目次

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表 3
2.6.1 緒言 3
2.6.1.1 臨床での用法・用量の概要 3
2.6.1.2 参考文献 3

略語一覧

略語	英語名	和名
HER2	human epidermal growth factor receptor type 2	ヒト上皮増殖因子受容体2型
PH FDC SC	Pertuzumab and trastuzumab fixed dose combination for SC injection	ペルツズマブ/トラスツズマブ配合皮下注射剤
rHuPH20	recombinant human hyaluronidase	ボルヒアルロニダーゼ　アルファ（遺伝子組換え）

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

ペルツズマブ及びトラスツズマブはF. Hoffmann-La Roche, Ltd.が開発したヒト上皮増殖因子受容体2型（HER2）を標的とした抗 HER2ヒト化モノクローナル抗体である。これら両抗体はHER2分子上の結合部位が異なり，ペルツズマブがリガンド依存的な HER2シグナルを抑制するのに対して，トラスツズマブはリガンド非依存的な HER2シグナルを抑制する（ペルツズマブ初回申請時資料[1)]）ことから，それぞれ異なる作用機序を有し，HER2シグナルを相補的に抑制するため，両抗体の併用により相加／相乗的な抗腫瘍効果が得られる。

本邦において，ペルツズマブはトラスツズマブとの併用で，「HER2陽性の乳癌」及び「がん化学療法後に増悪した HER2陽性の治癒切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌」を効能・効果として承認されている（2.5.1）。トラスツズマブは，本邦において「HER2過剰発現が確認された乳癌」，「HER2過剰発現が確認された治癒切除不能な進行・再発の胃癌」，「HER2陽性の根治切除不能な進行・再発の唾液腺癌」及び「がん化学療法後に増悪した HER2陽性の治癒切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌」を効能・効果として承認されている（2.5.1）。

今回，静脈内投与による長い拘束時間，侵襲性の高さ等を回避する目的で，ペルツズマブ及びトラスツズマブをそれぞれ固定用量で配合し，さらに皮下注入液の浸透吸収促進を目的としてボルヒアルロニダーゼ　アルファ（遺伝子組換え）（rHuPH20）を配合した調製不要の皮下投与製剤（ペルツズマブ/トラスツズマブ配合皮下注射剤，PH FDC SC）が開発された。有効成分として含有されるペルツズマブ及びトラスツズマブは点滴静注剤と同じ製法で製造された既承認薬と同一の原薬を更に皮下注用に調製し使用している。

PH FDC SC に配合された rHuPH20は，Halozyme Therapeutics, Inc.が開発した遺伝子組換えヒトヒアルロニダーゼであり，447アミノ酸から成る糖タンパク質である。結合組織のゲル状のヒアルロン酸を分解することにより，その粘度を低下させ組織の浸透性を増加させる生理活性を有する。

2.6.1.1 臨床での用法・用量の概要

今回申請した PH FDC SC の用法・用量の概要については，2.2に記載した。

2.6.1.2 参考文献

1) ペルツズマブ初回申請時資料 CTD

目次

2.6.2 薬理試験の概要文 3
2.6.2.1 まとめ 3
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 4
2.6.2.2.1 ヒト腫瘍細胞株 xenograft マウスにおける抗腫瘍効果 4
2.6.2.2.1.1 ヒト乳癌細胞株 KPL-4 xenograft マウスにおけるペルツズマブとトラスツズマブの併用効果 4
2.6.2.2.1.2 ヒト NSCLC 株 Calu-3 xenograft マウスにおけるトラスツズマブ SC 投与とトラスツズマブ IV 投与時の抗腫瘍効果の比較 5
2.6.2.2.2 rHuPH20 の作用機序 6
2.6.2.2.3 マウス皮膚組織における rHuPH20 の浸透作用 7
2.6.2.2.3.1 皮膚での色素拡散に対する rHuPH20（ID）投与の作用 7
2.6.2.2.3.2 皮膚組織に対する rHuPH20 + トリパンブルー同時（ID）投与と rHuPH20 + トリパンブルー逐次（ID）投与の作用 8
2.6.2.2.3.3 rHuPH20（ID）投与後の皮膚組織の再構成 9
2.6.2.2.3.4 遠隔部位に対する rHuPH20 局所（ID）投与の作用 10
2.6.2.2.3.5 皮膚での色素拡散に対する rHuPH20（IV）投与の作用 11
2.6.2.2.3.6 rHuPH20 の浸透作用に対する rHuPH20 中和抗体の影響 12
2.6.2.3 副次的薬理試験 14
2.6.2.4 安全性薬理試験 14
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 14
2.6.2.6 考察及び結論 14
2.6.2.7 図表 15
2.6.2.8 参考文献一覧 15

図一覧

図 2.6.2.2.1.1-1 ヒト乳癌細胞株 KPL-4 xenograft マウスにおけるペルツズマブ（IP）とトラスツズマブ（IP）の併用効果 5
図 2.6.2.2.1.2-1 ヒト NSCLC 株 Calu-3 xenograft マウスにおけるトラスツズマブ SC（トラスツズマブ + rHuPH20の併用）投与とトラスツズマブ IV 単独投与時の抗腫瘍効果 6
図 2.6.2.2.3.1-1 トリパンブルーの色素拡散に対する rHuPH20（ID）投与の作用 7
図 2.6.2.2.3.2-1 皮膚組織に対する rHuPH20 + トリパンブルー同時（ID）投与と rHuPH20 + トリパンブルー逐次（ID）投与の作用（色素拡散領域は，トリパンブルー投与1分後に測定） 9
図 2.6.2.2.3.3-1 rHuPH20（ID）投与後の皮膚組織の再構成（色素拡散領域は，トリパンブルー投与20分後に測定） 10
図 2.6.2.2.3.4-1 rHuPH20（ID）投与45分後にトリパンブルー（ID）を投与した後の色素拡散領域（色素拡散領域は，トリパンブルー投与15分後に測定） 11
図 2.6.2.2.3.5-1 rHuPH20（IV）投与45分後にトリパンブルー（ID）を投与した後の色素拡散領域（色素拡散領域は，トリパンブルー投与15分後に測定） 12
図 2.6.2.2.3.6-1 rHuPH20の色素拡散作用に対する rHuPH20中和抗体の影響 13

略語一覧

略語	英名	和名
HER2	human epidermal growth factor receptor type 2	ヒト上皮増殖因子受容体2型
ID	intradermal	皮内
IP	intraperitoneal	腹腔内
IV	intravenous	静脈内
NSCLC	non-small cell lung cancer	非小細胞肺癌
PH FDC SC	Pertuzumab and trastuzumab fixed dose combination for SC injection	ペルツズマブ/トラスツズマブ配合皮下注射剤
q7d	once a week	週1回の投与
rHuPH20	recombinant human hyaluronidase	ボルヒアルロニダーゼ　アルファ（遺伝子組換え）
SC	subcutaneous	皮下
TGI	tumor growth inhibitory ratio	腫瘍増殖抑制率

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

ペルツズマブは，本邦において，トラスツズマブとの併用で「HER2陽性の乳癌」及び「がん化学療法後に増悪した HER2陽性の治癒切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌」を効能・効果として承認されている（2.5.1）。トラスツズマブは，本邦において「HER2過剰発現が確認された乳癌」，「HER2過剰発現が確認された治癒切除不能な進行・再発の胃癌」，「HER2陽性の根治切除不能な進行・再発の唾液腺癌」及び「がん化学療法後に増悪した HER2陽性の治癒切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌」を効能・効果として承認されている（2.5.1）。今回，ペルツズマブ及びトラスツズマブの静脈内（IV）投与による長い拘束時間の短縮，侵襲性の高さの回避，並びに製剤の浸透吸収促進などを目的に，両抗体にボルヒアルロニダーゼ　アルファ（遺伝子組換え）（rHuPH20）を配合した製剤が開発された（2.6.1）。

ペルツズマブ及びトラスツズマブはヒト上皮増殖因子受容体2型（HER2）を標的とした抗HER2ヒト化モノクローナル抗体である。両抗体は HER2分子上での結合部位が異なり，ペルツズマブがリガンド依存的な HER2シグナルを抑制するのに対して，トラスツズマブはリガンド非依存的な HER2シグナルを抑制する（ペルツズマブ初回申請時資料[1)] ）。両抗体はそれぞれ異なる作用機序を有し，HER2シグナルを相補的に抑制するため，両抗体の併用により相加／相乗的な抗腫瘍効果が得られる。rHuPH20は447アミノ酸から成る蛋白質であり，本蛋白は，結合組織のゲル状のヒアルロン酸を分解することにより，その粘度を低下させ，組織の浸透性を増加させる作用を有する（2.6.1）。

