.03
Recovery	NA		NA	NA	0.27	0.31	0.40	0.44	0.38	0.32
Noteworthy Findings:										
Died or Killed Moribund [b]	0	0	0	1 (D24)	0	0	0	1 (D29)	3 (D85, 71, 81)	0
Clinical Observations (no. of animals affected)										
Convulsions	0	0	0	1	1	0	2	0	2	0
Tremors	0	0	0	1 (body)	1 (head)	0	0	1 (body)	0	0
Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0
Sternal recumbency	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0
Body weight gain, mean (g)										
Week 1-26 (mean)	399	152	407	176	400	160	418	176	471	160

表 2.6.7.7 C - Repeat-Dose Toxicity - 26-Week Rat Study with a 4-Week Recovery Period (continued)

Report Title: 26-week intravenous injection chronic toxicity study with recombinant human acid sphingomyelinase (rhASM) in rats with a 4-week recovery period

Dose (mg/kg/dose)	**0 (Saline Control)**		**0 (Vehicle Control)/DPH[a]**		**3 / DPH[a]**		**10 / DPH[a]**		**30 / DPH[a]**	
Number of Animals on Study (Main Study)	**M: 5**	**F: 5**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**
Food consumption, mean (g)										
Week 1	186	140	183	142	188	146	196	144	207	151
Week 4	209	154	210	155	213	160	223	152	242*	164
Week 8	225	159	221	161	220	170	228	166	261*	164
Week 12	205	143	196	149	200	149	199	156	224*	155
Week 16	225	164	219	167	224	168	225	173	261*	171
Week 20	233	167	214	167	219	172	217	173	246	170
Week 26	216	165	204	162	209	163	205	164	237	163

There were no toxicologically significant effects on ophthalmic examinations, hematology, serum chemistry, organ weight, macroscopic or microscopic observations.

Conclusion: In conclusion, intravenous administration of rhASM to Crl:CD®(SD)IGS BR rats once every two weeks for 26 weeks (14 doses) at 3, 10, or 30 mg/kg/dose resulted in a no-observable-adverse effect level (NOAEL) for rhASM treatment of at least 30 mg/kg/dose in males and females.

Additional Information: N= 4 to 5/group/timepoint for toxicokinetic analysis of olipudase alfa; the lower limit of quantitation was 0.137 ng

Abbreviations: M: male, F: female, DPH: diphenhydramine, IP: intraperitoneal, IV: intravenous, AUC: area under the curve, Cmax: maximum concentration; D: day, -: finding not present

*: significant increase over the Control Group 2

a All animals were pre-treated with DPH after Week 2, through Week 15. DPH dose was administered at 5.0 mg/kg for the second through the sixth doses, 2.5 mg/kg for the seventh dose, and 1.25 mg/kg for the eighth dose.

b Cause of death for three 30 mg/kg/dose males was not determined; death in the control female and 10 mg/kg/dose female were not considered related to olipudase alfa.

表 2.6.7.7 D - Repeat-Dose Toxicity - 26-Week Monkey Study with a 4-Week Recovery Period

Report Title: 26-week intravenous infusion chronic toxicity with recombinant human acid sphingomyelinase (rhASM) in cynomolgus monkeys with a 4-week recovery period									
Species/Strain: Monkey (cynomolgus)		**Duration of Dosing:** 26 weeks				**Test Article (Batch):** Olipudase alfa ([redacted]; [redacted])			
Initial Age: 2.5 to 5 years		**Duration of Post-Dose:** 4 weeks				**Study No.:** [redacted]007]			
Date of First Dose: [redacted]and [redacted] [redacted] 20[redacted]		**Method of Administration:** IV; once every 2 weeks (13 doses)				**Location:** 4.2.3.2-12			
Vehicle/Formulation: 20 mmol/L sodium phosphate, 5% sucrose, 100 mmol/L methionine, 0.1 mmol/L EDTA at a pH of 6.5						**GLP Compliance:** Yes			
Special Features:									
No Observed Adverse Effect Level: >30 mg/kg/dose									
Dose (mg/kg/dose)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**		**0**
Number of Animals on Study (Main Study) [b]	**M: 5**[a]	**F: 6**	**M: 7**	**F: 7**	**M: 7**	**F: 7**	**M: 7**	**F: 6**	**M: 1**[a]
Toxicokinetics									
$AUC_{0\text{-last}}$ (µg.h/mL) Day 1	NA	NA	202		988		3712		NA
Day 71	NA	NA	118		714		2714		
Day 169	NA	NA	98.2		672		2393		
C_{max} (µg/mL) Day 1	NA	NA	44		254		706		
Day 71	NA	NA	35.9		197		920		
Day 169	NA	NA	30.0		209		717		
Anti-ASM Antibody Analysis (no. of positives/total no. samples)									
Day 1	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	NA
Day 29	0/7	0/7	5/7	4/7	5/7	4/7	4/7	6/7	
Day 85	0/6	0/7	7/7	6/7	5/7	6/7	7/7	7/7	
Day 127	0/6	0/6	7/7	6/7	6/7	6/7	7/7	7/7	
Day 169	0/6	0/6	7/7	7/7	6/7	7/7	7/7	6/6	

表 2.6.7.7 D - Repeat-Dose Toxicity - 26-Week Monkey Study with a 4-Week Recovery Period (continued)

