オンキャスパー点滴静注用 3750

医薬品製造販売承認申請書添付資料

第 2 部（モジュール 2）

2.6.6　毒性試験の概要文

日本セルヴィエ株式会社

目次

1. まとめ....5
1.1 オンキャスパーの概要....5
1.2 オンキャスパー液体製剤を用いた毒性試験....5
1.3 オンキャスパー凍結乾燥製剤を用いた毒性試験....10
2. 単回投与毒性試験....11
2.1 ラット単回静脈内投与におけるトキシコキネティクス及び毒性に関するオンキャスパーと[redacted]との比較試験....11
2.2 イヌ単回静脈内投与におけるトキシコキネティクス及び毒性に関するオンキャスパーと[redacted]との比較試験....12
2.3 マウス単回腹腔内投与における最大耐量確認試験....14
3. 反復投与毒性試験....16
3.1 イヌの静脈内又は筋肉内投与における 2 週間反復投与毒性試験（パート 1）....16
3.2 イヌの静脈内あるいは筋肉内投与における 2 週間反復投与毒性試験（パート 2）....18
3.3 ラット腹腔内 28 日間反復投与毒性試験....20
3.4 ラット筋肉内 4 週間反復投与毒性試験....22
3.5 ラット腹腔内 4 週間反復投与試験（追加試験）....24
3.6 マウス腹腔内又は筋肉内 3 カ月反復投与毒性試験....26
3.7 ラット腹腔内 3 カ月反復投与毒性試験....28
3.8 イヌ静脈内 3 カ月反復投与毒性試験....29
4. 変異原性試験....31
5. がん原性試験....31
6. 生殖発生毒性試験....31
6.1 オンキャスパーの生殖発生毒性試験....31
6.2 L-アスパラキナーゼの生殖発生毒性試験....31
7. 局所刺激性試験....32
7.1 マウスの足底内投与局所刺激性試験....32
8. その他の毒性試験....35
8.1 マウスにおけるオンキャスパーと L-アスパラキナーゼの免疫原性比較試験....35
8.2 イヌ及びヒトの全血における血液適合性試験....37
8.3 オンキャスパー製剤（液体及び凍結乾燥製剤）のイヌ静脈内単回及び 4 週間反復投与における抗薬物抗体、薬物動態及び薬力学的検討....37
8.4 オンキャスパー凍結乾燥製剤添加物の精製白糖の毒性評価....39
8.5 製造工程関連不純物の遺伝毒性評価....39
9. 考察及び結論....39
10. 図表....40
11. 参考文献一覧....41

図目次

図 3.7:1　ラット腹腔内 3 カ月反復投与毒性試験体重曲線 29
図 3.8:1　イヌ静脈内 3 カ月反復投与毒性試験における雌体重曲線 30
図 7.1:1　マウス足底内投与における行動異常（継時推移） 33
図 7.1:2　マウス足底投与における行動異常（累積時間） 34
図 7.1:3　マウス足底内投与における足の腫脹 35

表目次

表 1.2:1　毒性試験一覧 7
表 1.2:2　主な毒性変化一覧 9
表 1.3:1　オンキャスパー凍結乾燥製剤の毒性試験の方法表 10
表 2.3:1　オンキャスパー単回投与後 3 週目の雌マウスにおける肝臓及び脾臓重量 15
表 2.3:2　オンキャスパーのマウス単回腹腔内投与における毒性概要 16
表 3.1:1　オンキャスパー200 IU/kg 投与後の血球数 17
表 3.1:2　オンキャスパー200 IU/kg 投与後の ALT 値 17
表 3.2:1　オンキャスパー1200 IU/kg 投与時の体重変化 19
表 3.2:2　オンキャスパー1200 IU/kg 投与時の ALT 値 19
表 3.2:3　イヌの静脈内又は筋肉内投与における 2 週間反復投与毒性試験の変化の概要 20
表 3.3:1　ラット腹腔内 28 日間反復投与毒性試験における変化の概要 22
表 3.4:1　ラット筋肉内 4 週間反復投与毒性試験における変化の概要 23
表 3.4:2　ラット筋肉内 4 週間反復投与毒性試験における炎症を含む形態学的変化の所見の概要 ..... **エラー! ブックマークが定義されていません。**
表 3.5:1　ラット腹腔内 4 週間反復投与毒性試験における変化の概要 26
表 3.6:1　マウス腹腔内 3 カ月反復投与毒性試験変化概要 27
表 3.6:2　マウス筋肉内 3 カ月反復投与毒性試験変化概要 28
表 8.1:1　L-アスパラキナーゼの抗体価 36
表 8.1:2　オンキャスパー腹腔内投与における抗体価 36
表 8.1:3　オンキャスパー筋肉内投与における抗体価 36

略語・略号一覧

略語・略号	省略していない表現（英語）	省略していない表現（日本語）
Alb	Serum albumin	血清アルブミン
ALP(AP)	Alkaline phosphatase	アルカリフォスファターゼ
ALT(GPT)	Alanine Amino Transferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST(GOT)	Aspartate Amino Transferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
Ca	Calcium	カルシウム
Cl	Chlorine	クロール
CRE	Creatinine	クレアチニン
D-Bil	Direct bilirubin	直接ビリルビン
F	Female	雌
GGT(γ−GTP)	γ-glutamyltranspeptidase	γ−グルタミルトランスペプチダーゼ
GLU	Glucose	糖
i m.	intramuscular	筋肉内
i.p.	Intra peritoneal	腹腔内
i.v.	Intra venous	静脈内
K	Potassium	カリウム
LDH	Lactate dehydrogenase	乳酸脱水素酵素
M	Male	雄
MTD	maximum tolerated dose	最大耐量
Na	Sodium	ナトリウム
PBS	phosphate-buffered saline solution	リン酸緩衝食塩水
pH	Hydrogen ion index	水素イオン指数
SDH	Sorbitol dehydrogenase	ソルビトール脱水素酵素
T-Bil	Total Bilbin	総ビリルビン
T-CHO	Total cholesterol	総コレステロール
TP	Total protein	血清総蛋白

1.　まとめ

1.1　オンキャスパーの概要

オンキャスパー（INN：pegaspargase；Oncaspar；S95014）は、PEG 化された *E. coli* の L-アスパラギナーゼである。*E. coli* アスパラギナーゼは、四量体ごとに 1 つの活性部位を持つ 4 つの同一のサブユニットで構成されている。分子量約 5000 Da のモノメトキシポリエチレングリコール（PEG）は、コハク酸スクシンイミジルリンカー（SS リンカー）を介してアスパラギナーゼ酵素のリジン残基に共有結合する。

当初、オンキャスパー（液体製剤、S95014_[redacted]）は、PBS、pH 7.3 中の単回使用バイアルに 5 mL あたり 3750 U を含有する（750 U/mL 溶液）等張滅菌液として供給された。凍結乾燥製剤（S95014_[redacted]）は、安定性を向上させるために開発された（液体製剤の 8 カ月と比較して最大 36 カ月安定）。

毒性試験は、液体製剤（S95014_[redacted]）で実施され、データは 1.2 に示した。現在の凍結乾燥製剤（S95014_[redacted]）の開発を裏付ける追加情報は、1.3 及び 8 に示し、総括した結論を 9 に示した。

過去の液体製剤情報及び分析比較データは【3.2.S.2.6】及び【3.2.P.2.3】に記載した。オンキャスパー（S95014）は、凍結乾燥粉末（3750 U/バイアル）として提供され、5.2 mL の注射用滅菌水（SWFI）を添加し、PBS 中に 750 U/mL 含有溶液を得る。

1.2　オンキャスパー液体製剤を用いた毒性試験

本承認申請書添付資料 2.6.6（本添付資料）に記載した毒性試験のほとんどは、米国 GLP 及び欧州 GLP に従って 1980～1990 年代初頭に実施した。これらの試験に使用したオンキャスパーは、Merck 社が製造したものである。これらの試験結果に基づき、1994 年に米国とドイツで製造販売承認を取得した。

実施した毒性試験及び GLP 適合性の有無については以下の表 1.2:1 に示した。これらの試験では、1 群あたりに使用した動物は限られた数で実施した。

最近実施した 2 試験【Report NP39217、NP39211】は、GLP に従って実施し、その結果は、本添付資料の冒頭に示した。その他のすべての試験は、CPMP/ICH/2887/99 Rev1 安全ガイドラインに従って実施した。

オンキャスパーの毒性評価は、マウス、ラット、イヌ及びモルモットにおける静脈内及び腹腔内の単回投与試験、並びにマウス、ラット及びイヌにおける静脈内、腹腔内及び筋肉内投与の反復投与試験を行った。本添付資料では、マウス、ラット、イヌの試験を記載した。

なお、それ以外に単回投与の予備的性格の 2 試験を実施しているが、パイロット的性格が強いため、本添付資料への記載を割愛した。

オンキャスパーは、反復投与試験の結果から試験されたすべての種において毒性面から十分に人に外挿可能と判断された。

オンキャスパーの免疫原性は、マウス 12 週間投与試験にて、L-アスパラギナーゼと比較した。

オンキャスパーの変異原性は、*S. typhimurium* の復帰突然変異試験（Ames 試験）で検討した。また、L-アスパラギナーゼを投与した妊娠ウサギとその胎児の核型に関する結果も得られている。

反復投与毒性試験において、動物の外観や行動に影響はみられなかった。単回投与毒性試験では、大量投与において、げっ歯類において行動低下、円背位、立毛、軽度の肝毒性がみられ、数例が死亡した。ただし、LD_{50} は確立できなかった。

さらにラットとイヌへの大量投与において摂餌量低下、体重増加抑制がみられたが、尿検査及び血液検査では、概して変化はなかった。反復投与毒性試験の血液化学的検査では、AST 及び ALT の上昇が散発的に観察された。血液検査では、ヘモグロビン及びヘマトクリットが、大量投与のラットの雌でわずかに低値を示した。

さらに、肝臓及び脾臓重量の減少がマウスの雌及びラットの雌雄においてみられた。脾臓重量の減少は、オンキャスパーの免疫抑制作用に基づくものと思われた。また、高用量投与のマウスに悪性度の低い肝変化が確認された。

試験で観察された主な変化を以下の表 1.2:2 に要約した。

L-アスパラギナーゼを PEG で修飾することにより、L-アスパラギナーゼの免疫原性が大幅に低下した（L-アスパラギナーゼ又は PEG-L-アスパラギナーゼの 12 週間免疫後の抗体価はそれぞれ 1：781250 vs. 1：<50 であった）。

表 1.2:1　毒性試験一覧

Study Type: Single dose										
Species, strain and sex	**Number of animals**	**Test Item**	**Doses (Batch #)**	**Duration of dosing**	**Route of administration**	**Systemic Exposure**	**Histopathology**	**Year**	**GLP**	**Study code**
Sprague Dawley rats[a] (M, F)	8/sex/group	PEG-L-asparaginase	0、100、500 IU/kg ([redacted])	Single dose	i.v.	Yes	Yes	20[redacted]	Yes	NP39217
Beagle dogs[a] (M, F)	4/sex/group	PEG-L-asparaginase	0、100、500 IU/kg ([redacted])	Single dose	i.v.	Yes	Yes	20[redacted]	Yes	NP39211
C3H/HeJ mice (F)	8 or 4/group	PEG-L-asparaginase	0、5,000、10,000、25,000、40,000、100,000 IU/kg ([redacted] and [redacted])	Single dose	i.p.	No	Yes	19[redacted]	Yes[b]	NP39222
Study Type: 2- and 4- week toxicity										
Species, strain and sex	**Number of animals**	**Test Item**	**Doses (Batch #)**	**Duration of dosing**	**Route of administration**	**Systemic Exposure**	**Histopathology**	**Year**	**GLP**	**Study code**
Beagle dogs (M, F)	1/sex/group	PEG-L-asparaginase	200、1,200 IU/kg ([redacted] and [redacted])	once a week for 2 weeks	i m., i.v.	Yes	No	19[redacted]	Yes[b]	NP39220 NP39221
Wistar rats (M, F)	6/sex/group	PEG-L-asparaginase	0、10、30、60 IU/kg ([redacted])	5 times a week for 4 weeks	i.p.	No	Yes	19[redacted]	Yes[b]	NP39233
Wistar rats (M, F)	6 or 8 /sex/group	PEG-L-asparaginase	0、100、200、400 IU/kg ([redacted])	5 times a week for 4 weeks	i m.	Yes	Yes	19[redacted]	Yes[b]	NP39218
Sprague Dawley rats (M, F)	6/sex/group	PEG-L-asparaginase	0、400 IU/kg ([redacted])	5 times a week for 4 weeks	i.p.	No	Yes	19[redacted]	Yes[b]	NP39213

表 1.2:1　毒性試験一覧（続き）

Study Type: 13-week toxicity										
Species, strain and sex	**Number of animals**	**Test Item**	**Doses (Batch #)**	**Duration of dosing**	**Route of administration**	**Systemic Exposure**	**Histopathology**	**Year**	**GLP**	**Study code**
Swiss-Webster mice (M, F)	5/sex/group	PEG-L-asparaginase	0、50、200、500 IU/kg ([redacted], [redacted] and [redacted])	once a week for 13 (i.p.) or 17 (i.m.) weeks	i m., i.p.	No	Yes	19[redacted]	Yes[b]	NP39210
Rats (M, F)	10/sex/group	L-asparaginase	0、200、800、3000 IU/kg	5 times a week for 3 months	i.p.	No	Yes	-	No	(Lorke, 1970) PE0150563
Beagle dogs (M, F)	3/sex/group	L-asparaginase	0、200、800、3000 IU/kg	5 times a week for 3 months	i.v.	No	Yes	-	No	(Lorke, 1970) PE0150563
Study Type: Mutagenicity - Reverse mutation test										
Species, strain		**Test Item**	**Concentration (Batch #)**			**Hours of exposure**		**Year**	**GLP**	**Study code**
Salmonella Typhimurium		PEG-L-asparaginase	75 IU/plate ([redacted]) With and without S-9 activation			48		19[redacted]	Yes	NP39215
Study Type: Determination of immunogenic properties										
Species, strain and sex	**Number of animals**	**Test Item**	**Doses (Batch #)**	**Duration of dosing**	**Route of administration**	**Systemic Exposure**	**Histopathology**	**Year**	**GLP**	**Study code**
Swiss-Webster mice (F)	8/group	PEG-L-asparaginase L-asparaginase	10.5 IU/mouse ~525 IU/kg (PEG-L-asparaginase: [redacted])	once a week for 12 weeks	PEG-L-asparaginase: i m., i.p. L-asparaginase: i.p.	No	Not applicable	19[redacted]	Yes[b]	NP39219

a　Studies presented at the very beginning of 2.6.6 Toxicology Written Summary. being performed according to more recent standards

b　米国 GLP（CFR Title 21 Part 58）に従って実施された毒性試験

表 1.2:2　主な毒性変化一覧

Effect	Single dose						Repeat dose				
	Mouse		Rat		Dog		Mouse	Rat		Dog	
	L-asp	PEG-L-asp	L-asp	PEG-L-asp	L-asp	PEG-L-asp	PEG-L-asp	L-asp	PEG-L-asp	L-asp	PEG-L-asp
Decreased motility	+	+	+		+						
Decreased food consumption	+		+	+	+				+		
Decreased weight / Body weight gain	++	++	++	+	++		+	+	+	++	+
Soft stool						+					
Emesis					+					+	
Haematology						↓reticulocytes			Mild anemia		
Spleen weight decrease		+					+		+		
Liver											
Weight decrease		+							+		
Transaminases									↑AST	↑AST ↑ALT	↑ALT
Synthesis				↓total protein ↓globulin ↑cholesterol		↓total protein			↑phosphatase alkaline ↓total protein		
Histopathology		[a]					[b]	[c]		[d]	
Thymus atrophy										+	

Histopathology:

a　minor change, without hepatocytes necrosis

b　hydropic cytoplasmatic changes

c　hepatocytes swelling and fatty infiltration

d　hepatocytes fatty infiltration

1.3　オンキャスパー凍結乾燥製剤を用いた毒性試験

オンキャスパーの凍結乾燥製剤については、添加した 5%精製白糖の毒性評価【Report NP39209】をマウスで、液体製剤と凍結乾燥製剤の血液適合性評価【Report NP39212】をイヌ及びヒトで、以下の表のように実施した。

表 1.3:1　オンキャスパー凍結乾燥製剤の毒性試験の方法表

Species, strain and sex	Number of animals	Test Item	Doses (Batch #)	Duration of dosing	Route of administration	Systemic Exposure	Histopathology	Year	GLP	Study code
Study Type: Local Tolerance										
Mice	8/group	Oncaspar liquid, Oncaspar Liquid with 5% Sucrose	50 µL	once	Intra-plantar	No	No	20[redacted]	No	NP39209
Study Type: Hemocompatibility										
Dog, Human, *in vitro*	n.a.	Oncaspar liquid, Oncaspar lyophilized		n.a.	n.a.	n.a.	no	20[redacted]	Yes	NP39212

2.　単回投与毒性試験

2.1　ラット単回静脈内投与におけるトキシコキネティクス及び毒性に関するオンキャスパーと[redacted]との比較試験

【Report NP39217】

目的

本試験は、Good Laboratory Practice（GLP）規則、21 連邦規則集（CFR）part 58 に従って実施された。

本試験の目的は、オンキャスパー及び類似化合物（[redacted]）をラットに静脈内単回投与後 14 日間観察における毒性、トキシコネティクス及び薬力学的プロファイルを評価することである。類似化合物のデータについては、ここには示さなかった。

方法

オンキャスパー（100 及び 500 IU/kg）及び溶媒（0.05 M PBS）、pH 7.3）を CD®[Crl:CD®(SD)]ラット（雌雄各 8 匹/群）に静脈内投与した。投与液量は、1 mL/kg で、投与時間は、約 30 秒で行った。