ペルツズマブ及びトラスツズマブの「HER2陽性の乳癌」に対する非臨床における IV 投与時の有効性及び安全性は，初回承認時に提出した試験成績に基づき評価されている（ペルツズマブ初回申請時資料[1)] ，トラスツズマブ初回申請時資料[2)] ）。今回「ペルツズマブ/トラスツズマブ配合皮下注射剤（PH FDC SC）の承認申請」のための効力を裏付ける試験として，「ヒト非小細胞肺癌（NSCLC）株 Calu-3 xenograft マウスにおいて，トラスツズマブ皮下（SC）（トラスツズマブ ＋ rHuPH20の併用）投与時とトラスツズマブ IV 単独投与時の抗腫瘍効果を比較した試験（1試験）」及び「マウス色素拡散モデルを用いて rHuPH20の薬理学的特性を検討した試験（6試験）」を新たに提出する。また，ヒト乳癌細胞株において，ペルツズマブとトラスツズマブ併用が抗腫瘍効果を増強することを裏付ける資料として，「ヒト乳癌細胞株 KPL-4 xenograft マウスにおけるペルツズマブとトラスツズマブの併用効果」の試験結果を初回申請時資料から再掲した（ペルツズマブ初回申請時資料[1)] ）。安全性薬理試験としては，rHuPH20を含むトラスツズマブのカニクイザルを用いた13週間 SC 投与毒性試験（心血管系評価）及びrHuPH20のカニクイザルを用いた39週間 SC 投与毒性試験（心血管系，呼吸系及び中枢神経系評価）を新たに提出する。

効力を裏付ける試験の概要

ペルツズマブ及びトラスツズマブの *in vivo* 抗腫瘍効果

In vivo xenograft マウスでの2試験の結果から，ペルツズマブ及びトラスツズマブの抗腫瘍効果として以下のことが示された。

- ヒト乳癌細胞株 KPL-4 xenograft マウスにペルツズマブとトラスツズマブを腹腔内（IP）で併用投与したところ，抗腫瘍効果の増強／相乗効果が認められた（ペルツズマブ初回申請時資料[1)] ）。
- ヒト NSCLC 株 Calu-3 xenograft マウスを用いて，トラスツズマブ 3，10 mg/kg SC（トラスツズマブ ＋ rHuPH20 の併用）投与時とトラスツズマブ 3，10 mg/kg IV 単独投与時の腫瘍増殖抑制率（TGI）ならびに血清トラフ濃度を比較したところ，3 mg/kg では，SC 及び IV 両群において TGI とトラフ濃度は同程度であった。10 mg/kg では，SC に比較して IV の方が，TGI 及びトラフ濃度ともに高い傾向を示した。SC 及び IV 両投与群ともに，TGI はトラフ濃

度と概ね相関していた。本試験は，SC 投与でも有効トラフ濃度が達成される可能性を示唆しており，実際，臨床での SC のトラフ濃度は IV に比べて同等以上であった（2.5.3.3.2）。臨床における SC 投与時の有効性は IV 投与時と同等以上であることが期待される。

rHuPH20の薬理学的特性

臨床ではこれまで50年以上にわたり，動物由来のヒアルロニダーゼが使用されてきた[3)]。rHuPH20とトレーサー色素（トリパンブルー）のマウスへの皮内（ID）投与は，ヒアルロン酸を局所的に分解し，トリパンブルーを濃度依存的に拡散させた。このマウス皮膚における色素拡散試験は，動物及びヒトの両方においてヒアルロニダーゼ活性を測定できる優れたモデルであることが報告されている[4)-6)]。

In vivo マウス色素拡散モデルでの6試験の結果から，rHuPH20の薬理学的特性として以下のことが示された。

- rHuPH20 の ID 投与は，トリパンブルーの浸透性を一過性かつ局所的に増強させた。
- rHuPH20（ID）投与の浸透増強作用及び持続作用は，濃度依存的かつ時間依存的であった。
- 臨床での SC 投与が約 8 分間であることを鑑みて，rHuPH20 + トリパンブルー逐次投与（rHuPH20 を ID 投与 5 分後にトリパンブルーID 投与）群の色素拡散の拡散活性を調べたところ，その拡散活性は rHuPH20 + トリパンブルー同時投与群の 5～50 倍に相当した。
- rHuPH20 の ID 投与は，投与 6 時間後までトリパンブルーの拡散を増加させたが，投与 6 時間後以降に有意な増加はみられなかった。皮膚組織は，rHuPH20 投与後 6～18 時間の間に再構成されると考えられた。
- rHuPH20 の局所 ID 投与は，1200 U/mouse の高用量においても遠隔皮膚部位に影響を与えず，rHuPH20 の浸透作用は局所部位においてのみ発揮された。
- 対照的に rHuPH20（10 U/mouse）の IV 投与は，皮膚組織での色素拡散を増加させた。
- rHuPH20（ID）と rHuPH20 中和抗体（IV）を投与した時に，中和抗体は，rHuPH20 の色素拡散作用に影響を与えなかった。

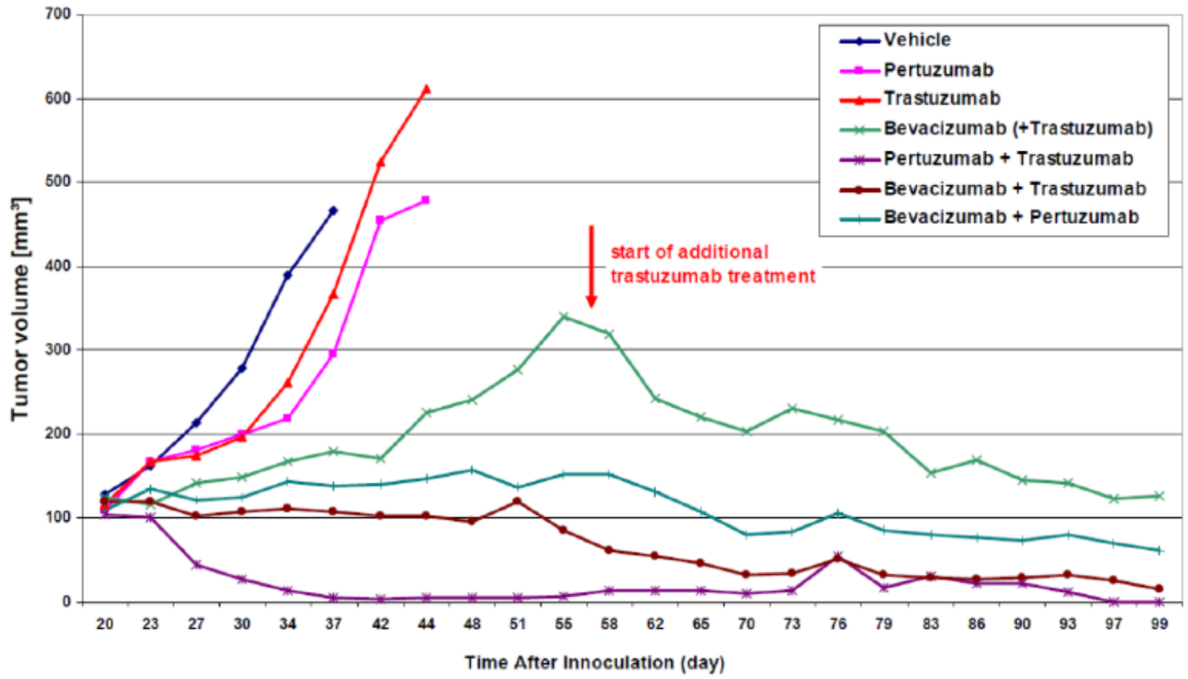
2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 ヒト腫瘍細胞株 xenograft マウスにおける抗腫瘍効果

2.6.2.2.1.1 ヒト乳癌細胞株 KPL-4 xenograft マウスにおけるペルツズマブとトラスツズマブの併用効果

ペルツズマブ初回申請時資料[1)]に示したように，ヒト乳癌細胞株 KPL-4 xenograft マウスにペルツズマブとトラスツズマブを IP で併用投与した時に相乗効果が認められている（図 2.6.2.2.1.1-1）。この結果は，臨床においてペルツズマブとトラスツズマブを併用投与で使用することの妥当性を支持している。

図 2.6.2.2.1.1-1 ヒト乳癌細胞株 KPL-4 xenograft マウスにおけるペルツズマブ（IP）とトラスツズマブ（IP）の併用効果



各データは median（n = 10），各群の動物数（n）は初回投与開始時の匹数

【初回承認申請資料 図2.6.2.5.1-1再掲】

2.6.2.2.1.2 ヒト NSCLC 株 Calu-3 xenograft マウスにおけるトラスツズマブ SC 投与とトラスツズマブ IV 投与時の抗腫瘍効果の比較