Report Title: 26-week intravenous infusion chronic toxicity with recombinant human acid sphingomyelinase (rhASM) in cynomolgus monkeys with a 4-week recovery period (continued)

Dose (mg/kg/dose)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**		**0**
Number of Animals on Study (Main Study) [b]	**M: 5**[a]	**F: 6**	**M: 7**	**F: 7**	**M: 7**	**F: 7**	**M: 7**	**F: 6**	**M: 1**[a]
Additional Information: For toxicokinetic parameters, N=12 to 14 per group (combined males and females)									
Anti-ASM Antibody Analysis (no. of positives/total no. samples)									
Day 1	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	
Day 29	0/7	0/7	5/7	4/7	5/7	4/7	4/7	6/7	
Day 85	0/6	0/7	7/7	6/7	5/7	6/7	7/7	7/7	NA
Day 127	0/6	0/6	7/7	6/7	6/7	6/7	7/7	7/7	
Day 169	0/6	0/6	7/7	7/7	6/7	7/7	7/7	6/6	
Noteworthy Findings:									
Died or Killed Moribund [c]	1 (D169)	1 (D110)						1 (D138)	
There were no treatment-related findings in any of the evaluated data.									

Conclusion: In conclusion, under the conditions of this study, the no-observable-adverse-effect level (NOAEL) for male and female cynomolgus monkeys treated with rhASM by intravenous infusion every 2 weeks for 26 weeks is >30 mg/kg/dose.

Abbreviations: M: male, F: female, AUC: area under the curve, Cmax: maximum concentration.

a Animal I61776, a Group 1 male, was not dosed after Day 29 (third dose) due to an irreparable catheter dysfunction. The monkey was moved to Group 5, given a new animal number (I62480), and not dosed further, although it was on the same schedule for evaluation of all other parameters as the other animals in the group.

b Reflects the numbers of animals that survived to scheduled terminations

c There were three unscheduled sacrifices on the study that were unrelated to treatment with the test article. A control female on Day 110 (Week16), a control male on Day 169 (Week 25), and a 30 mg/kg/day female on Day 138 (Week 20) suffered accidental limb fractures and were euthanized for humane reasons. There were no treatment-related findings in any of the evaluated data.

8 *In Vitro* 遺伝毒性試験

該当なし。

9 *In Vivo* 遺伝毒性試験

該当なし。

10　がん原性試験

該当なし。

11　生殖発生毒性試験 - 重要な試験以外の試験

該当なし。

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

表 2.6.7.12 A - Reproductive and Developmental Toxicity - Fertility and Early Embryonic Development to Implantation

Report Title: GZ402665 (Olipudase Alfa): Intravenous Fertility and Early Embryonic Development to Implantation in Mice		
Species/Strain: Mouse Crl:CD1(ICR)	**Duration of Dosing:** M: once every other day beginning 28 days before cohabitation, during cohabitation and continuing until euthanasia	**Test Article (Batch):** Olipudase alfa ([redacted])
Initial Age: 62 days old at receipt	F: once every other day beginning 15 days before cohabitation, during cohabitation (maximum of 14 days) and continuing until GD7	**Study No.:** [FER0510]
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Day of Mating:** GD 0	**Location:** 4.2.3.5.1-1
Special Features: None	**Day of C-Section:** GD 14	**GLP Compliance:** Yes
Design similar to ICH 4.1.1: Yes	**Method of Administration:** IV (GZ402665) or IP (DPH)	
No Observed Adverse Effect Level: **F0 Males:** 30 mg/kg/dose **F0 Females:** 30 mg/kg/dose **F1 Litters:** 30 mg/kg/dose	**Vehicle/Formulation:** 20 mmol/L sodium phosphate, 5% sucrose, 100 mmol/L methionine, 0.1 mmol/L EDTA at a pH of 6.5	

Daily Dose (mg/kg/dose)	**0/0 (Control)**	**0/20 (Control/DPH)**	**3.16/20 (GZ402665)**	**10/20 (GZ402665)**	**30/20 (GZ402665)**
Males:					
No. Evaluated	25	25	25	25	25
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	7	4	0
Clinical Observations (N/N) [a]					
Decreased Motor Activity	0/0	0/0	34/18	16/11	14/13
Ataxia	0/0	0/0	35/22	8/6	8/8
Vocalization	0/0	0/0	1/1	3/3	27/5
Hyperreactivity	0/0	0/0	9/8	6/5	2/2
Tremors	0/0	0/0	0/0	1/1	2/2

表 2.6.7.12 A - Reproductive and Developmental Toxicity - Fertility and Early Embryonic Development to Implantation (continued)

Report Title: GZ402665 (Olipudase Alfa): Intravenous Fertility and Early Embryonic Development to Implantation in Mice