一般状態観察：1 日 2 回実施した。

体重測定及び摂餌量測定：毎日測定した。

臨床病理学的検査：血液及び尿検査は、最終剖検前の採取サンプルにて測定した。

トキシコキネティックス（TK）測定：血漿アスパラギナーゼの活性（トキシコキネティクス）及び L-アスパラギンと L-グルタミンの濃度（薬力学）の測定サンプルは、指定した時期に採取した。

TK は、血漿アスパラギナーゼの活性時間データから測定した。

病理学的検査：観察期間終了後、剖検し、臓器（標準的）重量測定及び病理組織学的検査を実施した。

結果

トキシコキネティクス：結果は【2.6.4　薬物動態試験の概要文】に報告する。

一般状態観察・体重測定：溶媒対照群の雌 2 例とオンキャスパー500 IU/kg で投与の雌 1 例が、1、7、11 日目の採血中又は採血直後に死亡した。死亡は、ストレス又は／及び採血の合併症が原因とされた。

すべての試験群で 2 週間の試験期間中体重は増加した。しかし、初期体重と比較した場合、オンキャスパー投与では、100 IU/kg 投与群において雌雄で数日間非常にわずかな体重減少がみられ、500 IU/kg 群では雄（最大で約 4%～5%）と雌（最大で約 9%）で数日間軽度の体重減少がみられた。対照群と比較した場合、雄では 100 IU/kg 群で 3～14 日目において約 4.4%～5.1%の平均体重減少、500 IU/kg 群では 3～14 日目において平均体重が約 8.9%～14.1%減少した。雌では、

100 IU/kg 群で 3～14 日目において約 8.2%～5.6%の平均体重減少がみられた。500 IU/kg 群では、3～14 日目において約 8.6%～9.4%の平均体重減少がみられた。
摂餌量：溶媒対照群に比して、100 及び 500 IU/kg 群の雌雄で大幅に減少した。この変化は、体重減少と相関していた。
臨床病理学的検査：血液学的検査、凝固系検査及び尿検査ではオンキャスパー投与に関連すると思われる変化はみられなかった。血液化学的検査では、グロブリンと総蛋白質の減少が、500 IU/kg 群の雌雄及び 100 IU/kg 群の雌でみられた。グロブリンの減少は、オンキャスパー投与に関連しているとみなされたが、その程度は、生体への重大な影響を及ぼすレベルではないと判断された。T-CHO の増加が、500 IU/kg 群の雌雄でみられた。
病理学的検査：オンキャスパー群において、本オンキャスパーに関連する肉眼的所見は認められなかった。臓器重量検査では、溶媒対照群に比して肝臓及び脾臓の絶対重量及び臓器／脳重量比の減少がオンキャスパー群の雄に、また脳／体重比の増加が 500 IU/kg 群の雌雄にみられた。

結論

血漿アスパラギナーゼ活性値から、オンキャスパーを投与されたほぼすべてのラットが投与後 14 日間継続的して薬剤に曝露されていたことが示された。これは、期間中の L-アスパラギン濃度が検出限界以下であったことによって裏付された。

オンキャスパーの 100 及び 500 IU/kg の投与において有意な性差はなかった。本試験の結果に基づくと、ラットにおけるオンキャスパーの単回静脈内投与の最大耐量（MTD）は少なくとも 500 IU/kg である。

2.2　イヌ単回静脈内投与におけるトキシコキネティクス及び毒性に関するオンキャスパーと[redacted]との比較試験

【Report NP39211】

目的

本試験は、GLP 規則、21 CFR Part 58 に従って実施された。

本試験の目的は、オンキャスパー及び類似化合物（[redacted]）をイヌ（ビーグル犬）に単回静脈内投与後 14 日間観察における毒性、トキシコキネティクス及び薬力学的プロファイルを評価することである。類似化合物のデータについては、ここには示さなかった。

方法

オンキャスパー100 及び 500 IU/kg をイヌの雌雄各 4 匹に静脈内投与した。そのほか、雌雄各 4 匹の溶媒（0.05 M PBS、pH 7.3）対照群を設けた。投与は、0.75 mL/kg の液量を約 3 分間隔で行った。

一般状態、摂餌・飲水状況観察：すべての動物について 1 日 2 回実施した。体重測定及び摂餌量測定は、毎日実施した。
心電図検査：投与前、投与後約 2 時間、及び 14 日目に実施した。
血液・尿検査：サンプルは、すべての動物の投与前及び剖検前に採取された。
トキシコキネティクス測定：投与前及び投与後の設定された時点にすべての動物から採取し、血漿アスパラギナーゼ活性（トキシコキネティクス）、血漿 L-アスパラギン及び L-グルタミン濃度（薬力学）を測定した。このうちトキシコキネティクスパラメータは、血漿アスパラギナーゼ活性時間データから算定した。
病理学的検査：14 日間観察後剖検し、標準的臓器組織の重量測定及び病理組織学的検査を実施した。

結果

トキシコキネティクスの結果は【2.6.4　薬物動態試験の概要文】に記載した。

一般状態観察：試験期間を通じていずれの群にも死亡はみられなかった。イヌにおいてオンキャスパーの 100 及び 500 IU/kg 投与では、忍容性がみられた。オンキャスパー投与に関連する変化としては、全投与群において軟便発生率の増加、500 IU/kg 投与群の雌に流涙、100 及び 500 IU/kg 投与群の雌に投与部位の硬結がみられた。そのほか、オンキャスパー全投与群において、低頻度の変色した糞便が散発した。
体重及び摂餌量：全投与群において変化はみられなかった。
眼検査及び心電図検査：全投与群において変化は認められなかった。
血液学的検査：オンキャスパー全投与群の雄において対照群に比して網状赤血球数の減少がみられた。その他の検査項目では有意な変化はみられなかった。
血液化学的検査：総蛋白の減少がすべてのオンキャスパー投与群において対照群と比較して 7%～11%減少した。そのほか、Ca、Na、ALT、及びSDH で統計的有意差がみられたが、変化の程度及び傾向からオンキャスパーとの関連性はないと考えられた。
尿検査：オンキャスパー投与に関連すると思われる変化はなかった。
病理検査：オンキャスパー投与に関連すると思われる剖検所見、臓器重量及び病理組織学的変化は認められなかった。

結論

血漿アスパラギナーゼ活性の有意な性差はなかった。170 IU/mL 以上の血漿アスパラギナーゼ活性は、L-アスパラギン濃度の検出限界以下と相関したが、血漿 L-グルタミン濃度は影響を受けなかった。本試験の結果に基づき、イヌへのオンキャスパーの単回静脈内投与の MTD は少なくとも 500 IU/kg であると判断した。

2.3　マウス単回腹腔内投与における最大耐量確認試験

【Report NP39222】

目的

本試験は、GLP 規制、21 CFR、Part 58 に従って実施され、その結果は公表された［1］。

本試験の目的は、オンキャスパーの 5000～100000 IU/kg までの範囲の用量をマウスに単回腹腔内投与し、マウス単回投与における最大耐量及び毒性を確認することである。

方法

以下 1）及び 2）に示すように、C3H/HeJ 雌マウス 36 匹にオンキャスパー（バッチ#[redacted]、[redacted]）を、当初 24 匹に 3 用量（5000、10000、25000 IU/kg）を投与したが、最高用量投与で死亡がみられなかったことから、新たに 40000 及び 100000 IU/kg の追加投与群を設けた。

1）当初投与群構成

Dose（IU/kg）	Number of animals
0（0.05 M PBS）	5
5,000	8
10,000	8
25,000	8

2）追加投与群構成

Dose（IU/kg）	Number of animals
40,000	4[a]
100,000	4[a]
100,000	4[b]

a　体重 24～25 g
b　体重 27～28 g

一般状態観察：1 日 2 回行った。
体重測定：投与後 0、2、4、8、14 及び 21 日目に行った。
剖検：5000 IU/kg 投与群の 4 例、10000 IU/kg 投与群の 4 例、25000 IU/kg 投与群の 2 例を投与後 11 日目に剖検した。残りの 10 例及び追加投与の 40000 IU/kg 投与群、100000 IU/kg 投与群（体重 24～25 g）を投与後 3 週目に部検した。100000 IU/kg 投与群（体重 27～28 g）の 4 例を投与後 4 週目に剖検した。
臓器重量測定：脳、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎について測定した。
病理組織学的検査：脳、甲状腺、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、胃、膵臓、大腸、小腸、膀胱、子宮、卵巣、胸腺、目、骨、及び皮膚について行った。

結果

一般状態及び体重：一般状態では、オンキャスパーの投与後 2 日までは、全投与群の全例に異常はみられなかった。3 日目から、25000、40000 及び 100000 IU/kg（体重 24～25 g）の投与群において自発運動低下、立毛及び円背位を示し始め、11 日目頃まで増強し、その後徐々に減少し、3 週目まで持続した。死亡は、投与後 4 日目に 25000 IU/kg 投与群の 3 例に、5 日目に 100000 IU/kg 投与群（体重 24～25 g）の 2 例にみられた。
体重測定：オンキャスパー投与群において最大 20%減少した。一部の動物では投与後 3 週間目に増加傾向がみられたが、総じて観察期間終了まで低下を継続した。

臓器重量：全般的には対照群と同等であった。ただし、10000、25000、40000 IU/kg 投与群の脾臓重量及び 25000、40000 IU/kg 投与群の肝臓重量は、表 2.3:1 に示すように対照群より低かった。

表 2.3:1 に肝臓及び脾臓の平均重量を示す。

表 2.3:1　　オンキャスパー単回投与後 3 週目の雌マウスにおける肝臓及び脾臓重量

Dose (IU/kg)	Organ weights (g)	
	Liver	Spleen
Controls	1.13 ± 0.12	0.10 ± 0.004
5,000	1.30 ± 0.42	0.11 ± 0.050
10,000	0.93 ± 0.19	0.05 ± 0.044[a]
25,000	0.83 ± 0.18[b]	0.07 ± 0.025[b]
40,000	0.85 ± 0.11[b]	0.05 ± 0.010[a]
100,000	1.35 ± 0.12	0.11 ± 0.013

a　p<0.05
b　p<0.01
NOTE: The statistical analysis was performed after the issue of the final study report

病理組織学的検査：オンキャスパー投与に関連すると思われる変化として、肝臓において、投与後 3 週目に剖検された 3 例（10000 IU/kg 投与群 1 例及び 25000 IU/kg 投与群 2 例）に多核細胞増加、類洞周囲白血球浸潤、及び 1 例（10000 IU/kg 投与群）に門脈線維化がみられた。非常に高用量のオンキャスパーに対して肝臓の初期の毒性反応を示した可能性がある。さらに、門脈周囲性の散在性肝細胞脂肪化が、100000 IU/kg 投与群の投与後 4 週目剖検の 3 例で観察された。

結論

マウスにおける本毒性試験結果は、オンキャスパーによる毒性は低いと判断した。非常に大量の投与（25000～100000 IU/kg）で、少数の動物の死亡及び重篤性の低い肝臓変化を引き起こしたが、その他の変化としては、体重減少、立毛、及び自発運動低下があった。脾臓重量の減少は、オンキャスパーの免疫抑制作用に起因するものと判断された。

表 2.3:2 にオンキャスパー投与に関連する変化の概要を示す。

表 2.3:2　オンキャスパーのマウス単回腹腔内投与における毒性概要

Number and sex of animals	Dose (IU/kg)	Observations
5 F	Controls	None
8 F	5,000	Body weight loss
8 F	10,000	Body weight loss; Decreased weight of spleen (2 animals); Histopathological changes in the liver[c] (1 animal)
8 F	25,000[a]	Decreased weight of spleen[b] (2 animals); Histopathological changes in the liver[c] (2 animals); Death (3 animals)
4 F	40,000[a]	Decreased weight of spleen[b] (4 animals)
8 F	100,000[a]	Decreased weight of spleen[b] (1 animal); Histopathological changes in the liver[c] (3 animals); Death (2 animals)
Evaluations included:		survival, appearance, behaviour, body weight, organ weights, gross pathology and histopathology

a　16% average body weight loss, decreased activity, piloerection, hunched posture.
b　without histopathological changes.
c　no evidence of necrosis
NOTE: animals in this study suffered from pneumonia

3.　反復投与毒性試験

3.1　イヌの静脈内又は筋肉内投与における 2 週間反復投与毒性試験（パート 1）

【Report NP39220】

目的

本試験は、GLP 基準、21 CFR、Part 58 に従って実施され、その結果は公表された［1,2］。本試験の目的は、オンキャスパーのイヌ静脈内又は筋肉内投与における毒性学的影響を確認するためである。さらに、血漿 L-アスパラギナーゼ濃度を測定することである。オンキャスパーの投与用量は、200 IU/kg を 2 回投与し、その投与間隔は、1 週間とした。

方法

0.05 M PBS pH 7.3 に溶解したオンキャスパー（バッチ#[redacted]、[redacted]）を、4 匹のビーグル（6.8～8.1 kg 体重）に 200 IU/kg の用量で静脈内又は筋肉内に週 1 回 2 週間投与した。各経路について雌雄各 1 匹に投与した。投与用量の 200 IU/kg は、リンパ肉腫と診断されたイヌの予備試験で使用した治療有効用量の 10 倍である。

動物は、空調された部屋の個別代謝ケージに収容し、水は自由に摂取させ、1 日 1 回、犬用固形飼料（Purina Dog Chow）及びイヌ用缶詰（Ken-L-Ration 缶）を与えた。

オンキャスパー投与 2 週間前に一晩尿及び空腹時血液を採取した。投与前日に身体検査を実施した。初回投与後 6 日目では一晩尿及び空腹時血液を採取した。翌日、薬物の 2 回目を投与した。2 回目投与後 1 週目の一晩尿及び空腹時血液を採取した。

一般状態観察、摂餌量及び飲水量測定：毎日実施した。

体重測定：週 1 回行った。

尿検査：初回投与の 1 週間後及び 2 回目投与の 1 週間後に尿を採取し、以下の項目検査を行った。

色、比重、pH、蛋白質、糖、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲン
血液学的検査：初回投与の 1 週間後及び 2 回目投与の 1 週間後に採血して、以下の項目を測定した。
赤血球数、総白血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、平均赤血球容積、白血球分画
血液化学的検査：血液学的検査と同時期のサンプルを用いて以下の項目を測定した。
GOT、GPT、ALP、総蛋白、BUN、糖、クレアチニン、Ca、リン酸塩、T-bil、D-bil、ALB、Cl、Na、K、T-CHO、LDH、CGT、グロブリン、アミラーゼ
血漿 L-アスパラギナーゼ濃度測定：活性が検出されなくなるまで（2 回目の投与から 4 週後まで）定期的に測定した。同時に体重測定も行った。

結果
一般症状、体重：一般状態では、試験期間中、オンキャスパー投与に関連すると思われる変化はみられなかった。体重は、現状維持又は増加した。
血液学的検査：白血球が下表に示すように、全般的には投与前値に比較して 1 回目投与後 1 週間目では低下し、2 回目投与後 1 週間目では投与前値とほぼ同様であった。

表 3.1:1　　オンキャスパー200 IU/kg 投与後の血球数

Dog number	Sex	Route	Control	Leukocytes × 10^3	
				One week after 1st dose	One week after 2nd dose
245984	M	i.v.	8.4	5.2	7.4
245062	M	i.m.	9.4	5.6	9.7
245038	F	i.v.	11.7	7.7	11.8
244783	F	i.m.	10.0	8.9	9.0

尿検査：投与前値に比較して大きな変動はみられなかった。
血液化学的検査：表 3.1:2 に示すように、筋肉内投与の雄 1 例に 2 回目投与の 1 週間後に ALT が投与前値に比して約 5 倍上昇した。その他の検査項目では、投与前値に比較して大きな変動はみられなかった。

表 3.1:2　　オンキャスパー200 IU/kg 投与後の ALT 値

Dog number	Sex	Route	Control	sALT (IU/L)	
				One week after 1st dose	One week after 2nd dose
245984	M	i.v.	35.0	55.0	18.0
245062	M	i.m.	38.0	52.0	257.0
245038	F	i.v.	28.0	16.0	20.0
244783	F	i.m.	29.0	30.0	58.0

血漿 L-アスパラギナーゼ活性測定：活性値の結果は、【2.6.4　薬物動態試験の概要文】に記載した。

結論

この試験において、オンキャスパーは生存率、一般状態、体重、摂餌量及び飲水量に影響を与えなかった。

オンキャスパー投与に関連すると思われる変化として、1 回目投与後に総白血球数の低下及び血液化学的検査で 2 回目投与後の雄 1 例に ALT の上昇がみられたが、その変化を踏まえて、本実験条件においては、イヌに忍容性があると判断される。

3.2　イヌの静脈内あるいは筋肉内投与における 2 週間反復投与毒性試験（パート 2）

【Report NP39221】

目的

本試験は、GLP 規制、21 CFR、Part 58 に従って実施され、その結果は公表された［1,2］。本試験の目的は、オンキャスパーの 1200 IU/kg をイヌの静脈内又は筋肉内に週 1 回 2 週間投与して、その毒性を明らかにすることである。

方法

0.05 M PBS pH 7.3 に溶解したオンキャスパー（バッチ#[redacted]、[redacted]）1200 IU/kg をイヌ（ビーグル体重 7.7～9.0 kg）の雌雄各 1 匹に頭静脈内又は筋肉内に週 1 回 2 週間投与した。なお、筋肉内投与は、両後肢に分割投与した。

本試験に使用したイヌは、上記 3.1 に記載した試験に用いたイヌを 6 週間回復期間後に使用した。

オンキャスパー投与前に、各イヌから一晩尿及び空腹時血液の採取と身体検査を行った。翌日にオンキャスパーを初回投与した。初回投与後 6 日目に、一晩尿及び空腹時血液を採取した。翌日、2 回目の投与を行った。さらに 2 回目投与 1 週間後に同様のサンプルを採取した。

一般状態、摂餌及び飲水状況：毎日確認した。

体重測定：初回投与前日、初回投与後 1 週間目、及び 2 回目投与後 1 週間目、5 週間目、及び 8 週間目に測定した。

尿検査：pH、蛋白質、グルコース、ケトン、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲンを測定した。

