TABLE OF CONTENTS

LIST OF TABLES 2
LIST OF FIGURES 2
本項で使用する用語・略語 3
1. 非臨床試験計画概略 4
2. 薬理試験 5
2.1. 効力を裏付ける試験 5
2.1.1. 細胞表面抗原に対する親和性 5
2.1.2. 免疫抑制作用 6
2.1.3. 再生不良性貧血 9
2.2. 副次的薬理試験 11
2.3. 安全性薬理試験 11
2.4. 薬力学的薬物相互作用 12
3. 薬物動態試験 12
3.1. 分析法 12
3.2. 吸収 12
3.3. 分布 12
3.3.1. サルを用いた hATG の単回静脈内投与後の乳汁中分泌試験 12
3.4. 代謝 14
3.5. 排泄 14
3.6. 薬物動態学的薬物相互作用 14
3.7. トキシコキネティクス 14
4. 毒性試験 18
4.1. 単回投与毒性 18
4.2. 反復投与毒性 18
4.2.1. サルを用いた用量漸増によるロットリリース試験 18
4.2.2. サルを用いた 14 日間静脈内投与毒性試験（28 日間回復性試験を含む）（GLP 適用） 19
4.3. 遺伝毒性試験（GLP 適用試験） 20
4.4. がん原性 20
4.5. 生殖発生毒性 21
4.5.1. 雄性サルを用いた受胎能試験（GLP 適用試験） 21

4.5.2. 雌性サルを用いた受胎能試験（GLP 適用試験）.....21
4.5.3. ラットを用いた探索的胚・胎児発生毒性試験.....22
4.5.4. サルを用いた胚・胎児発生毒性試験（用量設定）（GLP 適用試験）.....22
4.5.5. サルを用いた胚・胎児発生毒性試験（GLP 適用試験）.....22
4.5.6. 出生前および出生後の発生に関する試験.....23
4.6. 局所刺激性試験.....23
4.7. その他の毒性試験.....24
4.7.1. 免疫毒性試験.....24
4.7.2. *不純物B.....24
4.7.3. hATG の交差反応性試験.....24
5. 総括及び結論.....25
6. 参考文献.....26

LIST OF TABLES

Table 1. hATG による各種モノクローナル抗体の T 細胞表面抗原に対する結合阻害能.....5
Table 2. 末梢血単核リンパ球の hATG による補体依存性細胞毒性.....7
Table 3. hATG による補体依存性および補体非依存性細胞毒性.....7
Table 4. hATG を授乳期サルに単回静脈内投与した時の薬物動態パラメータ.....13
Table 5. サル 14 日間静脈内投与毒性試験における試験 1 日の AUC_{24}.....16

LIST OF FIGURES

Figure 1. T 細胞表面抗原に対する hATG の結合.....6
Figure 2. 再生不良性貧血患者由来の活性化 PBMC からの IL-2 とインターフェロン(IFN)の産生.....8
Figure 3. hATG 刺激による健康被験者由来の PBMC のアポトーシス増加.....9
Figure 4. 健康被験者由来 PBMC および再生不良性貧血患者由来 PBMC を hATG により 72 時間刺激した後の細胞増殖.....10
Figure 5. hATG および正常ウマガンマグロブリン（hIgG）による骨髄赤血球前駆細胞の in vitro 増殖に及ぼす作用.....11
Figure 6. hATG を授乳期サルに単回静脈内投与した時の hATG 血中濃度推移.....13
Figure 7. サル 14 日間静脈内投与毒性試験における試験 1 日の血清中 hATG 濃度推移.....15
Figure 8. サル 14 日間静脈内投与毒性試験における投与直前の血清中 hATG 濃度推移.....17

＊新薬承認情報提供時に置き換え

本項で使用する用語・略語

用語・略号	省略していない表現または定義
ADA	Anti drug antibody：抗薬物抗体
Anti-Leu	Anti-Leucocyte antigens：抗白血球抗原抗体
AUC_{24}	Area under the plasma concentration-time curve from zero to infinity： 0 時間から投与後 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
AUC_{inf}	Area under the plasma concentration-time curve from time 0 to infinite time： ゼロから無限時間まで外挿した血漿中濃度－時間曲線下面積
BFU-E	Burst-forming units-erythroid：赤芽球バースト形成細胞
CD	Cluster of differentiation：分化抗原群，表面抗原
CFU-E	Colony-forming units-erythroid：赤芽球コロニー形成細胞
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay：酵素免疫測定法
GLP	Good Laboratory Practice：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor：顆粒球単球コロニー刺激因子
hATG	Lymphocyte immune globulin, anti-thymocyte globulin (equine) : 抗ヒト胸腺細胞ウマ免疫グロブリン
hIgG	Equine immunoglobulin G：ウマ免疫グロブリン G
HLA-DR	Human leukocyte antigen-DR isotype：ヒト白血球抗原 DR 型
IC_{50}	50% inhibitive concentration：50%阻害濃度
ICH	International Conference for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use：医薬品規制調和国際会議
IFN	Interferon：インターフェロン
IgG	Immunoglobulin G：免疫グロブリン G
IL	Interleukin：インターロイキン
NOAEL	No-observed-adverse-effect level：無毒性量
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell：末梢血単核細胞
$t_{½}$	Terminal phase half-life：消失半減期
TNF	Tumor necrosis factor：腫瘍壊死因子
TTC	Threshold of toxicologic concern：毒性学的懸念の閾値

1. 非臨床試験計画概略

抗ヒト胸腺細胞ウマ免疫グロブリン（以下，hATG）は，旧米国アップジョン社（現ファイザー社）により開発された免疫抑制剤で，米国では 1981 年に承認され，再生不良性貧血および腎移植拒絶反応の治療に用いられている。hATG はヒト胸腺リンパ球で免疫されたウマの過免疫血清を精製，濃縮，滅菌して得られた主に単量体免疫グロブリン G（IgG）からなるガンマグロブリンである。

hATG は限られた非臨床データにより 1981 年に米国で承認された。当初，薬理および薬物動態試験は実施されなかった。毒性試験は薬剤の各ロットの安全性を保証するためのマウス，ラットおよびモルモットでの単回投与試験ならびにサル反復投与試験で構成された。これらの試験における投与量は体表面積で標準化した最大ヒト投与量の 3 倍以上であった。後に追加の非臨床試験が実施された。hATG の薬力学的評価は公表論文に基づいて行った。hATG は霊長類のリンパ球と最も高い交差反応性を示した（M2.4.4.7.3）ことから，安全性評価のための非げっ歯類としてサルを選択した。非臨床薬物動態試験では，hATG を授乳期の雌性カニクイザルに単回静脈内投与した際の曝露量および乳汁中排泄（M2.4.3.3.1）ならびにサルを用いた 14 日間静脈内投与毒性試験（28 日間回復性試験を含む）（M2.4.4.2.2）におけるトキシコキネティクスおよび抗薬物抗体（ADA）生成を評価した。非臨床安全性試験は，サルを用いた 14 日間静脈内投与毒性試験（28 日間回復性試験を含む）（M2.4.4.2.2），遺伝毒性試験（M2.4.4.3），サルを用いた受胎能試験（M2.4.4.5.1 および M2.4.4.5.2）ならびにラット（M2.4.4.5.3）およびサルを用いた胚・胎児発生毒性試験（M2.4.4.5.5）が実施された。生殖発生毒性試験の結果から，妊娠したサルに hATG（40 mg/kg/日）を投与しても出生後の発達に及ぼす影響を評価するために十分な出生児数が得らないと考えられたことから，hATG の出生前および出生後の発生に関する毒性試験は実施しなかった。重要な反復投与毒性試験および生殖発生毒性試験は，臨床経路と同じ静脈内投与で行われた。サルを用いた 14 日間静脈内投与毒性試験および生殖発生毒性試験は FDA および厚生労働省の GLP に従って実施された。

hATG の非臨床試験は，現在の規制「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 S6(R1)ガイドライン］[1]の施行前に実施されているが，試験結果から hATG の毒性プロファイルが特定され，ヒトへの注意喚起に必要な情報は得られていると考える。これらの非臨床試験は，広範囲の臨床試験とともに，米国で承認された適応症における hATG の使用を十分に支持するものであった。これらの適応症において数十年もの間，hATG がヒトで使用された経験に基づき，追加の非臨床試験によって hATG 使用と関連する現在までのリスクに関する理解が変化する可能性は低いと考えられた。

以上，非臨床試験における有用な結果は，広範囲の臨床での使用経験とともに，中程度から重篤な再生不良性貧血における hATG の有用性を十分に支持していると考えられた。

2. 薬理試験

2.1. 効力を裏付ける試験

2.1.1. 細胞表面抗原に対する親和性

hATG を用いた非臨床薬理試験は社内で実施していないが，hATG の薬理学的特性を評価するためにヒト血液細胞および骨髄細胞を用いて実施した複数の in vitro 試験結果が報告されている（M2.6.3.1 および M2.6.3.2）。これらの公表文献において， T 細胞表面抗原に対する hATG の特異的な結合能が評価されている[2,3,4]。そのうちの 1 つの試験では，ヒト末梢血単核細胞（PBMC）の各種 T 細胞表面抗原に対する蛍光標識したそれぞれのモノクローナル抗体の結合能について，hATG とプレインキュベートして評価した[2]。その結果，プレインキュベーション時の hATG の添加濃度に依存してモノクローナル抗体の T 細胞表面抗原への結合が阻害された（Table 1）。