Daily Dose (mg/kg/dose)	0/0 (Control)	0/20 (Control/DPH)	3.16/20 (GZ402665)	10/20 (GZ402665)	30/20 (GZ402665)
Males (Continued):					
Labored Breathing	0/0	0/0	2/2	0/0	2/2
Body Jerks	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0
Cold to Touch	0/0	0/0	5/5	0/0	0/0
Necropsy Observations	-	-	-	-	-
Body Weight Day 49 (g)	37.7	36.6	36.3	36.9	37.0
Food Consumption Days 1 to 25 (g/day)	9.4	9.2	8.6	9.3	8.1
Mean No. Days Prior to Mating	2.2	2.2	2.5	2.4	2.0
No. of Males that Mated	25	25	19	19	23
No. of Fertile Males	25	23	15	17	18
Organ weights	-	-	-	-	-
Sperm motility	-	-	-	-	-
Sperm density	-	-	-	-	-
Histopathology	-	-	-	-	-
Females:					
No. Evaluated	25	25	25	25	25
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	6	4	1
Clinical Observations (N/N) [a]					
Pre-Cohabitation/Premating					
Increased Motor Activity	0/0	0/0	6/6	7/6	9/9
Decreased Motor Activity	0/0	0/0	18/15	10/10	4/4
Whole Body Twitches	0/0	0/0	2/2	0/0	0/0
Cold to Touch	0/0	0/0	2/2	0/0	0/0
Ataxia	0/0	0/0	1/1	0/0	0/0
Labored Breathing	0/0	0/0	1/1	0/0	0/0

表 2.6.7.12 A - Reproductive and Developmental Toxicity - Fertility and Early Embryonic Development to Implantation (continued)

Report Title: GZ402665 (Olipudase Alfa): Intravenous Fertility and Early Embryonic Development to Implantation in Mice

Daily Dose (mg/kg/dose)	0/0 (Control)	0/20 (Control/DPH)	3.16/20 (GZ402665)	10/20 (GZ402665)	30/20 (GZ402665)
Females (Continued):					
Gestation					
Decreased Motor Activity	0/0	0/0	12/9	1/1	0/0
Ataxia	0/0	0/0	10/8	1/1	0/0
Necropsy Observations	-	-	-	-	-
Premating Body Weight Day 15 (g)	28.5	27.9	28.0	27.4	28.2
Gestation Body Weight GD 14 (g)	44.3	42.7	43.8	42.6	43.9
Premating Food Consumption Days 1 to 15 (g/day)	7.9	8.8	7.7	6.5	7.5
Gestation Food Consumption GD 0 to 14 (g/day)	8.0	7.9	7.2	6.9	8.0
Mean No. Estrous Cycles/14 days	3.12	2.92	2.75	3.00	2.87
Mean No. Days Prior to Mating	2.2	2.2	2.5	2.5	2.0
No. of Females Sperm Positive	25	25	19	22	23
No. of Pregnant Females	25	23	15	19	18
Mean No. Viable Embryos	11.8	11.3	12.3	11.7	12.3
Mean No. Nonviable Embryos	1.2	1.1	0.7	1.2	0.8
Mean % Postimplantation Loss	9.0	10.0	6.2	9.0	6.8
Organ Weights	-	-	-	-	-

Conclusion: On the basis of these data, the paternal and maternal no-observable-adverse-effect levels (NOAELs) for olipudase alfa were 30 mg/kg/dose. The mortality that occurred in all olipudase alfa groups was considered due to hypersensitivity from olipudase alfa administration. The male and female reproductive NOAELs were 30 mg/kg/dose. Administration of olipudase alfa had no effects on mating and fertility of the male or female mice or cesarean-sectioning and litter parameters of female mice evaluated at mid-gestation.

Abbreviations: -: No noteworthy findings; N/N: Total Number of Observations/Number of Mice with Observation; DPH: Diphenhydramine; GD: Gestation Day

a All considered related to test article hypersensitivity.

13　生殖発生毒性試験－胚･胎児発生に関する試験

表 2.6.7.13 A - Reproductive and Developmental Toxicity - Effects on Embryo-fetal Development - Mouse

Report Title: GZ402665 (Olipudase Alfa): Intravenous Embryo-Fetal Toxicity Study in Mice		
Species/Strain: Mouse /Crl:CD1(ICR)	**Duration of Dosing:** GD 6 through 15	**Test Article (Batch):** Olipudase alfa ([redacted])
Initial Age: 62 days upon arrival at Testing Facility	**Day of Mating:** GD 0	**Study No.:** [TER0694]
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Day of C-Section:** GD 18	**Location:** 4.2.3.5.2-1
Special Features: Toxicokinetic and Anti-Drug Antibody Evaluations	**Method of Administration:** IV (GZ402665) or IP (Saline and DPH)	**GLP Compliance:** Yes
Design similar to ICH 4.1.3? Yes	**Vehicle/Formulation:** 20 mmol/L sodium phosphate, 5% sucrose, 100 mmol/L methionine, 0.1 mmol/L EDTA at a pH of 6.5	
No Observed Adverse Effect Level: **F0 Females:** 30 mg/kg/day **F1 Litters:** 30 mg/kg/day		

Daily Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**	**0/20 (Control/DPH)**	**3 (GZ402665)**	**10 (GZ402665)**	**30 (GZ402665)**
Toxicokinetics (Dams)					
AUC_{0-24} (µg.h/mL) **GD 12**	NA	NA	83.1	278	916
C_{max} (µg/mL) **GD12**	NA	NA	35.2	176	409
Anti-Drug Antibody: **GD 13**					
No. positive ADA response [a]	0/4	0/5	9/19	4/20	3/20
No. Pregnant	24	25	21	22	24
No. Died or Sacrificed Moribund	1[b]	-	9[c]	2[d]	-
No. Aborted of with Total Resorption of Litter	-	-	-	-	-
No. Delivered	-	-	-	2	-

Abbreviations: NA: Not Applicable; GD: Gestation Day; ADA: anti-drug antibody

表 2.6.7.13 A - Reproductive and Developmental Toxicity - Effects on Embryo-fetal Development - Mouse (continued)

