目次

2.6.6 毒性試験の概要文 4
2.6.6.1 まとめ 4
2.6.6.1.1 rHuPH20 を含むトラスツズマブの毒性試験 4
2.6.6.1.2 rHuPH20 の毒性試験 5
2.6.6.2 急性毒性試験 6
2.6.6.3 反復投与毒性試験 6
2.6.6.3.1 rHuPH20 を含むトラスツズマブのカニクイザル 13 週間皮下投与試験（17 週間回復性試験） 6
2.6.6.3.2 rHuPH20 のカニクイザル 7 日間静脈内及び皮下投与試験 7
2.6.6.3.3 rHuPH20 のカニクイザル 39 週間皮下投与試験（4 週間回復性試験） 7
2.6.6.4 遺伝毒性試験 8
2.6.6.5 がん原性試験 8
2.6.6.6 生殖発生毒性試験 9
2.6.6.6.1 rHuPH20 の皮下投与によるマウス胚・胎児発生に関する試験 9
2.6.6.6.2 rHuPH20 の皮下投与によるマウス出生前及び出生後の発生に関する試験 10
2.6.6.7 局所刺激性試験 11
2.6.6.7.1 rHuPH20 を含むトラスツズマブ皮下投与製剤のウサギ局所刺激性試験 11
2.6.6.8 その他の毒性試験 11
2.6.6.8.1 rHuPH20 皮下投与後の皮膚の硬結に関する評価 11
2.6.6.8.2 抗 rHuPH20 抗体のヒト組織交差反応性試験 12
2.6.6.8.3 SPAM1/PH20 の各動物種における組織発現 12
2.6.6.8.4 抗 rHuPH20 抗体のウサギ生殖機能に及ぼす影響 14
2.6.6.8.4.1 ウサギにおける抗 rHuPH20 抗体の雄授胎能及び生殖機能に及ぼす影響 14
2.6.6.8.4.2 ウサギにおける抗 rHuPH20 抗体の雌受胎能，胚・胎児発生，並びに出生後の機能に及ぼす影響 15
2.6.6.9 考察及び結論 16
2.6.6.9.1 ペルツズマブの毒性 17
2.6.6.9.2 トラスツズマブの毒性 18
2.6.6.9.3 rHuPH20 を含むトラスツズマブの毒性 18
2.6.6.9.4 rHuPH20 の毒性 19
2.6.6.9.4.1 急性毒性及び反復投与毒性 20
2.6.6.9.4.2 安全性薬理 20
2.6.6.9.4.3 生殖発生毒性 20

2.6.6.9.4.4 毒性試験における全身曝露.....21
2.6.6.9.4.5 免疫原性.....21
2.6.6.9.4.6 遺伝毒性及びがん原性.....22
2.6.6.9.4.7 皮下投与による局所刺激性及び皮膚の硬結に関する評価.....22
2.6.6.9.4.8 ヒアルロニダーゼ PH20 の各動物種における組織分布.....22
2.6.6.9.4.9 抗 rHuPH20 抗体の受胎能及び胚・胎児発生に及ぼす影響.....23
2.6.6.9.5 結論.....23
2.6.6.10 図表.....23
2.6.6.11 参考文献.....23

表一覧

表 2.6.6.1-1 PH FDC SC の承認申請のために追加実施した毒性試験一覧.....4
表 2.6.6.9.1-1 ペルツズマブの初回承認申請時の主要な毒性試験一覧.....17
表 2.6.6.9.2-1 トラスツズマブの初回承認申請時の主要な毒性試験一覧.....18
表 2.6.6.9.2-2 カニクイザルを用いたトラスツズマブの6カ月間静脈内投与試験とrHuPH20を含むトラスツズマブの13週間皮下投与試験の曝露量の比較.....19
表 2.6.6.9.3-1 rHuPH20の主要な毒性試験における用量と毒性所見との関係.....20

略語一覧

略語	英語名	和名
AUC	area under the concentration-time curve	濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}last}$	AUC from time 0 to the last measurable time point	投与後定量可能時間までの AUC
$AUC_{0\text{-}24h}$	AUC from time 0 to 24 hours	0～24時間までの AUC
BLQ	below the limit of quantification	定量下限未満
C_{max}	maximum concentration	最高濃度
EMA	European Medicines Agency	欧州医薬品庁
ENP	enteric plexus	腸管神経叢
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
NC	not calculable	算出せず
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
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
PK	pharmacokinetics	薬物動態
rHuPH20	recombinant human hyaluronidase	ボルヒアルロニダーゼ　アルファ（遺伝子組換え）
RNA-seq	RNA sequencing	RNA シークエンシング
RT-qPCR	reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction	逆転写–定量的ポリメラーゼ連鎖反応
SC	subcutaneous	皮下
SPAM	Sperm Adhesion Molecule 1	（ヒアルロニダーゼ PH20の別名）
TK	toxicokinetic(s)	トキシコキネティクス
U	units of hyaluronidase activity	ヒアルロニダーゼ活性の単位

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6.1 まとめ

ペルツズマブ/トラスツズマブ配合皮下注射剤（PH FDC SC）は，2つのモノクローナル抗体を混合し，ready-to-use で一度に皮下投与することを可能とする新しい注射剤である。PH FDC SC は，ペルツズマブ及びトラスツズマブに加えて，大量の溶液を皮下投与した際の投与部位からの拡散を容易にするための吸収促進剤であるボルヒアルロニダーゼ　アルファ（遺伝子組換え）（rHuPH20）含む処方としている。

ペルツズマブ及びトラスツズマブの包括的な毒性試験プログラムは，各製剤の静脈内投与を担保するために実施済みであり，各製剤の初回承認申請時に評価済みである（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)]）。また，海外での rHuPH20を含むトラスツズマブ皮下投与製剤の開発のため，rHuPH20についての一連の毒性試験に加えて，rHuPH20を含むトラスツズマブのカニクイザルを用いた13週間反復皮下投与毒性試験及びウサギを用いた単回皮下投与局所刺激性試験を実施した。これらの試験において，rHuPH20の毒性プロファイルが明らかにされ，また，rHuPH20を含むトラスツズマブのカニクイザル及びウサギにおける忍容性は良好であり，各有効成分の個別の試験結果と比較して，新たな毒性所見は認められなかった。これらの成績及び rHuPH20を含むペルツズマブ及びトラスツズマブのミニブタを用いた薬物動態試験（2.6.4.3.1）の結果から，PH FDC SC に関する毒性試験は不要と判断した。

本 CTD では，本邦におけるペルツズマブ及びトラスツズマブ静脈内投与製剤の初回承認申請後に実施された，rHuPH20を含むトラスツズマブの皮下投与による毒性試験，並びにrHuPH20の一連の毒性試験結果について記載する。これら試験の一覧を表 2.6.6.1-1に示した。