血液学的検査：赤血球数と総白血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、平均赤血球容積及び白血球分画を測定した。

血液化学的検査：標準的項目について実施した。

尿及び血液検査は、投与前日、初回投与後 1 週間目、2 回投与後 1 週間目に測定した。

血漿アスパラギナーゼ活性：初回投与後 24 時間及び 48 時間後については全例測定し、その後は検出限界以下になるまで毎週（2 回目投与後 5 週間目まで）測定した。

結果

一般状態及び体重：一般状態では、試験期間中、オンキャスパー投与に関連するとみられる変化はみられなかった。体重は、以下の表に示すように、体重増加抑制傾向がみられたが、アスパラギナーゼ活性が血液中から消失時（2 回目の投与から 5 週間後）には、全動物で増加した。

表 3.2:1　　オンキャスパー1200 IU/kg 投与時の体重変化

Dog number	Sex	Route	Control	One week after 1st dose	One week after 2nd dose	Five week after 1st dose	Five week after 2nd dose
245984	M	i.v.	7.7	8.1	7.7	8.1	9.0
245062	M	i m.	9.0	9.9	9.0	9.9	10.9
245038	F	i.v.	7.7	8.1	7.7	8.1	8.6
244783	F	i m.	7.7	8.1	7.7	8.1	9.0

尿検査：投与前値と差はなかった。

血液学的検査：全例において投与前値とほぼ同様であった。

血液化学的検査：全般的には投与前値に比してほぼ同様であった。ただし、筋肉内投与の雄において 2 回目投与 1 週間後に ALT がわずかに上昇した。以下の表に 1200 IU/kg 投与時の ALT 値を示す。

表 3.2:2　　オンキャスパー1200 IU/kg 投与時の ALT 値

Dog number	Sex	Route	Control	sALT (UI/L)	
				One week after 1st dose	One week after 2nd dose
245984	M	i.v.	62.0	30.0	50.0
245062	M	i m.	61.0	31.0	143.0
245038	F	i.v.	26.0	15.0	21.0
244783	F	i m.	41.0	39.0	30.0

血漿 L-アスパラギナーゼ活性：結果は、【2.6.4　薬物動態試験の概要文】に記載した。

結論

本試験条件下では、一過性の体重増加抑制がみられたが、その他の検査ではオンキャスパー投与に関連すると考えられる変化はみられなかった。

「イヌの静脈内又は筋肉内投与における 2 週間反復投与毒性試験」のパート 1 及び 2 のオンキャスパー投与に関連する変化の概要を以下の表に示す。

表 3.2:3　　イヌの静脈内又は筋肉内投与における 2 週間反復投与毒性試験の変化の概要

Number of animals	Dose (IU/kg)	Route	Observations
1M + 1F	200	i.v.	Decreased WBC after first dose (1M)
1M + 1F	200	i.m.	Decreased WBC after first dose (1M + 1F): Elevation in sALT after second i m. dose (1M)
6 week washout			
1M + 1F	1200	i.v.	Decreased body weight gains
1M + 1F	1200	i.m.	Decreased body weight gains; Elevation in sALT after second i.m. dose (1M)

3.3　ラット腹腔内 28 日間反復投与毒性試験

【Report NP39233】

目的

本試験は、GLP 規制、21 CFR、Part 58 に従って実施し、その結果は公表された［1］。本試験の目的は、オンキャスパーのラット腹腔内反復投与における毒性評価である。

方法

使用動物：ウィスター系ラット雄（体重が 280～350 g、平均体重が 310 g）及び雌（体重が 190～230 g、平均体重 210 g）を各 6 匹/群を使用した。

投与量・群構成：以下に示すように、投与量は、0（溶媒対照）、10、30 及び 60 IU/kg とし、腹腔内反復投与（5 回/週、4 週間）を行った。

Controls:	6 males and 6 females received 0.3 mL of 0.05 M PBS, pH 7.3.
	6 males and 6 females at 10 IU/kg
	6 males and 6 females at 30 IU/kg
	6 males and 6 females at 60 IU/kg

なお、60 IU/kg 投与群の雄 4 匹が投与 1 週目に肺炎で死亡したため、当該群に 4 匹を追加した。

一般状態：毎日実施した。

体重測定：毎週測定し、その体重を用いて投与量を再計算した。

剖検：オンキャスパーを投与した各群の雌雄各 2 匹は、投与 2 週間後に剖検した。残りの全動物は、4 週間後に剖検した。

尿検査：投与前及び剖検直前に各群雌雄各 2 匹の一晩尿を採取し、pH、蛋白質、糖、ケトン体、ビリルビン、潜血及びウロビリノーゲンを測定した。

血液学的検査：総白血球数及び赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、平均赤血球容積、及び白血球分画を測定した。

血液化学的検査：以下の項目について測定した。

GOT、GPT、ALP、TP、BUN、GLU、CRE、Ca、ALP、T-Bil、D-Bil、Alb、Cl、Na、K、T-CHO、LDH、GGT

臓器重量測定：脳、腎臓、副腎、精巣、心臓、肝臓、脾臓について測定した。
病理組織学的検査：脳、甲状腺、肺臓、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、胃、膵臓、大腸、小腸、膀胱、精巣、子宮、卵巣、胸腺、目、骨、及び皮膚について実施した。

結果
一般状態：試験期間中、投与に関連すると思われる変化は、みられなかった。ただし、その他の変化として試験期間を通して、溶媒対照群の雄 1 例、オンキャスパー投与群の雄 5 例及び雌 3 例が死亡した。いずれも死因は、肺炎と診断された。これらの死亡のうち、60 IU/kg 投与群の 4 例が投与 1 週目の間で死亡したので、当該群に 4 匹を追加した。
体重：オンキャスパー投与群の増加は、溶媒対照群と同様であった。
尿検査：溶媒対照群と投与群とは同様であった。なお、溶媒対照群及び投与群において潜血がみられた。
血液学的検査：投与群の値は、正常な変動範囲内で、溶媒対照群と同様であった。
血液化学的検査：投与群の値は、正常範囲内であり、溶媒対照群と同様であった。
臓器重量：脾臓の重量は、溶媒対照群に比して、低い値を示した。その他の臓器については、溶媒対照群と同様であった。
病理組織学的検査：オンキャスパー投与に関連すると思われる変化は認められなかった。

結論
本試験条件下で、オンキャスパー投与に関連する変化としては、脾臓重量の用量相関的減少が認められた。本変化は、オンキャスパーの免疫抑制作用に起因すると思われた。
本試験期間中に溶媒対照群を含めて複数の死亡がみられたが、いずれも肺炎と診断された。また、対照群及び投与群にみられた尿潜血についてはその正確な理由は不明である。しかし、ヘモグロビン尿は、はしかやおたふく風邪などのウイルス感染に併発することが知られていることから、おそらく肺炎に付随する変化と思われる。オンキャスパーの安全性評価の概要を表 3.3:1 に示した。

表 3.3:1　ラット腹腔内 28 日間反復投与毒性試験における変化の概要

Number of animals	Doses (IU/kg)	Observations
6M + 6F	Controls	Death[a] 1M Blood in urine[b] (M + F)
6M + 6F	10	Death[a] (1F) Blood in urine[b] (M + F)
6M + 6F	30	Blood in urine[b] (M + F) Decreased weight of spleen[c] (1M + 4F)
6M + 6F	60	Death[a] (5M + 2F) Blood in urine[b] (M + F) Decreased weight of spleen[c] (1M + 2F)

a　death due to pneumonia
b　blood in urine could be due to pulmonary infection
c　without histopathological changes
Note: animals in this study suffered from pneumonia

3.4　ラット筋肉内 4 週間反復投与毒性試験

【Report NP39218】

目的

本試験は、GLP 規制、21 CFR、パート 58 に従って実施し、その結果は公表された［1］。本試験の目的は、オンキャスパーのラット筋肉内 4 週間反復投与における毒性及び血漿アスパラギナーゼ活性を評価することである。

方法

使用動物：ウィスター系ラットの雌雄各 30 匹を使用した。使用時体重は、雄では 160～240 g（平均体重 210 g）、雌では体重 140～260 g（平均体重 177 g）であった。
投与経路：予想臨床投与ルートのひとつである筋肉内投与とした。
投与期間：週 5 回、4 週間投与した。
群構成：溶媒対照（雌雄各 6 匹）、オンキャスパー（バッチ#[redacted]）100、200 及び 400 IU/kg（各用量雌雄各 8 匹）
一般状態：毎日観察した。
体重測定：毎週 1 回測定し、測定ごとに次週の投与液量を再計算した。
尿検査：各群の雌雄各 2 匹を代謝ケージに収容し、一晩尿を採取し、以下の項目を測定した。
色、比重、pH、蛋白質、糖、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲン、尿沈渣
血液学的検査：剖検時採取した血液で以下の項目を検査した。
白血球、赤血球、ヘモグロビン、ヘマトクリット、平均赤血球容積、白血球百分率
血液化学的検査：剖検時採取した血漿を用いて以下の項目を測定した。
GOT、GPT、ALP、TP、BUN、GLU、CRE、Ca、ALP、T-Bil、D-Bil、Alb、Cl、Na、K、T-CHO、LDH、GGT

血漿アスパラギナーゼ測定：投与 1、7、8、9、11 日目に、各群雌 3 匹から採取した血液を用いて測定した。採取は、投与前に尾静脈から行った。
剖検及び臓器重量：剖検後、脳、腎臓、副腎、精巣、心臓、肝臓、脾臓を測定した。
病理組織学的検査：以下の臓器・組織について 検査を行った。
脳、甲状腺、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、胃、膵臓、大腸、小腸、膀胱、精巣、子宮、卵巣、胸腺、目、骨、皮膚

結果
トキシコキネティクス：結果は【2.6.4　薬物動態試験の概要文】に報告した。
一般状態：一般状態では、試験期間中溶媒対照群の雌雄各 1 例、投与群の雄 5 例、雌 2 例が死亡し、その後肺炎と診断された。それ以外の動物では異常な症状はみられなかった。
体重：投与群の雄には変化はなかったが、雌において体重増加抑制がみられた。
血液学的検査：溶媒対照群に比して、平均赤血球容積のわずかな低値が全投与群においてみられた。さらに、ヘモグロビン及びヘマトクリット値のわずかな低値が、200 IU/kg 及び 400 IU/kg 投与群の雌で観察された。
尿検査：潜血、蛋白質、及びケトンの出現が溶媒対照群を含めて全投与群においてみられた。これらの所見は、肺感染症に起因するものと思われた。
血液化学的検査：BUN の軽度の増加が 400 IU/kg 投与群の雄に、AST の軽度増加が、400 IU/kg 投与群の雌に、ALP の増加が全投与群に、及び TP の低下が 400 IU/kg 投与群の雌雄でみられた。
臓器重量：脾臓重量の減少が全投与群の雌雄に、肝臓重量の減少が 400 IU/kg 投与群の雌に認められた。
病理組織学的検査：各種組織において炎症性を含む形態学的変化が、溶媒対照群及び投与群に同様な頻度と程度で発生した。また、多くの動物に、多様な肺病変がみられたが、オンキャスパー投与に関連する組織形態学的変化はみられなかった。

以上の変化の概要を表 3.4:1 に示す。

表 3.4:1　　ラット筋肉内 4 週間反復投与毒性試験における変化の概要

Number of animals	Doses (IU/kg)	Observations	AP (F) ± SD IU/L	AST (F) ± SD IU/L
6M + 6F	Control	Death[a] (1M + 1F) Blood in urine[b] (M)	162.20 ± 24.74	248.00 ± 27.84
8M + 8F	100	Death[a] (3M + 1F) Blood in urine[b] (M + F) Elevated AP (F) Decreased weight of spleen[c] (2M + 2F)	291.00 ± 58.74	214.29 ± 75.12

表 3.4:1　ラット筋肉内 4 週間反復投与毒性試験における変化の概要（続き）

Number of animals	Doses (IU/kg)	Observations	AP (F) ± SD IU/L	AST (F) ± SD IU/L
8M + 8F	200	Death[a] (1M) Decreased body weight gains (F) Low haemoglobin, haematocrit (F) Elevated AP (F) Decreased weight of spleen[c] (4M + 6F)	251.88 ± 77.35	233.88 ± 88.25
8M + 8F	400	Death[a] (1M +1F) Decreased body weight gains (F) Blood in urine[b] (M + F) Low haemoglobin, haematocrit (F) Elevated AST (F), AP (F) Slightly decreased total protein (M + F) Decreased weight of spleen[c] (4M + 6F) Decreased weight of liver[c] (F)	302.57 ± 103.94	304.00 ± 45.37

a　death due to pneumonia,
b　blood in urine could be due to pulmonary infection,
c　without histopathological changes
p<0.05 compared with control values
Note: animals in this study suffered from pneumonia

結論

本試験で認められた変化を上記の表に示した。このうち、オンキャスパー投与に関連すると思われる変化は、ヘモグロビンの低下、ヘマトクリットの低下、AST の増加、ALP の増加、TP の低下、脾臓重量の減少及び肝臓重量の減少であった。なお、脾臓重量の減少は、オンキャスパーの免疫抑制作用との関連性が高いと推察される。
その他にみられた変化は、いずれも肺炎などの感染症に関連するものと思われた。
アスパラギナーゼ活性は用量依存的であり、400 IU/kg 投与群で高値を示した。
なお、本試験では肺炎が発症したため、オンキャスパーの毒性評価に影響した可能性があることから追加試験を実施した。

3.5　ラット腹腔内 4 週間反復投与試験（追加試験）

【Report NP39213】

目的

本試験は、GLP 規制、21 CFR、Part 58 に従って実施した。本試験の目的は、ラット筋肉内 4 週間反復投与試験【Report NP39218】において、溶媒対照群を含めて肺炎が発症したことから、オンキャスパーの毒性評価において肺炎の影響を確認するために、当該試験の最高用量である 400 IU/kg を腹腔内 4 週間反復投与で行った。

方法

使用動物：Sprague Dawley ラットの雌雄各 12 匹を使用した。
投与経路・期間：腹腔内に週 5 回、4 週間反復投与した。

群構成：溶媒対照群に雌雄各 6 匹、400 IU/kg 投与群に雌雄各 6 匹を使用した。
一般状態：毎日観察した。
体重測定：毎週 1 回測定し、測定ごとに次週の投与液量を再計算した。
摂餌量測定：週 1 回測定した。
飲水観察：一般状態観察時に飲水瓶の残留状況にて観察した。
尿検査：各群の雌雄各 2 匹を代謝ケージに収容し、一晩尿を採取し、以下の項目を測定した。
色、比重、pH、蛋白質、糖、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲン、尿沈渣
血液学的検査：剖検時採取した血液で以下の項目を検査した。
白血球、赤血球、ヘモグロビン、ヘマトクリット、平均赤血球容積、白血球百分率
血液化学的検査：剖検時採取した血漿を用いて以下の項目を測定した。
GOT、GPT、ALP、TP、BUN、GLU、CRE、Ca、ALP、T-Bil、D-Bil、Alb、Cl、Na、K、T-CHO、LDH、GGT
剖検及び臓器重量：剖検後、以下の臓器重量を測定した。
心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、卵巣、胸腺
病理組織学検査：以下の臓器・組織を 10%中性緩衝ホルマリンに固定後、検査を行った。
心臓、肝臓、脾臓、腎臓、胸腺、卵巣、精巣、膵臓

結果
一般状態：死亡は発生しなかった。その他の一般状態は、オンキャスパー投与に関連すると思われる変化はみられなかった。
体重：投与後 1 週目において投与群のすべての雌及び雄 2 例で有意な体重減少が観察された。その後、体重は増加したが、溶媒対照群に比してその増加は小さかった。
飲水状況・摂餌量：飲水状況は溶媒対照群と同様であった。摂餌量は、溶媒対照群に比して、投与 1 週目で雌雄ともに抑制された。その後、雌は抑制が回復傾向を示した。一方、雄は 2 週目以降溶媒対照群を下回ったままであった。
尿、血液検査：投与群の値は、溶媒対照群に比してほぼ同様であった。
臓器重量：投与群の雄の絶対臓器重量は、対照群より低かった。しかし、相対重量では、溶媒対照群に比して同等であった。一方、雌では、絶対重量及び相対重量ともに溶媒対照群と同等であった。ただし、脾臓重量については、有意の減少がみられた。
病理組織学的検査：溶媒対照群と同様であった。

結論
　オンキャスパー投与に関連すると思われた変化は、摂餌量減少、体重の減少と増加抑制、臓器全般での絶対重量減少、及び脾臓重量の減少がみられた。その他の検査（一般状態、血液検査）において変化はみられなかった。

この追加試験から、以前実施したラット筋肉内 4 週間反復毒性試験【Report NP39218】で発生した尿及び血液にみられた変化は、オンキャスパー投与に起因するものではなく、肺感染症に基づく変化であると判断された。

以下の表に本試験の変化の概要を示す。

表 3.5:1　　ラット腹腔内 4 週間反復投与毒性試験における変化の概要

Number of Animals	Doses (IU/kg)	Observations
6M + 6F	Controls	None
6M + 6F	400	Decreased bodyweight gains (M + F) Decreased weight of spleen[a] (M + F)

Evaluations included: survival, appearance, behavior, food and water consumption, bodyweight, organ weights, hematology, blood chemistry, urinalysis, gross pathology and histopathology.

a　without histopathological changes

3.6　マウス腹腔内又は筋肉内 3 カ月反復投与毒性試験

【Report NP39210】

目的

本試験は、GLP 規制、21 CFR、Part 58 に従って実施し、その結果は公表された［1］。本試験の目的は、オンキャスパーをマウスの腹腔内及び筋肉内に反復投与し、その毒性評価をすることである。

方法

使用動物：Swiss-Webster マウスの雌雄各 40 匹（31～40 g）。

投与経路：腹腔内及び筋肉内投与。

投与期間：腹腔内投与は、1 回/週にて計 14 回投与し、13 週目に剖検した。筋肉内投与は、1 回/週にて計 17 回投与し、17 週後に剖検した。

投与量・群構成：群構成は、以下のように溶媒対照群、投与群として 50、200、500 IU/kg の 3 群を、各群に雌雄各 5 匹を設けた。

群構成

Controls: Controls:	5 males and 5 females 0.1 mL of PBS i m. 5 males and 5 females 0.1 mL of PBS i.p.
	5 males and 5 females at 50 IU/kg i.m. 5 males and 5 females at 50 IU/kg i.p.
	5 males and 5 females at 200 IU/kg i.m. 5 males and 5 females at 200 IU/kg i.p.
	5 males and 5 females at 500 IU/kg i.m. 5 males and 5 females at 500 IU/kg i.p.