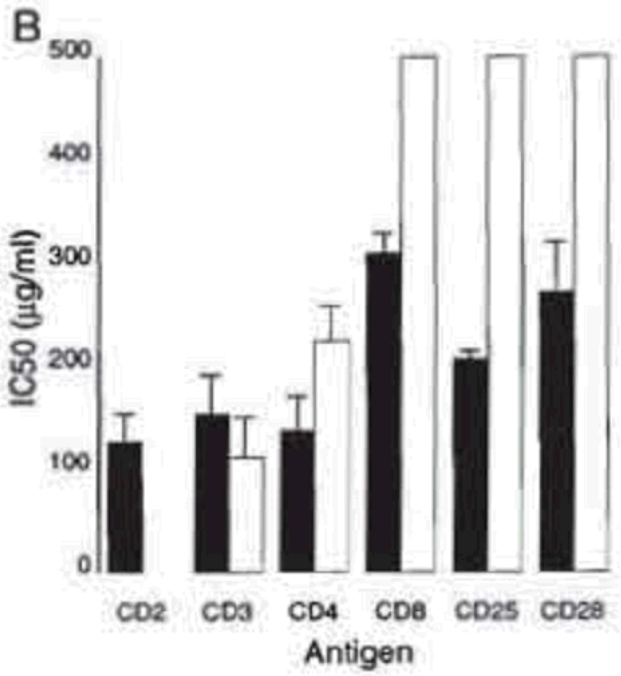
Table 1.　hATG による各種モノクローナル抗体の T 細胞表面抗原に対する結合阻害能

フルオレセイン標識モノクローナル抗体	表面抗原	IC_{50} 値（mg/mL）[a]
Anti-Leu 1（汎 T 細胞抗原）	CD5	5.8 ± 1.1
Anti-Leu 2a（制御性/細胞傷害性 T 細胞）	CD8	0.83 ± 0.34
Anti-Leu 3a（ヘルパーT 細胞）	CD4	1.6 ± 0.7
Anti-Leu 4（T 細胞受容体関連抗原）	CD3	3.8 ± 1.5
Anti-Leu 5b（E ロゼット受容体）	CD2	0.24 ± 0.06
Anti-Leu 7（大型顆粒リンパ球/ナチュラルキラー細胞）	CD57	>50[b]
Anti-HLA-DR（活性化 T 細胞）	DR	104 ± 77
Anti-IL2 受容体	CD25	>50[b]

Raefsky et al, 1986[2]
a. 蛍光標識モノクローナル抗体の蛍光強度が 50%減少したときの hATG 濃度を平均値±標準偏差（N=2～6）で示す。
b. hATG の最高濃度（50 mg/mL）における結合阻害は 10%以下であった。

健康被験者から採取した T 細胞上に発現する表面抗原に対する hATG の結合能をフローサイトメトリー法により評価[3]した。hATG は CD2，CD3，CD4，CD8，CD25 および CD28 に結合することが示された（Figure 1）。また，hATG とコンカナバリン A で刺激した T 細胞における表面抗原との結合能を評価したところ，CD8，CD25 および CD28 への結合活性は弱く，この検討結果は hATG の免疫原が刺激を与えていないヒト胸腺細胞であることを支持するものであった。一方，CD3 および CD4 への結合は，コンカナバリン A の刺激に関係なく同様の IC_{50} 値を示した（Figure 1）ことから，部分的な T 細胞活性化の可能性が示唆された。さらに，T 細胞特異的表面抗原への結合能に加えて，hATG は T 細胞および B 細胞の両方に発現する表面抗原である CD11a，CD18 および CD45 にも結合することが報告されている[4]。

Figure 1.　T 細胞表面抗原に対する hATG の結合



hATG がコンカナバリン A で刺激されていない T 細胞（■）またはコンカナバリン A で刺激した T 細胞（□）における表面抗原と結合することにより，各表面抗原に対応する蛍光強度が 50%減少したときの hATG 濃度（IC_{50} 値）を平均値±標準偏差（N＝4）で示す。なお，コンカナバリン A で刺激した T 細胞の CD8，CD25 および CD28 に対する IC_{50} 値は 500 µg/mL 超（検討した hATG の最高濃度）であり，標準偏差を示すことはできなかった（Merion, et al. 1998[3]）。

2.1.2. 免疫抑制作用

hATG による免疫抑制の機序は完全には明らかになっていないが，公表文献などによれば，hATG は血中の T 細胞に最も強く作用し，速やかかつ可逆的にリンパ球を減少させることが示唆されている[5,6]。

hATG によるリンパ球減少にはいくつかの機序が関与することが示唆されている。In vitro での補体依存性細胞傷害アッセイにおいて，hATG は ^{51}Cr 標識リンパ球の溶解を誘発した[2,7,8]。そのうちの 1 つの試験では，モルモットの補体存在下において，hATG と健康被験者由来の末梢血単核リンパ球をインキュベートしたところ，濃度依存的な細胞溶解が認められた（Table 2）。

Table 2.　末梢血単核リンパ球の hATG による補体依存性細胞毒性

hATG 希釈率	細胞溶解（%）[a]
対照（補体のみ）	12.8 ± 0.8
1:320	23.0 ± 3.0
1:160	22.4 ± 1.2
1:80	32.8 ± 2.6
1:40	42.8 ± 2.4
1:20	68.2 ± 4.6
1:10	67.5 ± 5.6

Fisher et al, 1982[7]
a. 5% Triton X-100 添加時の最大 ^{51}Cr 放出量を 100%としたときの ^{51}Cr 放出量（%）を平均値±標準誤差（N=6）で示した。

また，Greco らの報告[8]では，T 細胞，非 T 細胞，血小板および顆粒球をモルモット補体，ウサギ血清またはヒト血清存在下でインキュベートしたところ，上述の報告[7]に類似した結果が得られた。hATG は検討したすべての血球に結合したが，特に T 細胞に対して最も高い細胞毒性を示した（Table 3）。補体非存在下においても，高濃度の hATG により細胞溶解が認められた。また，ウサギまたはヒトの補体の存在下において，種々のロットの hATG は濃縮したヒト T 細胞を濃度依存的に溶解した[2]。

Table 3.　hATG による補体依存性および補体非依存性細胞毒性

	N 数	hATG 希釈率[a]	細胞溶解（%）[b]
補体存在下			
総単核細胞	4	1:4	50 ± 3
T細胞	3	1:20	79 ± 9
非T細胞	3	1:40	54 ± 15
血小板	3	1:10	51 ± 1 0
顆粒球	4	1:4	8 ± 3
対照（補体のみ）	4	-	<3
補体非存在下			
総単核細胞	4	1:10	20 ± 6
T細胞	3	1:10	57 ± 1 9
非T細胞	3	1:20	31 ± 1 6
血小板	3	1:40	22 ± 4
顆粒球	4	1:2	3 ± 2

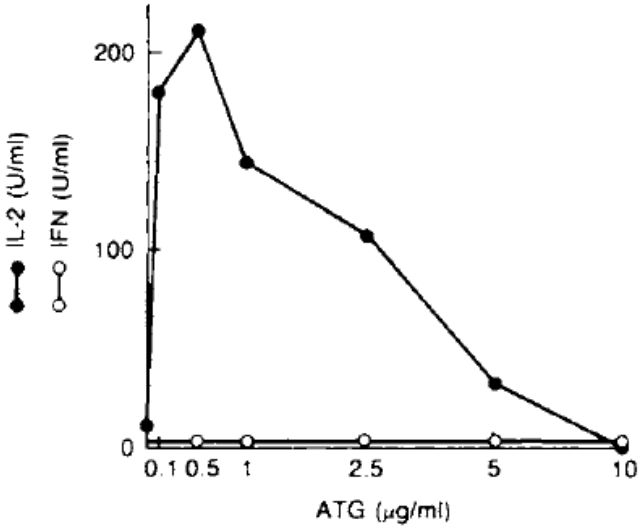
Greco et al, 1983[8]
a.　希釈前 hATG 濃度：50 mg/mL
b. 0.1% Triton X-100 添加時の最大 ^{51}Cr 放出量を 100%としたときの ^{51}Cr 放出量（%）を平均値±標準誤差で示した。

公表文献では, hATG による PBMC のリンホカインおよび造血刺激因子の産生も報告されている。

In vitro で健康被験者または再生不良性貧血患者由来の PBMC を一定の濃度範囲の hATG で処理したところ，インターロイキン（IL）-2，顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）および IL-3 の産生がみられたことから，hATG によりリンパ球が活性化されることが明らかになった[9,10]。Gascon らは再生不良性貧血患者由来の PBMC が hATG の濃度範囲 0.1～5 µg/mL にお

いて刺激され，PBMC からの IL-2 産生が顕著に増加することを示した（Figure 2）[9]。hATG で処理したすべての被験者由来の PBMC で活性化が認められたわけではなかったものの，概して健康被験者由来 PBMC に比べて再生不良性貧血患者由来 PBMC でより多くの活性化が認められた。