なお，ペルツズマブ及びトラスツズマブ静脈内投与製剤の承認申請時に評価済みの試験成績については，2.6.6.9に要約した。

表 2.6.6.1-1　PH FDC SC の承認申請のために追加実施した毒性試験一覧

試験の種類	動物種	投与方法	GLP 適合性
rHuPH20を含むトラスツズマブの毒性試験			
反復投与毒性：13週間	カニクイザル	皮下	適
局所刺激性：単回	ウサギ	皮下	適
rHuPH20の毒性試験			
反復投与毒性			
7日間	カニクイザル	静脈内及び皮下	適
39週間	カニクイザル	皮下	適
生殖発生毒性			
胚・胎児発生	マウス	皮下	適
出生前及び出生後の発生	マウス	皮下	適
その他の毒性			
投与部位の硬結の評価	ミニブタ	皮下	非
抗 rHuPH20抗体の組織交差反応性	ヒト	*In vitro*	非
SPAM1/PH20の組織発現	ヒト，マウス，ウサギ	*In vitro*	非
抗 rHuPH20抗体の生殖機能に及ぼす影響（2試験）	ウサギ	皮下	適

2.6.6.1.1 rHuPH20を含むトラスツズマブの毒性試験

13週間反復皮下投与試験ではカニクイザルを使用した。カニクイザルはトラスツズマブに対する交差反応性が確認されており，本薬の静脈内投与による一連の毒性試験においても使用されている。単回皮下投与による局所刺激性試験ではウサギを使用した。ウサギについてはトラスツズマブに対する交差反応性を有さないが，注射剤の局所刺激性評価において一般的に用い

られている動物種であることから選択した。

2.6.6.1.2 rHuPH20の毒性試験

rHuPH20は投与局所において一過性の活性を示す，浸透吸収促進作用を示す酵素であり，一般に静脈内投与される治療薬の皮下投与を可能にするものである。ヒアルロニダーゼの作用機序は，皮下投与部位の局所において，ヒアルロン酸を脱重合させることである。ヒアルロン酸は N-アセチルグルコサミンと D-グルクロン酸が繰り返し連結したポリマーであり，皮下組織におけるゲル状の細胞外マトリックスの構成成分である。ヒアルロニダーゼによるヒアルロン酸の脱重合は，反復多糖構造の加水分解により達成される。この脱重合により，ゲル状の細胞外マトリックスの粘性を一過性に減少させることができる。このヒアルロン酸による粘性を低下させることで水力学的コンダクタンスが増加し，投与された薬物の拡散及び吸収が促進される（2.6.2.2.2）。

rHuPH20は高度に精製されたヒアルロニダーゼであり，中性 pH で活性を示す。rHuPH20は，ヒトヒアルロニダーゼ SPAM1/PH20の DNA 配列をコードしたプラスミドをトランスフェクトしたチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞より産生される。産生された糖蛋白は一連のクロマトグラフィーの工程により精製され，精製蛋白は約100000～120000 単位(U)/mg 蛋白の高い比活性を示す。rHuPH20は，比活性において動物由来ヒアルロニダーゼよりも約100倍純度が高いと考えられる[3)] 。

rHuPH20の一連の毒性試験プログラムは，本薬の皮下投与治療薬としての使用をサポートするために実施された。主要な試験は ICH S6(R1)（平成24年3月23日 薬食審査発0323第1号 バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価）に準拠し，GLP を遵守して実施した。また，これらの試験は rHuPH20を含む治療薬の長期間投与をサポートすることも目的として計画され，安全性評価は FDA の添加物ガイダンス（2005）[4)] の推奨に概ね従い，EMA の指針（2010）[5)] にも適合するものである。

rHuPH20の主要な毒性試験として，カニクイザルを用いた7日間（1日1回）静脈内及び皮下投与試験，39週間（週1回）皮下投与試験，マウスを用いた胚・胎児発生に関する試験，並びに出生前及び出生後の発生に関する試験を実施した。毒性試験の投与量は mg/kg を単位として表記したが，必要に応じて U/kg も併記した。毒性試験の投与経路は，臨床適用に準じて皮下投与（一部静脈内投与）とし，投与頻度は臨床適用よりも高頻度となるよう1日1回又は週1回とした。また，毒性試験におけるトキシコキネティクス評価として血漿中 rHuPH20濃度測定（ヒアルロニダーゼ活性として測定）を実施し，抗 rHuPH20抗体の産生についても評価した。

rHuPH20の毒性評価に用いる動物種として，マウス，ウサギ及びカニクイザルを選択した。rHuPH20の基質となるヒアルロン酸は脊椎動物の組織中に普遍的に分布しており[6)]，これらの動物種において，rHuPH20は薬理活性を示し，酵素的にヒアルロン酸を脱重合させることが確認されている。マウスは rHuPH20の最初の薬理試験で用いられた動物種であり，生殖発生毒性試験に使用した。反復投与毒性試験でカニクイザルを用いた理由は，PH20のヒトとの相同性が他の動物種よりも高く，免疫原性が低い可能性が想定されたためである。カニクイザルとヒト PH20の相同性は89%であり，マウス及びウサギではそれぞれ58%及び70%である（米国立生物工学情報センター〔NCBI〕の Basic Local Alignment Search Tool による検索結果）。また，カニクイザルを選択したもう一つの理由は，トラスツズマブの毒性評価動物種として選択されていたためである。動物由来ヒアルロニダーゼが長年にわたり臨床で使用されてきたこと[7)]，並びに rHuPH20がヒト組換え蛋白であることから，動物実験における3Rs の観点も考慮し，反復投与毒性試験及び生殖発生毒性試験は，それぞれ1種類の動物種で実施した。更に，抗 rHuPH20抗体の生殖機能（雌雄受胎能，胚・胎児発生，並びに出生前及び出生後の発生）に及ぼす影響について評価するため，ウサギを用いた試験を実施した。

rHuPH20は組換えヒト蛋白であり，ヒトで毒性を惹起する可能性は低いと考えられる。また，ヒトでの rHuPH20の投与量は蛋白量として非常に少ないことから，臨床において rHuPH20の

局所皮下投与後に検出可能な全身曝露量に到達することは想定されず，実際に PH FDC SC の臨床試験において，血漿中に rHuPH20は検出されていない（2.7.2.2.3.1.3）。

2.6.6.2 急性毒性試験

PH FDC SC の急性毒性試験は実施していないが，rHuPH20を含むペルツズマブ及びトラスツズマブの単回投与 PK 試験（2.6.4.3.1）において，併用皮下投与による忍容性を確認した。本試験では，ミニブタ（各群雄5例，投与日の体重：約9～10 kg）に，ペルツズマブ10 mg/kg（静脈内投与），ペルツズマブ120 mg／rHuPH20 2000 U（皮下投与），又はペルツズマブ120 mg／rHuPH20 2000 U 及びトラスツズマブ120 mg／rHuPH20 2000 U（連続皮下投与）を投与し，いずれの動物においても一般状態及び体重の異常は認められなかった。

また，rHuPH20の単回投与 PK 試験（2.6.4.3.3）において，マウスに0.4 mg/kg（43700 U/kg）を静脈内投与，又はカニクイザルに最高30 mg/kg（3480000 U/kg）を静脈内又は皮下投与したとき，いずれの動物においても異常は認められなかった。