一般状態：毎日観察した。

体重測定：毎週 1 回測定し、測定ごとに次週の投与液量を再計算した。
剖検及び臓器重量：剖検後、脳、腎臓、副腎、精巣、心臓、肝臓、脾臓の重量を測定した。
病理組織学的検査：以下の臓器・組織の検査を行った。
脳、甲状腺、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、胃、膵臓、大腸、小腸、膀胱、精巣、子宮、卵巣、胸腺、目、骨、皮膚

結果
一般状態観察：オンキャスパー投与に関連する変化は、両投与経路において認められなかった。ただし、雌において真菌感染による脱毛及び数例の死亡が発生した。死亡はオンキャスパーに関連するものではなく、肺感染症、陰茎潰瘍、技術的エラーなどによるものと判断された。
体重：両投与経路の 500 IU/kg 投与の雌で体重増加抑制がみられた。
臓器重量：全投与群の値は、溶媒対照群とほぼ同等であった。ただし、500 IU/kg 投与群の雄 1 例、雌 2 例の脾臓重量は、減少した。
病理組織学： 500 IU/kg 腹腔内投与群の雄 3 例及び雌 4 例の肝において肝細胞の細胞質に羽毛状の水疱性変化が観察された。また、同群雄 3 例において、ごく軽度の門脈周囲性肝細胞萎縮が観察された。しかしこれらの肝細胞の変化には、細胞の変性又は壊死を伴わなかった。
500 IU/kg筋肉内投与群では、投与に関連すると思われる病理組織変化は認められなかった。なお、投与局所での変化は、局所投与における創傷治癒過程の変化と判断された。

結論
本試験で認められた変化の概要を以下の表 3.6:1 及び表 3.6:2 に示したが、そのうち、投与に関連する変化としては、腹腔内投与で高用量群の雌の体重増加抑制、脾臓重量の減少及び肝細胞の軽微な変化が、筋肉内投与では、高用量群の雌の体重増加抑制及び投与局所の変化がみられた。なお、脾臓重量の減少は、オンキャスパーの免疫抑制作用によるものと考えられる。

表 3.6:1　　マウス腹腔内 3 カ月反復投与毒性試験変化概要

Number of animals per sex	Doses (IU/kg)	Observations
5M + 5F	Controls	None
5M + 5F	50	Death[a] (2M)
5M + 5F	200	None
5M + 5F	500	Decreased body weight gains (Females) Decrease weight of spleens[b] (1M + 2F) Histopathological changes in liver[c] (3M + 4F)

EVALUATIONS INCLUDED: survival, appearance, behavior, body weight, organ weights, gross pathology, and histopathology.
a　death due to a pulmonary infection
b　without histopathological changes
c　no evidence of necrosis

表 3.6:2　マウス筋肉内 3 カ月反復投与毒性試験変化概要

Number of animals per sex	Doses (IU/kg)	Observations
5M + 5F	Controls	None
5M + 5F	50	Death[a] (1M + 1F)
5M + 5F	200	Death[a] (3M)
5M + 5F	500	Death[b] (1M) Decreased body weight gains (Females)

EVALUATIONS INCLUDED: survival, appearance, behavior, body weight, organ weights, gross pathology, and histopathology.

a　death due to pulmonary infection or to an ulcer

b　death due to technical error

3.7　ラット腹腔内 3 カ月反復投与毒性試験

目的

本試験結果は公表された［3］。本試験の目的は、オンキャスパーのラット腹腔内 3 カ月間反復投与における毒性を評価することである。

方法

オンキャスパーの 0、200、800、3000 IU/kg を雌雄各 10 匹に 3 カ月間連日（5 回/週）投与し、一般状態、体重測定、血液学的検査、血液化学的検査及び病理学的検査を実施した。

結果

一般状態及び体重：体重は、以下の図に示すように 800 及び 3000 IU/kg 投与群の雄でわずかに体重増加抑制が観察されたが、同用量群の雌には変化はなかった。

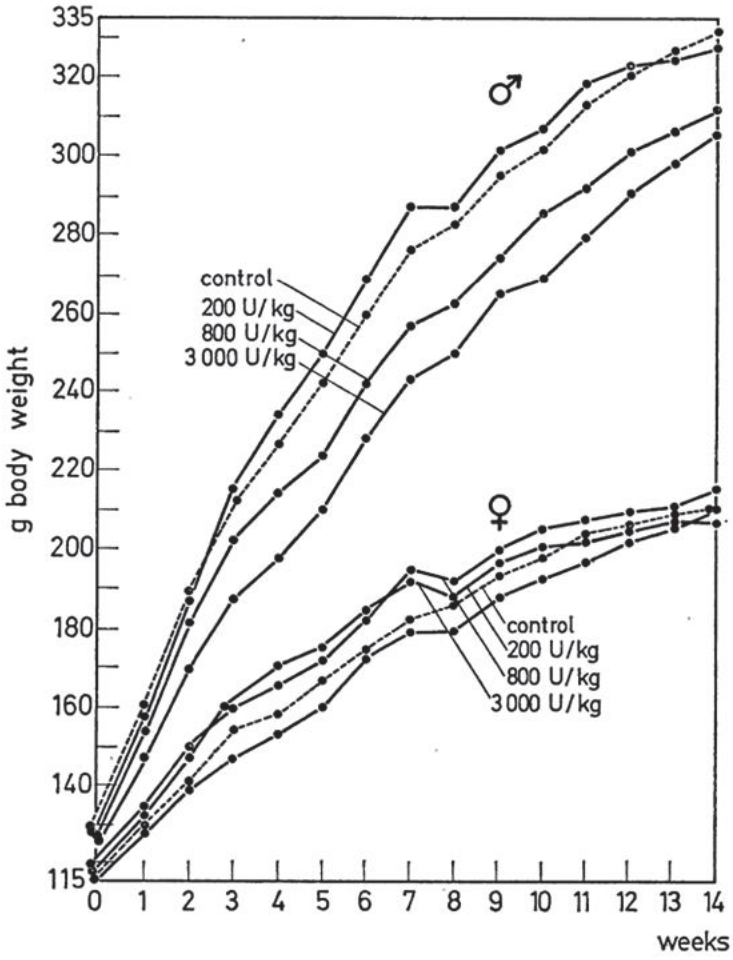


図 3.7:1　　ラット腹腔内 3 カ月反復投与毒性試験体重曲線

血液学的及び血液化学的検査：投与群と対照群の間に差異はみられなかった。
剖検、臓器重量：投与に関連すると思われる変化はなかった。
病理組織学的検査：軽度の脂肪浸潤を伴う門脈周囲性肝細胞腫大及び胸腺皮質の拡大がみられた。

結論

本試験条件下では、死亡を引き起こさず、一般状態、血液学的、血液化学的及び病理学的の各検査において、オンキャスパー投与による明らかな毒性変化はみられなかった。

3.8　イヌ静脈内 3 カ月反復投与毒性試験

目的

本研究の結果は公表された［3］。本研究の目的は、オンキャスパーをイヌの静脈内に 3 カ月間反復投与における毒性を評価することである。

方法

オンキャスパーの 0、200、800、3000 IU/kg の用量をイヌ（各群雌雄 3 匹）の静脈内に 3 カ月間連日（5 回/週）投与し、一般状態、体重測定、尿検査、心電図検査、眼科検査、血液学的検査、血液化学的検査、剖検及び病理組織学検査を行った。

結果

一般状態・体重：一般状態は、全般的に投与群の一部に明らかな毒性の兆候を示したが、死亡はなかった。3000 IU/kg 投与群は、注射の 1～2 時間後に嘔吐がみられた。その後、嘔吐頻度は減少し、投与 4 週間目には消失した。

体重は、以下の図に示すように最高用量群において顕著な減少がみられ、その後は増加抑制が継続した。

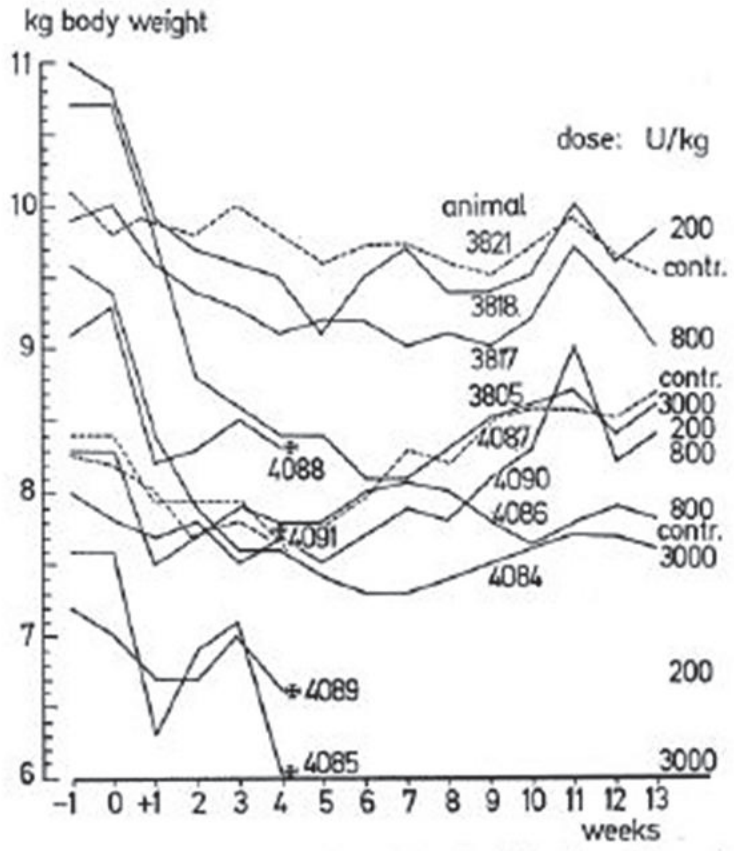


図 3.8:1　　イヌ静脈内 3 カ月反復投与毒性試験における雌体重曲線

臨床病理学的検査：ブロムサルファレン（BSP）試験のわずかな増加が 1 例に、別のイヌに AST 及び ALT の一過性の上昇及び、肝臓の軽微な変化がみられた。

この変化の発生状況は、著しい体重減少及び症状とは対照的であった。

剖検：投与 4 週目の途中剖検において、胸腺の完全な萎縮がみられた。3 カ月の試験期間終了時点の剖検では胸腺サイズの縮小はみられたが、完全な萎縮は確認されなかった。
病理組織学的検査：最高用量群の 1 例で、肝細胞に微細滴状の脂肪浸潤が軽度にみられた。

結論

最高用量群においてのみ、嘔吐、体重減少、低悪性度の肝毒性などの毒性兆候を示した。 本試験条件下において、200 及び 800 IU/kg の用量は、イヌの雌雄ともに忍容性を示した。

4.　変異原性試験

オンキャスパー（75 IU/プレート、バッチ#[redacted]）は、代謝活性化の有無にかかわらず Ames 試験で *Salmonella typhimurium* TA97a、TA98、TA100、及び TA102 株に対して復帰突然変異性を示さなかった【Report NP39215】。

Adamson［4］は、L-アスパラギナーゼを投与した妊娠ウサギ（母体及び胎児）における核型への影響を検討したが、異常はみられなかった。さらに、*in vitro* 試験において、L-アスパラギナーゼは核型異常を示さず、ウサギの培養白血球細胞の有糸分裂指数を減少させた。

5.　がん原性試験

オンキャスパーの申請適応症から適用外である。

6.　生殖発生毒性試験

6.1　オンキャスパーの生殖発生毒性試験

生殖発生毒性試験は、実施しなかった。

6.2　L-アスパラキナーゼの生殖発生毒性試験

L-アスパラギナーゼの胚毒性試験では、ラット及びウサギにおける催奇形性を有することを示唆した。臨床予想投与量の用量域で奇形と胚死が観察された。生殖能力及び出生前後の発達への影響についての試験は実施されていない。

L-アスパラギナーゼは、ラットの培養胚の頭部形成期（9.5 日）に催奇形性を示すことが、摘出ラット胚の培養法で確認された。培養液に 1.5 IU/mL の L-アスパラギナーゼを添加した 9.5 日目の胚は、脳、目、顔、及び体幹の奇形とともに成長及び発達の遅延を示した。神経外胚葉の変化は、病理組織学的検査において頭部の強度血管拡張が観察された。しかし、10.5 日処理では、対照群と比較して成長率と蛋白質含有量にわずかな違いしか生じなかった［5］。

その後の研究では、0.05～1.5 IU/mL の L-アスパラギナーゼを投与したところ、胚期 10.5 日及び 11.5 日において内臓の卵黄嚢内胚葉細胞の変形が観察された。これらの結果から、L-アスパラギナーゼには、主に若い胚（卵黄嚢への陥入前）に直接作用するものと、卵黄嚢を介して作用するものの 2 つの催奇形性メカニズムを有することが示唆された［6］。

L-アスパラギナーゼの *in vivo* 試験での催奇形性については、いくつかの研究が行われている。哺乳類における結果のスペクトルは、ラットでは特別な現象がみられないものから、ウサギやラットでは主に中枢神経系、心臓や骨格の異常、胃捻転、尾部欠損などの奇形がみられるものまで様々である［5］。

L-アスパラギナーゼの胚毒性及び催奇形の種差について、Adamson［4］が述べている。New Zealand ウサギに L-アスパラギナーゼの 50 又は 100 IU/kg を妊娠 8 日目と 9 日目に投与したところ先天性奇形を伴う生存胎児が観察された。50 IU/kg において、新生ラットの 6%～11%に先天性奇形が認められ、膀胱、腸及び肝臓の外転等がみられた。100 IU/kg において、60%～100%の胎芽の再形成をもたらした。対照的に、Sprague Dawley ラットに L-アスパラギナーゼの 100 及び 1000 IU/kg を妊娠 7 日目及び 8 日目に静脈内投与したところ、胚毒性は観察されなかった。

さらに、ラットに L-アスパラギナーゼを 300、1000、3000、10000 IU/kg を静脈内投与したところ、1000 IU/kg において小眼球症 1 例及び脊椎奇形 1 例、3000 IU/kg において exenteria1 例、小眼球症 4 例及び胸郭裂 2 例、10000 IU/kg において胎児吸収が全例で認められ、明らかな用量相関性をもって胚毒性及び奇形を誘発した。この場合では 1000 IU/kg の用量から胎児に奇形（小眼球症、脊椎奇形、胸郭裂、exenteria）を引き起こした［3］。

7.　局所刺激性試験

オンキャスパーの筋肉内投与における局所刺激性は、マウスでの 17 週間の毒性試験【Report NP39210】の投与局所の肉眼的及び病理組織学的所見で、500 IU/kg 投与群の雌 1 例で散在性の単核細胞と伴う筋線維再生が認められたが、これは局所投与における創傷治癒過程の変化と判断されたことから、忍容性があることが示された。

オンキャスパー凍結乾燥製剤について、以下の試験を実施した。

7.1　マウスの足底内投与局所刺激性試験

【Report NP39209】

目的

オンキャスパー液体製剤への 5%精製白糖添加が、左後足足底内皮下投与後のマウスの行動に及ぼす影響を評価することである。

方法

群構成

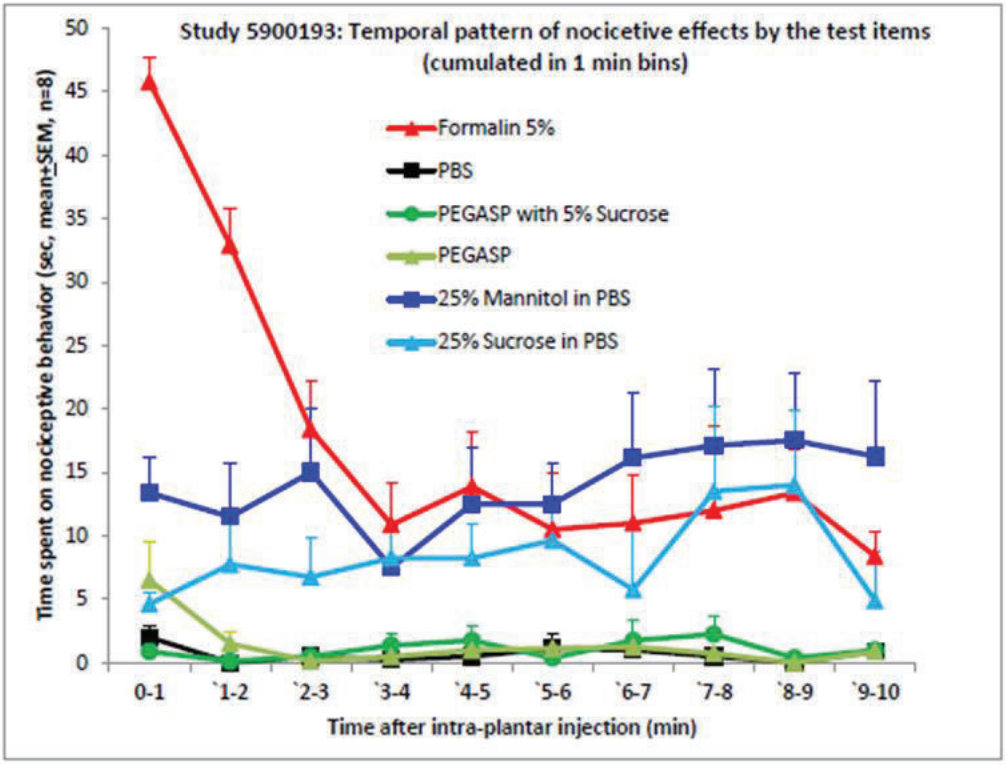
被検物質 A［オンキャスパー液体製剤（PEGASP）に 5%精製白糖を添加］、被検物質 B（PEGASP）、被検物質 C（25%マンニトール含有 PBS）及び被検物質 D（25%精製白糖含有 PBS）、陽性対照（5%ホルマリン）及び陰性対照（PBS）の群を設けた。