Figure 2.　再生不良性貧血患者由来の活性化 PBMC からの IL-2 とインターフェロン(IFN)の産生



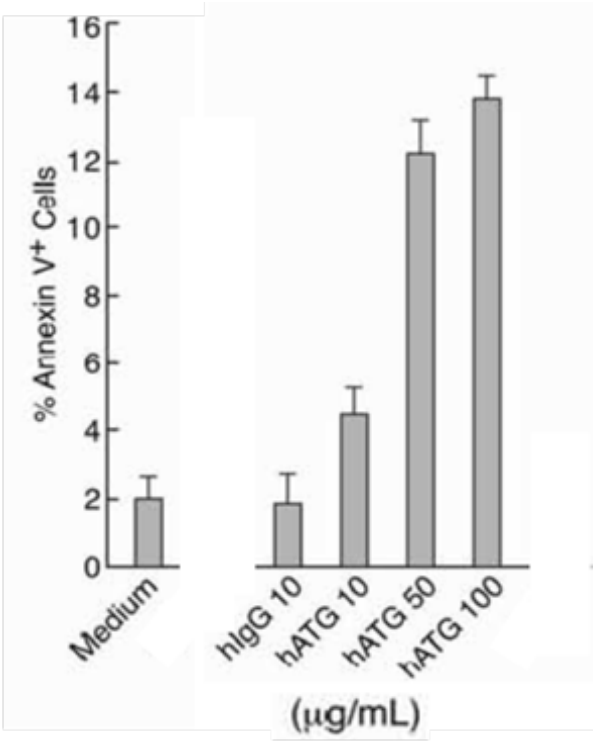
再生不良性患者由来の PBMC を hATG で刺激した際の IL-2（●）およびインターフェロン（○）の産生量を示す（Gascon et al, 1985[9]）。

さらに，公表文献では，hATG によるリンパ球減少の一因として活性化誘導アポトーシスの関与が示唆されている。

健康被験者由来の PBMC を 50 µg/mL または 100 µg/mL の hATG と 24 時間インキュベートとしたところ，溶媒対照またはウマ IgG と比較してアポトーシスが増加した（Figure 3）[11]。

市販のウマ抗胸腺細胞グロブリン製剤を用いた in vitro 試験においても，活性化 PBMC のアポトーシスが認められた[12]。

Figure 3.　hATG 刺激による健康被験者由来の PBMC のアポトーシス増加



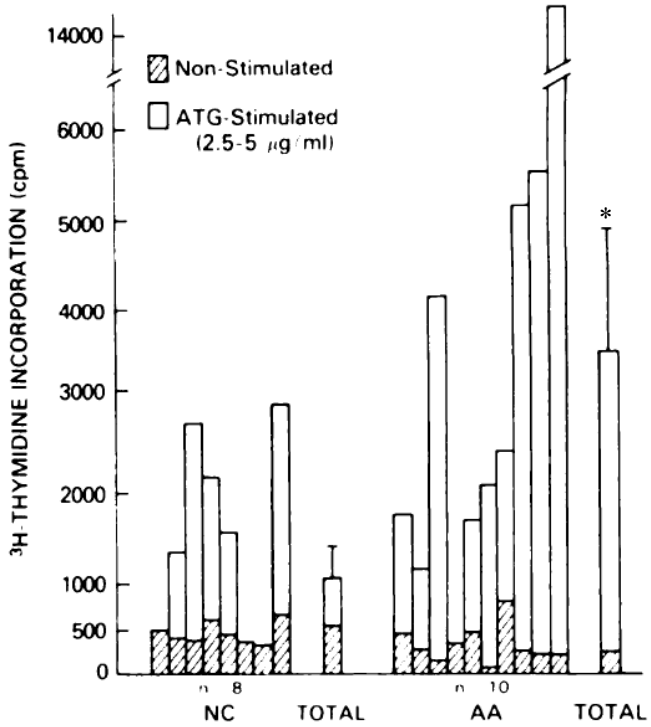
健康被験者由来の PBMC をウマ IgG または hATG で 24 時間刺激した際のアポトーシスを評価した。アポトーシスは annexin V 陽性細胞を指標として評価した。平均値±標準誤差（N = 3）（Feng et al, 2008[11] より改変）。

2.1.3. 再生不良性貧血

再生不良性貧血の多くは，免疫関連の異常に起因したものと考えられている[13]。Th1 細胞の産生するサイトカイン，特にインターフェロン（INF）-γおよび腫瘍壊死因子（TNF）-αにより活性化された細胞傷害性 T 細胞が骨髄造血幹細胞および前駆細胞を破壊するために，骨髄細胞が減少すると考えられている。再生不良性貧血の治療における hATG の作用機序は，前述の免疫抑制作用が大きく関与していると考えられ，主にエフェクター細胞傷害性 T 細胞に対する作用と考えられる。

hATG は in vitro で造血幹細胞の増殖を直接刺激することも示唆されている[2,9,14]。hATG 刺激に対して再生不良性貧血患者由来の PBMC の感受性が高いことも，hATG の作用機序の一つである可能性がある。健康被験者由来および再生不良性貧血患者由来の PBMC を in vitro で hATG 2.5 µg/mL または 5 µg/mL と 72 時間インキュベートしたところ，[^{3}H]チミジン取り込みが増加し，細胞増殖が亢進した。その際，健康被験者由来の PBMC と比較して再生不良性貧血患者由来の PBMC で，より高い増殖能が認められた（Figure 4）[9]。

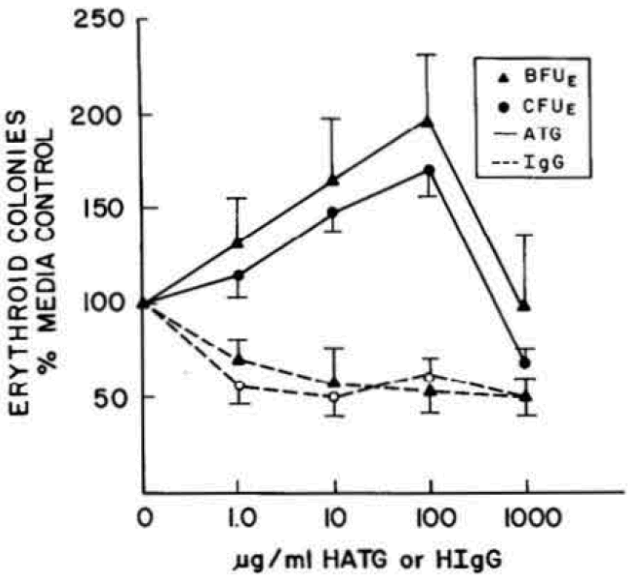
Figure 4.　健康被験者由来 PBMC および再生不良性貧血患者由来 PBMC を hATG により 72 時間刺激した後の細胞増殖



健康被験者由来 PBMC（NC）のチミジン取り込み細胞計数率（N=8）および再生不良性貧血患者由来 PBMC（AA）のチミジン取り込み細胞計数率（N=10）。Total（合計）は平均±標準誤差を示す［*: NC と比較して有意差あり（$p<0.02$，t-検定）］（Gascon et al, 1985[9]）。

また，健康被験者の骨髄由来の赤血球前駆細胞［赤芽球コロニー形成細胞（CFU-E）および赤芽球バースト形成細胞（BFU-E）］を用い, in vitro で hATG と 7 日間（CFU-E）または 14 日間（BFU-E）インキュベートしたところ，PBMC を用いた検討と同様に細胞増殖が亢進した（Figure 5）[14]。

Figure 5.　hATG および正常ウマガンマグロブリン（hIgG）による骨髄赤血球前駆細胞の in vitro 増殖に及ぼす作用



平均値±標準偏差（N = 6）。▲は BFU-E を，●は CFU-E を示す。実線は hATG による処理を，破線はウマ IgG（非免疫対照物質）による処理を示す。縦軸は溶媒対照との比較（%）を示す（Mangan et al, 1986[14]）。

hATG は IL-3 や GM-CSF などの造血成長因子の放出を誘発することが知られている[10]。このような hATG の直接または間接的な刺激による活性は再生不良性貧血における作用機序の一つと考えられる。

2.2. 副次的薬理試験

hATG を用いた副次的薬理試験は実施していない。

2.3. 安全性薬理試験

hATG を用いた独立した安全性薬理試験は実施していない。hATG を最大 80 mg/kg/日投与したサルを用いた 14 日間静脈内投与毒性試験（28 日間回復性試験を含む）では，神経系に関連する一般状態の変化はみられず，また，心電図，心拍数，血圧および呼吸数にも投与に関連した変化は認められなかった（M2.4.4.2.2）。

2.4. 薬力学的薬物相互作用

hATG を用いた薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。しかしながら，hATG とよく併用される薬剤（主に他の免疫抑制剤）との間に生じる相互作用については，海外での長年にわたる臨床使用の間に十分評価されてきたものと考える。

3. 薬物動態試験

3.1. 分析法

サルを用いた 14 日間静脈内投与毒性試験（28 日間回復性試験を含む）（M2.4.4.2.2）におけるサル血清中の hATG 濃度の定量には，マイクロタイタープレート上に固相化したウサギ抗ウマ免疫グロブリン G（IgG）により hATG を補足し，西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ウサギ抗ウマ IgG を用いて検出するサンドイッチ法による酵素免疫測定法（ELISA）を用いた。

授乳期サルにおける hATG の静脈内投与後の乳汁中分泌試験（M2.4.3.3.1）におけるサル血清中または乳汁中の hATG 濃度の定量には，マイクロタイタープレート上に固相化したヤギ抗ウマ IgG により hATG を補足し，西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ヤギ抗ウマ IgG を用いて検出するサンドイッチ法による ELISA 法を用いた。

サルを用いた 14 日間静脈内投与毒性試験（28 日間回復性試験を含む）（M2.4.4.2.2）におけるサル血清中抗薬物抗体（ADA）の定量には，マイクロタイタープレート上に固相化した hATG により ADA を補足し，西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ヤギ抗サル IgG を用いて検出するサンドイッチ法による ELISA 法を用いた。