2.6.6.3 反復投与毒性試験

2.6.6.3.1 rHuPH20を含むトラスツズマブのカニクイザル13週間皮下投与試験（17週間回復性試験）

（資料番号：4.2.3.2-1）

カニクイザル（各群雌雄各5例）にトラスツズマブ SC 製剤を0（溶媒）又は30 mg/kg/週の用量で週1回，計14回皮下投与した。なお，本試験に用いた溶媒は rHuPH20（12000 U/mL）を含有する20 mmol/L ヒスチジン，210 mmol/L トレハロース，10 mmol/L メチオニン，0.04%ポリソルベート20，pH 5.5であり，rHuPH20の投与量はいずれの群も3000 U/kg であった。最終投与後3日に各群雌雄各3例を剖検し，最終投与後17週に残りの動物を剖検した。

本試験のトラスツズマブの投与量は，先に実施したトラスツズマブのカニクイザルを用いた26週間静脈内投与試験[2)] の最高用量である25 mg/kg/週における曝露量と同程度の曝露量が得られると推定される皮下投与用量として，30 mg/kg を選択した。また，rHuPH20の投与量（3000 U/kg）は，臨床投与量（20000～30000 U/ヒト，体重60 kg として333～500 U/kg）を超えるよう設定した。

試験結果を表2.6.7.7.1-1に示した。

すべての動物が試験期間を通じて生存し，いずれの検査項目（一般状態，摂餌状況，体重，眼科学的検査，心電図〔心拍数を含む〕，血圧，尿検査，血液学的検査，血液凝固検査，血液化学的検査及び病理学的検査）においても被験物質に関連した有害作用は認められなかった。

反復投与により，トラスツズマブの持続的な曝露が確認され，曝露量は2.1～3.6倍増加した。また，曝露量に明らかな性差は認められなかった。休薬期間中の3/36検体（いずれも同一の雌由来）で抗トラスツズマブ抗体が検出された。一方，皮下投与による rHuPH20の明らかな吸収は確認されなかった。血漿中 rHuPH20活性の測定値は概して低かったが，これは測定法の特異性が低いことに起因するものと考えられた。また，7/20例が抗 rHuPH20中和活性陽性と考えられた。

以上のとおり，被験物質投与による有害作用は認められなかったことから，本試験におけるトラスツズマブ（rHuPH20を含む SC 製剤）の NOAEL は，30 mg/kg/週（Day 78の $AUC_{0\text{-}168hr}$〔雌雄合算〕：166000 μg•hr/mL）と判断した。

2.6.6.3.2 rHuPH20のカニクイザル7日間静脈内及び皮下投与試験

（資料番号：4.2.3.2-2）

カニクイザル（各群雌雄各2例）に rHuPH20を5 mg/kg/日の用量で1日1回，7日間静脈内ボーラス投与又は皮下投与した。対照群には溶媒（10 mmol/L ヒスチジン，130 mmol/L 塩化ナトリウム，pH 6.0）を静脈内及び皮下投与した。なお，本試験で用いた rHuPH20のヒアルロニダーゼ活性は116000 U/mL であり，この値に基づき算出したヒアルロニダーゼ活性としての投与量は580000 U/kg である。

試験結果を表2.6.7.7.2-1に示した。

rHuPH20の静脈内又は皮下投与による忍容性は良好であり，一般状態，摂餌量，体重，眼科学的検査，尿検査，血液学的検査及び血液凝固検査に異常は認められなかった。対照群の雌1例，並びに5 mg/kg/日（静脈内投与）及び5 mg/kg/日（皮下投与）の雄各1例で，Day 2の投与前に投与前値と比較して ALT，AST 及び CK の一過性増加が認められたが，Day 7の投与前では5 mg/kg/日（皮下投与）の雄で認められた ALT 及び CK の軽度の増加を除き，すべての動物において投与前値と同程度であった。また，5 mg/kg/日（皮下投与）の雄2例では投与期間終了後の病理組織学的検査において，軽微で限局性の肝細胞空胞化が認められた。しかしながら，同用量の雌ではこの変化は認められず，同様の曝露量が確認された5 mg/kg/日（静脈内投与）の雌雄でも肝臓の変化は認められなかったことから，この変化は肝細胞に対する傷害性を示唆するものではないと考えられた。また，CK の増加を伴った ALT 及び AST の軽度の増加は，肝毒性ではなく，動物のハンドリングに伴う筋骨格系の変化に関連して生じたものと推察された。

TK 評価として，血漿中ヒアルロニダーゼ活性の測定を実施した。5 mg/kg/日投与後の血漿中ヒアルロニダーゼ活性は，静脈内投与で高く（平均 $AUC_{0\text{-last}}$：708000 U•min/mL），皮下投与で低かった（平均 $AUC_{0\text{-last}}$：38500 U•min/mL）。皮下投与後の最大の活性は，投与後60分（中央値）に確認された。7回投与後の平均 $AUC_{0\text{-last}}$ は，静脈内投与及び皮下投与の両方で，初回投与後と比較して若干の低値を示した。

以上のとおり，被験物質投与に関連した明らか有害所見は認められなかったことから，本試験における rHuPH20の NOAEL は，静脈内及び皮下投与のいずれにおいても5 mg/kg/日と判断した。

2.6.6.3.3 rHuPH20のカニクイザル39週間皮下投与試験（4週間回復性試験）

（資料番号：4.2.3.2-3）

カニクイザル（各群雌雄各6例）に rHuPH20を0.02，0.2又は2 mg/kg/週の用量で週1回，39週間皮下投与した。対照群には溶媒（10 mmol/L ヒスチジン，130 mmol/L 塩化ナトリウム，pH6.0）を皮下投与した。なお，本試験で用いた rHuPH20のヒアルロニダーゼ活性は100970～116000 U/mL であり，この値に基づき算出したヒアルロニダーゼ活性としての投与量は，2019.4～2320，20194～23200又は201940～232000 U/kg である。最終投与翌日（Day 274）に各群雌雄各4例を剖検し，最終投与後4週（Day 302）に残りの動物を剖検した。

本試験の投与量は，先に実施した7日間静脈内及び皮下投与試験の結果に基づき設定した。また，臨床で想定される投与頻度と同程度以上となるよう，週1回の反復投与とした。

試験結果を表2.6.7.7.3-1に示した。

試験期間中に死亡例は認められなかった。また，一般状態，月経周期（雌），摂餌量，体重，心電図，血圧，呼吸数，眼科学的検査，精巣容積（雄），精子検査（雄），尿検査，血液学的検査，血液凝固検査，血液化学的検査，黄体形成ホルモン（雄），器官重量及び剖検において，被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

投与期間終了時剖検例の病理組織学的検査において，投与部皮下に軽微なリンパ形質細胞浸

潤が2 mg/kg/週の全例，並びに0.2 mg/kg/週の雄1/4例及び雌1/4例で認められた。休薬期間終了時剖検例では，2 mg/kg/週の雄1/2例のみで投与部皮下の軽微なリンパ形質細胞浸潤がみられ，4週間の休薬による回復性が確認された。

TK 測定では，0.02及び0.2 mg/kg/週において，投与期間を通じて血漿中ヒアルロニダーゼ活性は認められず，投与局所に拡散したことが推察された。血漿中ヒアルロニダーゼ活性は2 mg/kg/週のみで認められ，雄では少なくとも6カ月間，雌では9カ月間，継続して検出された。しかし，雌雄において Day 85に検出された最大の活性値であってもその値は相対的に低く，概して生理学的レベルと同様（10～25 U/mL）であった。rHuPH20の主要な作用が投与局所に限定されることを考慮すると，上記の血漿中 rHuPH20濃度の低レベルの変動の意義は低いと考えられた。これらのことから，rHuPH20を非常に大量（2 mg/kg）に週1回皮下投与しても，全身曝露はわずかであることが示された。