評価項目

投与後 10 分間、投与した足を噛む、なめる、振る、たじろぐなどの行動異常を 1 分単位の秒数で測定した。また、投与足の腫れ及び発赤の程度について個別に記録した。

結果

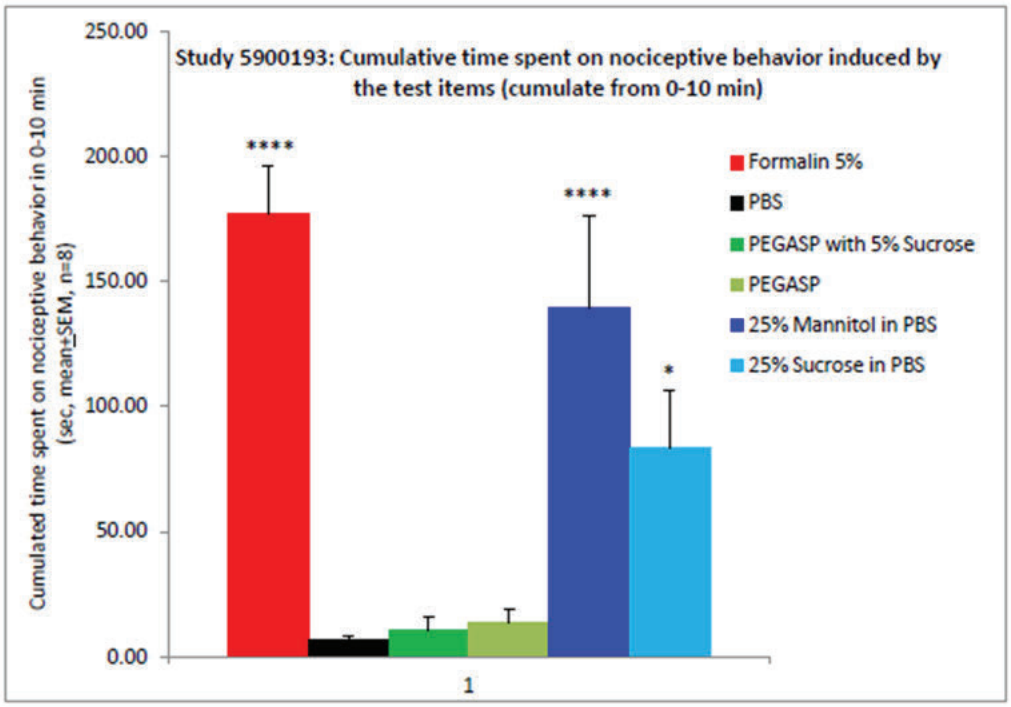
図 7.1:1 に示すように、陽性対照である 5%ホルマリンは、足底内投与直後に行動異常が発生し、時間の経過とともに徐々に軽減し、投与後 10 分ではまだ若干の行動異常がみられた。一方、陰性対照群では、行動異常を示さなかった。試験項目のうち、被検物質 A 及び B は、有意な行動異常を誘発しなかった。被検物質 C 及び D は、評価の全時間を通して、持続的行動異常を引き起こし、被検物質 C がやや強く認められた。



Temporal pattern of nociceptive behavior in mice upon intra-plantar injections with 5% formalin, Phosphate Buffered Saline (PBS), Test Item A (Oncaspar liquid, referred to as 'PEGASP' with 5% Sucrose), Test Item B (Oncaspar liquid, referred to as PEGASP), Test Item C (25% Mannitol in PBS) and Test Item D (25% Sucrose in PBS). Each data point represents mean + standard error of mean (SEM) of time in seconds spent on nociceptive behavior by the mice in one minute bin.

図 7.1:1　　マウス足底内投与における行動異常（継時推移）

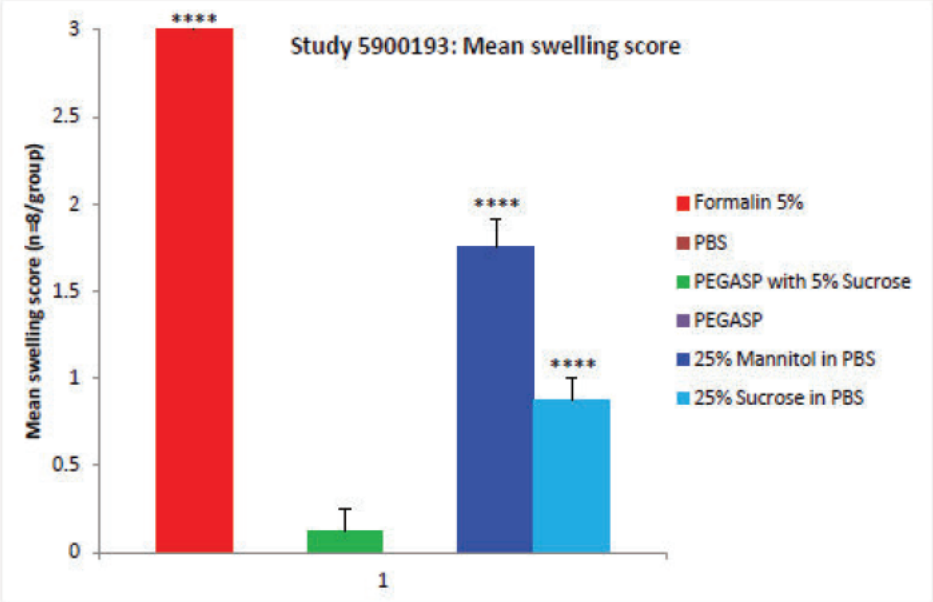
合計 10 分間における行動異常発生累積時間を以下の図 7.1:2 に示した。陰性対照群に比して統計的に有意な差を示したのは、陰性対照群及び被験物質 C 及び D であった。



upon intra-plantar injections with 5% Formalin, Phosphate Buffered Saline (PBS), Test Item A (Oncaspar liquid, referred to as 'PEGASP' with 5% Sucrose), Test Item B (Oncaspar liquid, referred to as 'PEGASP'), Test Item C (25% Mannitol in PBS) and Test Item D (25% Sucrose in PBS). Each column represents mean + standard error of mean (SEM) of total time in seconds spent on nociceptive behavior by the mice during 0-10 minutes. '*' indicates $p<0.05$ and '****' indicates $p<0.0001$ compared with the PBS-treated group.

図 7.1:2　　マウス足底投与における行動異常（累積時間）

足の腫脹及び発赤スコアの結果を以下の図 7.1:3 に示した。行動異常累積時間で対照群に比して統計的有意差を示した群において、足の腫脹及び発赤スコアも統計学的有意差を示した。



Swelling score in the mice visually observed at approximately 60 minutes post intraplantar injections with 5% Formalin, Phosphate Buffered Saline (PBS), Test Item A (Oncaspar liquid, referred to as 'PEGASP' with 5% Sucrose), Test Item B (Oncaspar liquid, referred to as 'PEGASP'), Test Item C (25% Mannitol in PBS) and Test Item D (25% Sucrose in PBS). '****' indicates p<0.0001 compared with the PBS-treated group.

図 7.1:3　　マウス足底内投与における足の腫脹

結論

本試験の結果は、オンキャスパー液体製剤及び 5%精製白糖添加は、陰性対照群と比較した場合にマウスで有意な行動異常を引き起こさなかった 。

8.　その他の毒性試験

8.1　マウスにおけるオンキャスパーと L-アスパラキナーゼの免疫原性比較試験

【Report NP39219】

目的

本試験は、GLP 規制、21 CFR、Part 58 に従って実施した。本試験の目的は、オンキャスパーと L-アスパラギナーゼの免疫原性を比較することである。

方法

オンキャスパーの免疫原性の試験には、Swiss-Webster マウス（約 20 g）を 8 匹/群、計 24 匹を使用した。

被検物質は、オンキャスパー（バッチ#[redacted]、4.56 mg/mL、480 IU/mL）及び L-アスパラギナーゼ（*E. coli*）を、0.05 M PBS、pH 7.3 に溶解して使用した。

投与液は、投与前、1 mg/mL（i.m.投与用）及び 0.5 mg/mL（i.p.投与用）になるよう酵素を希釈し、以下の表の群構成にて、週 1 回、12 週間投与した。

群構成

ANTISERUM AGAINST	Route	Dose（IU/body）	Number of Animals
PEG-L-Asparaginase	i.p.	10.5	8
PEG-L-Asparaginase	i.m.	10.5	8
Asparaginase	i.p.	10.5	8

血液サンプルは、初回投与前、初回投与後の 3、6、9、及び 12 週目に、眼窩静脈叢から採取した。血中抗体価は、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）により測定した。

結果

L-アスパラギナーゼ群の抗体価は、投与 3 週目の時点で顕著にみられた。一方、オンキャスパーの両経路投与群では、1：50 未満の抗体価を示した（表 8.1:1～表 8.1:3）。

表 8.1:1　L-アスパラキナーゼの抗体価

ANTISERUM AGAINST	WEEK AFTER FIRST DOSING	ANTIGEN	AVERAGE TITER
Asparaginase	0	Asparaginase	1:5
Asparaginase	3	Asparaginase	1:87,500
Asparaginase	6	Asparaginase	1:781,250
Asparaginase	9	Asparaginase	1:468,750
Asparaginase	12	Asparaginase	1:781,250

表 8.1:2　オンキャスパー腹腔内投与における抗体価

ANTISERUM AGAINST	WEEK AFTER FIRST DOSING	ANTIGEN	AVERAGE TITER
PEG-L-asparaginase	0	PEG-L-asparaginase	<1:10
PEG-L-asparaginase	3	PEG-L-asparaginase	1:3
PEG-L-asparaginase	6	PEG-L-asparaginase	1:5
PEG-L-asparaginase	9	PEG-L-asparaginase	1:13
PEG-L-asparaginase	12	PEG-L-asparaginase	1:13

表 8.1:3　オンキャスパー筋肉内投与における抗体価

ANTISERUM AGAINST	WEEK AFTER FIRST DOSING	ANTIGEN	AVERAGE TITER
PEG-L-asparaginase	0	PEG-L-asparaginase	<1:10
PEG-L-asparaginase	3	PEG-L-asparaginase	1:3
PEG-L-asparaginase	6	PEG-L-asparaginase	1:23
PEG-L-asparaginase	9	PEG-L-asparaginase	1:13
PEG-L-asparaginase	12	PEG-L-asparaginase	1:35

結論

本試験条件下で、L-アスパラギナーゼを PEG で修飾することにより、酵素の免疫原性が明らかに失われた。

8.2　イヌ及びヒトの全血における血液適合性試験

【Report NP39212】

目的

本試験は、オンキャスパーの 2 製剤の溶血性を確認するために実施した。

方法

被検製剤は、当初開発製剤（液体製剤、S95014_[redacted]）及び現在使用製剤（凍結乾燥製剤、S95014_[redacted]）である。これらの被検製剤をイヌ及びヒトの全血と混合し、溶血性を有するか否かを検討した。抗凝固剤は、K_2EDTA を用いた。

測定は、イヌとヒトの全血サンプル以外に陰性対照（生理食塩水）、陽性対照（1%サポニン）、及び溶媒対照（注射用滅菌水）を設定し、シアン-メトヘオグロビン法を用いて溶血（上清のヘモグロビン濃度）を分析した。追加のコントロールとして、未処理の全血を用いた。
被検製剤を生理食塩水と 1：4 の比率で混合し、直接分析し、被検製剤がヘモグロビン濃度測定に干渉しないことを確認した。

試験は 4 段階で行い、フェーズ 1 と 2 は、オンキャスパーの液体製剤を、フェーズ 3 と 4 は、凍結乾燥製剤を使用して実施した。

結果

両製剤とも 750 IU/mL 濃度においてヒト全血に対して影響を示さなかった。

イヌの全血を用いたフェーズ 1 及び 3 の検討では、溶媒対照試料（滅菌水+イヌの全血）の結果がプロトコール基準を満たさなかったため、評価できなかった。凍結乾燥製剤の結果はプロトコール基準内だったが、溶媒対照試料の不具合により評価できなかった。したがって、イヌの溶血の可能性のある結果は有効でないとみなされた。

結論

フェーズ 2 及び 4 の結果から、オンキャスパー濃度 750 IU/mL において両製剤ともヒト全血への血液適合性に影響を示さなかった。

8.3　オンキャスパー製剤（液体及び凍結乾燥製剤）のイヌ静脈内単回及び 4 週間反復投与における抗薬物抗体、薬物動態及び薬力学的検討

【Report NP39227】

目的

本試験の目的は、オンキャスパー2 製剤（液体及び凍結乾燥製剤）をイヌ静脈内に単回及び 4 週間反復投与し、両製剤の抗薬物抗体、薬物動態及び薬力学を比較することである。

方法

液体製剤（ロット番号：[redacted]）又は凍結乾燥製剤（ロット番号：[redacted]）をイヌ（ビーグル犬）の静脈内に 0.667 mL/kg の投与液量で低速に直接投与した。
投与は、単回投与が 1 日目に、反復投与が 1、15、22、29、36 日目に実施した。
投与用量は、以前の非臨床試験結果を踏まえて、イヌでの忍容性があり、検出可能性が高く、ヒトにおけるオンキャスパーの推奨用量（2500 IU/m^2）の 4 倍量となる 500 IU/kg（10000 IU/m^2）を選択した。
薬力学については、以下のセクションに要約した。
【CTD 2.6.2　薬理試験の概要文、CTD 2.6.2.2.6　Oncaspar 凍結乾燥剤の効力を裏付ける試験：イヌにおける 2 剤形の単回及び 4 週間反復静脈内投与の比較 PK/PD 同等性試験】
薬物動態については以下のセクションに要約した。
【CTD 2.6.4　薬物動態試験の概要文、CTD 2.6.4.3.12　イヌにおけるオンキャスパー 2 剤形の単回 i.v.投与後及び 4 週間反復投与の比較 PK/PD 試験】

2 つの製剤間で PK/PD プロファイルの違いを説明するために、抗薬物抗体の検出を本試験に組み込んだ。

抗薬物抗体（ADA）を評価したところ、全体的に緩やかな ADA 反応（ADA の発現又は増加）の発生がみられた。その ADA 反応は、明らかな群間差はみられず、単回投与群で 1/10 及び 3/10 例、反復投与群で 3/10 及び 1/10 例の発生であった。

すべてのサンプルについて中和抗体（NAb）を評価した。全サンプルの 10%（10/111 例）に中和抗体の陽性を示した。その内訳は、投与前で 2 例、22 日目で 5 例、36 日目で 3 例であった。22 日目又は 36 日目に陽性であった 8 例の内訳は、液体製剤で単回投与 1 例及び反復投与 3 例、凍結製剤で単回投与 1 例及び反復投与 3 例であった。すなわち、両製剤とも 4 例において中和抗体陽性であったが、これはアスパラギナーゼの動態に影響を与えなかったと思われた。

以上の結果を要約すると、オンキャスパーの液体及び凍結乾燥製剤の 500 IU/kg を投与した結果、両製剤における抗薬物抗体生成に差はなかった。PK/PD パラメータに違いがなかったため、抗体の結果は、二次的で生物学的意義はほとんどないと考えられる。

8.4　オンキャスパー凍結乾燥製剤添加物の精製白糖の毒性評価

凍結乾燥製剤の精製白糖（5%）添加を除き、両製剤の製造材料に差はなく、精製白糖の毒性は評価されている［7］【Report NP39448】。免疫グロブリン療法（IVIG）後の急性腎不全を除いて、市販精製白糖含有製品による健康への悪影響は観察されなかった。IVIG 製品に含まれる精製白糖による腎障害の閾値は 1 g/kg とされている［8］。

成人患者に規定量の凍結乾燥製剤を投与した場合の精製白糖曝露量が 3.24 mg/kg であることを考慮すると、結果として安全マージンは約 300 となる。小児の場合，最大精製白糖曝露量は 6 mg/kg とした。この結果、安全マージンは 160 以上となる。さらに，凍結乾燥製剤は，筋肉内投与が承認されている他の製品と同等の濃度の精製白糖を含んでいる。

なお、凍結乾燥製剤に含まれる精製白糖は、糖尿病の患者には注意が必要である。しかし、精製白糖を静脈内投与された被験者では、この二糖類を直接分解する酵素がないため、血糖値の上昇はみられなかった。

したがって、凍結乾燥製剤の規定量を静脈内又は筋肉内投与する成人又は小児患者には、精製白糖によるリスクは想定されていない。

8.5　製造工程関連不純物の遺伝毒性評価

液体及び凍結乾燥製剤の原薬及び最終製剤に残留する可能性のある 製造工程関連不純物の健康被害について，ICH M7 ガイドラインに基づき，遺伝毒性及び変異原性を評価した。この目的のために，*in vitro* 及び *in vivo* 試験による毒性データが考慮された。試験的根拠がない場合は、Lhasa 社（Leeds、UK）の Derek (version 4.1.0) 及び Sarah (version 1.2.0) システムを用いて、ICH M7 ガイドラインに準拠し、*in silico* で変異原性に関する構造警告の発生を調べた。結果は報告書［9］、【Report NP39449】にまとめられている。