〔資料番号：4.2.1.1-1〕

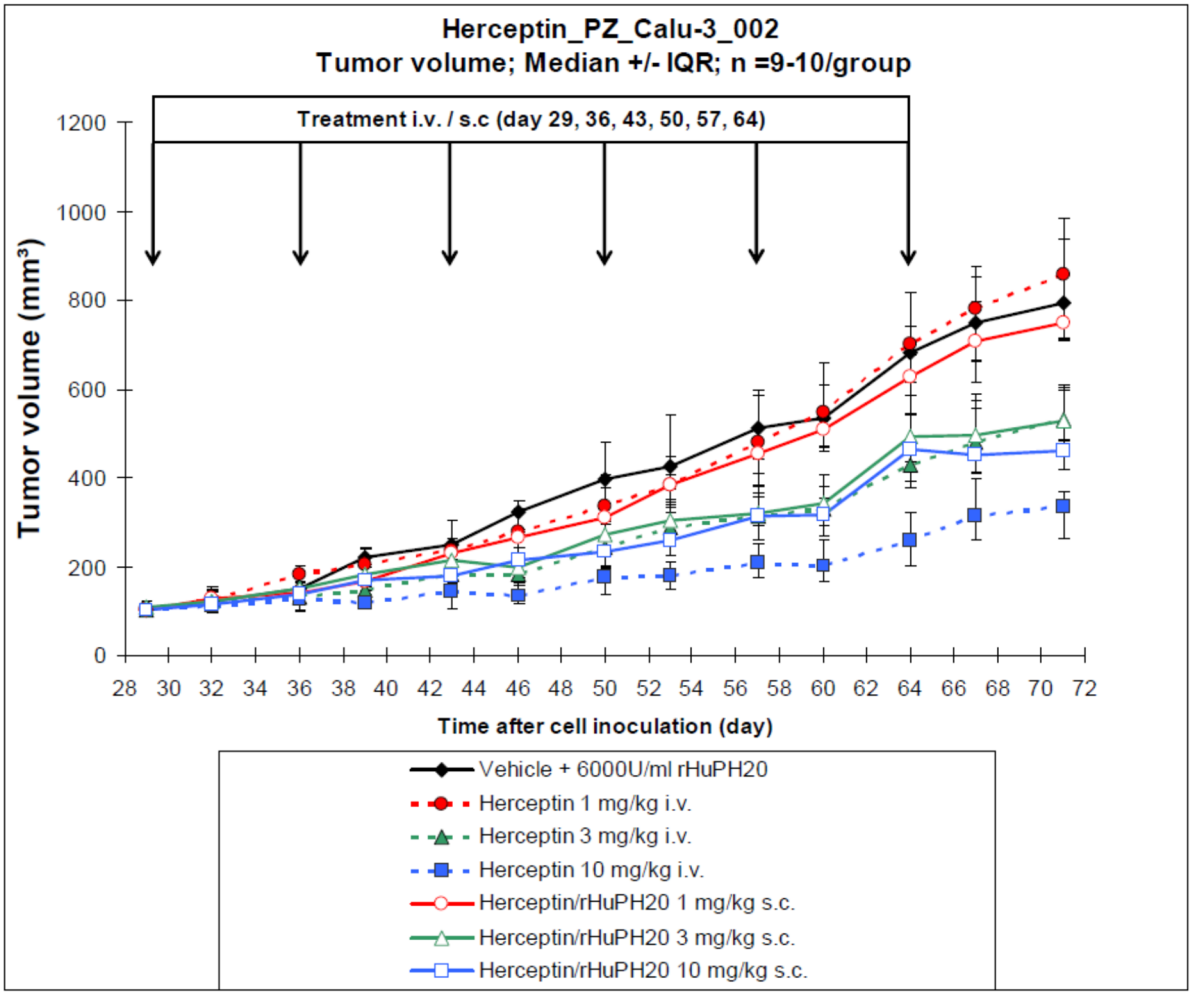
Calu-3細胞（5 × 10^6 cells/mouse）を Balb/c ヌードマウス（雌）に異種移植した Calu-3 xenograft マウスを用いて，トラスツズマブ SC 投与群〔3群：トラスツズマブ（1 mg/kg）+ rHuPH20*，トラスツズマブ（3 mg/kg）+ rHuPH20*及びトラスツズマブ（10 mg/kg）+ rHuPH20*，週1回の投与（q7d）〕とトラスツズマブ IV 単独投与群〔3群：トラスツズマブ（1, 3, 10 mg/kg），q7d〕の抗腫瘍効果を比較した（図 2.6.2.2.1.2-1）。トラスツズマブ 1 mg/kg 投与群では IV 及び SC 群ともに抗腫瘍効果はみられなかったが，トラスツズマブ 3及び10 mg/kg 投与群では IV 及び SC 群ともに抗腫瘍効果が認められた。

トラスツズマブ 3 mg/kg（SC 又は IV）投与群の腫瘍細胞移植71日後（Day71）の TGI はそれぞれ39%及び38%と同等であり，また，Day64の血清トラフ濃度も両群ともに約10 μg/mL と同程度であった。トラスツズマブ 10 mg/kg（SC 又は IV）投与群の Day71の TGI はそれぞれ48%及び66%と，SC に比較して IV の方が高い傾向を示した。また， Day64のトラフ濃度（SC 群：61 μg/mL，IV 群：96 μg/mL）も，SC に比較して IV の方が高い傾向を示した。トラスツズマブ 3及び10 mg/kg 群の TGI は，SC 及び IV 両群ともに概ね血清トラフ値と相関していた。

本試験は，SC 投与でも有効トラフ濃度が達成される可能性を示唆しており，実際，臨床での SC のトラフ濃度は IV に比べて同等以上であった（2.5.3.3.2）。臨床における SC 投与時の有効性は IV 投与時と同等以上であることが期待される。

* 4600 U/mL 濃度を10 mL/kg 容量で投与

図 2.6.2.2.1.2-1 ヒト NSCLC 株 Calu-3 xenograft マウスにおけるトラスツズマブ SC（トラスツズマブ + rHuPH20の併用）投与とトラスツズマブ IV 単独投与時の抗腫瘍効果



Herceptin：トラスツズマブ

【4.2.1.1-1 Figure 2再掲】

2.6.2.2.2 rHuPH20の作用機序

投与部位での rHuPH20の一過性かつ局所的な酵素活性の発現作用は，これまで一般的であったトラスツズマブとペルツズマブの IV 治療を，SC 投与に代替えすることを可能にした。

rHuPH20の作用機序は，皮膚の投与部位で基質であるヒアルロン酸を局所的に脱重合することである。ヒアルロン酸は，皮膚において N-アセチルグルコサミンと D-グルクロン酸が繰り返しのポリマー構造をとっているゲル状基質であり，細胞外マトリックス成分の一つである。二つの繰り返し多糖間の β-1, 4結合がヒトヒアルロニダーゼにより加水分解されることにより，ヒアルロン酸の脱重合が引き起こされる。このヒアルロン酸の脱重合により，一過性に細胞外マトリックスの粘性が減少するものの，巨大分子構造を持つコラーゲンとエラスチンには影響がなく，ヒアルロン酸の粘性の減少により水力学的コンダクタンスが増加し，その結果，薬物注入量，薬物の拡散及び吸収レベルが増加することが報告されている[4),7)]。ヒアルロン酸の構造[8),9)]は各動物種を通じて保存されていることから[10),11)]，rHuPH20 は実験動物及びヒトのすべての種において活性を示す。

2.6.2.2.3 マウス皮膚組織における rHuPH20の浸透作用

NCR-nu/nu（ホモ接合，雌）マウスを用いて rHuPH20の浸透作用を評価した。以下の *in vivo* 試験で用いた色素拡散アッセイは論文報告されており[5),6),12)]，動物及びヒト両方においてヒアルロニダーゼ活性を測定できる優れたモデルである。rHuPH20の投与は，4.2.1.1-6（IV 投与）（2.6.2.2.3.5）試験を除き ID で行い，浸透活性のトレーサーとしてトリパンブルー（0.4%）色素を使用した。ID ルートは，ヒトと実験動物の解剖学的違いを鑑みた時に，色素の拡散状態の可視化を可能にする投与法であることから選択した。げっ歯類の ID スペースに大量の溶液を注入した時には抵抗が生じるが，この抵抗は解剖学的にヒトの SC スペースに大量の溶液を注入した時に抵抗が発生する状態に極めて近いと推定される。