Report Title: GZ402665 (Olipudase Alfa): Intravenous Embryo-Fetal Toxicity Study in Mice

Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	0 (Control/DPH)	3 (GZ402665)	10 (GZ402665)	30 (GZ402665)
Clinical Observations[e]					-
Decreased activity	-	-	5 / 4	4 / 4	7 / 7
Body Weight (g) - GD 18	59.8	59.2	56.8	56.7	59.0
Body Weight Gain (g) - GD 6 to 18	29.5	28.9	26.6	26.8	29.1
Gravid Uterine Weight (g)	23.42	22.28	20.66	21.05	22.45
Food Consumption (g/animal/day) - GD 6 to 18	7.7	7.4	7.4	7.4	7.6
Mean No. Corpora Lutea	14.5	15.1	15.3	14.4	14.7
Mean No. Implantations	14.4	14.6	14.4	13.7	14.0
Mean % Preimplantation Loss	0.58	2.66	4.93	5.08	3.88

表 2.6.7.13 A - Reproductive and Developmental Toxicity - Effects on Embryo-fetal Development - Mouse (continued)

Report Title: GZ402665 (Olipudase Alfa): Intravenous Embryo-Fetal Toxicity Study in Mice

Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	0 (Control/DPH)	3 (GZ402665)	10 (GZ402665)	30 (GZ402665)
Litters:					
No. Litters Evaluated	24	25	14	21	23
No. Live Fetuses	13.5	13.2	12.0	12.7	12.8
Mean No. Resorptions	0.8	1.5	2.4**	1.0	1.3
No. of Litters with Dead Fetuses	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Mean % Postimplantation Loss	5.88	10.28	16.26*	6.70	9.51
Mean Fetal Body Weight-Combined (g)	1.334	1.314	1.294	1.314	1.352
Live Male Fetuses (%)	49.40	52.03	47.86	46.03	45.10
Fetal Anomalies:	-	-	-	-	-
Gross External	-	-	-	-	-
Visceral Anomalies	-	-	-	-	-
Skeletal Anomalies	-	-	-	-	-
Fetal Ossification Site	-	-	-	-	-

Conclusion: Olipudase alfa was intravenously administered to pregnant Crl:CD1(ICR) mice once daily on GDs 6 through 15 at doses of 3, 10, or 30 mg/kg/day. Maternal effects were limited to an increased incidence of decreased activity at ≥3 mg/kg/day which resulted in administration of DPH. Olipudase alfa did not result in any mortality or effects on maternal body weights, body weight gains, and food consumption. Olipudase alfa did not result in any effects on embryo-fetal survival or fetal body weights, and did not produce any fetal external, visceral, or skeletal malformations or variations. On the basis of these data, the maternal and developmental no-observable-adverse-effect level (NOAEL) for olipudase alfa is 30 mg/kg/day ($AUC_{0\text{-}24}$ 916 µg•h/mL).

Abbreviations: - :No noteworthy findings; GD: Gestation Day; DPH: diphenhydramine hydrochloride

a ADA positive animals/total number of animals

b Female 2006 (main study) was found dead on GD 7, and female 2128 (TK satellite) was found dead on GD 12 following the 2-hour blood collection time point.

c Females 2072 and 2075 were found dead on GD 12, females 2062 and 2071 were found dead on GD 13, and females 2052, 2058, and 2066 were found dead on GD 14. Female 2069 was found dead on GD 14 before dose administration, while female 2060 was found dead on GD 16, during the non-dosing period. Female 2144 (TK satellite) was found dead on GD 12 following the 2-hour blood collection time point.

d Female 2084 delivered on GD 7, the 2nd day of the dose administration and it is related to an error in animal procurement. Female 2087 delivered its litter on GD 18, the day of the scheduled euthanasia.

e X/X = Frequency of observation/number of affected animals

*p<0.05, ** -p<0.01 (Dunnet Test)

表 2.6.7.13 B - Reproductive and Developmental Toxicity - Effects on Embryo-fetal Development - Rabbit

Report Title: GZ402665 (Olipudase alfa) An Intravenous Infusion Embryo-Fetal Development Study in Rabbits		
Species/Strain: Rabbit (New Zealand White)	**Duration of Dosing:** GD 6 to 19	**Test Article (Batch):** Olipudase alfa ([redacted])
Initial Age: Approximately 5 to 6 months	**Day of Mating**: GD 0	**Study No.:** [TER0698]
Date of First Dose: [redacted]	**Day of C-Section:** GD 13 (TK), GD 29 (Main)	**Location:** 4.2.3.5.2-2
Special Features: Toxicokinetic and Anti-Drug Antibody Evaluations	**Method of Administration:** Intravenous infusion	**GLP Compliance:** Yes
	Vehicle/Formulation: 20 mM sodium phosphate, 5% sucrose, 100 mM methionine, 0.1 mM EDTA in Sterile Water for Injection, USP at a pH of 6.5	