試験的な毒性データが得られているすべての製造工程関連不純物及び反応中間体について、非遺伝毒性又は非発癌性であることが示された。反応中間体に由来する PEG 誘導体や原材料に含まれる不純物など、試験的な根拠がないすべての化合物について、*in silico* 解析を行ったところ、遺伝毒性や変異原性に関する構造的な警告は得られなかった。

したがって、オンキャスパーの液体及び凍結乾燥製剤製造工程関連不純物には、変異原性の可能性はないと考えられる。

9.　考察及び結論

マウス、ラット、及びイヌに対して、単回又は反復投与毒性試験を実施した。検出した所見は次のように要約できる。

摂餌量減少、体重の減少又は増加抑制、脾臓重量の軽度の減少（血中リンパ球への影響なし）及び肝細胞の脂肪浸潤（細胞壊死又は肝機能異常の発生なし）。

オンキャスパーの遺伝毒性及び染色体異常誘発性に関する情報はほとんどない。復帰突然変異試験の結果は、遺伝毒性がないことを示している。L-アスパラギナーゼは、妊娠ウサギとその子孫に核型異常を誘発しなかった。定型的生殖発生毒性試験は、オンキャスパーでは実施しなかった。しかし、L-アスパラギナーゼのラット又はウサギでの *in vivo* 又は *in vitro* 試験において、胚毒性／催奇形性の誘発性への証拠を示した。したがって、オンキャスパーは、妊娠中に使用してはならない。

筋肉内に投与されたマウスでは 、筋肉忍容性は 17 週間良好であった。

結論として、オンキャスパーは、既知の毒性プロファイルを持っており、急性リンパ芽球性白血病患者（小児又は成人）に安全に投与することができる。凍結乾燥製剤は、液体製剤の製造工程に凍結乾燥工程を加えたものである。前述のように、凍結乾燥製剤の製造工程で使用される原料と、液体製剤の製造工程で使用される原料との間には、凍結乾燥製剤に精製白糖（5%）を添加することを除いて、同様である。その 5%の精製白糖を添加しても、マウスの局所忍容性（侵害受容反応）に影響を与えないことが示された。

液体及び凍結乾燥製剤の最終濃度 750 IU/mL のヒト全血に対する血液適合性への影響は認められなかった。

また、液体及び凍結乾燥製剤の 500 IU/kg の投与量において、抗薬物抗体の発現に関する顕著な違いはなく、検出された抗体はアスパラギナーゼの 薬物動態に影響を与えないと考えられる。

賦形剤として添加された精製白糖の毒性を評価した結果、成人及び小児の患者が指示された用量で静脈内又は筋肉内に投与しても危険性はないとされた。

両製剤の製造工程の不純物の遺伝毒性を検討したところ、変異原性は認められなかった。

結論として、液体製剤（S95014_[redacted]）の初期評価と凍結乾燥製剤（S95014_[redacted]）の試験結果から、オンキャスパーは、既知の毒性プロファイルを有しており、急性リンパ芽球性白血病の患者に安全に投与できることが確認された。

10. 図表

図表は、本文中に織り込んだため該当図表なし。

11. 参考文献一覧

1) Viau AT, Abuchowski A, McCoy JR, Kazo GM, Davis FF. Toxicologic studies of a conjugate of asparaginase and polyethylene glycol in mice, rats, and dogs. Am J Vet Res. 1986 Jun;47(6):1398-401 [PE0151470]

2) MacEwen EG, Rosenthal R, Matus R, Viau AT, Abuchowski A. A preliminary study on the evaluation of asparaginase. Polyethylen glycol conjugate against canine malignant lymphoma. Cancer. 1987 Jun 15;59(12):2011-5 [PE0150568]

3) Lorke D, Tettenborn D. Experimental studies on the toxicity of crasnitin in animals. Recent Result Cancer Res. 1970;33:174-80 [PE0150563]

4) Adamson RH, Fabro S, Hahn MA, Creech CE, Whang-Peng J. Evaluation of the embryotoxic activity of L-asparaginase. Arch Int Pharmacodyn Ther 1970 Aug;186(2):310-20 [PE0150549]

5) Sanfeliu C, Nebot-Cegarra J, Domenech-Mateu JM. Teratogenic effects of L-asparaginase in rat embryos in vitro. Acta Anat (Basel). 1986;125(3):152-60 [PE0151467]

6) Sanfeliu C, Nebot-Cegarra J, Calvet S, Domenech-Mateu JM. Effects of L-asparaginase on rat embryonic development and yolk sac membrane in vitro. Teratology. 1989 Oct;40(4):375-86 [PE0151466]

7) [redacted] [NP39448]

8) Zhang R, Szerlip HM. Reemergence of Sucrose Nephropathy: Acute Renal Failure Caused by High-Dose Intravenous Immune Globulin Therapy, South Med J. 2000 Sep;93(9):901-4 [PE0151473]

9) [redacted] [NP39449]

オンキャスパー点滴静注用 3750

医薬品製造販売承認申請書添付資料

第 2 部（モジュール 2）

2.6.7　毒性試験概要表

日本セルヴィエ株式会社

目次

1.　毒性試験：一覧表 4
2.　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表 6
3.　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧 6
4.　毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧 9
5.　単回投与毒性試験 10
5.1　該当試験一覧 10
5.2　単回投与における最大耐量(MTD)確認試験【Report NP39222】 11
5.3　ラット単回静脈内投与におけるトキシコキネッティクス及び毒性に関するオンキャスパーと[redacted]との比較試験【Report NP39217】 13
5.4　イヌ単回静脈内投与におけるトキシコキネティクス及び毒性に関するオンキャスパーと[redacted]との比較試験【Report NP39211】 15
6.　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 18
7.　反復投与毒性試験：重要な試験 19
7.1　該当試験一覧 19
7.2　イヌの静脈内又は筋肉内投与における 2 週間反復投与毒性試験（パート 1）【Report NP39220】 20
7.3　ラット腹腔内 28 日間反復投与毒性試験【Report NP39233】 23
7.4　ラット筋肉内 4 週間反復投与毒性試験【Report NP39218】 24
7.5　ラット腹腔内 4 週間反復投与試験（追加試験）【Report NP39213】 30
7.6　マウス腹腔内又は筋肉内 3 カ月反復投与毒性試験【Report NP39210】 32
8.　*In Vitro* 遺伝毒性試験【Report NP39215】 35
9.　*In Vivo* 遺伝毒性試験 35
10.　がん原性試験 35
11.　生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 35
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 35
13.　生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 36
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 36
15.　新生児を用いた試験 36
16.　局所刺激性試験 37
17.　その他の毒性試験 38
17.1　血液適合性試験 38

略語・略号一覧

略語・略号	省略していない表現（英語）	省略していない表現（日本語）
Alb	Serum albumin	血清アルブミン
ALP(AP)	Alkaline phosphatase	アルカリフォスファターゼ
ALT(GPT)	Alanine Amino Transferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST(GOT)	Aspartate Amino Transferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
Ca	Calcium	カルシウム
Cl	Chlorine	クロール
CRE	Creatinine	クレアチニン
D-Bil	Direct bilirubin	直接ビリルビン
F	Female	雌
GGT(γ−GTP)	γ-glutamyltranspeptidase	γ−グルタミルトランスペプチダーゼ
GLU	Glucose	糖
i m.	intramuscular	筋肉内
i.p.	Intra peritoneal	腹腔内
i.v.	Intra venous	静脈内
K	Potassium	カリウム
LDH	Lactate dehydrogenase	乳酸脱水素酵素
M	Male	雄
Na	Sodium	ナトリウム
PBS	phosphate-buffered saline solution	リン酸緩衝食塩水
pH	Hydrogen ion index	水素イオン指数
SDH	Sorbitol dehydrogenase	ソルビトールデヒドロゲナーゼ
T-Bil	Total Bilbin	総ビリルビン
T-CHO	Total cholesterol	総コレステロール
TP	Total protein	血清総蛋白

1.　毒性試験：一覧表

表 1:1　毒性試験一覧

Type of Study	Species and strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose (IU/kg)	GLP Compliance	Testing Facility	Report No.	Location Vol. Section
Single-Dose Toxicity	C3H/Hej mouse	i.p.	Single dose	5,000 10,000 25,000 40,000 100,000	Yes[a]	[redacted] ([redacted]-US)	【NP39222】	4.2.3.1.1
	Sprague Dawley Rat	i.v.	Single dose	100 500	Yes	[redacted] ([redacted]-US)	【NP39217】	4.2.3.1.2
	Beagle Dog	i.v.	Single dose	100 500	Yes	[redacted] ([redacted]-US)	【NP39211】	4.2.3.1.3
Repeat-Dose Toxicity	Beagle Dog	i.v. i m.	Once a week for 2 weeks	200 1,200	Yes[a]	[redacted] ([redacted]-US)	【NP39220】 【NP39221】	4.2.3.2.3 4.2.3.2.6
	Wistar Rat	i.p.	Five times a weeks for 4 Weeks	10 30 60	Yes[a]	[redacted] ([redacted]-US)	【NP39233】	4.2.3.2.5
	Wistar Rat	i m.	Five times a weeks for 4 weeks	100 200 400	Yes[a]	[redacted] ([redacted]-US)	【NP39218】	4.2.3.2.4
	Sprague Dawley Rat	i.p.	Five times a weeks for 4 weeks	400	Yes[a]	[redacted] ([redacted]-US)	【NP39213】	4.2.3.2.1
	Swiss-Webster mouse	i.p. i m.	Once a week For 13(i.p.) or 17(i.m.)weeks	50 200 500	Yes[a]	[redacted] ([redacted]-US)	【NP39210】	4.2.3.2.2

表 1:1　毒性試験一覧（続き）

Type of Study	Species and strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose (IU/kg)	GLP Compliance	Testing Facility	Report No.	Location Vol. Section
Genotoxicity	*Salmonella Typhimurium,* TA97a,TA98, TA100,TA102	Preincubation method	48 hours 30-35℃	75IU/plate Tested both In presence and absence of metabolic activation.	Yes	[redacted]-US)	【NP39215】	4.2.3.3.1.1
Local Tolerance	Mouse, C57BL/6	Intra-plantar subcutaneous	Once	Dose volume 50µl Oncaspar Liquid or Oncapspar liquid with 5% sucrose	No	[redacted]	【NP39209】	4.2.3.6.1
Other toxicity: Determination Immunogenic Properties	Swiss-Webster mouse	PEG-L-Asparaginase: i.p. and i m. L-asparaginase : i.p. .	Once a week for 12(weeks)	~525	Yes[a]	[redacted]-US)	【NP39219】	4.2.3.7.2.1
Other toxicity: Determination of Hemocompatibility In Dog and Human Whole Blood	*In vitro* (Human, Dog blood)	*In* vitro	n.a.	750IU/ml Oncaspar Liquid or Oncaspar lyophilized	Yes[a]	[redacted]	【NP39212】	4.2.3.7.7.1

a　米国 GLP（CFR Title 21 Part 58）に従って実施された毒性試験

2.　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表

表 2:1　トキシコキネティクス試験一覧

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose (IU/kg)	GLP Compliance	Report No.	Location Vol. Section
Single-Dose Toxicity	Sprague Dawley Rat	i.v.	100 500	Yes	【NP39217】	4.2.3.1.2
	Beagle Dog	i.v.	100 500	Yes	【NP39211】	4.2.3.1.3
Repeat-Dose Toxicity	Wistar Rat	i.m.	100 200 400	Yes[a]	【NP39218】	4.2.3.2.4
	Beagle Dog	i.m. i.v.	200 1200	Yes[a]	【NP39220】 【NP39221】	4.2.3.2.3 4.2.3.2.6

a　米国 GLP（CFR Title 21 Part 58）に従って実施された毒性試験

3.　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧

表 3:1　ラットにおけるオンキャスパー単回投与後のアスパラキナーゼ活性値（Mean±SD）【Report NP39217】

Test Article: PEG-L –asparaginase (INN: pegaspargase)					
Dose (IU/kg)	**Gender**	**AUC_{last} (IU*h/mL)**	**C_{max} (IU/mL)**	**t_{max} (h)**	**$t_{1/2}$ (h)**
100	Female	93.5 ± 46.1	0.974 ± 0.480	15.9 ± 11.3	79.5 ± 16.1
	Male	163± 22.7	1.36 ± 0.289	10.7 ± 11.3	68.1 ± 6.47
500	Female	720± 199	5.91 ± 2.510	15.2 ± 12.2	77.6 ± 12.2
	Male	726± 188	6.03 ± 1.890	12.1 ± 12.7	74.9 ± 10.7

表 3:2　イヌにおけるオンキャスパー単回投与後のアスパラキナーゼ活性値（Mean±SD）【Report NP39211】

Test Article: PEG-L –asparaginase (INN: pegaspargase)					
Dose (IU/kg)	**Gender**	**AUC_{last} (IU*h/mL)**	**C_{max} (IU/mL)**	**t_{max} (h)**	**$t_{1/2}$ (h)**
100	Female	418 ± 70.7	2.12 ± 0.248	18.3 ± 35.8	184 ± 74.7
	Male	360 ± 65.0	1.66 ± 0.352	1.83 ± 2.81	206 ± 78.5
500	Female	1,660 ± 361	8.48 ± 1.27	36.3 ± 41.2	139 ± 67.9
	Male	2,230 ± 165	11.4 ± 3.66	30.3 ± 59.8	281 ± 123[a]

a　N=4 (male dog 117 excluded because of not reliable estimation of terminal elimination rate constant)

表 3:3　雌ラットにおけるオンキャスパー連日筋肉内投与後のアスパラキナーゼ活性値（Mean±SD）【Report NP39218】

Test Article: PEG-L –asparaginase (INN: pegaspargase)					
Dose	**Plasma asparaginase activity (IU/mL)**				
(IU/kg)	**PID 1[a]**	**PID 7**	**PID 8**	**PID 9**	**PID 11**
100	1.21 ± 0.17	2.09 ± 0.81	3.16 ± 0.32	3.89 ± 1.04	5.15 ± 0.48
200	2.08 ± 0.32	4.50 ± 0.23	6.15 ± 0.73	6.65 ± 1.05	7.46 ± 1.59
400	5.94 ± 0.85	12.53 ± 2.47	16.46 ± 2.36	20.52 ± 0.11	20.51 ± 0.32

a　PID: post-injection day

表 3:4　イヌにおけるオンキャスパー200 IU/kg 投与後のアスパラキナーゼ活性値（Mean±SD）【Report NP39220】

Test Article: PEG-L-asparaginase (INN: pegaspargase)										
		Plasma asparaginase activity (IU/mL)								
		i.v.		**i.m.**				**i.v.**		**i m.**	
	Dog (sex)	**245984 (M)**	**245038 (F)**	**245062 (M)**	**244783 (F)**		**Dog(sex)**	**245984 (M)**	**245038 (F)**	**245062 (M)**	**244783 (F)**
Time after 1 st dose (1 dec-82)	24 h	5.00	4.34	3.58	4.94	Time after 2^{nd} dose (8 Dec 82)	12 day	3.92	3.19	3.34	3.19
	2 day	4.79	3.79	4.23	4.46		20 day	0.99	1.15	1.79	0.02
	6 day	1.90	0.10	0.29	2.40		28 day	nd[a]	0.29	0.43	nd

a　not detectable

表 3:5　イヌにおけるオンキャスパー1200 IU/kg 投与後のアスパラキナーゼ活性値（Mean±SD）【Report NP39221】

Test Article: PEG-L-asparaginase (INN: pegaspargase)											
		Plasma asparaginase activity (IU/mL)									
		i.v.		i m.				i.v.		i m.	
	Dog (sex)	245984 (M)	245038 (F)	245062 (M)	244783 (F)		Dog (sex)	245984 (M)	245038 (F)	245062 (M)	244783 (F)
Time after 1st dose (26 Jan 83)	24 h	26.04	18.54	20.84	24.17	Time after 2nd dose (2 Feb 83)	24 h	35.42	34.58	21.87	17.71
	48 h	30.84	28.12	28.75	23.34		48 h	30.84	42.92	9.79	19.17
	5 day	27.08	24.17	23.75	20.42		6 day	6.46	25.83	0.34	0.51
	7 day	16.46	16.67	0.25	0.19		8 day	2.42	17.50	0.10	0.76
							14 day	0.09	10.50	0.03	0.46
							3 week	0.12	2.50	nd	0.07
							4 week	nd[a]	0.37	nd	nd
							5 week	-	nd	-	nd

a　detectable

4.　毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧

表 4:1　被検物質一覧

Batch No.	Protein (mg/mL)	Labelled activity (IU/mL)	Specific activity (IU/mg)	Purity (%)	Study Number	Type of Study
[redacted]	7.65	820	107	96.5	1 - NP39222 - 4.2.3.1.1 2 - NP39233 - 4.2.3.2.5 5 - NP39210 - 4.2.3.2.2 4a - NP39220 - 4.2.3.2.3 4b - NP39221 - 4.2.3.2.6	Single dose i.p. toxicity mouse Repeat dose toxicity i.p. 4 weeks rat Repeat dose toxicity i.p. /i m. 3 months mouse Repeat dose toxicity i.v. /i.m. 2 weeks dog
[redacted]	11.0	1,200	109	100	1 - NP39222 - 4.2.3.1.1 3 - NP39218 - 4.2.3.2.4 5 - NP39210 - 4.2.3.2.2 4a - NP39220 - 4.2.3.2.3 4b - NP39221 - 4.2.3.2.6	Single dose i.p. toxicity mouse Repeat dose toxicity i.m. 4 weeks rat Repeat dose toxicity i.p. /i m. 3 months mouse Repeat dose toxicity i.v. /i.m. 2 weeks dog
[redacted]	8.9	1,200	135	100	8 - NP39213 - 4.2.3.2.1 5 - NP39210 - 4.2.3.2.2	Repeat dose toxicity i.p. 4 weeks rat Repeat dose toxicity i.p. /i.m. 3 months mouse
[redacted]	5.5	718	131	100	824-015 - NP39217-4.2.3.1.2 824-016 - NP39211 - 4.2.3.1.3	Single dose i.v. toxicity rat Single dose i.v. toxicity dog
[redacted]	4.5	480	107	100	29 - NP39219 - 4.2.3.7.2.1	Determination of immunogenic properties in mouse
[redacted]	6.4	748	117	100	49515 - NP39215 - 4.2.3.3.1.1	Bacterial reverse mutation assay
[redacted]	6.6	741	113.	97.25	15-7530 - NP39212 - 4.2.3.7.7.1	Determination of Hemocompatibility in Dog and Human Whole Blood
[redacted]	6.2	773	126	98.14	15-7530 - NP39212 - 4.2.3.7.7.1	Determination of Hemocompatibility in Dog and Human Whole Blood