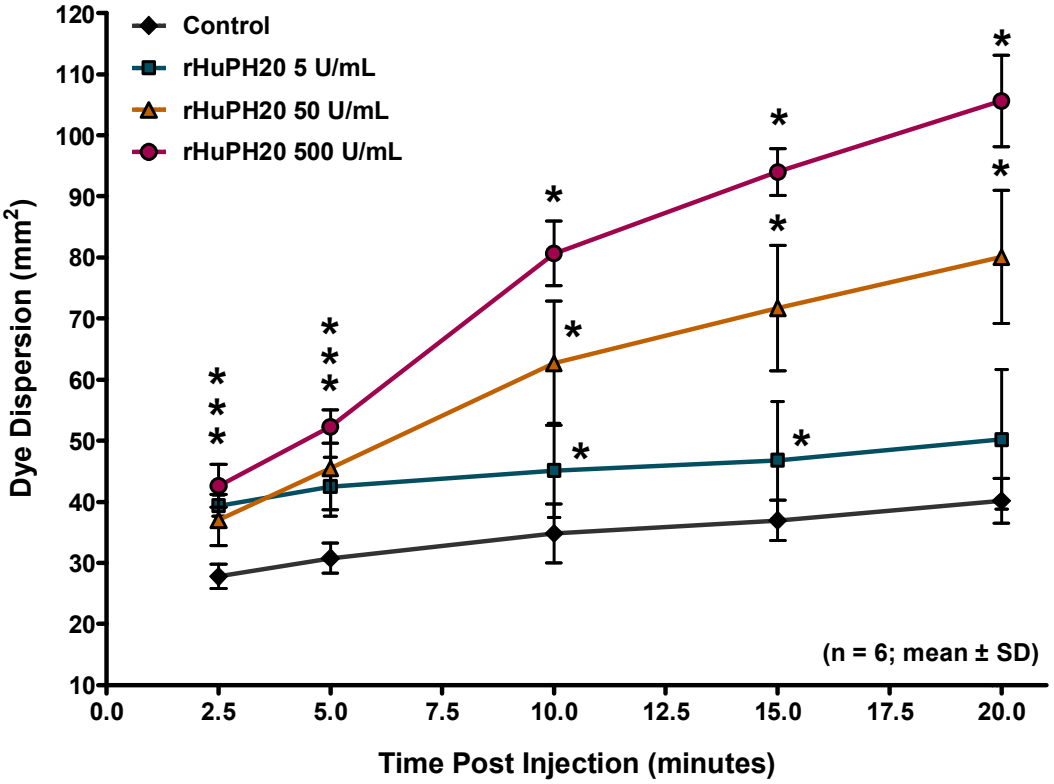
2.6.2.2.3.1 皮膚での色素拡散に対する rHuPH20（ID）投与の作用

〔資料番号：4.2.1.1-2〕

本 *in vivo* 試験は，マウス皮膚に rHuPH20 + トリパンブルーを ID にて同時投与した時の rHuPH20の浸透活性を定量化することを目的に実施した。rHuPH20の活性は，トリパンブルー + rHuPH20溶液投与後に，トリパンブルーの拡散領域を経時的に測定することにより評価した。

溶媒（コントロール）又は rHuPH20〔3用量：0.2 U/mouse（5 U/mL），2 U/mouse（50 U/mL）及び20 U/mouse（500 U/mL）〕溶液を投与し，投与2.5，5，10，15，20分後に色素拡散領域を測定した（図 2.6.2.2.3.1-1）。

図 2.6.2.2.3.1-1 トリパンブルーの色素拡散に対する rHuPH20（ID）投与の作用



* - p<0.05, treatment vs. control (*t*-test)

【4.2.1.1-2 Figure 1再掲】

rHuPH20（5，50，500 U/mL）は，濃度依存的かつ時間依存的にトリパンブルーの拡散領域

を増加させた（図 2.6.2.2.3.1-1）。最低用量（5 U/mL）群の投与20分後を除き，コントロール群に比較して拡散領域の有意な増加が認められた（$p<0.05$）。500 U/mL 群では，投与20分後に拡散領域がコントロール群に比較して2.6倍増加した。

2.6.2.2.3.2 皮膚組織に対する rHuPH20 + トリパンブルー同時（ID）投与と rHuPH20 + トリパンブルー逐次（ID）投与の作用

〔資料番号：4.2.1.1-3〕

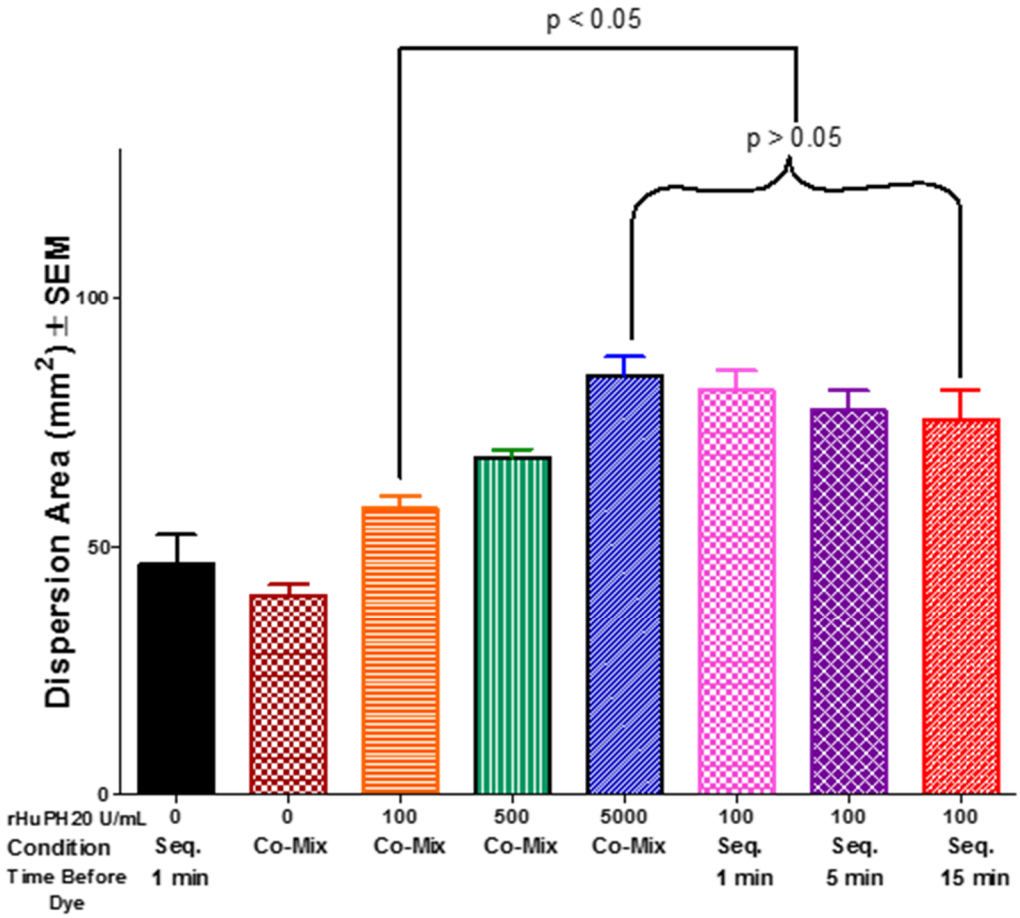
薬剤治療を目的として皮膚内蛋白を分解するためには，投与レジメンとして rHuPH20と被験物質を同時投与あるいは逐次投与する方法が考えられる。マウスに rHuPH20とトリパンブルーを同時投与又は逐次投与することにより，両レジメンにおけるトリパンブルーの拡散領域を比較した。

同時投与群では，3用量の rHuPH20〔2 U/mouse（100 U/mL），10 U/mouse（500 U/mL）及び100 U/mouse（5000 U/mL）〕溶液とトリパンブルーを同時に ID 投与した。逐次投与では，rHuPH20〔2 U/mouse（100 U/mL）〕溶液投与1，5及び15分後に，トリパンブルーを ID 投与した。トリパンブルーID 投与1，2.5，5及び20分後に色素の拡散領域を測定した。

rHuPH20（100 U/mL，500 U/mL，5000 U/mL）同時投与群におけるトリパンブルー投与1分後の色素拡散領域は，濃度依存的に増加した（図 2.6.2.2.3.2-1）。rHuPH20（100 U/mL）溶液投与1，5及び15分後にトリパンブルーを逐次投与したとき，各時点（1，5，15 min）の色素拡散領域のレベル間に有意差は認められなかった（図 2.6.2.2.3.2-1）。これらのことから，トリパンブルーの拡散は，投与1分後には最大レベルに達していることが示唆された。同用量群（100 U/mL）の比較において，逐次投与群は同時投与群に比較して，色素拡散をより早く促進させることが示された。同時投与群（500～5000 U/mL）の色素拡散領域は逐次投与群（100 U/mL）と同等であり，同じ用量で比較した場合，同時投与群の5～50倍の活性が逐次投与群に相当すると推定された。

これらの結果は，1) ID 投与時の rHuPH20とヒアルロン酸の *in vivo* 相互作用は，約1分以内に迅速に生じる，2) 同時投与における局所での rHuPH20の浸透活性発現に必要な時間は，rHuPH20の用量を増加することで減少できる可能性がある，3) 臨床での SC 投与が約8分間であることを鑑みた時に，逐次投与群〔rHuPH20（100 U/mL）ID 投与1，5及び15分後に，トリパンブルーを ID 投与〕の活性は，同時投与群の rHuPH20（500～5000 U/mL）と概ね同等であることを示すと考えられる。

図 2.6.2.2.3.2-1　皮膚組織に対する rHuPH20 + トリパンブルー同時（ID）投与と rHuPH20 + トリパンブルー逐次（ID）投与の作用（色素拡散領域は，トリパンブルー投与1分後に測定）



Seq.：逐次的投与，Co-Mix：同時投与，n = 6 animals/cohort，STATISTICAL METHODS: A one-way ANOVA with a Tukey's multiple comparisons post-hoc analysis