Dose (mg/kg/day)		**0** [a] **(Control)**	**0** [a] **(Control)**	**3 (GZ402665)**	**10 (GZ402665)**	**30 (GZ402665)**
Females	**Toxicokinetics:**					
	$AUC_{(0\text{-}24h)}$ (µg.h/mL) – GD12	NA	NA	598	2000	6350
	C_{max} (µg/mL) - GD12	NA	NA	114	370	1180
	Anti-Drug Antibody:					
	No. positive ADA response [b] Day 6	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	No. positive ADA response [b] Day 12	0/3	0/3	3/3	1/2	2/2
	No. Pregnant	21	23	24	25	25
	No. Died or Sacrificed Moribund	0	4	3	4	2
	No. with All Nonviable Conceptuses	2	4	3	2	2
	Clinical Observations[c]					
	Ungroomed Fur	3	4	6	8	8
	Necropsy Observations[d]					
	Material accumulation in thoracic cavity	-	-	1	-	-
	Fluid accumulation, Pale in thoracic cavity	-	-	1	-	-
	Material accumulation, abnormal appearance in sternal region subcutis	-	-	1	-	-

表 2.6.7.13 B - Reproductive and Developmental Toxicity - Effects on Embryo-fetal Development – Rabbit (continued)

Report Title: GZ402665 (Olipudase alfa) An Intravenous Infusion Embryo-Fetal Development Study in Rabbits (continued)

Dose (mg/kg/day)		0 [a] (Control)	0[a] (Control)	3 (GZ402665)	10 (GZ402665)	30 (GZ402665)
Females (continued)	**Absolute Body Weights GD 20 (%)[e]**	3982.6 g	-0.9	-3.3	-0.1	-1.0
	Food Consumption GD 6 to 20 (%)[e]	129.17	-6.33	-21.66	-8.74	-2.41
	No. Corpora Lutea	11.7	12.3	11.0	11.3	11.7
	No. Implantations	10.7	10.6	10.0	10.8	10.8
	Mean % Pre-implantation Loss	8.33	12.87	8.13	4.16	7.16
Litters	**No. Litters Evaluated**	19	19	21	21	23
	No. Live Fetuses	194	185	187	222	229
	Mean No. Resorptions	1.4	0.9	1.1	0.8	0.8
	No. of Liters with Dead Fetuses	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Mean % Post Implantation Loss	12.63	8.54	11.30	8.22	7.25
	Mean Fetal Body Weight (g)	39.36	38.83	38.42	37.79	39.45
	Fetal Sex Ratios (% live males)	51.37	47.66	47.50	37.31	52.24
	Fetal Anomalies					
	Gross External	-	-	-	-	-
	Visceral Anomalies	-	-	-	-	-
	Skeletal Anomalies	-	-	-	-	-
	Fetal Ossification Sites	-	-	-	-	-

Abbreviations: NA: not applicable, GD: gestation day, AUC: area under the curve, -: no noteworthy findings; No.: number

a Test Article Control: 20 mM sodium phosphate, 5% sucrose, 100 mM methionine, 0.1 mM EDTA in Sterile Water for Injection, USP at a pH of 6.5

b ADA positive animals/total number of animals

c Gestation period. Number listed is the number of animals affected.

d Animals that aborted and were euthanized before scheduled only.

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).

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

表 2.6.7.14 - Reproductive and Developmental Toxicity - Effects on Pre- and Postnatal Development, Including Maternal Function

Report Title: GZ402665 (Olipudase alfa): An Intravenous Pre-/Postnatal Developmental Toxicity Study in Mice, Including a Postnatal Behavioral/Functional Evaluation		
Species/Strain: Mouse (Crl:CD1(ICR)	**Duration of Dosing:** GD6 to LD19	**Test Article (Batch):** Olipudase alfa ([redacted])
Initial Age: 69 Days	**Day of Mating:** GD0	**Study No.:** [DPN0380]
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** IV (GZ402665) or IP (Saline and DPH)	**Location:** 4.2.3.5.3-1
Special Features: None	**Vehicle/Formulation:** 20 mmol/L sodium phosphate, 5% sucrose, 100 mmol/L methionine, 0.1 mmol/L EDTA at a pH of 6.5	
Litters Culled/Not Culled: Not culled	**Day of Necropsy:** LD 21 (or GD 23 for dams that did not deliver)	GLP Compliance: Yes
Design similar to ICH 4.1.2: Yes		
No Observed Adverse Effect Level: F0 Females: 30/20 mg/kg/dose **F1 Males:** 30/20 mg/kg/dose **F1 Litters:** 30/20 mg/kg/dose		

Daily Dose (mg/kg)	**0/0 (Control)**	**0/20 (Control/DPH)**	**3.16/20 (GZ402665/DPH)**	**10/20 (GZ402665/DPH)**	**30/20 (GZ402665/DPH)**
F0 Females:					
No. Pregnant	24	23	23	22	25
No. Died or Sacrificed Moribund [a]	1	0	5	0	2
No. Aborted or with Total Resorptions Of Litter	0	0	4	1	1
Clinical Observations (Gestation) [a]					
Decreased Motor Activity	0/0	0/0	5/4	1/1	2/2
Clinical Observations (Lactation) [a]					
Increased motor activity	0/0	3/2	0/0	1/1	2/2
Decreased motor activity	0/0	0/0	1/1	0/0	2/2
Pale Extremities	0/0	0/0	0/0	0/0	2/2
Hunched Posture	2/1	0/0	0/0	0/0	1/1
Cold to Touch	0/0	0/0	1/1	0/0	0/0

表 2.6.7.14 - Reproductive and Developmental Toxicity - Effects on Pre- and Postnatal Development, Including Maternal Function (continued)

Report Title: GZ402665 (Olipudase alfa): An Intravenous Pre-/Postnatal Developmental Toxicity Study in Mice, Including a Postnatal Behavioral/Functional Evaluation (continued)