3.2. 吸収

hATG の非臨床における吸収試験は実施していない。hATG の投与経路は静脈内投与のみであり，100 %の吸収が想定される。

3.3. 分布

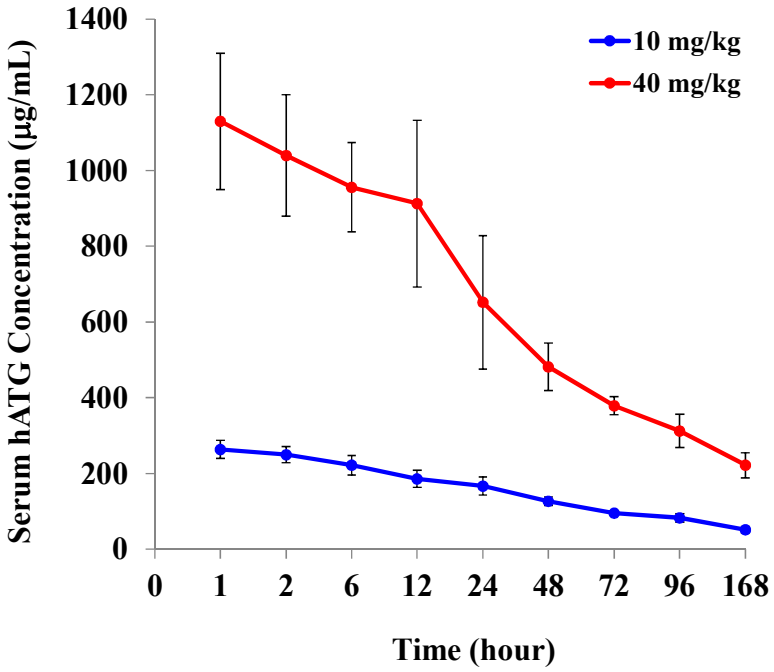
全身分布を検討した非臨床試験は実施していないが，細胞表面抗原への結合試験（M2.4.2.1.1）の結果から，hATG は広く体内に分布することが示唆されている。

3.3.1. サルを用いた hATG の単回静脈内投与後の乳汁中分泌試験

授乳期のカニクイザルにおける hATG の静脈内投与後の乳汁中への分布を評価した。授乳期サル（雌 4 匹/群）に hATG 10 mg/kg または 40 mg/kg をインフュージョンポンプを用いて単回静脈内投与した。投与前および投与後 168 時間まで血清および乳汁を採取し，サンプル中 hATG 濃度を測定した。Figure 6 に hATG の血中濃度時間推移および Table 4 に薬物動態パラメータを示した。hATG 濃度と時間 0 から無限時間までの曲線下面積（AUC_{inf}）は 10 mg/kg から 40 mg/kg の用量増加に比例して増加した。半減期（$t_{½}$），全身クリアランス（CL），定常状態分布容積（V_{ss}）は

いずれの用量においても同様であった。いずれのサンプリング時間においても，乳汁中の hATG 濃度は定量限界（10 µg/mL）未満であった。これらのことから，hATG は乳汁中へ分布してもごくわずかであることが示唆された。

Figure 6.　hATG を授乳期サルに単回静脈内投与した時の hATG 血中濃度推移



報告書番号 1470-[redacted]-028

平均値 ± 標準偏差（N=4）

Table 4.　hATGを授乳期サルに単回静脈内投与した時の薬物動態パラメータ

薬物動態パラメータ	用量 [a]	
	10 mg/kg	40 mg/kg
AUC_{inf} (mg•hr/mL)	25.4 ± 4.0	110 ± 16
$t_{½}$ (時間)	97.9 ± 16.5	115 ± 25
$t_{½}$ (日)	4.1 ± 0.68	4.8 ± 1.04
CL (mL/hr/kg)	0.401 ± 0.056	0.370 ± 0.054
V_{ss} (mL/kg)	53.1 ± 5.2	56.9 ± 11.6

報告書番号 1470-[redacted]-028

a: 平均値 ± 標準偏差（N = 4）

3.4. 代謝

「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」[1] の考え方に基づき，hATG を用いた代謝試験は実施していない。hATG の代謝は他の免疫グロブリンと同様であると推測される[15]。

3.5. 排泄

hATG を用いた排泄試験は実施していない。hATG は他の免疫グロブリンと同様に代謝，排泄されると考えられている [15,16]。

3.6. 薬物動態学的薬物相互作用

hATG を用いた薬物動態学的相互作用試験は実施していない。hATG はリンパ球表面の多様なタンパク質に結合する様々な抗体で構成される。抗体医薬品の主な消失経路は，タンパク質の分解異化および受容体を介した消失と考えられることから，他の治療薬との薬物動態学的相互作用の可能性は低いと考えられる（M2.5.5.7.3）。

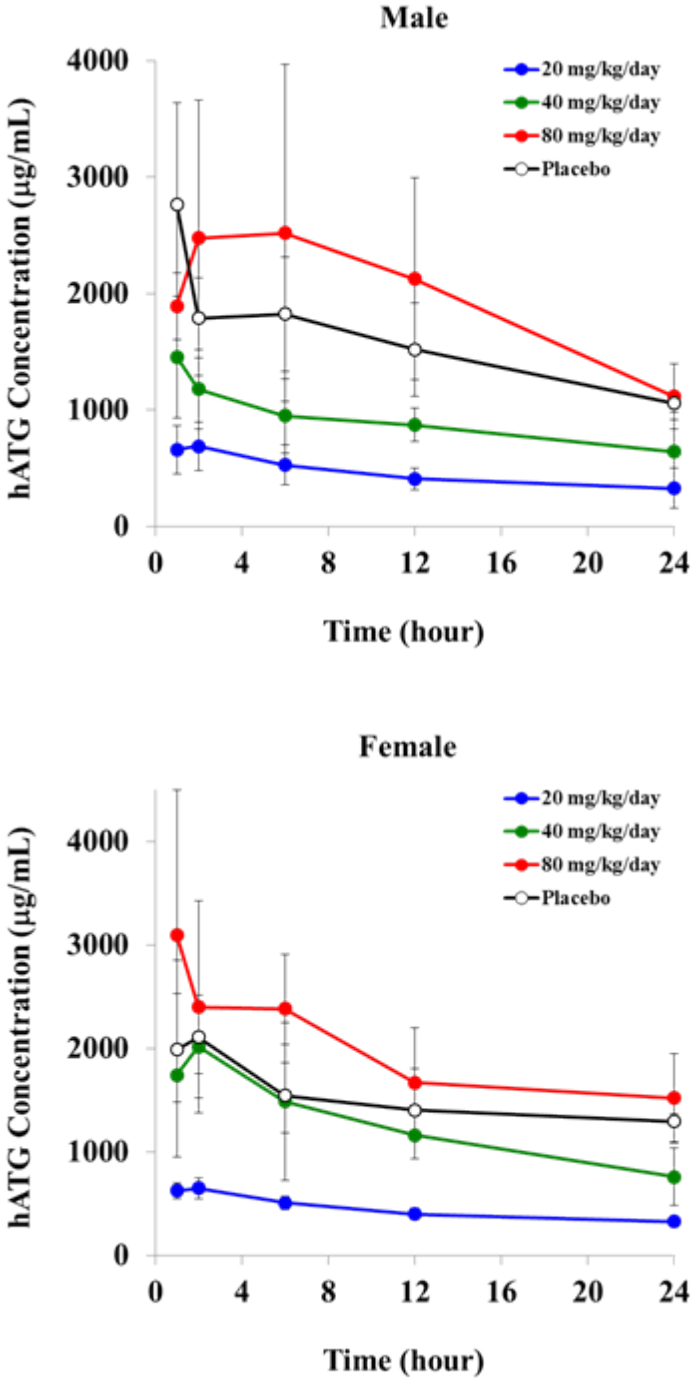
3.7. トキシコキネティクス

サルを用いた 14 日間静脈内投与毒性試験（28 日間回復性試験を含む）（M2.4.4.2.2）において，血清中 hATG および ADA 濃度を測定した。一部の試料で予期せぬ凍結による沈殿が認められたことから，薬物動態の傾向を把握することのみが可能であった。

試験 1 日における血清中 hATG 濃度推移を Figure 7 に示す。雌雄における AUC_{24} は類似しており，AUC_{24} は概ね用量に比例して増加した（Table 5）。血中濃度は試験 5 日までに定常状態に達した（Figure 8）。投与直前における血清中 hATG 濃度は，試験 11 日まで用量依存的な推移を示したが，以降，20 mg/kg/日および 40 mg/kg/日において顕著な血清中濃度の低下が認められた。しかしながら，80 mg/kg/日では投与直前における血清中濃度の低下はみられなかった。消失相における血清中 hATG 濃度の $t_{½}$（平均値±標準偏差）は，80 mg/kg/日の雌で 2.6±1.1 日であった。他の hATG 投与群では試験 18，21 および 28 日における血清中 hATG 濃度が定量限界未満であったため，パラメータ算出に必要な十分なデータが得られず $t_{½}$は算出できなかった。

溶媒対照群および 80 mg/kg/日の雄 1 例を除き，すべての動物で ADA 産生が認められ，ほとんどの動物で試験 11 日までに ADA が確認された。20 mg/kg/日および 40 mg/kg/日における ADA 濃度は 80 mg/kg/日における ADA 濃度よりも高く，20 mg/kg/日および 40 mg/kg/日で試験 11 日以降に認められた血中 hATG 濃度低下の原因であると考えられた。