5.　単回投与毒性試験

5.1　該当試験一覧

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Doses (IU/kg)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Nonlethal Dose (IU/kg)	Approximate Lethal Dose (IU/kg)	Noteworthy Findings	Study Number
C3H/HeJ mouse	i.p. (PBS)	5,000 10,000 25,000 40,000 100,000	4 or 8 F	10,000	25,000	Decreased activity, hunched posture, piloerection. Body weight loss. Decrease weight spleen and liver. Minor hepatic changes	1 - NP39222 - 4.2.3.1.1
Sprague Dawley rat	i.v. (PBS)	100 500	8M +8F	500	-	Body weight decrease, food consumption decrease	824-015 NP39217 4.2.3.1.2
Beagle dog	i.v. (PBS)	100 500	4M +4F	500	-	Soft faeces	824-016 NP39211 4.2.3.1.3

5.2　単回投与における最大耐量(MTD)確認試験【Report NP39222】

方法

使用動物：C3H/HeJ mice

被検物質：オンキャスパー液体製剤（Lot No.[redacted]、[redacted]）

投与量：0(PBS)、5000、10000、25000、40000、100000 IU/kg　　投与経路：腹腔内　　初回投与日：19[redacted]年[redacted]月[redacted]日

結果

MTD: 10000 IU/kg　　致死量：25000 IU/kg

表 5.2:1　　試験結果概要

Dose (IU/kg)	Control	5,000	10,000	25,000	40,000	100,000
	F	F	F	F	F	F
Number of Animals:	5	8	8	8	4	8
Noteworthy Findings: Died or Killed Moribund	0	0	0	3	0	2
Clinical Observations:						
• Decreased activity	0	0	0	8	4	4
• Piloerection	0	0	0	8	4	4
• Hunched posture	0	0	0	8	4	4
Body Weight %[a] (Day 14):	25 g	-12	-16	-20	-16	-8 / +4[b]

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

b　Since the body weights were not homogenous, group 6 (100,000 IU/kg) animals were divided into two sub-groups having a mean body weight change of +4 and +17 compared to controls, on day 1 (source data study report #1).

表 5.2:1　　試験概要（続き）

Dose (IU/kg)	Control	5,000	10,000	25,000	40,000	100,000
	F	F	F	F	F	F
Absolute Organ Weights %[a] (Day 21)						
• Liver (g)	1.130	+15	-19	-27	-25	+19
• Spleen (g)	0.102	+3	-51	-29	-56	+6
Histopathology -(Number Examined):	5	8	8	8	4	8
• Liver:						
Nuclear polyploidy	-	-	2	2	-	-
Sinusoidal leukocyte infiltration	-	-	2	2	-	-
Portal fibrosis	-	-	1	-	-	-
Periportal lipoid degeneration	-	-	-	-	-	3

Abbreviations:
M：Male
F：Female
a　For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown
-　no noteworthy (biologically significant) findings

5.3　ラット単回静脈内投与におけるトキシコキネッティクス及び毒性に関するオンキャスパーと[redacted]との比較試験【Report NP39217】

方法

使用動物：Sprague Dawley rats　　試験開始時年齢:：約 10 週齢

被検物質：オンキャスパー液体製剤（Lot No.[redacted]）

投与量：0 (PBS)、100、500 IU/kg　　投与液量：1 mL/kg　　投与経路：静脈内　　初回投与日：20[redacted]年[redacted]月[redacted]日

結果

概略の致死量：>500 IU/kg

表 5.3:1　　試験結果概要

Dose (IU/kg)	Control		100		500	
	M	F	M	F	M	F
Number of Animals Toxicity/Toxicokinetics:	8	8	8	8	8	8
Toxicokinetics (Day 1): AUC_{last} (mIU*h/mL) C_{max} (mIU/mL)			163,000 1,360	93,500 974	726,000 6,030	720,000 5,910
Noteworthy Findings: Died or Killed Moribund	0	0 (°)	0	0	0	0 (°)
Clinical Observations:	-	-	-	-	-	-
Body Weight % [c] (Day 14):	357.4	252	-5	-6[a]	-14[b]	-9[b]
Bodyweight at necropsy	322	224	-4.7	-5.3	-14.3[b]	-10.3[b]
Organ weight (g and %)c: mean absolute (mean relative % bodyweight at necropsy)						
Brain	1.96 (0.61)	1.81 (0.82)	0.5 (4.9)	1.7 (6.1)	2.0 (14.8)	1.1 (11.0[a])
Adrenal	0.07 (0.021)	0.08 (0.037)	-14.3 (-10.5)	-12.5 (-12.5)	-28.6 (-10.5)	0 (-8.1)
Epididymides	0.96 (0.30)	NA	-2.1 (3.3)	NA	3.1 (20.0)	NA
Heart	1.31 (0.41)	0.94 (0.42)	4.6 (0)	-5.3 (0)	-15.4 (-2.4)	-12.8[a] (-2.4)
Kidney	2.92 (0.91)	1.93 (0.86)	2.1 (6.6)	-2.6 (3.5)	-5.1 (9.9[a])	-1.0 (10.5)

表 5.3:1　試験結果概要(続き)

Dose (IU/kg)	Control		100		500	
	M	F	M	F	M	F
Liver	10.43 (3.23)	7.64 (3.41)	-8.7 (-4.0)	-13.6[b] (-8.5[a])	-20.2[b] (-6.5)	-12.3[a] (-2.1)
Lung (with bronchi)	1.41 (0.44)	1.30 (0.58)	4.2 (9.1)	-11.5 (-5.2)	-7.8 (6.8)	-6.2 (5.5)
Pituitary gland	0.013 (0.004)	0.017 (0.007)	0 (0)	0 (14.2)	-8.3 (0)	0 (28.6)
Mandibular Salivary. Gland	0.35 (0.108)	0.22 (0.098)	5.7 (12.0)	0 (7.1)	-5.7 (9.3)	13.6 (25.5)
Spleen	0.72 (0.22)	0.58 (0.26)	-11.1 (4.5)	-8.6 (-3.8)	-25.0b (-9.0)	-24a (-15.4)
Testes / Ovaries	3.27 (1.02)	0.08 (0.036)	-1.5 (2.9)	12.5 (13.9)	-2.1 (13.7[b])	0 (11.1)
Thymus	0.47 (0.15)	0.46 (0.20)	0 (0)	-15.2 (-10.0)	-12.8 (0)	-10.9 (-5.0)
Thyroid (with parathyroid)	0.024 (0.007)	0.018 (0.008)	-12.5 (0)	0 (11.1)	-12.5 (14.3)	5.2 (11.1)
Food consumption % [c] (Day 7):	27.1	19.3	-7	-5	-21b	-27[a]
Haematology:						
• Monocytes (10^3/µL) Day 14	0.441	0.278	0.379	0.340	0.293[a]	0.234
• Neutrophils (10^3/µL) Day 14	3.423	1.643	2.544	2.238	1.788[b]	1.499
• Basophils (10^3/µL) Day 14	0.078	0.058	0.063	0.039	0.054[a]	0.036
Clinical Chemistry						
• Total Protein (g/dL) Day 14	6.18	6.83	6.11	5.96[b]	5.81[a]	6.13[a]
• Globulin (g/dL) Day 14	2.76	3.08	2.65	2.65[a]	2.43[b]	2.64[a]
• Cholesterol (mg/dL) Day 14	46.1	51	57	57.1	68.8[b]	73.1[a]

Abbreviations:

(°)　one animal died due to complications of blood collection (no treatment related)

M：Male

F：Female;

Dunnett's test:

a　p<0.05

b　<p 0.01

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

-　no noteworthy (biologically significant) findings

5.4　イヌ単回静脈内投与におけるトキシコキネティクス及び毒性に関するオンキャスパーと[redacted]との比較試験【Report NP39211】

方法

使用動物：ビーグル犬　　投与開始時年齢：5－6 カ月齢

被検物質：オンキャスパー液体製剤（Lot No.[redacted]）

投与量：0 (PBS)、100、500 IU/kg　　投与液量：0.75 mL/kg　　投与経路：静脈内　　初回投与開始日：20[redacted]年[redacted]月[redacted]日

結果

概略の致死量：>500 IU/kg

表 5.4:1　　試験結果概要

Dose (IU/kg)	Control		100		500	
	M	F	M	F	M	F
Number of Animals Toxicity/Toxicokinetics:	4	4	4	4	4	4
Toxicokinetics (Day 1): AUC_{last} (mIU*h/mL) C_{max} (mIU/mL)			360,000 1,660	418,000 2,120	2,230,000 11,400	1,660,000 8,480
Noteworthy Findings: Died or Killed Moribund	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations:						
• injected sclera	2 (1.4)	2 (1.3)	3 (2.3)	3 (1.8)	2 (1.4)	2 (1.4)
• lacrimation	1 (0.8)	3 (1.5)	2 (1.6)	2 (0.8)	2 (0.7)	3 (1.9)
• soft faeces	1 (0.3)	1 (0.2)	3 (2.3)	4 (1.6)	4 (2.8)	4 (2.6)
Ophthalmoscopic examination:	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography	-	-	-	-	-	-

Abbreviations:
M：Male
F：Female
( )　　mean number of animals days that the group displayed the clinical sign
-　　no noteworthy (biologically significant) findings

表 5.4:2　　血液及び血液生化学的検査の成績

Endpoint	Interval of Study	0 IU/kg			100 IU/kg ([redacted], Oncaspar)			500 IU/kg ([redacted], Oncaspar)		
		Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N
Summary of Hematology Values - Male										
Leukocytes $10^3/\mu L$	Pretest	11.65	1.292	4	11.80	1.770	4	13.08	2.816	4
	Terminal	11.50	1.564	4	8.60	0.883	4	7.23	0.896	4
Erythrocytes $10^6/\mu L$	Pretest	6.868	0.5989	4	6.913	0.1544	4	6.610	0.4179	4
	Terminal	6.993	0.7545	4	6.405	0.2596	4	6.083	0.3098	4
Hemoglobin g/gL	Pretest	14.95	0.858	4	15.08	0.685	4	14.23	0.472	4
	Terminal	15.35	1.290	4	14.15	0.661	4	13.30[a]	0.983	4
Hematocrit %	Pretest	42.25	2.316	4	42.58	1. 797	4	40.40	1.564	4
	Terminal	42.75	3.492	4	39.38	2.290	4	37.45	3.044	4
Platelets $10^3/\mu L$	Pretest	441.0	48.29	4	304.5[b]	75.50	4	377.3	11. 79	4
	Terminal	374.0	55.02	4	264.5[a]	81.13	4	312.3	27.18	4
Absolute Reticulocytes $10^3/\mu L$	Pretest	86.80	40.448	4	58.90	18.483	4	55.73	14.553	4
	Terminal	87.10	31.099	4	40.65[b]	4.529	4	36.75[b]	12.755	4
Percent Reticuoicytes $10^3/\mu L$	Pretest	1.30	0.606	4	0.85	0.289	4	0.85	0.252	4
	Terminal	1.28	0.479	4	0.63[a]	0.050	4	0.60[a]	0.216	4
Neutrophils $10^3/\mu L$	Pretest	7.495	1.3079	4	7.078	2.0865	4	8.095	2.5781	4
	Terminal	7.238	1.6081	4	5.270	1.1292	4	4.368	0.8777	4
Lymphocytes $10^3/\mu L$	Pretest	3.243	0.5409	4	3.635	0.4807	4	3.915	0.5313	4
	Terminal	3.425	0.1843	4	2.633	0.9906	4	2.305	0.2714	4
Basophils $10^3/\mu L$	Pretest	0.070	0.0216	4	0.068	0.0171	4	0.048	0.0096	4
	Terminal	0.053	0.0096	4	0.018	0.0050	4	0.013	0.0096	4
Large Unstained Cells $10^3/\mu L$	Pretest	0.053	0.0150	4	0.048	0.0050	4	0.050	0.0141	4
	Terminal	0.048	0.0096	4	0.015	0.0129	4	0.013	0.0126	4

表 5.4:2　　血液及び血液生化学的検査の成績（続き）

Endpoint	Interval of Study	0 IU/kg			100 IU/kg ([redacted], Oncaspar)			500 IU/kg ([redacted], Oncaspar)		
		Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N
Summary of Hematology Values - Female										
Leukocytes $10^3/\mu L$	Pretest	12.20	3.488	4	10. 73	1. 861	4	11.30	1.742	4
	Terminal	11. 23	2.268	4	8.25	2.161	4	8.55	2.408	4
Erythrocytes $10^6/\mu L$	Pretest	6.433	0.2823	4	6.928	0.4013	4	6.878	0.5608	4
	Terminal	6.370	0.2254	4	6.568	0.2266	4	6.385	0.5551	4
Hemoglobin g/gL	Pretest	14.18	0.629	4	15.08	0.556	4	15.50	1.329	4
	Terminal	14.33	0.330	4	14.43	0.624	4	14.38	1.193	4
Hematocrit %	Pretest	40.35	1.967	4	42.68	1.825	4	43.70	4.109	4
	Terminal	40.53	1.466	4	40.98	1.696	4	40.73	3.189	4
Platelets $10^3/\mu L$	Pretest	459.5	29.08	4	378.3	63.66	4	400.5	50.53	4
	Terminal	372.8	36.69	4	319.8	38.13	4	357.3	54.51	4
Absolute Reticulocytes $10^3/\mu L$	Pretest	45.33	21.239	4	54.50	8.045	4	70.93	38.843	4
	Terminal	57.18	29.112	4	39.85	12. 219	4	64.78	45.581	4
Percent Reticuoicytes $10^3/\mu L$	Pretest	0.70	0.316	4	0.80	0.163	4	1.03	0.499	4
	Terminal	0.90	0.455	4	0.60	0.200	4	0.98	0.608	4
Neutrophils $10^3/\mu L$	Pretest	7.293	2.4059	4	6.028	0.8160	4	6.905	1.0258	4
	Terminal	6.410	1.1007	4	5.200	2.0960	4	5.828	2.4759	4
Lymphocytes $10^3/\mu L$	Pretest	4.103	1.0540	4	3.855	1.4472	4	3.573	0.8426	4
	Terminal	3.973	1.8847	4	2.485	0.8586	4	2.235	0. 1914	4
Basophils $10^3/\mu L$	Pretest	0.060	0.0383	4	0.055	0.0129	4	0.068	0.0206	4
	Terminal	0.048	0.0275	4	0.013	0.0050	4	0.013	0.0096	4
Large Unstained Cells $10^3/\mu L$	Pretest	0.070	0.0294	4	0.043	0.0126	4	0.058	0.0096	4
	Terminal	0.048	0.0150	4	0.013	0.0050	4	0.018	0.0096	4

表 5.4:2　　血液及び血液生化学的検査の成績（続き）

Endpoint	Interval of Study	0 IU/kg			100 IU/kg ([redacted], Oncaspar)			500 IU/kg ([redacted], Oncaspar)		
		Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N
Summary of Clinical Chemistry Values- Male										
Total Protein	Pretest	5.68	0.359	4	5.68	0.287	4	5.38	0.222	4
g/gL	Terminal	5.80	0.337	4	5.38[a]	0.171	4	5.18[b]	0.150	4
Albumin	Pretest	3.08	0.126	4	3.00	0.141	4	2.93	0.171	4
g/gL	Terminal	3.25	0.100	4	3.00	0.082	4	2.98	0.150	4
Globulin	Pretest	2.60	0.346	4	2.68	0.171	4	2.45	0.173	4
g/gL	Terminal	2.55	0.370	4	2.38	0.096	4	2.20	0.245	4
Summary of Clinical Chemistry Values- Female										
Total Protein	Pretest	5.35	0.191	4	5.10	0.245	4	5.30	0.245	4
g/gL	Terminal	5.35	0.100	4	5.10	0.258	4	5.15	0.129	4
Albumin	Pretest	2.90	0.141	4	2.95	0.191	4	3.05	0.129	4
g/gL	Terminal	3.15	0.058	4	3.03	0.206	4	3.03	0.150	4
Globulin	Pretest	2.45	0.311	4	2.15	0.058	4	2.25	0.129	4
g/gL	Terminal	2.20	0. 141	4	2.08	0.096	4	2.13	0.206	4

N：Number of measures used to calculate mean
SD：Standard Deviation
a　Significantly different from control; ($p<0.05$)
b　Significantly different from control; ($p<0.01$)

6.　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

該当試験なし

7.　反復投与毒性試験：重要な試験

7.1　該当試験一覧

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (IU/kg)	Gender and No. per Group	NOAEL (IU/kg)	Noteworthy Findings	Study Number
Beagle dog	i m. and i.v. (PBS)	Once a week for 2 weeks	200 1,200	1M+1F	1,200 IU/kg regarded as NOAEL	Reduced body weight gain Sporadic increase ALT	NP39220 NP39221
Wistar rat	i.p. (PBS)	Five times a week for 4 weeks	10 30 60	6M+6F	60 IU/kg regarded as NOAEL	Decrease spleen weight	NP39233
Wistar rat	i.m. (PBS)	Five times a week for 4 weeks	100 200 400	6 / 8M+6 / 8F	400 IU/kg regarded as NOAEL	Reduced body weight gain (F) Increase ALP, AST; decrease Total protein Decrease spleen and liver weight	NP39218
Sprague Dawley rat	i.p. (PBS)	Five times a week for 4 weeks	400	6M+6F	400 IU/kg regarded as NOAEL	Body weight and food consumption decrease	NP39213
Swiss-Webster mouse	i.p. and i m. (PBS)	Once a week for 13 (i.p.) or 17 (i m.) weeks	50 200 500	5M+5F	200 IU/kg regarded as NOAEL	500 IU/kg regarded as MTD Body weight decrease Spleen weight decrease Low grade hepatic toxicity (high dose)	NP39210