Daily Dose (mg/kg)	0/0 (Control)	0/20 (Control/DPH)	3.16/20 (GZ402665/DPH)	10/20 (GZ402665/DPH)	30/20 (GZ402665/DPH)
Dehydration - Moderate	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1
Swollen – Whole Body	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1
Necropsy Observations	-	-	-	-	-
Body Weight					
Gestation Body Weight GD 18 (g)	58.4	55.8	51.9 *	55.6	56.8
Gestation Body Weight Change GD 10 to 12 (g)	4.4	4.1	4.3	4.8*	4.7 *
Gestation Body Weight Change GD 14 to 16 (g)	7.0	6.1 #	4.8	6.3	6.2
Gestation Body Weight Change GD 16 to 18 (g)	6.7	5.7 ##	3.1	5.1	5.8
Gestation Body Weight Change GD 6 to 18 (g)	27.2	24.4 #	21.0	24.1	25.4
Gestation Body Weight Change GD 0 to 18 (g)	30.8	28.5	24.6*	28.1	29.4
Lactation Body Weight LD 3 (g)	38.1	36.3 ##	36.4	36.8	36.8
Lactation Body Weight LD 4 (g)	39.4	37.6 ##	37.3	37.8	37.7
Lactation Body Weight LD 5 (g)	40.4	37.9 ##	37.3	38.5	38.0
Lactation Body Weight LD 6 (g)	41.5	39.5 #	38.9	39.9	39.5
Lactation Body Weight LD 7 (g)	42.2	39.6 ##	39.2	39.8	39.9
Lactation Body Weight LD 8 (g)	43.8	42.1 #	41.1	41.8	41.4
Lactation Body Weight LD 9 (g)	44.8	42.9 #	40.9	42.5	42.4
Lactation Body Weight LD 10 (g)	46.1	43.4 ##	42.3	44.0	42.8
Lactation Body Weight LD 11 (g)	45.7	43.5 #	42.3	43.7	43.5
Lactation Body Weight LD 12 (g)	47.0	44.2 ##	43.1	44.5	44.0
Lactation Body Weight LD 13 (g)	46.9	44.4 #	42.7	45.0	45.0
Lactation Body Weight LD 14 (g)	46.8	44.6 #	43.3	45.1	44.0
Lactation Body Weight LD 15 (g)	47.8	45.1 ##	43.3	45.3	44.6
Lactation Body Weight LD 16 (g)	48.0	45.7 #	44.8	45.7	44.1
Lactation Body Weight LD 17 (g)	47.8	45.4 #	44.0	45.2	43.9
Lactation Body Weight LD 18 (g)	47.0	44.5 #	43.6	45.3	44.8

表 2.6.7.14 - Reproductive and Developmental Toxicity - Effects on Pre- and Postnatal Development, Including Maternal Function (continued)

Report Title: GZ402665 (Olipudase alfa): An Intravenous Pre-/Postnatal Developmental Toxicity Study in Mice, Including a Postnatal Behavioral/Functional Evaluation (continued)

Daily Dose (mg/kg)	0/0 (Control)	0/20 (Control/DPH)	3.16/20 (GZ402665/DPH)	10/20 (GZ402665/DPH)	30/20 (GZ402665/DPH)
Lactation Body Weight Change LD 18 to 21 (g)	-4.9	-2.4 ##	-2.6	-3.3	-3.8
Lactation Body Weight Change LD 1 to 21 (g)	6.7	7.7	6.6	7.4	6.7
Mean Duration of Gestation (days)	19.6	19.8	19.8	19.8	19.7
F1 Litters (Preweaning):					
No. Litters Evaluated	24	23	17	21	25
Mean No. of Implantations	14.1	12.9	14.5	13.4	13.4
Dams with No Liveborn Pups	0	0	1	0	0
Gestation Index (%)	100.0	100.0	85.0	100.0	100.0
No. Dams with All Pups Dying: LDs 1 to 4	0	0	1	0	0
No. Dams with All Pups Dying: LDs 5 to 21	1	0	1	0	2
Mean No. Liveborn Pups/Litter	13.1	11.2	8.6	11.0	12.0
No. Liveborn Pups	314	257	146	231	301
Mean No. of Stillborn Pups/Litter	0.0	0.0	0.2	0.2	0.3
No. Stillborn Pups	0	1	4	4	7
Unknown Vital Status	0	0	1	0	0

表 2.6.7.14 - Reproductive and Developmental Toxicity - Effects on Pre- and Postnatal Development, Including Maternal Function (continued)

Report Title: GZ402665 (Olipudase alfa): An Intravenous Pre-/Postnatal Developmental Toxicity Study in Mice, Including a Postnatal Behavioral/Functional Evaluation (continued)