【4.2.1.1-3 Figure 2再掲】

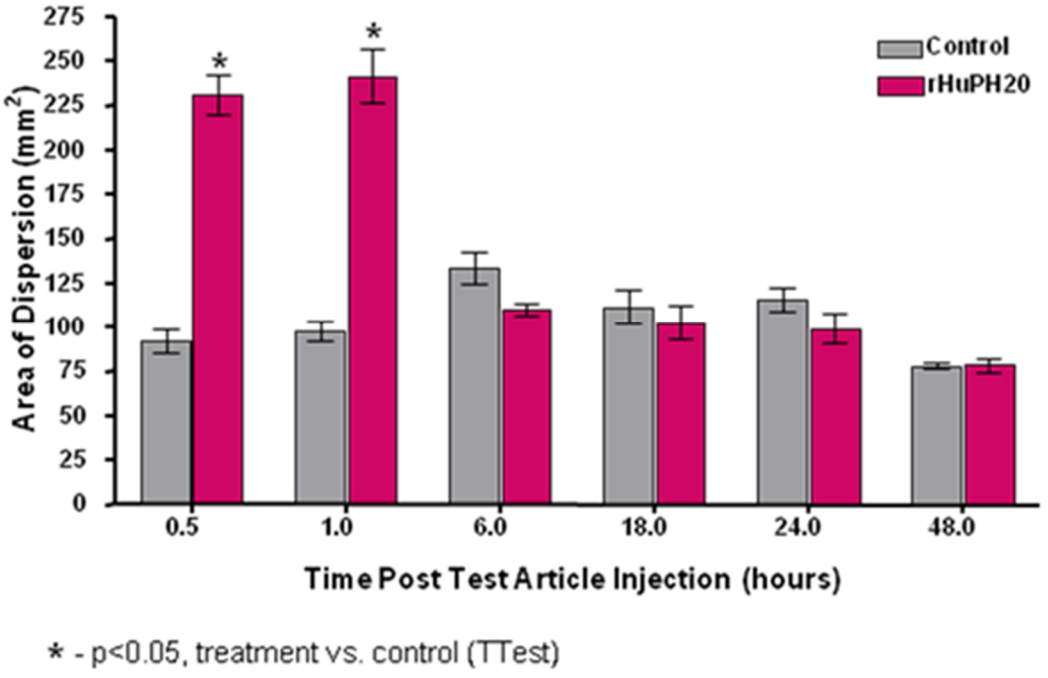
2.6.2.2.3.3　rHuPH20（ID）投与後の皮膚組織の再構成

〔資料番号：4.2.1.1-4〕

生体内でヒアルロン酸は迅速にターンオーバーされ，ヒト皮膚組織での再構成期間は24～42時間であることが報告されている[13)]。本 *in vivo* 試験の目的は，マウスに rHuPH20とトリパンブルーを ID 投与した後の色素拡散領域を経時的に測定することにより，皮膚組織の再構成過程を評価することである。本試験で用いた皮膚バリアー再構成の評価系は，Bywaters ら[13)] がヒトで用いたものと類似の評価系を使用した。

溶媒（コントロール）及び rHuPH20（4 U/mouse）溶液を投与し，投与0.5，1，6，18，24及び48時間後にトリパンブルーを投与した。トリパンブルーID 投与5及び20分後に，色素の拡散領域を測定した。

図 2.6.2.2.3.3-1 rHuPH20（ID）投与後の皮膚組織の再構成（色素拡散領域は，トリパンブルー投与20分後に測定）



* - p<0.05, treatment vs. control (TTest)

Data = Mean ± SD, n = 3 animals/group

【4.2.1.1-4 Figure 2再掲】

トリパンブルー投与20分後の色素拡散領域は，rHuPH20投与0.5及び1時間後で有意に増加していた（p<0.05 vs control）（図 2.6.2.2.3.3-1）。トリパンブルー投与5分後に色素拡散領域を測定した時には，投与0.5，1時間後に加えて6時間後にも有意差がみられた（p<0.05 vs control）（データ未記載）。

rHuPH20投与18，24及び48時間後では，コントロール群と rHuPH20群間に有意差は認められなかった（図 2.6.2.2.3.3-1）。コントロール投与群と rHuPH20投与群間の有意差が，rHuPH20投与後6時間目からなくなる傾向を示すことから，皮膚組織は rHuPH20投与後6～18時間に再構成されると考えられた。

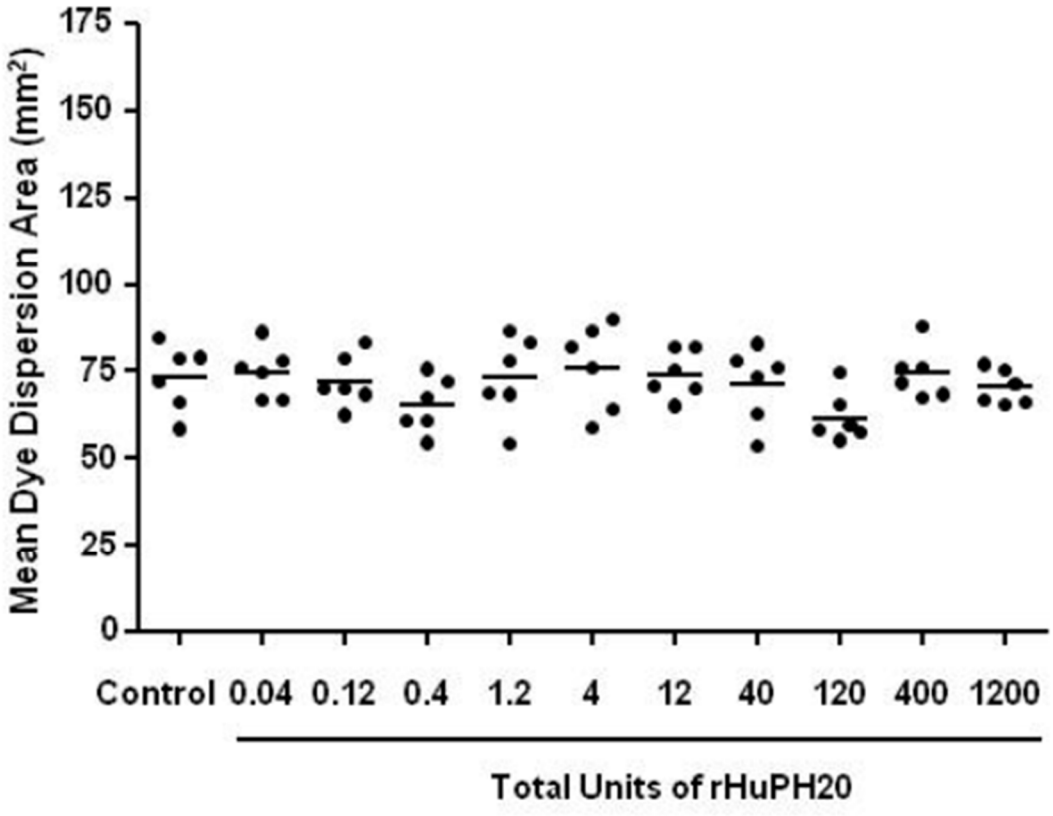
2.6.2.2.3.4 遠隔部位に対する rHuPH20局所（ID）投与の作用

〔資料番号：4.2.1.1-5〕

本試験では，希釈系列で調製した rHuPH20（0.04～1200 U/mouse）溶液を用いて，rHuPH20の局所 ID 投与がマウスの遠隔部位の色素拡散に影響を与えるか否かを調べた。初めに各マウスに溶媒（コントロール）又は rHuPH20溶液を ID 投与し，投与45分後に被験物質溶液投与部位とは反対側の遠隔部位にトリパンブルーを ID 投与した。トリパンブルー投与5及び15分後に，色素の拡散領域を測定した。

図 2.6.2.2.3.4-1に示すように，トリパンブルー投与15分後の遠隔部位での色素拡散はコントロール群と同様であり，高用量（1200 U/mouse）の rHuPH20を含む希釈列の局所 ID 投与は，遠隔部位に薬力学的な作用を誘導しなかった。また，トリパンブルー投与5分後の遠隔部位での色素拡散も，コントロール群と同様であった（データ未記載）。これらの結果から，rHuPH20の ID 投与は局所のみに作用することが明らかとなった。

図 2.6.2.2.3.4-1 rHuPH20（ID）投与45分後にトリパンブルー（ID）を投与した後の色素拡散領域（色素拡散領域は，トリパンブルー投与15分後に測定）