Figure 7.　サル 14 日間静脈内投与毒性試験における試験 1 日の血清中 hATG 濃度推移



報告書番号 7227-[redacted]-035

平均値 ± 標準偏差（N=6），Placebo=ウマ IgG（80 mg/kg/日）

Table 5.　サル 14 日間静脈内投与毒性試験における試験 1 日の AUC_{24}

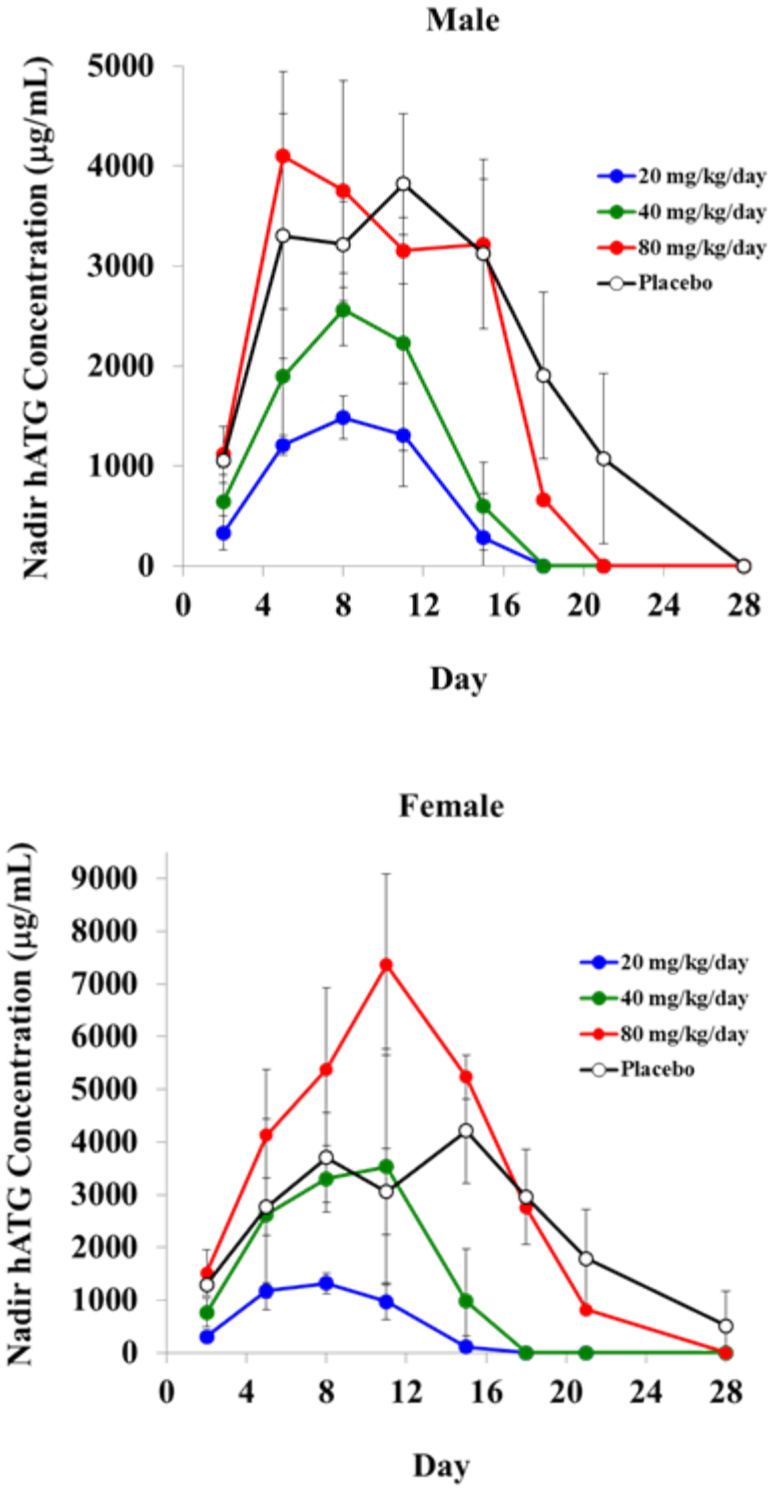
	AUC_{24} (µg•h/mL)[a]			
性別	hATG			プラセボ対照 [b]
	20 mg/kg/日	40 mg/kg/日	80 mg/kg/日	80 mg/kg/日
雄	10500 ± 3850	20970 ± 4060	43520 ± 15250	36620 ± 5510
雌	10280 ± 820	29260 ± 6930	45410 ± 9330	35530 ± 5360

報告書番号 7227-[redacted]-035

a. 平均値 ± 標準偏差（N = 5〜6）

b. ウマ IgG

Figure 8.　サル 14 日間静脈内投与毒性試験における投与直前の血清中 hATG 濃度推移



報告書番号 7227-[redacted]-035

平均値 ± 標準偏差（N=3～6），Placebo=ウマ IgG（80 mg/kg/日）

4. 毒性試験

4.1. 単回投与毒性

hATG についての標準的な単回投与毒性試験は実施していない。しかしながら，hATG の単回投与時の安全性については，げっ歯類（マウス，モルモットおよびラット）を用い，市場への出荷前に実施されるロットリリース試験で評価した[a,b]。マウスまたはモルモットを用いた試験では，マウス 2 匹およびモルモット 2 匹に，それぞれ 25 mg および 250 mg の hATG を腹腔内投与し，投与後 7 日間までに両種の動物において死亡，体重減少，またはその他の毒性所見が認められなかった場合，その hATG ロットは良好であると判断された。ラットを用いた試験では，雄ラットに hATG を 5 mg または 50 mg の用量で単回静脈内投与し，投与 18 時間後に安楽殺した。腎臓について糸球体基底膜における抗 IgG 抗体の沈着を免疫組織学的に確認し，抗体沈着が認められた場合には不適合ロットとして除外した。

現在までの数十年間において，これらの安全性評価で基準を満たさなかったロットは，ラットで評価した 69 ロット中 2 ロットのみであったことから，hATG の急性毒性は低いことが示唆された。

4.2. 反復投与毒性

4.2.1. サルを用いた用量漸増によるロットリリース試験

hATG の反復投与時の安全性については，各ロットについて実施したサルのロットリリース試験（非 GLP 適用）において評価した。ロットリリース試験は，19[redacted] 年以前はアカゲザルを用いた用量漸増試験として実施し，19[redacted] 年以降カニクイザルを用いた単一用量での試験に変更した。アカゲザルを用いた試験では，サル 2 匹に試験 1，3 および 5 日にそれぞれ 100，200 および 400 mg/kg の hATG を静脈内投与し，初回投与後 24 または 25 日に剖検に供した。一般状態観察（体温を含む），血液学的検査，血液生化学検査，器官重量測定，剖検および病理組織学的検査を実施した。カニクイザルを用いた試験では，サル 2 匹に試験 1，3，5 および 8 日に hATG 50 mg/kg を静脈内投与し，最終投与の 3 週間後に剖検に供した。一般状態観察，血液学的検査，血液生化学検査，剖検および病理組織学的検査を実施した。

アカゲザルを用いた試験とカニクイザルを用いた試験では，同様の結果が得られた。hATG の投与に関連した所見は，ほとんどが hATG の薬理作用から想定されたものであった。すべての用量において，リンパ球数の可逆的な減少が認められた。白血球数および好中球数は 24 時間以内に増加し，一過性の血小板数減少が散見された。胸腺重量の減少が認められ，病理組織学的検査でみられた胸腺萎縮との関連が考えられた。脾臓重量は増加し，脾臓およびリンパ節の胸腺依存性領域において，リンパ球数の減少が認められた。赤血球パラメータ（赤血球数，ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値）の減少，網状赤血球数増加，有核赤血球数増加など，様々な程度の貧血が認められた。一部の動物で，貧血が原因の死亡が認められた。対照群および hATG 投与群

[a] Wilson AB. ATGAM Expert Report on Toxicological and Pharmacological Documentation. 19[redacted] （参考文献 4.3.1）

[b] Part III Toxicological and Pharmacological Documentation（参考文献 4.3.2）

のいずれにおいても，投与部位（伏在静脈と大腿静脈）に沿って血栓形成が頻発したが， hATG 投与群ではその頻度がやや高かった。

4.2.2. サルを用いた 14 日間静脈内投与毒性試験（28 日間回復性試験を含む）（GLP 適用）

カニクイザルを用いた 14 日間静脈内投与毒性試験（28 日間回復性試験を含む）を，hATG を 0（溶媒対照：0.45%塩化ナトリウム），20，40 および 80 mg/kg/日の用量で実施した。

80 mg/kg/日で雌各 1 例が死亡または安楽殺となった。雌 1 例が，投与初日の投与終了直後に死亡した。死亡前の一般状態観察では中等度の運動量低下および中等度の歯肉の蒼白がみられた。病理組織学的検査の結果，左心室，心室中隔の心内膜および心筋におけるうっ血および出血ならびに多巣性間質性肺胞炎がみられ，これらは剖検時にみられた左心室内の暗色領域および肺葉の暗部領域の所見とそれぞれ一致した。これらの一般状態および剖検時の所見は，アナフィラキシー様症状の特徴と一致していた。雌 80 mg/kg/日のもう 1 例は，運動量低下，歯肉または全身の蒼白，脱力，赤血球パラメータ減少，頻脈，努力性呼吸が最大 3 日間にわたり認められたため，試験 8 日に安楽殺した。この動物の死因は重度の貧血によるものと考えられた。この貧血に関して in vitro 試験による検討が実施された。その結果から，hATG がサル赤血球の表面抗原へ結合し，その後，産生されたサル抗ウマ IgG 抗体により，hATG が結合したサル赤血球が破壊されるために，サル赤血球数が減少することが示唆された。それらの抗原はヒト赤血球には発現していないことから，サルで認められた赤血球数減少はヒトに外挿される安全性上のリスクではないと考えられた。