Daily Dose (mg/kg)	0/0 (Control)	0/20 (Control/DPH)	3.16/20 (GZ402665/DPH)	10/20 (GZ402665/DPH)	30/20 (GZ402665/DPH)
No. Pups Found Dead or Presumed Cannibalized					
LD 1	0/314	4/257	2/146	2/231	1/301
LDs 2 to 4	2/314	4/253	1/133	1/229	10/300
LDs 5 to 7	0/312	2/249	0/132	0/228	12/290 *
LDs 8 to 10	1/312	1/247	1/132	1/228	6/278
LDs 11 to 14	14/311	1/246 ##	1/131	0/227	10/272 *
LDs 15 to 18	0/297	1/245	8/130 **	0/227	7/256
LDs 19 to 21	1/297	0/244	6/122 **	1/227	0/249
Viability Index (%) [b]	99.4	96.9	97.8	98.7	96.3
Lactation Index (%) [c]	94.9	98.0	87.9 **	99.1	87.7 **
Mean No. Surviving Pups Per Litter					
LD 1	13.1	11.2 #	8.6	11.0	12.0
LD 4	13.0	10.8 ##	9.4	10.8	11.6
LD 7	13.0	10.7 ##	9.4	10.8	11.1
LD 10	13.0	10.7 ##	9.4	10.8	10.9
LD 14	12.4	10.6 ##	9.3	10.8	10.5
LD 18	12.4	10.6 ##	8.7	10.8	10.4
LD 21	12.3	10.6 ##	8.3	10.8	10.4
Pup Sex Ratios (% males)					
LD 1	47.4	54.3	49.1	47.3	54.1
LD 4	47.4	55.2	56.8	47.8	54.8
LD 7	47.4	54.8	56.8	47.8	55.7
LD 10	47.6	55.0	56.6	47.7	56.5
LD 14	47.2	55.1	56.9	47.7	56.3
LD 18	47.2	55.0	55.9	47.7	56.8
LD 21	47.0	55.0	56.4	47.7	56.8

表 2.6.7.14 - Reproductive and Developmental Toxicity - Effects on Pre- and Postnatal Development, Including Maternal Function (continued)

Report Title: GZ402665 (Olipudase alfa): An Intravenous Pre-/Postnatal Developmental Toxicity Study in Mice, Including a Postnatal Behavioral/Functional Evaluation (continued)

Daily Dose (mg/kg)	0/0 (Control)	0/20 (Control/DPH)	3.16/20 (GZ402665/DPH)	10/20 (GZ402665/DPH)	30/20 (GZ402665/DPH)
Mean Live Litter Size at Weighing					
LD 1	13.0	11.0##	9.0	10.9	12.0
LD 4	13.0	10.8##	10.1	10.8	11.6
LD 7	13.0	10.7##	10.2	10.8	11.6
LD 10	13.0	10.7##	10.1	10.8	11.3
LD 14	12.9	10.6##	10.0	10.8	11.4
LD 18	12.9	10.6##	9.5	10.8	11.3
LD 21	12.9	10.6##	9.7	10.8	11.3
Mean Pup Weight/Litter (grams)					
LD 1	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
LD 4	2.6	2.7	2.7	2.6	2.6
LD 7	3.8	4.0	4.1	4.0	3.8
LD 10	5.0	5.0	5.2	5.1	4.9
LD 14	6.0	5.9	6.1	6.2	5.9
LD 18	6.8	6.8	7.3	7.3	7.0
LD 21	8.8	8.9	9.9	9.4	9.3
Pup Clinical Observations	-	-	-	-	-
Pup Necropsy Observations					
No milk in stomach	0	1	13	1	31

表 2.6.7.14 - Reproductive and Developmental Toxicity - Effects on Pre- and Postnatal Development, Including Maternal Function (continued)

Report Title: GZ402665 (Olipudase alfa): An Intravenous Pre-/Postnatal Developmental Toxicity Study in Mice, Including a Postnatal Behavioral/Functional Evaluation (continued)

Daily Dose (mg/kg)	0/0 (Control)	0/20 (Control/DPH)	3.16/20 (GZ402665/DPH)	10/20 (GZ402665/DPH)	30/20 (GZ402665/DPH)
F1 Males (Postweaning): No. Evaluated	25	25	25	25	25
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	3	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-	-
Necropsy Observations	-	-	-	-	-
Mean Body Weight Day 85 (g)	37.1	36.9	38.9*	38.0	36.6
Mean Body Weight Day 92 (g)	37.2	36.9	38.9*	38.2	36.7
Mean Body Weight Day 99 (g)	36.4	36.4	38.5*	38.1	36.4
Mean Body Weight Day 113 (g)	37.8	37.6	39.2	39.1	37.3
Mean Body Weight Change Day 43 to 50 (g)	2.0	1.5 ##	1.4	1.5	1.5
Mean Body Weight Change Day 22 to 113 (g)	27.5	27.3	28.0	27.9	26.7
Mean Food Consumption Day 71 to 78 (g/day)	5.4	5.1	5.8 **	5.9 **	5.1
Mean Food Consumption Day 78 to 85 (g/day)	5.2	4.9	6.0 *	5.4 *	4.8
Mean Food Consumption Day 29 to 92 (g/day)	5.7	5.6	5.9	6.0 **	5.6
Mean Age of Preputial Separation (days)	27.8	27.8	28.3	28.4	27.9
Morris Water Maze	-	-	-	-	-
Motor Activity	-	-	-	-	-
Acoustic Startle	-	-	-	-	-
Mean No. Days Prior to Mating	3.1	2.8	3.3	2.3	2.4
No. of Males that Mated	22	23	23	25	24
No. of Fertile Males	22	21	22	23	24
Terminal Body Weights	39.1	39.6	41.3	40.8	38.9
Organ Weights	-	-	-	-	-

表 2.6.7.14 - Reproductive and Developmental Toxicity - Effects on Pre- and Postnatal Development, Including Maternal Function (continued)

Report Title: GZ402665 (Olipudase alfa): An Intravenous Pre-/Postnatal Developmental Toxicity Study in Mice, Including a Postnatal Behavioral/Functional Evaluation (continued)