2 mg/kg/週の血漿サンプルにおけるヒアルロニダーゼ活性の消失は，ヒアルロニダーゼの中和活性（中和力価）の増加と一致していた。抗 rHuPH20抗体及び中和活性の両方は投与量に依存し，概して経時的に増加した。抗 rHuPH20抗体は投与後6週からすべての被験物質投与群で認められた。一方，0.02 mg/kg/週では，6カ月間投与時において半数の個体で低レベルの中和活性が認められた。7カ月間投与時においては，0.2 mg/kg/週及び2 mg/kg/週のそれぞれ11/12例で中和活性が認められた。4週間の休薬期間終了後において，ヒアルロニダーゼの中和活性はピークレベルの約50%に低下した。rHuPH20はヒト蛋白であることから，カニクイザルにおける免疫学的反応は予想されたものである。

以上のとおり，rHuPH20の投与による有害所見が認められなかったことから，本試験における rHuPH20の NOAEL は，高用量の2 mg/kg/週と判断した。

なお，本試験で実施したテストステロン測定については，測定法バリデーションに不備があり，評価に用いることが適切でないと判断されたことから，評価から除外した。また，非GLP 下での追加検討結果は下記の通りであった；1) 免疫組織化学解析において，カニクイザルで誘導された抗 rHuPH20抗体は，カニクイザルの精巣に交差反応するが，腸管神経叢（ENP）には交差反応しないことが示された。2) ENP，精巣及び精巣上体における IgG 沈着に関する検討の結果，IgG の分布は血液組織関門に制限されることが示され，論文報告[8),9)]と一致した。3) バリデートしたヒト血漿中の抗 rHuPH20抗体検出のための ECL 法は，カニクイザル血漿の評価にも利用可能であることが確認された。4) カニクイザル血漿中の抗体は，カニクイザル精巣由来の内因性 PH20を中和できることが確認された。5) 免疫組織化学染色により，カニクイザルの rHuPH20反応性抗体は，ヒト及びサル精子の PH20に特異的に結合することが確認された。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

ICH S6(R1)に従い，PH FDC SC 及びその構成成分（ペルツズマブ及び rHuPH20）の遺伝毒性試験は実施していない。通常の医薬品で適用される定型的な遺伝毒性試験は，バイオ医薬品においては適切なものではなく，実施の必要はないと考えられる。更に，これらの試験系において大量のペプチド及び蛋白質を適用することは解釈不能な結果を生じる可能性がある。本薬は，DNA 及び他の染色体関連分子に対して直接作用する可能性はないものと考えられる。なお，トラスツズマブについては，ICH S6(R1)施行前に実施した一連の試験において，遺伝毒性は確認されなかった[2)]。

2.6.6.5 がん原性試験

ICH S6(R1)及び ICH S9（平成22年6月4日 薬食審査発0604第1号 抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン）に従い，PH FDC SC 及びその構成成分（ペルツズマブ，トラスツズマブ及び rHuPH20）のがん原性試験は実施していない。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

2.6.6.6.1 rHuPH20の皮下投与によるマウス胚・胎児発生に関する試験

（資料番号：4.2.3.5.2-2）

妊娠したCrl:CD1(ICR)マウス（各群25例）にrHuPH20を3，9及び18 mg/kg/日の用量で，妊娠6日目～15日目まで1日1回皮下投与した。対照群には溶媒（10 mmol/L ヒスチジン，130 mmol/L 塩化ナトリウム）を皮下投与した。なお，本試験で用いた rHuPH20のヒアルロニダーゼ活性は120200 U/mL であり，この値に基づき算出したヒアルロニダーゼ活性としての投与量は，360600，1081800又は2163600 U/kg である。妊娠18日目に帝王切開を行い，子宮，卵巣及び胎児の観察を行った。rHuPH20投与群については別途サテライト群（各群36例）を設定し，TK 評価のための血液採取に供した。

本試験の投与量は，先に実施した予備試験（4.2.3.5.2-1，表2.6.7.11.1-1）の結果に基づき設定した。すなわち，妊娠マウス（各群8例）に rHuPH20を0（溶媒），1，3，10及び30 mg/kg/日の用量で妊娠6～15日目まで1日1回皮下投与したとき，10 mg/kg/日の1例及び30 mg/kg/日の3例で脾臓の肥大が認められ，これらの個体では明らかな胚吸収（10 mg/kg/日の1例で68.8%，30 mg/kg/日の3例全例で100%）が認められた。1及び3 mg/kg では母動物及び胎児への影響は認められなかった。このことから，本試験では高用量を18 mg/kg/日とし，以下，9及び3 mg/kg/日を中及び低用量として設定した。

試験結果を表2.6.7.13.1-1に示した。

被験物質投与によると考えられる死亡例は認められなかった。18 mg/kg/日で2例（毒性評価群及び TK 群の各1例）及び9 mg/kg/日で2例（毒性評価群）の死亡が認められた。しかし，いずれの個体においても毒性を示唆する所見（一般状態及び体重変化）は認められず，死亡発現に用量依存性や時間依存性もみられなかったことから，被験物質投与に関連したものではないと考えられた。他の生存例においても一般状態及び剖検における異常は認められず，体重及び体重増加量も，最高用量の18 mg/kg/日まで異常は認められなかった。

全ての投与群で23又は24例の妊娠が確認された。9及び18 mg/kg/日では，対照群と比較して胎児体重（雌雄，雄及び／又は雌）の有意（$P<0.05$）な低値が認められた。また，統計学的に有意ではないものの，9及び18 mg/kg/日では後期吸収胚の増加が認められ，被験物質投与に関連した変化と考えられた。最高用量の18 mg/kg/日まで，外表，内臓及び骨格検査における異常（形態異常又は変異）は認められなかった。胎児の骨化部位数の平均値は，各群間で同様であった。

血漿中 rHuPH20濃度（ヒアルロニダーゼ活性）の C_{max} 及び AUC は概ね用量に応じて増加し，妊娠6日目に対する妊娠15日目の AUC 比は3, 9及び18 mg/kg/日でそれぞれ10.1，1.74及び3.03であった。

TK 評価用血漿サンプルを用いたレトロスペクティブ評価（非 GLP）において，妊娠6日目の血漿中抗 rHuPH20抗体は全例で陰性（抗体価：1:50未満）であったが，妊娠15日目は全例が陽性（抗体価：1:200～1:3200000以上）であり，18 mg/kg/日で高い抗体価を示す個体が多い傾向がみられた。抗 rHuPH20抗体は主に IgG であり，胎盤を通過すると考えられたが，すべての投与群で抗 rHuPH20抗体の産生が認められていることから，この抗 rHuPH20抗体産生と9及び18 mg/kg/日で認められた後期胚吸収の増加との間には関連性がないものと考えられた。