生存例では hATG 投与に関連する一般状態の変化として，80 mg/kg/日で運動量低下ならびに歯肉または全身の蒼白が散見され，40 mg/kg/日の雌の 1 例でも軽度の歯肉または全身の蒼白がみられるなど，貧血の症状に一致する所見が認められた。体重，摂餌量，体温，眼科検査，血液凝固検査，心血管パラメータ（心電図，血圧，心拍数）および呼吸数に hATG 投与に関連した変化は認められなかった。

血液学的検査では，すべての hATG 投与群で赤血球パラメータ（赤血球数，ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値）の用量依存的な減少がみられた。試験 14 日では，hATG の 20 mg/kg/日以上で赤血球数，ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値の減少がみられ，その程度は試験期間をとおして最大となり，用量制限毒性と考えられた。また，試験 14 日では雄 20 mg/kg/日以上および雌 40 mg/kg/日以上で網状赤血球数の増加，雄 80 mg/kg/日および雌 40 mg/kg/日以上で平均赤血球ヘモグロビン量（MCH）および平均赤血球容積（MCV）の増加が認められ，赤血球パラメータの減少による再生応答の変化と考えられた。赤血球パラメータの減少について試験 21 日より回復性が認められ，試験 42 日ではおおむね回復した。

40 mg/kg/日以上で脾臓重量の増加（最大 171%，比体重値）が認められ，病理組織学的検査より赤脾髄における細胞密度上昇またはうっ血がその一因と考えられた。hATG 投与に関連した剖検所見は認められなかった。病理組織学的検査では，白脾髄，主に T 細胞領域における細胞密度低下がみられ，この変化は hATG の抗リンパ球に関する薬理学的作用の 1 つと考えられた。また，赤脾髄における細胞密度上昇，骨髄における赤芽球骨髄球の過形成ならびに肝臓および下顎リンパ節における髄外造血が認められ，これらの変化は赤血球数減少に対する応答反応に関連する変

化と考えられた。また，脾臓の胚中心に球状から線維状の好酸性物質がみられた。すべての病理組織学的所見は軽度であり，回復性も認められた。

溶媒対照，プラセボ対照および hATG 投与群の一部の個体において，腎臓における糸球体領域の毛細血管基底膜および関連する細胞の超微細構造について透過電子顕微鏡検査を実施した。糸球体損傷に典型的な糸球体毛細血管壁（上皮下，内皮または内透明板）への免疫複合体沈着の所見はみられなかった。

ウマ IgG，サル IgG および補体の分布を検討するため腎臓の凍結切片を免疫染色したところ，微細な顆粒状沈着物および粗状の顆粒状沈着物が糸球体に認められた。微細な顆粒状沈着物は hATG 投与群のみでみられ，抗ウマ IgG や補体によるものではなく，糸球体基底膜の染色動態は典型的な線条ではなかった。粗状の顆粒状沈着物はプラセボ対照および hATG 投与群でみられ，ウマ IgG 投与により生成した補体結合抗ウマ免疫複合体と考えられた。これらの糸球体沈着物は，腎臓に関連する血液生化学検査，尿検査，病理組織学的および超微細構造に変化は認められなかったことから毒性学的意義の乏しい変化と考えられた。

病理組織学的検査で脾臓に認められた好酸性物質の特徴をより詳細に調べるため，脾臓の凍結切片を用いて免疫染色を行った。免疫染色の結果からは，断定まではできないものの，好酸性物質はウマ IgG，サル IgG および補体から形成されていることが示唆された。さらに，濾胞 B 細胞によって産生される抗ウマ抗体は，ウマ IgG との免疫沈降反応とそれに続く補体結合を引き起こす可能性が考えられた。これらの所見は外来タンパク質抗原に対する正常反応と考えられ，毒性学的意義の乏しい変化であると考えられた。

以上より，hATG をサルに 14 日間反復静脈内投与したときの無毒性量（NOAEL）は 20 mg/kg/日と考えられた。

4.3. 遺伝毒性試験（GLP 適用試験）

hATG が遺伝毒性を誘発する可能性について，細菌を用いる復帰突然変異試験ならびにチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞およびヒト末梢血リンパ球を用いた in vitro 染色体異常試験を実施した。hATG に遺伝毒性は認められなかった。

4.4. がん原性

hATG を用いたがん原性試験は実施していない。これは ICH S6(R1)ガイドライン「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」[1] に記載されたがん原性試験実施に対する考え方と一致している。さらに，ICH S1A ガイドライン「医薬品におけるがん原性試験の必要性に関するガイダンス」[17]では，臨床での使用期間が連続して 6 ヵ月未満の場合には，がん原性試験は原則要求されない。hATG の臨床における投与期間は最長 4 日間であり，この点も hATG のがん原性試験を実施しないことと合致する。

4.5. 生殖発生毒性

4.5.1. 雄性サルを用いた受胎能試験（GLP 適用試験）

カニクイザル（雄 5 匹/群：5～9 歳齢）に，hATG を 0（プラセボ対照：ウマ IgG 40 mg/kg/日），10，20 および 40 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回 14 日間反復静脈内投与し，雄受胎能に対する影響を評価した。

雄で死亡例は認められなかった。hATG 投与に関連した一般状態の変化は 40 mg/kg/日のみでみられ，口腔粘膜の蒼白（2 例），鎮静（1 例）および運動量低下（1 例）が認められた。また，40 mg/kg/日で投与期間中に一過性の体重減少ならびに投与期間中および投与終了後の初期に摂餌量の低下がみられた。一般状態，体重および摂餌量の変化は剖検までには回復した。また，hATG 投与に関連した精子検査および血清中テストステロン濃度の変化は認められず，交尾行動にも異常は認められなかった。雄の受胎率はプラセボ対照, 10, 20 および 40 mg/kg/日でそれぞれ 80%, 40%, 60%および 80%であった。雄では，剖検所見および器官重量の変化は認められなかった。

妊娠した雌においてhATG投与に関連した毒性変化は認められなかった。胎児死亡は認められず，hATG 投与に関連した胎児パラメータの変化も認められなかった。40 mg/kg/日で一般状態，体重減少および摂餌量の低下が認められたことから雄の一般毒性に関するNOAELは20 mg/kg/日であり，雄の受胎能および交尾行動に関する NOAEL は 40 mg/kg/日であった。

4.5.2. 雌性サルを用いた受胎能試験（GLP 適用試験）

カニクイザル（雌 5 匹/群：3～8 歳齢）に，hATG を 0（プラセボ対照：ウマ IgG 40 mg/kg/日），10，20 および 40 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回 14 日間（予測排卵日を挟んで前後 7 日間）反復静脈内投与し，月経周期，交尾行動，受胎能および胚発生に対する影響を評価した。

40 mg/kg/日の雌の 1 例が投与終了から 11 日後に死亡した。この個体は口腔粘膜の蒼白，運動量低下および鎮静が認められ，サルを用いた 14 日間静脈内投与毒性試験（28 日間回復性試験を含む）において貧血により死亡した個体で認められた一般状態変化と一致していた。20 mg/kg/日および40 mg/kg/日の生存例のそれぞれ2 例で口腔粘膜の蒼白および活動性低下が投与開始後 7 日から投与終了後 18 日まで認められた。20 mg/kg/日の 1 例および 40 mg/kg/日の 2 例で体重減少が投与期間中および投与期間終了後の早期に認められたものの，2 回目の交配期間終了時（投与終了後 8～12 週間）までに回復した。40 mg/kg/日の 1 例で一過性の摂餌量低下が認められた。月経周期ならびに血清中プロゲステロン，17β-エストラジオールおよびプロラクチン濃度に hATG 投与に関連する変化は認められなかった。交尾行動に異常は認められず，雌の受胎率についても，hATG 投与群と対照群の間に統計学的な有意差は認められなかった。母動物の黄体数や胎児パラメータに hATG 投与に関連した変化は認められなかった。

以上，20 mg/kg/日で一般状態および体重の変化がみられたことから，母動物の一般毒性に関するNOAEL は 10 mg/kg/日であり, 受胎能および初期胚発生に関する NOAEL は 40 mg/kg/日であった。

4.5.3. ラットを用いた探索的胚・胎児発生毒性試験

妊娠した Sprague-Dawley ラット（雌 13 匹/群）に，hATG を 0（溶媒対照：0.9%塩化ナトリウム），25，50 および 100 mg/kg/日の用量で妊娠 7 日から 17 日まで 1 日 1 回反復静脈内投与し，母動物および胚・胎児発生に対する影響を評価した。

いずれの用量においても死亡はみられず，一般状態変化，母動物の体重および摂餌量に hATG 投与に関連した変化はみられなかった。黄体数，着床数，着床率，生存胎児数，死亡胎児数，早期・後期吸収胚数，流産した母動物数に変化はみられなかった。また，性別，胎児体重および胎盤重量にも変化はみられなかった。胎児の外表，内臓および骨格に hATG 投与に関連した催奇形性はみられなかった。100 mg/kg/日では，胎児に骨格変異である頸椎椎弓の低形成の増加が認められた。

母動物の一般毒性および生殖毒性に関する NOAEL は 100 mg/kg/日，胎児発達に関する NOAEL は骨格への影響（変異）を考慮し 50 mg/kg/日と考えられた。また，器官形成期における hATG の投与において 100 mg/kg/日まで催奇形性を示さなかった。

hATG 投与に関連する頸椎椎弓の低形成は可逆的な化骨遅延と考えらえる発生学的変異であり，動物の健康状態，生存および身体的発育に影響は及ぼさないことから，正常からの逸脱はごく軽微と考えられる[18]。以上より，100 mg/kg/日は動物の健康状態，生存および身体的発育に関する有害な骨格への悪影響を示さない用量と考えられた。