Daily Dose (mg/kg)	0/0 (Control)	0/20 (Control/DPH)	3.16/20 (GZ402665/DPH)	10/20 (GZ402665/DPH)	30/20 (GZ402665/DPH)
F1 Females (Postweaning): No. Evaluated	25	25	25	25	25
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-	-
Necropsy Observations	-	-	-	-	-
Premating Body Weight Day 92 (g)	29.8	30.3	31.0	30.6	29.8
Premating Body Weight Change Days 22 to 92 (g)	19.4	20.9	20.6	19.6	19.8
Gestation Body Weight GD 14 (g)	47.8	48.5	49.4	49.5	47.2
Gestation Body Weight Change GD 0 to 14 (g)	18.0	18.0	18.3	19.0	17.4
Mean Age of Vaginal Patency (days)	26.9	26.5	27.4	25.8	26.3
Passive Avoidance	-	-	-	-	-
Motor Activity	-	-	-	-	-
Acoustic Startle	-	-	-	-	-
Mean No. Days Prior to Mating	3.9	3.0	3.1	2.3	2.5
No. of Pregnant Females	23	23	23	23	25
Mean No. Corpora Lutea	15.6	15.2	15.8	16.6	14.7
Mean No. Implantations	14.8	14.5	14.9	15.7	14.1
Mean % Preimplantation Loss	5.2	5.5	5.8	5.4	3.4
Ratio (Organ Weights to Terminal Body Weights)	-	-	-	-	-

表 2.6.7.14 - Reproductive and Developmental Toxicity - Effects on Pre- and Postnatal Development, Including Maternal Function (continued)

Report Title: GZ402665 (Olipudase alfa): An Intravenous Pre-/Postnatal Developmental Toxicity Study in Mice, Including a Postnatal Behavioral/Functional Evaluation (continued)

Daily Dose (mg/kg)	0/0 (Control)	0/20 (Control/DPH)	3.16/20 (GZ402665/DPH)	10/20 (GZ402665/DPH)	30/20 (GZ402665/DPH)
F1 Litters:					
Mean No. Live Conceptuses/Litter	13.4	12.7	13.0	14.1	12.7
Mean No. Nonviable Conceptuses/Litter	1.4	1.8	1.9	1.6	1.4
No. of Litters with Nonviable Conceptuses	15	18	13	15	15
No. Nonviable Conceptuses	32	42	43	36	34
Dams with all Nonviable Conceptuses	0	1	0	0	0
Mean % Postimplantation Loss	9.6	15.8	12.2	9.6	9.3

Conclusion: In conclusion, the maternal no-observable-adverse-effect level (NOAEL) for olipudase alfa was 30/20 mg/kg/dose. The NOAEL for reproduction in the dams and for viability and growth in the offspring was 30/20 mg/kg/dose. The mortality that occurred in all olipudase alfa groups was considered due to hypersensitivity from olipudase alfa administration. There were no effects on maternal (F1) reproductive function. There were no toxicologically important differences in any developmental and reproductive parameters evaluated in the F1 generation male and female offspring.

Abbreviations: -: No noteworthy findings; GD: Gestation day; LD: Lactation Day; DPH: Diphenhydramine Hydrochloride

* Significantly different from the Group 2 value (p≤0.05)

** Significantly different from the Group 2 value (p<0.01)

Significantly different from the Group 1 value (p≤0.05)

Significantly different from the Group 1 value (p≤0.01)

a The mortality and clinical observations that occurred in all Olipudase alfa groups was considered due to hypersensitivity from olipudase alfa administration.

b Number of live pups on Day 4 postpartum/number of liveborn pups on Day 1 postpartum

c Number of live pups on Day 21 (weaning) postpartum/number of live pups on Day 4 postpartum

15　新生児を用いた試験

該当なし。

16　局所刺激性試験

該当なし。

17　その他の毒性試験

表 2.6.7.17 - Other Toxicity Studies

Test Article: Olipudase alfa

Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Human whole blood	In Vitro	Not applicable	1.1 mg/mL	Not applicable	Under the conditions of administration of this assay, Acid Spingomyelinase (ASM) at a concentration of 1.1 mg/mL and ASM buffer gave no hemolysis response and therefore considered negative for hemolytic activity.	[[redacted]009]	4.2.3.7.7-1
Mouse (ASMKO)	IV (bolus)	Single dose	20	7F	Lot [redacted] produced similar toxicity as Lot [redacted] based on the findings of mild to severe lethargy 15, 17 and 22 hours post-dose as well as gross pathology findings at necropsy (enlarged/swollen, red adrenal glands)	[[redacted]-0372Pnp]	4.2.3.1-21
Mouse (ASMKO)	IV (bolus)	Single dose	3, 10 [a]	4M / 4F	Under the conditions of this study, following a single intravenous dose, the toxicity profiles at 3 mg/kg and mortality at 3 and 10 mg/kg are similar for rhASM Lot [redacted] with <10% (8.3%) HMWS and rhASM Lot [redacted] with >10% (11.0%) HMWS.	[[redacted]-02784]	4.2.3.1-22

Abbreviations: ASM : Acid Sphingomyelinase, HMWS: High Molecular Weight Species

a Two different lots of olipudase alfa (Lot [redacted] with <10% (8.3%) HMWS and Lot [redacted] with >10% (11.0%) HMWS).