以上のとおり，最高用量の18 mg/kg/日まで母動物毒性は認められず，9及び18 mg/kg/日で後期吸収胚の増加が認められたことから，本試験における rHuPH20の母動物毒性に関する NOAEL は18 mg/kg/日，胚・胎児発生に関する NOAEL は3 mg/kg/日と判断した。また，rHuPH20は最高用量の18 mg/kg/日まで催奇形性を示さないと判断した。

2.6.6.6.2 rHuPH20の皮下投与によるマウス出生前及び出生後の発生に関する試験

（資料番号：4.2.3.5.3-1，4.2.3.5.3-2）

妊娠した Crl:CD1(ICR)雌マウス（各群25例）に rHuPH20を3，6及び9 mg/kg/日の用量で，妊娠6日目～授乳20日目まで1日1回皮下投与した。対照群には溶媒（10 mmol/L ヒスチジン，130 mmol/L 塩化ナトリウム，pH6.5）を投与した。なお，本試験で用いた rHuPH20のヒアルロニダーゼ活性は120200 U/mL であり，この値に基づき算出したヒアルロニダーゼ活性としての投与量は，360600，721200又は1081800 U/kg である。授乳21日目に母動物を剖検し，子宮内状態観察を行った。なお，被験物質投与群で出産しなかった雌について妊娠22日目を最終投与として翌日に剖検し，妊娠状態の確認を行った。出生児（F1）については，授乳21日目に雌雄各1例を選抜し，身体的及び機能的発達（包皮分離〔雄〕，膣開口〔雌〕，学習機能〔受動回避試験，短期及び長期記憶〕，運動機能及び生殖能〔生後約90日目から交配開始〕）の評価に供した。その他の出生児は生後21日目に剖検した。

本試験の投与量は，先に実施した胚・胎児発生に関する試験（2.6.6.6.1）の結果に基づき設定した。すなわち，rHuPH20の9及び18 mg/kg/日で吸収胎児数の増加が認められたことから，本試験では高用量を9 mg/kg/日とし，以下，6及び3 mg/kg/日を中及び低用量として設定した。

試験結果を表2.6.7.14.1-1に示した。

6及び9 mg/kg/日の各1例が投与期間中に死亡発見され，9 mg/kg/日の1例を早期剖検したが，その他全例は計画剖検時まで生存した。上記の低頻度の死亡の原因は明らかではないが，被験物質による直接的な作用ではなく，おそらく蛋白性物質の反復投与に対し忍容できなかった可能性が考えられた。マウスへの蛋白性物質の反復投与による散発的な死亡は，他の試験においても認められている。妊娠及び授乳期間を通じて，一般状態及び剖検において，被験物質投与に関連した変化は認められなかった。また，体重及び体重増加量への影響も認められなかった。

各群の妊娠率は，0（溶媒），3，6及び9 mg/kg/日で，それぞれ22例（88%），20例（80%），21例（84%）及び20例（80%）であり，自然分娩及び出生児観察における異常は認められなかった。離乳時までの一般状態及び剖検においても異常は認められなかった。

離乳後の F1では，対照群の雌1例が生後31日目に死亡発見されたが，その他の雌雄全例は計画剖検時まで生存した。また，一般状態観察及び剖検において，母動物への被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

9 mg/kg/日の F1では，離乳時の体重の低値に関連して，生後22，29及び36日目（雄）又は生後22日目（雌）の体重が，対照群と比較して有意な低値を示した。しかし，離乳期間全体を通しての体重増加量は，雌雄とも対照群と同様であった。

性成熟，学習機能，短期記憶，長期記憶及び行動抑制に対する影響は認められなかった。また，生後22日目及び61±2日目に実施した運動機能検査においても異常は認められなかった。更に，F1雌雄の交尾及び受胎能への影響は認められず，雌の帝王切開及び胎児検査においても異常は認められなかった。

以上のとおり，最高用量の9 mg/kg/日まですべての検査項目に異常は認められなかったことから，本試験における rHuPH20の無毒性量は，母動物及び出生児のいずれにおいても9 mg/kg/日と判断した。

なお，本試験においては投与動物の血漿中 rHuPH20濃度及び抗 rHuPH20抗体の評価を実施していなかったことから，同様の試験デザインでの評価を非 GLP 下で別途実施した（表2.6.7.14.2-1）。妊娠18日目及び授乳21日目（投与後2時間）において，血漿中 rHuPH20活性が一部の母動物及び胎児で検出されたが，多く個体では定量下限未満（< 0.625 U/mL）であった。妊娠後期（18日目）から授乳終了（23日目）までの評価において，rHuPH20を投与したすべての母動物で最初の評価時点である妊娠18日目に抗 rHuPH20抗体が検出され，抗体価は授乳23

日目まで上昇しつづけた。妊娠18日目の胎児（プール血漿）においても抗 rHuPH20抗体が検出され，出生児では授乳6及び15日目（雌雄別のプール血漿）にかけて抗体価が上昇し，授乳23日目においても高値のままであった。また，出生児は離乳後 rHuPH20に曝露されていないにも関わらず，血清中 rHuPH20抗体が生後60日目（最終評価時点）まで確認された。また，母動物及び胎児／出生児の抗 rHuPH20抗体は，マウスの PH20及び HYAL5と交差反応性を有することが確認された。

これらの結果から，GLP 下でのマウス出生前及び出生後の発生に関する試験の目的は rHuPH20の毒性の評価であったが，これと合わせて，すべての発生及び発育期間を通じた抗 rHuPH20抗体の曝露は，出生児に対して有害な影響を及ぼさないことが確認された。

2.6.6.7 局所刺激性試験

2.6.6.7.1 rHuPH20を含むトラスツズマブ皮下投与製剤のウサギ局所刺激性試験

（資料番号：4.2.3.6-1）

ニュージーランドホワイトウサギ（雄6例）の右又は左側腹部に，rHuPH20を含むトラスツズマブ皮下投与製剤（120 mg/mL トラスツズマブ，2000 U/mL rHuPH20，20 mmol/L ヒスチジン，210 mmol/L トレハロース, 10 mmol/L メチオニン，0.04%ポリソルベート20，pH 5.5）又は生理食塩液（対照）の0.5 mL を単回皮下投与し，投与後約24時間又は96時間に各3例を剖検した。

試験結果を表2.6.7.16.1-1に示した。

被験物質投与による一般状態異常及び投与部位反応は認められなかった。また，投与部位の病理学的検査（肉眼的及び組織学的）においても，被験物質投与に関連した所見は認められなかった。

以上の結果から，本試験条件下において rHuPH20を含むトラスツズマブ皮下投与製剤の局所刺激性はないと判断した。

2.6.6.8 その他の毒性試験

rHuPH20に関する以下の試験を実施した。

2.6.6.8.1 rHuPH20皮下投与後の皮膚の硬結に関する評価

（資料番号：4.2.3.7.7-1，4.2.3.7.7-2）

皮下に溶液を注入したとき，皮膚の腫脹又は硬結が生じる。IgG のような生物薬は高分子であることから，溶液の吸収は主にリンパ管を通じて行われる。注入速度が投与部位からの吸収及び拡散能力を上回ると，注入局所に腫脹が生じる。また，溶液の蓄積が持続すると，その部位は徐々に硬化する。硬結は硬化した腫瘤又は構造物であり，硬結に伴う有害事象として，局所の虚血が考えられる。