7.2　イヌの静脈内又は筋肉内投与における２週間反復投与毒性試験（パート１）【Report NP39220】

方法

使用動物：ビーグル犬　　投与開始時年齢：不明

被検物質：オンキャスパー液体製剤（Lot No. [redacted]、[redacted]）

投与量：0 (PBS)、200、1200 IU/kg　　投与液量：不明　　投与経路：静脈内又は筋肉内　　初回投与開始日：19[redacted]年[redacted]月[redacted]日

結果

概略の致死量：>1200 IU/kg

表 7.2:1　200 IU/kg 投与試験結果概要

Dose (IU/kg)	Pre-dose values intravenous		200 intravenous		Pre-dose values intramuscular		200 intramuscular	
	M	F	M	F	M	F	M	F
Number of Animals: Toxicity/Toxicokinetics:			1	1			1	1
Toxicokinetics: AUC_{last} (IU.h/mL) C_{max} (ng/mL)			not available	not available			not available	not available
Noteworthy Findings: Died or Killed Moribund			0	0			0	0
Clinical Observations:			-	-			-	-
Body weight %[a] (pre dose-week 2)	7.3	6.8	+10	+13	8.1	7.7	+17	+5
Haematology								
• WBC (x 10^3) Week 1	7.30	11.80	5.20	7.70	11.70	11.00	5.60	8.90
• WBC (x 10^3) Week 2	7.30	11.80	7.40	11.80	11.70	11.00	9.70	9.00
Clinical Chemistry								
• ALT (IU/L) Week 2	35.00	28.00	18.00	20.00	38.00	29.00	257.00	58.00

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

-　no noteworthy (biologically significant) findings

表 7.2:2　1200 IU/kg 投与試験結果概要

Dose (IU/kg)	Pre-dose values intravenous		1,200 intravenous		Pre-dose values intramuscular		1,200 intramuscular	
	M	F	M	F	M	F	M	F
Number of Animals: Toxicity/Toxicokinetics:			1	1			1	1
Toxicokinetics (Day 14): AUC_{last} (IU.h/mL) C_{max} (IU/mL)			not available	not available			not available	not available
Noteworthy Findings: Died or Killed Moribund			0	0			0	0
Clinical Observations:			-	-			-	-
Body weight % [a] (pre dose-week 2)	8.1	8.1	-5	-5	9.0	8.1	-9	-5
Clinical Chemistry • ALT (IU/L) Week 2	62.0	26.0	50.0	21.0	61.0	41.0	143.0	30.0

Abbreviations:
M：Male
F：Female
a　For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown
-　no noteworthy (biologically significant) findings

7.3　ラット腹腔内 28 日間反復投与毒性試験【Report NP39233】

方法

使用動物：Wistar rats　　投与開始時年齢：不明

被検物質：オンキャスパー液体製剤（Lot No. [redacted]）

投与量：0(PBS)、10、30、60 IU/kg　　投与液量：0.3 mL/ラット　　投与経路：腹腔内　　投与条件：5 回/週、4 週間

初回投与開始日：19[redacted]年[redacted]月[redacted]日

結果

概略の致死量：>60 IU/kg

表 7.3:1　　試験結果概要

Dose (IU/kg)	Control		10		30		60	
	M	F	M	F	M	F	M	F
Number of Animals:	6	6	6	6	6	6	6	6
Noteworthy Findings: Died or Killed Moribund (°)	1	0	2	3	2	2	6	4
Clinical Observations:	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight % [a] (Day 28):	384	256.67	-1	-4	+2	-4	+2	-14
Absolute Organ Weights (%[a]) • Spleen (g)	2.100	1.267	-25	-7	-38	-35	-44	-47

Abbreviations:
(°)　several animals died of pneumonia
M : Male
F : Female.
a　for controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown
-　no noteworthy (biologically significant) findings

7.4　ラット筋肉内 4 週間反復投与毒性試験【Report NP39218】

方法

使用動物：Wistar rats　　投与開始時年齢：不明

被検物質：オンキャスパー液体製剤（Lot No. [redacted]）

投与量：0 (PBS)、100、200、400 IU/kg　　投与液量：0.1 mL/ラット　　投与経路：筋肉内　　投与条件：5 回/週、4 週間

初回投与開始日：19[redacted]年[redacted]月[redacted]日

結果

概略の致死量：>400 IU/kg

表 7.4:1　　試験結果概要

Dose (IU/kg)	Control		100		200		400	
	M	F	M	F	M	F	M	F
Number of Animals:								
• Toxicity	6	6	8	8	8	8	8	8
• Toxicokinetics				3	3	3	3	3
Toxicokinetics:								
AUC_{last} (IU.h/mL)			not available	not available	not available	not available	not available	not available
C_{max} (IU/mL)								
Noteworthy Findings:								
Died or Killed Moribund (°)	1	1	3	1	1	0	1	1
Clinical Observations:	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight % [a] (Day 28):	367.2	281.6	-8	-13[a]	-6	-18[a]	-9	-19[a]

Student's "t" test
a　　$p<0.05$
Abbreviations:
(°)　　Several animals died of pneumonia

表 7.4:1　　試験結果概要(続き)

Dose (IU/kg)	Control		100		200		400	
	M	F	M	F	M	F	M	F
Haematology								
• MCV (μ^3)	59.40	59.00	55.60[a]	55.86[a]	54.00[a]	55.75[a]	56.71[a]	55.86[a]
• HGB (g/dL)	14.32	14.00	13.84	12.84[a]	13.29	12.68[a]	13.34	12.54[a]
• HCT (%)	38.38	37.92	38.34	35.79	37.00	33.95[a]	37.74	34.91[a]
Clinical Chemistry								
• AST (IU/L)	272	248	270	214	199[a]	234	294	304[a]
• ALP (IU/L)	423	162	355	291[a]	359	252[a]	399	303[a]
• Total Protein (g/dL)	6.24	6.42	5.90	6.64	5.97	7.01[a]	5.83[a]	5.89[a]
Absolute Organ Weights (%[b])								
• Spleen (g)	1.900	1.514	-48	-38	-47	-18	-48	-48
• Liver (g)	13.832	10.156	-6	-6	-7	-6	-7	-22

Abbreviations:
(°)　Several animals died of pneumonia
M：Male
F：Female
Student's "t" test:
a　$p<0.05$
b　For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences)
-　no noteworthy (biologically significant) findings

表 7.4:2　炎症を含む形態学的変化の所見の概要

Dose group (UI/kg)		0		400	
Sex		**M**	**F**	**M**	**F**
BRAIN (number examined)		5	5	7	7
Lymphocytic perivascular cuffing	Mild	0	0	1[a]	0
Granulomata		0	0	2	1
	Minimal	-	-	1	1
	Moderate	-	-	1[a]	-
Lymphocytic meningitis	Mild	0	0	1[a]	0
KIDNEYS (number examined)		5	5	7	7
Lymphocytic interstitial infiltrate		3	1	5	2
	Minimal	3	1	4	1
	Mild	-	-	-	1
	Moderate	-	-	1	-
Chronic interstitial nephritis		1	1	4	1
	Minimal	1	-	2	-
	Mild	-	1	2	1
Proximal tubule epithelial basophilia and hypertrophy (regeneration)	Minimal	2	2	3	2
Mineralized concretions, cortico-medullary junction		0	4	0	3
	Minimal	-	4	-	2
	Mild	-	-	-	1
Subacute arteritis, renal artery	Mild	0	0	1	0
Granulomatous abscess, unilateral	No grading, present	0	0	1	0
LUNGS (number examined)		5	5	7	7
Lymphocytic infiltrate, perivascular		5	5	7	7
	Minimal	-	2	1	-
	Mild	2	2	1	2
	Moderate	3	1	4	4
	Marked	-	-	1	1[a]
Lymphocytic infiltrate, parabronchiolar		5	2	5	6
	Minimal	2	2	3	4
	Mild	3	-	2	2

表 7.4:2　炎症を含む形態学的変化の所見の概要（続き）

Dose group (UI/kg)		0		400	
Sex		M	F	M	F
Interstitial pneumonitis		5	2	7	7
	Minimal	1	2	1	1
	Mild	2	-	4	3
	Moderate	2	-	2	1
	Marked	-	-	-	2[a]
Parabronchial lymphoid hyperplasia		5	5	5	7
	Minimal	-	3	2	4
	Mild	4	1	3	1
	Moderate	1	1	-	2
Foamy alveolar macrophages		3	1	4	4
	Minimal	3	1	4	3
	Mild	-	-	-	1
Bronchitis		2	1	2	1
	Minimal	-	1	1	-
	Mild	2	-	1	1
Chronic bronchopneumonia	Moderate	0	0	0	1
HEART (number examined)		5	5	7	7
Lymphocytic periarteritis	Minimal	0	0	1	0
LIVER (number examined)		5	5	7	7
Hydropic vacuolation, hepatocytes		2	0	1	0
	Mild	1	-	1	-
	Moderate	1	-	-	-
Lymphocytic infiltrate, intralobular		1	1	2	1
	Minimal	1	-	1	-
	Mild	-	1	1	0
Lymphocytic infiltrate, portal triad		3	3	2	1
	Minimal	3	2	2	1
	Mild	-	1	-	-
Extramedullary haematopoiesis		2	0	0	2
	Mild	1	-	-	2
	Mild	1	-	-	-
Fatty change, hepatocyte	Minimal	0	0	0	1

表 7.4:2　　炎症を含む形態学的変化の所見の概要（続き）

Dose group (UI/kg)		0		400	
Sex		**M**	**F**	**M**	**F**
ILEUM (number examined)		**5**	**5**	**7**	**7**
Lymphoid hyperplasia	Mild	1	0	1	0
COLON (number examined)		5	5	6	3
Lymphoid hyperplasia		1	0	1	0
	Minimal	-	-	-	-
	Mild	1	-	1	-
Lymphocytic perivasculitis, mesentery	Mild	1	0	0	0
Submucosal hemorrhage	Mild	1	0	0	0
Nematodiasis	No grading, present	0	0	2	0
URINARY BLADDER (number examined)		4	4	7	7
Trichosomoides crassicauda	No grading, present	0	2	0	0
ADRENALS (number examined)		5	5	7	7
Increased cytoplasmic lipids, *zona fascicularis*	Minimal	1	0	0	0
EYES (number examined)		5	5	7	7
Absence of outer plexiform layer, retina	No grading, present	1	0	0	0
Narrowing of inner plexiform layer, retina	No grading, present	1	0	0	0
Retinal dystrophy	Mild	0	0	0	1

a　　same animal

7.5　ラット腹腔内 4 週間反復投与試験（追加試験）【Report NP39213】

方法

使用動物：Wistar rats　　投与開始時年齢：不明

被検物質：オンキャスパー液体製剤（Lot No. [redacted]）

投与量：0 (PBS)、400 IU/kg　　投与液量：0.2 mL/ラット　　投与経路：腹腔内　　投与条件：5 回/週、4 週間

初回投与開始日：19[redacted]年[redacted]月[redacted]日

結果

概略の致死量：>400 IU/kg

表 7.5:1　　試験結果概要

Dose (IU/kg)	Control		400	
	M	F	M	F
Number of Animals:	6	6	6	6
Noteworthy Findings: Died or Killed Moribund	0	0	0	0
Clinical Observations:	-	-	-	-
Body Weight %[a] (Day 29):	365 g	226 g	-21	-11
Organ weights (g and %) [a] : mean absolute (mean relative to %body weight)				
Heart	1.36 (0.371)	0.89 (0.382)	-23.5 (-3.0)	-18.0 (-6.3)
Liver	13.64 (3.720)	7.83 (3.394)	-13.7 (-5.3)	-2.5 (-9.7)
Spleen	0.96 (0.261)	0.78 (0.341)	-32.2 (-14.5)	-24.4 (-15.2)
Kidney	2.74 (0.747)	1.74 (0.751)	-6.9 (0)	0 (14.5)
Testes / Ovary	3.55 (0.972)	0.12 (0.052)	-1.1 (+24.6)	-8.3 (0)
Thymus	0.71 (0.193)	0.46 (0.199)	28.1 (-9.3)	-8.9 (3.0)
Adrenal	0.04 (0.012)	0.06 (0.026)	0 (8.3)	-16.7 (-3.8)
Food consumption %[a] (week 4):	180 g	112 g	-7	+10

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

-　no noteworthy (biologically significant) findings

7.6　マウス腹腔内又は筋肉内 3 カ月反復投与毒性試験【Report NP39210】

方法

使用動物：Swiss-Webster mice　　投与開始時年齢：不明

被検物質：オンキャスパー液体製剤（Lot No.[redacted]）

投与量：0 (PBS)、50、200、500 IU/kg　　投与液量：0.1 mL/マウス　　投与経路：腹腔内又は筋肉内　　投与条件：1 回/週、13 週間(腹腔内)、17 週間(筋肉内)　　初回投与開始日：19[redacted]年[redacted]月[redacted]日

結果

概略の致死量：>500 IU/kg

特記すべき所見

500 IU/kg 投与群の雌 1 例で散在性の単核細胞を伴う筋線維再生が認められたが、局所投与における創傷治癒過程の変化と判断された。

表 7.6:1 筋肉内投与の試験結果概要

Dose (IU/kg) Intramuscular	Control		50		200		500	
	M	F	M	F	M	F	M	F
Number of Animals: • Toxicity	5	5	5	5	5	5	5	5
Noteworthy Findings: Died or Killed Moribund (#)	0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations:	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight % (Week 13)[a]								
Absolute Organ Weights (%[a]) • Spleen (g)	0.205	0.208	+82	-17	0	-24	-21	-23
Histopathology Number Examined): • Liver: Hydropic cytoplasmatic changes Periportal hepatocellular atrophy	4 0 0	4 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	4 0 0	5 0 0
Gross observations at injection site	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology at intramuscular injection site (Number Examined): Leucocytic infiltrates Myofibre regeneration	4 0 0	4 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	4 0 0	5 1* 1*

a Data non readable in Study Report

* same animal, changes considered as procedure -related

表 7.6:2 腹腔内投与の試験結果概要

Dose (IU/kg) intraperitoneal	Control		50		200		500	
	M	F	M	F	M	F	M	F
Number of Animals: • Toxicity	5	5	5	5	5	5	5	5
Noteworthy Findings: Died or Killed Moribund (°)	0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations:	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight % (Week 13)[a]:								
Absolute Organ Weights (%[c]) • Spleen (g)	0.192	0.197	+40	-34	+4	-9	-26	-43
Histopathology (Number Examined): • Liver: Periportal hydropic changes Periportal hepatocellular atrophy	4 0 0	4 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	6[b] 3 3	4 4 0

a Data non readable in Study Report

b One female animal was included in the male group by mistake. Error detected at necropsy

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

- no noteworthy (biologically significant) findings

Abbreviations:

(°) two animals died (not treatment related)

(#) six animals died (not treatment related)

M：Male

F：Female

8.　*In Vitro* 遺伝毒性試験【Report NP39215】

方法：　Ames 試験
被験物質：　[redacted] Batch No.: [redacted] PEG-Asparaginase batch [redacted] Act 750 U/mL
菌株：　*S. typhimurium*
代謝活性化系：TA97a, TA98, TA100 TA102 stains with and without metabolic activation
溶媒：　0.85% physiological buffered saline
処理：　48 h at 30-35°C
遺伝毒性：　PEG-L-Asparaginase, tested neat, was not mutagenic when tested against TA97a, TA98, TA100 TA102 stains with and without metabolic activation
GLP 適用：　YES
処理年月日：　[redacted] 19[redacted]

9.　*In Vivo* 遺伝毒性試験

該当試験なし

10. がん原性試験

該当試験なし

11. 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

該当試験なし

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

該当試験なし

13. 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

該当試験なし

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

該当試験なし

15. 新生児を用いた試験

該当試験なし

16. 局所刺激性試験

表 16:1　局所刺激性試験概要

Species/ Strain	Test Article	Comparative Agent	Route (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Dose	Gender and Number/ Group	Noteworthy Findings	Report
Mouse / C57BL/6	Oncaspar liquid (referred to as 'PEGASP')	Oncaspar Liquid (referred to as 'PEGASP') with 5% Sucrose	intra-plantar subcutaneous	once	50 µl	8 M /group (6 groups)	Test Item A (PEGASP with 5% Sucrose) and Test Item B (PEGASP) did not produce any significant nociception after intra-plantar injection in the mice compared with the negative control PBS.	NP39209

17. その他の毒性試験

17.1　血液適合性試験

表 17:1　血液適合性試験概要

Species/ Strain	Test Article	Comparative Agent	Route (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Dose (IU/kg BW)	Gender and Number/ Group	Noteworthy Findings	Report
in vitro	Oncaspar (lyophilized)	Oncaspar (liquid)	*in vitro*	n. a.	750 IU/ml	n. a.	The results of Phases 2 and 4 indicate that there were no observed hemocompatibility effects from both presentations of Oncaspar (liquid and lyophilized) on human whole blood at the final concentration of 750 IU/mL.[a]	NP39212

a The results of Phases 1 and 3 using dog whole blood could not be evaluated because the vehicle control (sterile water + dog whole blood) generated results > negative control + 0.5 g/dL. The reconstituted Oncaspar (lyophilized) generated results within protocol criteria but these results could not be evaluated due to the failure of the vehicle. Therefore, the hemolytic potential results for dog whole blood were considered not valid. It is noted that detectable hemoglobin levels were observed for human whole blood plus vehicle, but these results were within criteria and most likely represent differences in red cell fragility between species.