Horizontal line = Mean，6 animals/cohort = 6 data points/dose cohort

【4.2.1.1-5 Figure 2再掲】

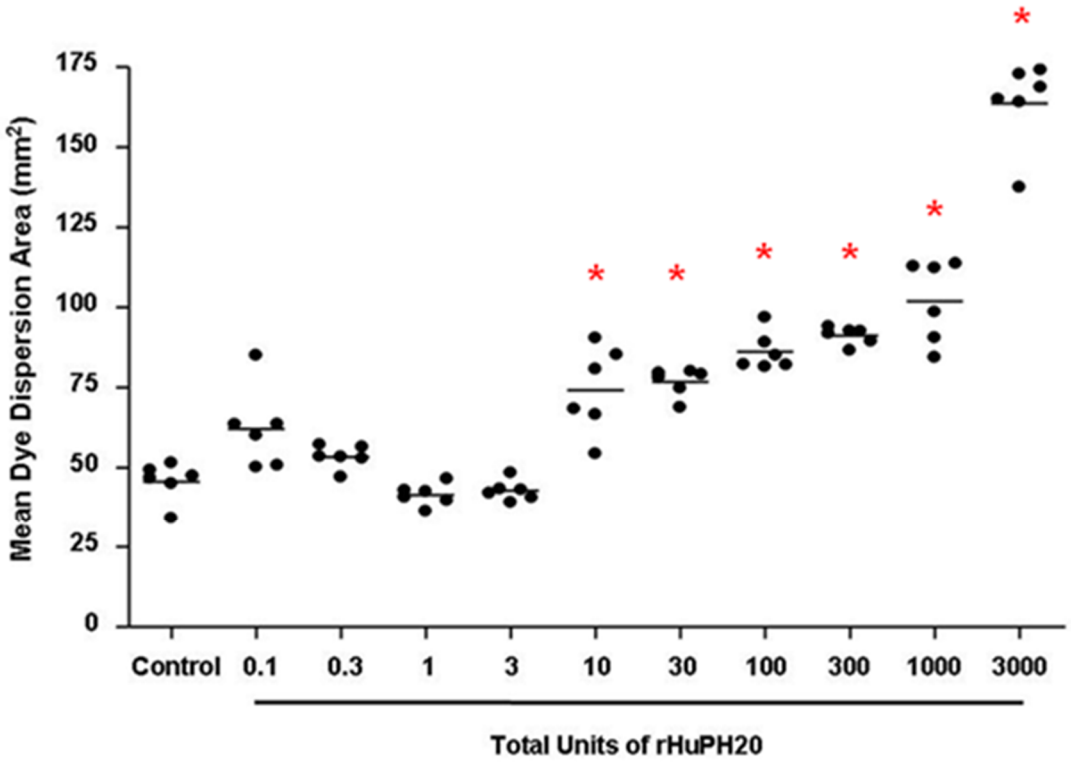
2.6.2.2.3.5 皮膚での色素拡散に対する rHuPH20（IV）投与の作用

〔資料番号：4.2.1.1-6〕

rHuPH20の ID 投与は，ID 投与部位（局所部位）におけるトリパンブルーの拡散を増加させた（2.6.2.2.3.1，2.6.2.2.3.2）。一方，遠隔部位においては，高用量の rHuPH20（1200 U/mouse）ID 投与時にも，色素拡散は増加しなかった（2.6.2.2.3.4）。以上の結果を踏まえて，本試験では，rHuPH20を IV 投与した時に，局所 ID 投与したトリパンブルーの色素拡散に影響が出るか否かを調べた。

マウス尾静脈に，溶媒（コントロール）又は希釈系列で調製した rHuPH20（0.1～3000 U/mouse）溶液を IV 投与した。被験物質溶液 IV 投与45分後に，トリパンブルーを ID 投与した。色素の拡散領域は，トリパンブルーの ID 投与5及び15分後に測定した。

図 2.6.2.2.3.5-1 rHuPH20（IV）投与45分後にトリパンブルー（ID）を投与した後の色素拡散領域（色素拡散領域は，トリパンブルー投与15分後に測定）



Horizontal line = Mean，3 animals/cohort = 6 data points/dose cohort，STATISTICAL METHODS: ANOVA with a Tukey's multiple comparisons test

【4.2.1.1-6 Figure 2再掲】

rHuPH20（10 U/mouse）の IV 投与は，トリパンブルー投与15分後の皮膚組織の色素拡散を有意に増加させた（図 2.6.2.2.3.5-1）。10 U/mouse 用量を超える投与群でも有意な増加が認められ，高用量（3000 U/mouse）の IV 投与群の拡散領域は，コントロール群に比較して3.6倍高かった。トリパンブルー投与5分後に色素拡散を測定した時には，30 U/mouse 用量以上の IV 投与群で拡散領域の有意な増加がみられ，高用量（3000 U/mouse）の IV 投与群の拡散領域は，コントロール群に比較して3.2倍高かった（データ未記載）。

rHuPH20を IV 投与した本試験において，色素拡散に変化をもたらす rHuPH20の閾値は10 U/mouse であった。10 U/mouse 用量での IV 投与時の全身曝露量は，ID で高用量（1200 U/mouse）局所投与した時（2.6.2.2.3.4）の全身曝露量に比べて高いと考えられた。rHuPH20の ID 投与時のバイオアベイラビリティはないかあっても極めて低いことが示唆される（2.6.4.4.1）一方で，rHuPH20の IV 投与により全身曝露量が高レベルに達した時には薬理学的作用が発現する可能性もあると考えられる。

2.6.2.2.3.6 rHuPH20の浸透作用に対する rHuPH20中和抗体の影響

〔資料番号：4.2.1.1-7〕

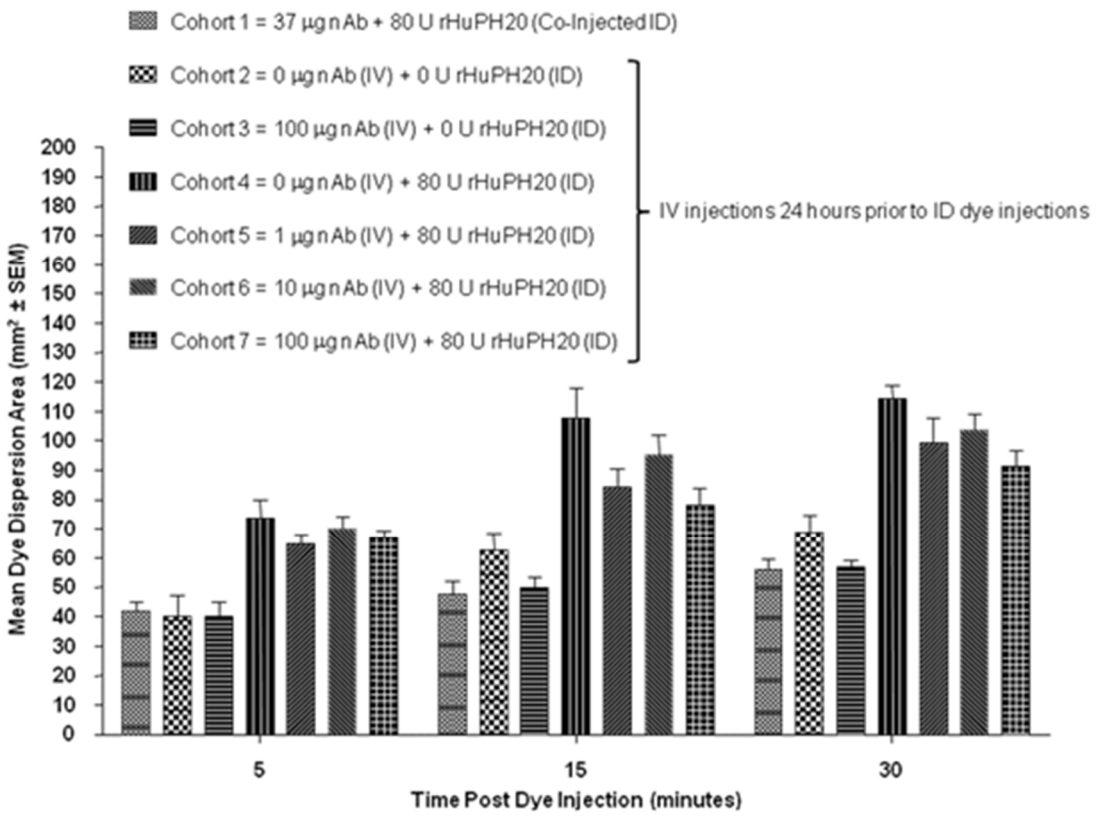
生物学的製剤は，体液性免疫応答を引き起こす可能性がある[14),15)]。本試験では，rHuPH20の浸透作用に対する抗 rHuPH20抗体（ウサギ抗 rHuPH20中和抗体：nAb）の中和作用の影響を調べた。投与群として，以下のようにコホート1～7を設定した。

- コホート 1（陽性コントロール群）：nAb（37 μg/mouse） ＋ rHuPH20（80 U/mouse）
- コホート 2（陰性コントロール群）：nAb（0 μg/mouse） ＋ rHuPH20（0 U/mouse）
- コホート 3： nAb（100 μg/mouse） ＋ rHuPH20（0 U/mouse）
- コホート 4（nAb 無投与群）： nAb（0 μg/mouse） ＋ rHuPH20（80 U/mouse）
- コホート 5： nAb（1 μg/mouse） ＋ rHuPH20（80 U/mouse）
- コホート 6： nAb（10 μg/mouse） ＋ rHuPH20（80 U/mouse）
- コホート 7： nAb（100 μg/mouse） ＋ rHuPH20（80 U/mouse）