本試験では，大量のヒト IgG 溶液を皮下投与したときに生じる投与局所の腫脹／硬結について，rHuPH20存在下／非存在下での変化を，ミニブタを用いて検討した。

ミニブタの腹部皮下に300 mL の IgG 溶液（濃度10%）を1時間かけて投与し，引き続いて14 mL の溶媒（150 mmol/L アルギニン，20 mmol/L リン酸，50 mmol/L 塩化ナトリウム，0.05%ポリソルベート80，pH 6.5）又は rHuPH20溶液（160 U/mL，全量で2240U）を投与した。

試験結果を表2.6.7.17.2-1に示した。

注入期間中のインライン注入圧測定において，rHuPH20投与部は溶媒投与部と比較して39%の注入圧低下が確認された。また皮膚局所の柔軟性が平均25%増加した。また IgG を投与した中間部位の皮膚表面温度が，rHuPH20投与部では溶媒投与部と比較して約2℃高かった。硬結

の発生頻度は rHuPH20投与部の方が低く，rHuPH20投与部の腫脹／硬結の容積及びエリアは，溶媒注入部位のそれぞれ82%及び54%であった。定性的評価においても，rHuPH20投与部では溶媒投与部と比較して腫脹エリアが小さく，柔らかかった。最終的に溶媒投与部の9/9で硬結が認められた一方，rHuPH20投与部における硬結は2/9のみであった。

投与部位の病理組織学的評価において，拡張したリンパ管，水腫，炎症，単核細胞浸潤及び出血が溶媒及び rHuPH20投与部の両方で認められた。重症度のスコア評価では，溶媒投与部の方が投与翌日及び4日後の変化がより重度であった。rHuPH20投与部は溶媒投与部と比較して，投与翌日におけるリンパ管拡張がより高度に認められ，一方で腫脹はより軽度であった。また，投与4日後の組織学的検査では rHuPH20投与部の方が回復の程度が大きかった。投与24時間後の免疫蛍光染色では，rHuPH20投与部における IgG の残留が，溶媒投与部と比較して12%低かった。

ミニブタを用いた同様の試験において，レーザードップラー血流計を用いた評価を行った結果，rHuPH20投与部では溶媒投与部と比較して28%の血流増加が確認された。また，rHuPH20投与部では，血流減少エリアの増加が溶媒投与部と比較して少なく，最小血流のカテゴリーと判断される変化を85%低下させた。インライン注入圧測定，投与部の皮膚表面温度，投与後の腫脹／硬結の容積及びエリア，投与部位の定性的評価，並びに投与部の病理組織学的評価においても，前回の試験と同様の結果が得られた。

以上のとおり，ミニブタを用いた本検討において，rHuPH20の前投与は，大量の IgG 溶液の皮下投与により生じる組織変化及び有害作用を軽減できることが示された。rHuPH20は投与局所の腫脹及び硬結を減少させ，さらに間質内圧を低下させて皮膚血流を改善することが示された。

2.6.6.8.2 抗 rHuPH20抗体のヒト組織交差反応性試験

（資料番号：4.2.3.7.7-3）

ヒト組織における内因性ヒアルロニダーゼ PH20の分布について評価するため，rHuPH20に対するウサギポリクローナル抗体を用いて，男女各3例のヒトの凍結組織切片パネルへの交差反応性を免疫組織学的染色により検討した。

最初に42種類のヒト組織を用いた検討を実施し，引き続いて，精巣を含むいくつかの組織を用いて rHuPH20蛋白による特異性確認試験を実施した。

試験結果を表2.6.7.17.3-1に示した。

抗原特異的な染色性が精巣の精細管に認められ，より強い染色性が精子形成後期の精上皮細胞膜に認められた。また，この特異的な染色性は，抗 rHuPH20抗体と rHuPH20蛋白をプレインキュベーションすることにより阻害された。対照のウサギ IgG 及び二次抗体による染色性は認められなかった。軽度かつびまん性の染色性が，結腸及び食道の筋層内の ENP で認められた。これらの組織における染色性は細胞質に限定しており，細胞表面に染色性はみられなかった。rHuPH20蛋白を用いた特異性確認試験では，細胞質の染色性の消失が確認された。女性生殖器，滑膜及び軟骨を含むその他の組織において，特異的な染色性は認められなかった。

以上のとおり，抗 rHuPH20抗体の免疫反応性は，精巣の精細管中央部（精子形成後期）の精上皮に限定していた。4/12例の ENP で染色性が認められ，rHuPH20のプレインキュベーションにより阻害されたことから，これは軽度の特異性を有すると判断した。しかし，別の抗 rHuPH20抗体及び対照抗体を用いた追加試験では，この結果は再現されなかった。また，より特異的な手法（RT-qPCR 及び RNA-seq）による検討では PH20が ENP に発現していないことが確認された（2.6.6.8.3）。

2.6.6.8.3 SPAM1/PH20の各動物種における組織発現

ヒト，マウス及びラットの各種組織における *Sperm Adhesion Molecule 1 (SPAM1)/PH20*遺伝子

の発現について検討するため，逆転写反応により作製した相補的 DNA 試料について，動物種特異的プライマーを用いた定量的ポリメラーゼ連鎖反応（RT-qPCR）による解析を行った。

各試験結果の要約を以下及び表2.6.7.17.4-1に示した。

1) ヒト結腸 ENP における *SPAM1/PH20* 遺伝子の発現（資料番号：4.2.3.7.7-4）
7 例のヒト結腸 ENP 試料において *SPAM1/PH20* 遺伝子の mRNA 発現は検出されなかった。一方，精巣では ENP 試料と同量の RNA 中に，高レベルの *SPAM1/PH20* 遺伝子の発現が検出された。

2) ヒト成人及び胎児組織における *SPAM1/PH20* 遺伝子の発現（資料番号：4.2.3.7.7-5）
37 種類のヒト成人組織及び 20 種類のヒト胎児組織を用いて検討した結果，ヒト成人組織では雄性生殖器に最も高い発現が認められ，その他いくつかの組織（骨／軟骨，精巣上体，腎臓，胎盤，骨格筋，及び滑膜細胞）において，検出限界付近のわずかな発現が認められた。ヒト胎児組織では，低レベルの *SPAM1/PH20* 遺伝子の発現が結腸，卵巣，膵臓，小腸及び精巣において認められた。

3) マウスにおける *Spam1/PH20* 及び *Hyal5* 遺伝子の発現（資料番号：4.2.3.7.7-6）
マウスの *Spam1/PH20* 及び *Hyal5* の発現は生後 2~3 週以降の精巣で認められた。また，両遺伝子は，精巣上体においても認められ（精巣の約 1/350～1/250），更に低レベルの *Spam1/PH20* 遺伝子の発現が卵巣において認められた（精巣の約 1/2000）。これまでの論文報告 [10) – 12)] に反し，マウスにおける *Spam1/PH20* 遺伝子の雌性生殖器又は脳の脳梁における発現は検出されなかった。