4.5.4. サルを用いた胚・胎児発生毒性試験（用量設定）（GLP 適用試験）

妊娠したカニクイザル（雌 3 匹/群：4～6 歳齢）に，hATG を 10，20 および 40 mg/kg/日の用量で妊娠 20 日から 35 日まで 1 日 1 回反復静脈内投与し，妊娠維持および胚・胎児発生に対する影響を評価した。

すべての投与群において母動物の死亡はみられなかった。いずれの用量においても軽度の体重減少がみられたものの，背景データの範囲であった。40 mg/kg/日の 1 例で流産が，40 mg/kg/日の 2 例および 20 mg/kg/日の 1 例で胎児死亡が認められた。この胎児死亡は，M2.4.4.2.2 で述べたように，サル赤血球抗原に対する抗ウマ IgG 抗体の作用に伴う母動物の貧血に起因するものであり，ヒト胎児への外挿性は低いものと考えられた。生存胎児数は 10 mg/kg/日で 3 例，20 mg/kg/日で 2 例であり，胎児体重，形態または胎盤重量について hATG 投与に関連する変化はみられなかった。生存または死亡胎児に催奇形性はみられなかった。

4.5.5. サルを用いた胚・胎児発生毒性試験（GLP 適用試験）

妊娠したカニクイザル（雌 5 匹/群：3～7 歳齢）に，hATG を 0（プラセボ対照：ウマ IgG 20 mg/kg/日），5，10 および 20 mg/kg/日の用量で妊娠 20 日～妊娠 35 日（器官形成期前半）に，加えて 20 mg/kg/日を妊娠 35 日～妊娠 50 日（器官形成期後半）に，1 日 1 回反復静脈内投与し，胚・胎児発生に対する影響を評価した。

母動物の死亡はみられなかった。器官形成期前半の妊娠 20 日から妊娠 35 日まで 20 mg/kg/日を投与した母動物の 1 例で流産（妊娠 40 日），2 例で胎児死亡が，妊娠 35 日～妊娠 60 日に認められた。20 mg/kg/日での胎児死亡は，用量設定試験（M2.4.4.5.4）の 20 mg/kg/日の母動物において貧血がみられていることから，母動物の貧血に起因するものと考えられた。流産がみられた 20 mg/kg/日の 1 例で体重および摂餌量の減少がみられた。器官形成後期の妊娠 35 日から妊娠 50 日まで 20 mg/kg/日を投与した母動物では，流産または胎児死は認められなかった。いずれの投与群でも子宮および卵巣（黄体数も含む）の異常はみられなかった。

生存胎児数は，プラセボ対照群で 5 例（雄 4 例，雌 1 例），5 mg/kg/日で 4 例（雄 3 例，雌 1 例），10 mg/kg/日で 4 例（雄 3 例，雌 1 例），20 mg/kg/日（器官形成期前半）で 2 例（雄 2 例），20 mg/kg/日（器官形成期後半）で 5 例（雄 2 例，雌 3 例）であった。hATG 投与に関連した胎児体重，臓器重量，胎盤の重量および形態（外観）に変化は認められず，胎児の外表，内臓および骨格の変異や奇形は認められなかった。また，死亡胎児に形態異常は認められなかった。

以上，20 mg/kg/日で母動物において流産ならびに体重および摂餌量の変化がみられ，また胎児死亡がみられたことから，母動物の一般毒性および生殖毒性，ならびに胚・胎児発生に対する NOAEL は 10 mg/kg/日と考えられた。なお，20 mg/kg/日でみられた胚・胎児死亡については，サル特異的な機序による母動物の貧血に起因するものであり，ヒトへの外挿性はないと考えられる。

4.5.6. 出生前および出生後の発生に関する試験

サルを用いて実施した胚・胎児発生毒性試験の結果に基づいて， hATG の出生前および出生後の発生に関する試験については実施しなかった。すなわち，妊娠したサルを用いた胚・胎児発生毒性試験（用量設定試験）において，40 mg/kg/日の全 3 例および 20 mg/kg/日の 3 例中 1 例で胎児死亡または流産がみられた（M2.4.4.5.4）。また，妊娠したサルを用いた胚・胎児発生毒性試験（重要な試験）において，妊娠 20 日～妊娠 35 日（器官形成期前半）に 20 mg/kg/日を投与した 5 例中 3 例で流産または胎児死亡がみられた（M2.4.4.5.5）。20 mg/kg/日で胎児毒性および胚致死性がみられたことから，母動物の毒性および胚・胎児発達に関する NOAEL は 10 mg/kg/日であった。妊娠したサルを用いたこれらの試験結果を考慮すると，出生前期間に臨床用量（40 mg/kg/日）を妊娠サルに投与しても，出生後の発達への影響を評価するために十分な数の出生児が得られないと考えられた。

4.6. 局所刺激性試験

hATG を用いた局所刺激性試験は実施していない。サルを用いた 14 日間静脈内投与毒性試験（28 日間回復性試験を含む）では，投与部位に hATG 投与に関連する所見は認められなかった（M2.4.4.2.2）。なお，ロットリリース試験においてサルに溶媒対照および hATG を静脈内投与した際，いずれにおいても投与部位に沿って血栓形成が頻発した。血栓形成の頻度は hATG 投与群の方で対照群と比べてわずかに高かった（M2.4.4.2.1）。

4.7. その他の毒性試験

4.7.1. 免疫毒性試験

hATG を用いた免疫毒性試験は実施していない。hATG の薬効薬理作用である免疫抑制作用に起因して，hATG は標準的な免疫毒性試験において陽性を示すと考えられる。hATG のサルを用いた 14 日間静脈内投与毒性試験（28 日間回復性試験を含む）において，白血球数および好中球数の増加ならびに抗ウマ IgG 抗体の産生が認められていることから，非臨床で用いた動物種において免疫原性を示すと考えられる（M2.4.4.2.2）。

4.7.2. *不純物B

*不純物B はhATG における工程由来不純物であり，バッチの実測値に基づく *不純物B の規格値は 0.1 µg/mL である。細菌を用いた変異原性試験において *不純物B は変異原性を示した[19,20]。 *不純物B の発がん性については不明であることから，「潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中 DNA 反応性（変異原性）不純物の評価及び管理ガイドラインの補遺[ICH M7(R1)]」[21]における変異原性物質の評価および管理の考え方を *不純物B にあてはめた場合，化合物特異的な許容限度値は得られず，許容限度値［適切な毒性学的概念の閾値（TTC）］以下で管理する必要がある。

再生不良性貧血の適用における hATG の最大投与量は，40 mg/kg/日の 4 日間投与で，体重 50 kg のヒトの場合の *不純物B の摂取量は 1 日あたり 4 µg[a]となる。この値はガイドラインで規定する TTC 値（投与期間 1 ヵ月以下，1 日摂取量：120 µg/日）以内である。

以上より， 再生不良性貧血において，hATG 投与に伴う *不純物B 曝露によって想定される発がんリスクは極めて低いと考えられた。

4.7.3. hATG の交差反応性試験

抗体，特に抗リンパ球抗体の結合および有効性は動物種に特異的であると考えられる。hATG の安全性を評価するための最適な動物種の選択においては，ヒトと同じまたは類似の交差反応性抗原を有する動物種が好ましいと考えられることから，hATG のリンパ球および白血球との結合性についてヒトまたは動物の血液を用いて評価した。

健康被験者，カニクイザル，ラット，ネコ，イヌ，マウス，ブタ，ウサギおよびモルモットから採取した血液を用いて塗抹標本を作製し，エタノールで固定後，非特異的な結合をブロッキングした後，hATG または正常ウマ IgG（陰性対照）とインキュベートした。その後，蛍光標識したウサギ抗ウマ IgG を二次抗体として用いることで，hATG のリンパ球および白血球との結合を蛍

[a] 40 mg/kg/日を体重 50 kg のヒトに投与した際の hATG の投与量は 2000 mg/日であり，投与容量は投与量 2000 mg を製剤濃度 50 mg/mL で除した 40 mL となる。 *不純物B 規格値は 0.1 µg/mL であることから，1 日あたりの *不純物B 摂取量は 4 µg/日となる。

＊新薬承認情報提供時に置き換え

光顕微鏡下で観察した。hATG はヒトの好中球，リンパ球，単球，好酸球および血小板と結合したが赤血球とは結合しなかった。hATG のカニクイザルの血液細胞への結合はヒト血液細胞への結合に類似していたが，その結合性はヒトより少し弱かった。hATG のマウスおよびモルモットの血液細胞への結合はみられず，その他の動物種においても血液細胞への結合は限定的で弱かった。

以上より，hATG はヒト以外の動物の中ではカニクイザルの血液細胞と最も高い交差性を示したことから，hATG の安全性評価にカニクイザルを用いることとした。また，hATG は非霊長類のリンパ球および他の血液細胞とほとんどもしくは全く交差反応性を示さなかった。