コホート 1（陽性コントロール群）では，マウスに nAb と rHuPH20 を混合して ID 投与した。その他のコホートにおいては，マウスへの nAb の IV 投与 24 時間後に，トリパンブルーを含む rHuPH20 溶液を ID 投与した。トリパンブルー投与 5，15 及び 30 分後に色素拡散領域を測定した（図 2.6.2.2.3.6-1）。nAb 投与とトリパンブルー投与間の間隔（24 時間）は，皮膚組織への抗体分布を検討した Garg ら [16] の知見に基づいて設定した。

測定したすべての時間において，コホート5～7とコホート1（陽性対照群），コホート2（陰性対照群）又はコホート4（nAb 無投与群）間の統計解析を行った。コホート5~7の色素拡散領域は，コホート1又はコホート2と比較した時に有意に増加していたが，コホート4と比較した時に有意差は認められなかった。

図 2.6.2.2.3.6-1 rHuPH20の色素拡散作用に対する rHuPH20中和抗体の影響



(n = 6 per cohort)

【4.2.1.1-7 Figure 1改変】

以上の結果から，マウスへの nAb（1～100 μg/mouse）の IV 前投与は，測定したすべての時間において，rHuPH20（80 U/mouse）ID 投与による浸透作用に有意な影響を与えないことが示

された。nAb（1～100 μg/mouse）の投与量は薬力学的に妥当な量と考えられ，臨床においても中和抗体はrHuPH20の局所的作用に影響を与えない可能性が示唆された。

2.6.2.3 副次的薬理試験

該当なし。

2.6.2.4 安全性薬理試験

〔資料番号：4.2.3.2-1，4.2.3.2-3〕

PH FDC SCの安全性薬理試験は実施していない。ペルツズマブ及びトラスツズマブの心血管系，呼吸系及び中枢神経系に対する影響は，先に実施したカニクイザルを用いた反復 IV 投与毒性試験において評価済みである（ペルツズマブ初回申請時資料[1)]，トラスツズマブ初回申請時資料[2)]）。

rHuPH20を含むトラスツズマブのカニクイザルを用いた13週間 SC 投与毒性試験において，トラスツズマブの30 mg/kg/週（rHuPH20の3000 U/kg を含む）の投与による心電図（心拍数を含む）及び血圧に対する影響は認められなかった。また，rHuPH20のカニクイザルを用いた39週間 SC 投与毒性試験において，2 mg/kg/週（201940～232000 U/kg/週）の用量まで心血管系（心電図，心拍数及び血圧），呼吸系（呼吸数）及び中枢神経系（一般状態観察における行動評価）に対する影響は認められなかった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当なし。

2.6.2.6 考察及び結論

ペルツズマブ及びトラスツズマブは HER2を標的とした抗 HER2ヒト化モノクローナル抗体である。ペルツズマブがリガンド依存的な HER2シグナルを抑制するのに対して，トラスツズマブはリガンド非依存的な HER2シグナルを抑制することから，両抗体の併用により HER2シグナルを相補的に抑制することができ，相加／相乗的な効果が発揮される（ペルツズマブ初回申請時資料[1)]）。実際，ヒト乳癌細胞株 KPL-4 xenograft マウスでは，ペルツズマブとトラスツズマブの IP 併用による抗腫瘍効果の増強が認められている（ペルツズマブ初回申請時資料[1)]）。ヒト NSCLC 株 Calu-3 xenograft マウスを用いて，トラスツズマブ SC（トラスツズマブ 10 mg/kg + rHuPH20の併用投与）及びトラスツズマブ 10 mg/kg IV 投与時の抗腫瘍効果を比較した試験では，SC に比較して IV の方が，TGI 及びトラフ濃度ともに高い傾向を示した。SC 及び IV 両投与群ともに，TGI はトラフ濃度と概ね相関していた。本 Calu-3 xenograft マウス試験の結果は，SC 投与でも有効トラフ濃度が達成される可能性を示唆しており，実際，臨床での SC のトラフ濃度は IV に比べて同等以上であった（2.5.3.3.2）。臨床における SC 投与時の有効性は IV 投与時と同等以上であることが期待される。

rHuPH20の薬力学的特性を検討した試験結果から，rHuPH20は ID 投与によりトリパンブルーの色素拡散を濃度依存的かつ時間依存的に増加させること，その浸透活性は一過性かつ局所的に発現することが示された。皮膚組織における rHuPH20の浸透活性は，rHuPH20投与後6時間まで発現したが，投与後6～18時間の間に皮膚バリアーは再構成された。この rHuPH20の浸透活性の経時変化は，rHuPH20の基質であるヒアルロン酸が生体内で迅速にターンオーバーされること，皮膚組織における半減期は約半日～数日であること[17) -20)]，ヒトでは SC 投与後のマトリックス再生が24～42時間の間に生じるとの論文知見[13)]と概ね一致する。

rHuPH20の ID 投与は，高用量（1200 U/mouse）でも遠隔部位のトリパンブルーの色素拡散を増加させなかったが，10 U/mouse の用量での IV 投与は色素拡散を増加させた。rHuPH20の局所（ID）投与時にはバイオアベイラビリティはないかあっても極めて低いことが示唆される

（2.6.4.4.1）一方で，IV 投与により全身曝露量が高レベルに達した時には薬理学的作用が発現する可能性もあると考えられた。また，nAb（生物学的に妥当な用量と考えられる1～100 μg）をマウスへ IV 投与した時に，nAb は rHuPH20の浸透活性に影響を与えなかった。

PH FDC SC の安全性薬理試験は実施していないが，rHuPH20を含むトラスツズマブのカニクイザルを用いた13週間 SC 投与毒性試験における心血管系評価，並びに rHuPH20のカニクイザルを用いた39週間 SC 投与毒性試験における心血管系，呼吸系及び中枢神経系評価おいて，有害な影響は認められなかった。

以上の薬理試験結果から，ペルツズマブ ＋ トラスツズマブ ＋ rHuPH20の SC 併用投与により，ペルツズマブとトラスツズマブの抗腫瘍効果が十分に発揮されること，rHuPH20の浸透活性発現は一過性かつ局所的に発現することが推定された。本非臨床薬理試験結果は，ペルツズマブ ＋ トラスツズマブ ＋ rHuPH20の併用投与の有効性及び安全性を示すものであり，臨床において，PH FDC SC 製剤を使用することの妥当性を支持する結果であると考えられる。

2.6.2.7 図表

本文中に記載。

2.6.2.8 参考文献一覧

1) ペルツズマブ初回申請時資料 CTD
2) トラスツズマブ初回申請時資料 CTD
3) Frost GI. Recombinant human hyaluronidase (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration. Expert Opin Drug Deliv 2007;4:427-40.
4) Hechter O. Studies on spreading factors I. The importance of mechanical factors in hyaluronidase action in skin. J Exp Med 1947;85:77-97.
5) Holborow EJ, Keech MK. Hyaluronidase skin spreading effect; an analysis of repeated measurements. Br Med J 1951;2:1173-8.
6) Bookbinder LH, Hofer A, Haller MF, Zepeda ML, Keller GA, Lim JE, et al. A recombinant human enzyme for enhanced interstitial transport of therapeutics. J Controlled Release 2006;114:230-41.
7) Fessler JH. Mode of Action of Testicular Hyaluronidase. Biochem J 1960;76:132-5.
8) Cowman MK, Matsuoka S. Experimental approaches to hyaluronan structure. Carbohydr Res 2005;340:791-809.
9) Day AJ, Sheehan JK. Hyaluronan: polysaccharide chaos to protein organization. Curr Opin Struct Biol 2001;11:617-22.
10) Chen WYJ, Abatangelo G. Functions of hyaluronan in wound repair. Wound Repair Regen 1999;7:79-89.
11) Price RD, Berry MG, Navsaria HA. Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. J Plast Reconstr Aesthet Surg 2007;60:1110-9.
12) Girish KS, Kemparaju K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview. Life Sci 2007;80:1921-43.
13) Bywaters EGL, Holborow EJ, Keech MK. Reconstitution of the dermal barrier to dye spread after hyaluronidase injection. Br Med J 1951;2:1178-83.
14) Porter S. Human immune responses to recombinant human proteins. J Pharm Sci 2001;90:1-11.
15) Schellekens H. Factors influencing the immunogenicity of therapeutic proteins. Nephrol Dial Transplant 2005;20(Suppl 6):vi3-9.
16) Garg A, Lowe PJ, Balthasar JP. Neonatal Fc receptor impacts the subcutaneous bioavailability of monoclonal IgG antibodies. Abstracts 37th Annual Meeting American College of Clinical Pharmacology, September 14-16, 2008 Philadelphia, Pennsylvania. J Clin Pharmacol 2008;48:1131.
17) Fraser JRE, Laurent TC, Pertoft H, Baxter E. Plasma clearance, tissue distribution and metabolism of

hyaluronic acid injected intravenously in the rabbit. Biochem J 1981;200:415-24.
18) Fraser JRE, Laurent TC, Laurent UBG. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. J Intern Med 1997;242:27-33.
19) Jadin L, Bookbinder LH, Frost GI. A comprehensive model of hyaluronan turnover in the mouse. Matrix Biol 2012;31:81-9.
20) Laurent TC, Fraser JRE. Catabolism of hyaluronan. In: Henriksen JH, editor. Degradation of bioactive substances: Physiology and pathophysiology. Boca Raton: CRC Press. 1991:249-65.