4) マウスの脳梁における *Spam1/PH20* 遺伝子の発現〔予備試験〕（資料番号：4.2.3.7.7-7）
3 系統のマウス（C57Bl/6，NU/NU 及び Scid）の脳及び精巣試料について，論文報告 [11)] と同じ 3 種類のプライマーを用いて解析を行った結果，全てのマウス精巣組織において PCR 増幅産物が検出された一方，脳梁及び脳皮質試料では *Spam1/PH20* 転写に関連した増幅産物は検出されなかった。

5) ウサギ組織（精巣，脳及び結腸 ENP）における *Spam1/PH20* 遺伝子の発現（資料番号：4.2.3.7.7-8）
3 例のウサギ試料を用いた検討において，*Spam1/PH20* 遺伝子は精巣のすべての試料で高い発現が確認されたが，脳の脳梁及び皮質，並びに結腸 ENP において発現は認められず，成人ヒト試料の結果と一致していた。

6) ウサギの胎児及び成体組織における *Spam1/PH20* 遺伝子の発現（資料番号：4.2.3.7.7-9）
ウサギ成体において，*Spam1/PH20* 遺伝子は精巣以外の組織では検出されなかった。幼若動物では，*Spam1/PH20* 遺伝子は精巣で生後 3 カ月以降，精巣上体で生後 4 カ月以降に検出されたが，生後 1 及び 2 カ月では検出されなかった。生後 3 カ月での精巣の *Spam1/PH20* 遺伝子の発現レベルは低かったが，生後 4 カ月では成体の発現レベルと同程度であった。精巣上体では生後 4 カ月目以降に Spam1/PH20 遺伝子の発現が認められたが，その発現レベルは精巣と比較して非常に低かった。生後 1～4 カ月目までの脳梁及び脳皮質において，*Spam1/PH20* 遺伝子の発現は認められなかった。妊娠 14～23 日目の胎盤において，*Spam1/PH20* 遺伝子の低レベルの発現がみられたが，妊娠 11 及び 26 日目には認められなかった。また，妊娠 11，14 及び 17 日目の全胚において，*Spam1/PH20* 遺伝子の発現は認められなかった。

また，上記の試験で得られた各動物種の RNA 試料（ヒト：83，マウス：69，ウサギ：40）について，次世代シークエンサを用いたハイスループット RNA シークエンシング（RNA-seq）を行い，各組織中の *SPAM1*遺伝子の発現の程度を，他のヒアルロニダーゼや組織特異的遺伝子の発現量と比較した（資料番号：4.2.3.7.7-10）。2つのゲノム解析法（Cuffliks 及び eXpress）による解析の結果，*SPAM1*遺伝子はヒト，マウス及びウサギにおいて，雄性生殖器（精巣）以

外のいかなる組織にも発現していないことが示唆された。また，検出可能な定常的な mRNA 転写産物がないことに基づき，発生期のマウス及びヒトの脳，並びに ENP において *SPAM1/PH20*の発現は認められなかった。これらの結果は，SPAM1の発現に関する複数の論文，別途実施した Allen Brain database による解析結果（資料番号：4.2.3.7.7-5），並びに上記の RT-qPCR による一連の試験結果と一致するものであった。更に，in situ ハイブリダイゼーションによる検討において，*SPAM1/PH20* mRNA は，ヒト精巣において検出されたものの，結腸 ENP では検出されなかった（資料番号：4.2.3.7.7-11）。

2.6.6.8.4 抗 rHuPH20抗体のウサギ生殖機能に及ぼす影響

抗 rHuPH20抗体が受胎能，胚・胎児発生を含めた生殖機能に及ぼす影響について検討するため，ウサギを用いた2試験を実施した。

生殖機能を評価する試験に先立ち，非妊娠ウサギを用いて rHuPH20の免疫原性について検討した（資料番号：4.2.3.7.1-1）。rHuPH20（0.76 mg/kg）を週1回，計5回，更に約3週間後（試験50日目）に皮下投与したとき，持続的かつ高力価の抗体産生が確認され，この抗体はウサギ PH20（rRbPH20）と高い交差反応性（80%以上）を有することが確認された（表2.6.7.17.1-1）。

この結果から，抗 rHuPH20抗体が生殖機能に及ぼす影響について，ウサギを用いた評価が可能と判断した。

2.6.6.8.4.1 ウサギにおける抗 rHuPH20抗体の雄授胎能及び生殖機能に及ぼす影響

（資料番号：4.2.3.5.1-1）

本試験は，rHuPH20の皮下投与により産生された抗 rHuPH20抗体が，雄ウサギの生殖機能に及ぼす影響について検討した。

雄性 NZW ウサギ（各群22例）に rHuPH20の0.76 mg/kg を Day 1，8，15，22，29，43（交尾前）及び57に皮下投与した。対照群には溶媒（10 mmol/L ヒスチジン，130 mmol/L 塩化ナトリウム）を同様に投与した。Day 44に無処置の雌と1対1で同居させ，交尾が確認された雌については，2時間以内にヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG）を静脈内投与することによる過排卵処置を行った。雌は妊娠18日目に帝王切開し，子宮，卵巣及び胎児の観察を行った。雄は Day 85に剖検した。

試験結果を表2.6.7.12.1-1に示した。

rHuPH20を投与したすべての雄において，Day 8までに抗 rHuPH20抗体陽性が確認され，Day 85の剖検日まで持続した。抗体価の中央値は，Day 8で1600，Day 29で2457600であり，以後，Day 85まで819200以上の値で推移した。抗 rHuPH20抗体の rRbPH20への交差反応性は Day 15 以降に検出され，Day 29には100%となった。また，Day 85まで90%以上で推移した。交尾前（Day 43）の時点において，rHuPH20の中和活性が82%の血漿で確認された。

試験期間中に rHuPH20を投与した雄との交尾が確認された雌1例が死亡した（妊娠8日目）。死因を明らかにすることはできなかったが，本例は rHuPH20を投与しておらず，偶発的な死亡と考えられた。その他の動物は試験終了時まで生存した。rHuPH20を投与した雄で認められた唯一の一般状態所見は，投与後の投与部位における紅斑であった。この変化はいずれも投与後4日以内に回復したことから有害な変化ではないと考えられた。rHuPH20投与に関連した体重，体重増加量及び摂餌量の変化も認められなかった。

交尾前後（Day 37, 49, 71）に実施した精子検査（精子数，運動性及び形態観察）において，rHuPH20投与した雄の精子に異常は認められなかった。

雄の剖検（Day 85）において異常は認められず，生殖器官重量も対照群と比較して差はなかった。雄において生殖関連の評価項目に異常が認められなかったことから，生殖器官の病理組

織学的検査は実施しなかった。

対照群及び rHuPH20群における交尾率は，それぞれ90.9%（20/22例）及び95.4%（21/22例），受胎率はそれぞれ85.0%（17/20例）及び100%（21/21例）であり，いずれも両群間に有意差はなかった。その他の帝王切開パラメータ（黄体数，着床数，生存／死亡胎児数，着床前／着床後損失率）においても有意差は認められなかった。