5. 総括及び結論

本項に収載する非臨床毒性試験の成績は，海外での豊富な臨床使用実績とともに，中等度以上の再生不良性貧血における hATG の使用を十分に支持するものと考える。hATG の非臨床安全性試験は，ICH S6(R1)ガイドライン「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」[1] の制定前に実施された。しかしながら，一連の薬理，薬物動態および毒性試験は hATG の特性および必要な注意喚起を理解するため，ならびに臨床利用をサポートするのに十分であると考えられる。

hATG は，リンパ球およびその他の血球の表面に存在する様々なタンパクに結合し，また，他の組織の表面および細胞質内のタンパクにも結合すると考えられている。hATG による免疫抑制作用は，主に血液中のリンパ球の可逆的な減少によるものであり，特に T 細胞の減少に起因すると考えられる。リンパ球減少は，補体依存性溶解，アポトーシスの活性化誘導，T 細胞の部分的活性化または免疫不応答の誘導に起因するものと考えられる[3]。また別の薬理作用として，造血幹細胞の増殖に対する直接刺激または造血成長因子の放出も，再生不良性貧血の治療に寄与していることが示唆された。hATG を用いた副次的薬理試験および独立した安全性薬理試験は実施していない。サルに hATG を最大 80 mg/kg/日を投与したサル 14 日間静脈内投与毒性試験（28 日間回復性試験を含む）では，心電図，心拍数，血圧および呼吸数の変化ならびに中枢神経系に関連する一般状態の変化は認められなかった。

サルを用いた 14 日間静脈内投与毒性試験（28 日間回復性試験を含む）で，10 mg/kg/日から 80 mg/kg/日の用量範囲における試験 1 日または試験 10 日の血清中濃度は用量増加に概ね比例して増加した。試験 11 日以降に 20 mg/kg/日および 40 mg/kg/日で血清中濃度が低下し，ADA 発現によるものと考えられた。サル血清中での本剤の $t_{1/2}$は 2.6 日から 4.8 日で，ヒトの $t_{1/2}$（5.7 日）（M2.7.2.2.2.3）とおおむね一致した。授乳期サルの乳汁中濃度は定量限界未満であり，本剤は乳汁中へほとんど移行しないことが示唆された。

サルを用いた 14 日間静脈内投与毒性試験（28 日間回復性試験を含む）における主な毒性として，用量依存的な赤血球パラメータの低下が認められた。80 mg/kg/日では，重度の貧血により雌 1 例が死亡した。サルにおける貧血は，赤血球表面上に hATG で認識される表面抗原が発現していることによるもので，赤血球表面抗原が発現しないヒトでのリスクとはならないと考えられた。試験 8 日の 40 mg/kg/日以上でリンパ球数の減少が時に好中球数の増加を伴って認められたが，試験 14 日には概ね溶媒対照群と同等の値に回復した。リンパ球の減少は hATG の薬理学的作用の 1

つと考えられた。病理組織学的検査では，hATG の薬理作用である免疫抑制作用と一致した変化（胸腺萎縮，白脾髄の細胞密度低下）または赤血球数減少に対する再生応答の変化（赤脾髄の細胞密度上昇，骨髄における赤芽球骨髄球の過形成，髄外造血）が認められた。

サルを用いた受胎能試験では，雌雄ともに最高用量である 40 mg/kg/日まで hATG による受胎能への影響はみられなかった。40 mg/kg/日の雌 1 例が投与終了から 11 日後に死亡した。死亡を含む親動物に認められた重篤な毒性（蒼白，運動量低下および鎮静などの一般状態変化）は貧血に起因していた。妊娠ラットを用いた胚・胎児発生毒性試験では，器官形成期（妊娠 7 日～妊娠 17 日）に最高用量 100 mg/kg/日まで投与したところ，母動物への毒性，胎児の外表，内臓および骨格の変異や奇形は認められなかった。また，100 mg/kg/日でみられた所見は，胎児における頸椎椎弓の低形成のみであった。妊娠サルを用いた胚・胎児発生毒性試験では，器官形成前半期（妊娠 20～35 日）に 20 mg/kg/日を投与した際に流産または胎児死亡が認められたが，器官形成後半期（妊娠 35～50 日）に投与した際は同様の変化はみられなかった。この胎児死亡は，M2.4.4.2.2 で述べたように，サル赤血球表面抗原に対する抗ウマ IgG 抗体の作用に結合母動物の貧血に起因するものであり，ヒトには外挿されない。加えて，胎児の死亡はヒトでみられる貧血の様々な転帰の 1 つである[22]。したがって，この毒性はヒトでの胎児発達に関連しないと考えられた。死亡胎児に形態異常は認められず，生存した胎児においても hATG 投与に関連した外表，内臓および骨格の変異や奇形は認められなかった。

hATG のがん原性試験は実施していない。これは ICH S6(R1)ガイドライン「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」[1] に記載されたがん原性試験実施に対する考え方と一致している。さらに，ICH S1A ガイドライン「医薬品におけるがん原性試験の必要性に関するガイダンス」[17] では，臨床での使用期間が連続して 6 ヵ月未満（米国では 3 ヵ月未満）の場合には，がん原性試験は原則要求されない。hATG の臨床における投与期間は最長 4 日間であり，この点も hATG のがん原性試験を実施しないことと合致する。

hATG 中に含まれる遺伝毒性不純物である　*不純物B　が含まれることに伴うリスクは，想定される適応症である再生不良性貧血の治療に対して用いる場合には許容できる範囲であると考えられ，「潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中 DNA 反応性（変異原性）不純物の評価及び管理ガイドラインの補遺」[21] の考え方とも一致している。

以上，一連の非臨床試験結果ならびに海外での臨床使用実績から，hATG は中等度から重度の再生不良性貧血の治療に有用であると考えられた。

6. 参考文献

1　ICH S6(R1)ガイドライン：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（薬食審査発 0323 第 1 号　平成 24 年 3 月 23 日）

2　Raefsky EL, Gascon P, Gratwohl A, et al. Biological and immunological characterization of ATG and ALG. Blood. 1986;68(3):712-9.

＊新薬承認情報提供時に置き換え

[3] Merion RM, Howell T, Bromberg JS. Partial T-cell activation and anergy induction by polyclonal antithymocyte globulin. Transplantation. 1998;65(11):1481-9.

[4] Bourdage JS, Hamlin DM. Comparative polyclonal antithymocyte globulin and antilymphocyte/antilymphoblast globulin anti-CD antigen analysis by flow cytometry. Transplantation. 1995;59(8):1194-200.

[5] Abouna GM, Al-Abdullah IH, Kelly-Sullivan D, et al. Randomized clinical trial of antithymocyte globulin induction in renal transplantation comparing a fixed daily dose with dose adjustment according to T cell monitoring. Transplantation. 1995;59(11):1564-8.

[6] Scheinberg P, Nunez O, Weinstein B, et al. Horse versus rabbit antithymocyte globulin in acquired aplastic anemia. N Engl J Med. 2011;365(5):430-8.

[7] Fisher RI, Silver BA, Vanhaelen CP, et al. Objective regressions of T- and B-cell lymphomas in patients following treatment with anti-thymocyte globulin. Cancer Res. 1982;42(6):2465-9.

[8] Greco B, Bielory L, Stephany D, et al. Antithymocyte globulin reacts with many normal human cell types. Blood. 1983;62(5):1047-54.

[9] Gascon P, Zoumbos NC, Scala G, et al. Lymphokine abnormalities in aplastic anemia: implications for the mechanism of action of antithymocyte globulin. Blood. 1985;65(2):407-13.

[10] Nimer SD, Golde DW, Kwan K, et al. In vitro production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in aplastic anemia: possible mechanisms of action of antithymocyte globulin. Blood. 1991;78(1):163-8.

[11] Feng X, Kajigaya S, Solomou EE, et al. Rabbit ATG but not horse ATG promotes expansion of functional CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells in vitro. Blood. 2008;111(7):3675-83.

[12] Genestier L, Fournel S, Flacher M, et al. Induction of Fas (Apo 1, CD95) mediated apoptosis of activated lymphocytes by polyclonal antithymocyte globulins. Blood. 1998;91(7):2360-8.

[13] Young NS, Calado RT, Scheinberg P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. Blood. 2006;108(8):2509-19.

[14] Mangan KF, D'Alessandro L, Mullaney MT. Action of antithymocyte globulin on normal human erythroid progenitor cell proliferation in vitro: erythropoietic growth enhancing factors are released from marrow accessory cells. J Lab Clin Med. 1986;107(4):353-64.

[15] Waldmann TA, Strober W. Metabolism of immunoglobulins. Prog Allergy 1969;13:1-110.

[16] Covell DG, Barbet J, Holton OD, et al. Pharmacokinetics of monoclonal immunoglobulin G1, F(ab')2, and Fab' in mice. Cancer Res 1986;46(8):3969-78.

[17] ICH S1A ガイドライン : 医薬品におけるがん原性試験の必要性に関するガイダンス（薬審第 315 号　平成 9 年 4 月 14 日）

[18] Carney EW, Kimmel CA. Interpretation of skeletal variations for human risk assessment: delayed ossification and wavy ribs. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol 2007;80(6):473-96.

[19] Wugmeister M, Summers WC. A bacterial mutagenicity study of rivanol, an acridine derivative used as an abortifacient. Yale J Biol Med 1983;56(1):9-13.

[20] Yasunaka K, Okada H. Mutagenic activity of acrinol in Salmonella typhimurium. Mutat Res 1985;144(1):9-12.

[21] ICH M7 (R1)ガイドライン：潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中 DNA 反応性（変異原性）不純物の評価及び管理ガイドラインの補遺（薬生薬審発 0627 第 1 号　平成 30 年 6 月 27 日）

[22] Rathod Niranjan. High Risk Cases in Obstetrics 2014;1(e):20. DOI: 10.5005/jp/books/12373_2