目次

2.6.3 薬理試験概要表 2
2.6.3.1 薬理試験一覧表 2
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 4
2.6.3.3 副次的薬理試験 6
2.6.3.4 安全性薬理試験 7
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 8

表一覧

表 2.6.3.1-1 薬理試験一覧表 2
表 2.6.3.2-1 効力を裏付ける試験 4
表 2.6.3.4-1 安全性薬理試験 7

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験一覧表

表 2.6.3.1-1 薬理試験一覧表

Test Article: Trastuzumab containing rHuPH20/ rHuPH20

Type of Study	Test System / Species	Method of Administration	Testing Facility	Report No.	Location in CTD
Primary Pharmacodynamics					
Trastuzumab containing rHuPH20					
Antitumor activity of trastuzumab after SC and IV dosing in a mouse xenograft model	Calu-3 NSCLC xenografts (HER2 positive) in female Balb/c nude mice	SC, IV	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany	1032485	4.2.1.1-1
rHuPH20					
Dye dispersion assay	Mouse, NCr-*nu/nu* homozygous	ID	Halozyme Therapeutics, San Diego, CA, USA	1040357	4.2.1.1-2
Dye dispersion: Co-mixture of rHuPH20 versus single dose sequential delivery of rHuPH20	Mouse, NCr-*nu/nu* homozygous	ID	Halozyme Therapeutics, San Diego, CA, USA	1040355	4.2.1.1-3
Dermal reconstitution	Mouse, NCr-*nu/nu* homozygous	ID	Halozyme Therapeutics, San Diego, CA, USA	1040356	4.2.1.1-4
Dye dispersion at a distal site	Mouse, NCr-*nu/nu* homozygous	ID	Halozyme Therapeutics, San Diego, CA, USA	1040360	4.2.1.1-5
Dye dispersion after IV injection	Mouse, NCr-*nu/nu* homozygous	IV	Halozyme Therapeutics, San Diego, CA, USA	1040359	4.2.1.1-6
Effect of anti-rHuPH20 neutralizing antibody on dye dispersion	Mouse, NCr-*nu/nu* homozygous	ID	Halozyme Therapeutics, San Diego, CA, USA	1040361	4.2.1.1-7

表 2.6.3.1-1 薬理試験一覧表（続）

Test Article: Trastuzumab containing rHuPH20, rHuPH20

Type of Study	Test System / Species	Method of Administration	Testing Facility	Report No.	Location in CTD
Safety Pharmacology					
Trastuzumab containing rHuPH20					
Cardiovascular system	Cynomolgus monkey	SC	[redacted]	1027259 [a]	4.2.3.2-1
rHuPH20					
Cardiovascular, respiratory, and central nervous system	Cynomolgus monkey	SC	[redacted]	1017117 [a]	4.2.3.2-3

ID = intradermal; IV = intravenous; NSCLC = non-small cell lung cancer; SC = subcutaneous.
a: GLP study

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

表 2.6.3.2-1 効力を裏付ける試験

Test Article: Trastuzumab containing rHuPH20/ rHuPH20

Study Type	Test system	Test Method	Key Results	Location in CTD
Trastuzumab containing rHuPH20				
Antitumor activity of trastuzumab after SC and IV dosing in a mouse xenograft model	Calu-3 NSCLC xenografts (HER2 positive) in female Balb/c nude mice	*In vivo* (n=10); • SC: Trastuzumab (1, 3, 10 mg/kg) containing rHuPH20 (4600 U/mL), q7d, 6wks • IV: Trastuzumab (1, 3, 10 mg/kg), q7d, 6wks	At 3 mg/kg Trastuzumab given IV or SC there was no difference in tumor growth inhibition comparing each treatment. Also terminal serum trough concentrations of Trastuzumab were similar for both dose routes. At 10 mg/kg Trastuzumab given IV or SC, tumor growth inhibition after the IV dosing was tended to be slightly higher than the SC, which was in line with the higher serum concentrations after IV dosing.	4.2.1.1-1
rHuPH20				
Dye dispersion assay	Mouse, NCr-*nu/nu* homozygous	*In vivo* (n=6 animals/cohort); rHuPH20 (0.2, 2, 20 U/mouse), ID, once	Quantification of the rHuPH20 permeation enhancing effect was determined by the increased dispersion of a co-administered tracer dye (TB) *in vivo*. This permeation enhancing effect was both concentration- and time-dependent.	4.2.1.1-2
Dye dispersion: Co-mixture of rHuPH20 versus single dose sequential delivery of rHuPH20	Mouse, NCr-*nu/nu* homozygous	*In vivo* (n=6 animals/cohort); • Co-mixture: rHuPH20 (2, 10, 100 U/mouse) + TB, ID, once • Sequential: rHuPH20 (2 U/mouse) –> TB, ID	rHuPH20 degraded the local hyaluronan and increased local dye (TB) dispersion in a dose-dependent manner. A direct comparison of dye area and concentration of rHuPH20 demonstrated that it took 5 to 50-fold more units of rHuPH20 in a co-mixture solution to approach the dye dispersion area of a sequential administration.	4.2.1.1-3

表 2.6.3.2-1 効力を裏付ける試験（続）

Test Article: Trastuzumab containing rHuPH20/ rHuPH20

Study Type	Test system	Test Method	Key Results	Location in CTD
Dermal reconstitution	Mouse, NCr-*nu/nu* homozygous	*In vivo* (n=3); rHuPH20 (4 U/mouse), ID, once	The permeation enhancing effect of rHuPH20 was shown to be transient and fully reversible, enabling increased TB dispersion for up to 6 hours after rHuPH20 administration, with complete restoration of the dermal barrier to dye dispersion within 6 to 18 hours.	4.2.1.1-4
Dye dispersion at a distal site	Mouse, NCr-*nu/nu* homozygous	*In vivo* (6 animals/cohort = 6 data points/dose cohort); rHuPH20 (0.04–1200 U/mouse), ID, once	The effects of ID delivered rHuPH20 on TB dispersion at a distal dermal site was evaluated. 0.04 to 1200 total units of rHuPH20 delivered ID did not affect the dispersion of dye at a distal dermal site compared to the control cohort.	4.2.1.1-5
Dye dispersion after IV injection	Mouse, NCr-*nu/nu* homozygous	*In vivo* (3 animals/cohort = 6 data points/dose cohorts); rHuPH20 (0.1–3000 U/mouse), IV, once	rHuPH20, delivered via IV injection at ≥ 30 U/mouse, significantly increased mean TB dispersion area 5 minutes post ID injection of the dye. The mean increase in TB dispersion area at the highest dose of rHuPH20 (3000 U/mouse) was 3.2-fold higher than the control. At 15 minutes post TB injection, ≥ 10 U/mouse of IV rHuPH20 significantly increased the dye dispersion area at a distal dermal site. The mean increase in TB dispersion area at the highest dose of rHuPH20 (3000 U/mouse) was 3.6-fold higher relative to the control.	4.2.1.1-6
Effect of anti-rHuPH20 neutralizing antibody on dye dispersion	Mouse, NCr-*nu/nu* homozygous	*In vivo* (n=6 per cohort); rabbit α-rHuPH20 antibody (1, 10, 100 µg/mouse, IV) + rHuPH20 (80 U/mouse, ID), once	The ID dispersive effects of rHuPH20 (80 U/mouse) were not affected by the presence of circulating anti-rHuPH20 neutralizing antibodies.	4.2.1.1-7

ID = intradermal; IV = intravenous; NSCLC = non-small cell lung cancer; SC = subcutaneous; TB = Trypan Blue.

2.6.3.3 副次的薬理試験

該当なし。

2.6.3.4 安全性薬理試験

表 2.6.3.4-1 安全性薬理試験

Test Article: Trastuzumab containing rHuPH20, rHuPH20

Study Type	Test system	Test Method	Key Results	Location in CTD
Trastuzumab containing rHuPH20				
Cardiovascular system (GLP)	Cynomolgus monkey	*In vivo* (n=5/sex); Trastuzumab containing rHuPH20 (30 mg/kg trastuzumab/ 3000 U/kg rHuPH20, SC, QW)	No toxicologically significant changes in cardiovascular (electrocardiography [incl. heart rates] and blood pressure) safety pharmacology parameters after Week 13 of administration.	4.2.3.2-1
rHuPH20				
Cardiovascular, respiratory, and central nervous system (GLP)	Cynomolgus monkey	*In vivo* (n=6/sex); rHuPH20 (0.02, 0.2, 2 mg/kg [a], SC, QW, followed by a 4-week recovery period)	No toxicologically significant changes in cardiovascular (electrocardiography [incl. heart rates] and blood pressure), respiratory (respiratory rate), and neurologic (general observation) safety pharmacology parameters during dosing and recovery periods.	4.2.3.2-3

a: Hyaluronidase activity: 2019.4 – 2320 U/kg, 20194 – 23200 U/kg and 201940 – 232000 U/kg at 0.02, 0.2 and 2 mg/kg, respectively.

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当なし。