以上のとおり，rHuPH20を投与したすべての雄において，rHuPH20抗体の持続的な産生が確認され，抗体価は交尾前の精子検査の時点から授胎成績の評価時点まで持続していることが確認された。ウサギ血漿中の抗 rHuP20抗体は rRbPH20に対する交差反応性を示したことから，ウサギを用いて本抗体産生の雄性生殖機能に及ぼす影響を評価することの妥当性が示された。本試験において，抗 rHuPH20抗体の持続的曝露下における精子検査及び帝王切開パラメータ（雄の授胎成績）に生物学的に意義のある変化は認められなかったことから，交尾前の持続的な rHuPH20抗体への曝露は，雄の生殖機能，交尾行動及び授胎成績に影響を及ぼさないと判断された。

2.6.6.8.4.2 ウサギにおける抗 rHuPH20抗体の雌受胎能，胚・胎児発生，並びに出生後の機能に及ぼす影響

（資料番号：4.2.3.5.3-3）

本試験は，rHuPH20の皮下投与により産生された抗 rHuPH20抗体が，雌ウサギの生殖機能（受胎能，胚・胎児発生，並びに出産後の母体の機能）に及ぼす影響について検討した。また，出生児の発育に及ぼす影響についても検討した。

雌性 NZW ウサギ（各群44例）に rHuPH20の0.76 mg/kg を Day 1，8，15，22，29，42（交尾前）及び妊娠15日目に皮下投与した。対照群には溶媒（10 mmol/L ヒスチジン，130 mmol/L 塩化ナトリウム）を同様に投与した。Day 44に無処置の雄と1対1で同居させ，交尾が確認された雌については，2時間以内にヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG）を静脈内投与することによる過排卵処置を行った。雌の半数は妊娠29日目に帝王切開し，子宮，卵巣及び胎児の観察を行った。また，残りの動物は自然分娩させた。F1は離乳時（生後29日目）に各 F0について雌雄1例を選抜し，生殖機能を含む成長及び発達に関する検査に供した。更に，母動物及び胎児血漿中の抗 HuPH20抗体測定のためのサテライト群（各群6例）を設定し，妊娠20日目及び授乳4日目の血液採取に供した。

試験結果を表2.6.7.14.3-1に示した。

rHuPH20を投与したすべての雌（F0）において，Day 15までに抗 rHuPH20抗体陽性が確認された。抗体価の中央値は，Day 8～Day 29にかけて増加し，Day 29～妊娠29日目の間にピークに達し（中央値：3276800），維持された。その後，抗体価は徐々に低下し，授乳最終日（29日目）の抗体価の中央値は409600であった。別途サテライトとして設定した母動物（3例）において，妊娠20日目の抗 rHuPH20抗体価は204800～3276800の範囲であった。また母動物ごとにプールした胎児の抗体価は204800であり，抗 rHuPH20抗体が胎盤移行することが示された。出生児（F1）においては，授乳4～62日目まで抗 rHuPH20抗体の陽性率が100%であった。その後陽性率は徐々に低下し，F1の生殖能検査のための交尾前（生後152日目）の時点の陽性率は58%であった。F1の抗体価のピークは，生後早期の授乳4日目（中央値：3276800）に認められ，授乳期間終了（29日目）にかけて徐々に低下した。抗 rHuPH20抗体の rRbPH20への交差反応性は，Day 15以降の F0血漿で検出され，Day 22～妊娠29日目の交差反応率は80%以上であった。また，Day 42（交尾前）の交差反応率は100%であった。F1においても rRbPH20と結合する IgG が生後42日目まで検出され，生後4日目のみ100%であった。Day 42，妊娠15及び29日目の F0血漿の多く（>75%）で rHuPH20の中和活性が確認され，rRbPH20に対する中和活性も認められた（≧60%）。F1においては，生後4日目の血漿で rRbPH20の中和活性が低頻度（30%）に認められた。

rHuPH20の投与に関連した F0の死亡は認められなかった。rHuPH20投与の1例が交尾前のDay 9に死亡発見されたが，一般状態所見から脱水及び／又はヒト蛋白投与による過敏症によるものと推察された。その他生存例においては，rHuPH20に関連した皮膚症状，体重及び摂餌量の変化は認められなかった。

対照群及び rHuPH20群における交尾率（サテライト群を含む）は，それぞれ96%（48/50例）及び100%（49/49例），受胎率はそれぞれ93.75%（45/48例）及び87.76%（43/49例）であった。

帝王切開に供されたすべての雌で妊娠が確認され，黄体数，着床数，生存胎児数，胎児体重及び着床前／着床後損失率は対照群と rHuPH20群で同様であった。rHuPH20群で雄動物の比率（性比）の有意な高値（53.8±20.0%，対照群は41.2±16.7%）が認められたが，ウサギにおける背景値（平均値：38.2～56.7%）の範囲内であった。また，死亡胎児は認められず，着床後損失数及び雌雄の胎児体重に群間差は認められなかった。rHuPH20投与に関連した胎児の外表，内臓及び骨格異常は認められず，認められた所見はいずれも背景データの出現範囲内及び／又はウサギで一般的にみられる自然発生所見であった。

rHuPH20投与群のすべての雌で自然分娩が確認され，死産は認められなかった。妊娠期間，母体ごとの胎児数，生存胎児数及び胎児体重は対照群と同様であった。母動物の剖検において肉眼所見は認められなかった。授乳期間中の F1の一般状態所見も rHuPH20群と対照群で同様であった。離乳後の成長及び神経学的発達の評価においても rHuPH20群と対照群で同様であり，子宮内での抗 rHuPH20抗体の曝露は，F1の成長及び発達に影響を及ぼさないことが示された。離乳時に選抜されず剖検した F1においても剖検での異常所見は認められなかった。

rHuPH20投与群の雌1例を除き，すべての F1が剖検時まで生存した。死亡例（生後69日目に発見）の死因を特定することはできなかったが，1例のみの事象であることから，抗 rHuPH20抗体との関連はないものと考えられた。F1の一般状態，性成熟，行動及び機能検査（オープンフィールド評価を含む FOB 変法）において，抗 rHuPH20抗体の影響は認められなかった。更に，抗 rHuPH20抗体の曝露は，F1雄の精子検査パラメータ，雄性生殖器重量，並びに雌雄の交尾及び受胎成績に影響を及ぼさなかった。F1雌雄の体重，体重増加量及び摂餌量に影響は認められず，剖検においても異常所見は認められなかった。

以上のとおり，雌ウサギにおける交尾前から妊娠期間中の抗 rHuPH20抗体の曝露は，交尾及び受胎能に影響を及ぼさなかった。また，母動物の抗 rHuPH20抗体は妊娠期間中に胎児に移行し，少なくとも生後3カ月まで持続したが，胚・胎児発生及び出生後の発達（身体的・行動的発達，性成熟，交尾及び受胎能）に影響を及ぼさなかった。

2.6.6.9 考察及び結論

PH FDC SC の構成成分であるペルツズマブ及びトラスツズマブの包括的な毒性試験プログラムは，各製剤の静脈内投与を担保するために実施済みであり，各製剤の初回承認申請時に評価済みである[1)，2)]。また，海外での rHuPH20を含むトラスツズマブ皮下投与製剤の開発のため，追加の毒性試験を実施した。これらの試験において，rHuPH20の毒性プロファイルが明らかにされ，また，rHuPH20を含むトラスツズマブのカニクイザル（13週間反復皮下投与）及びウサギ（単回皮下投与）における忍容性は良好であり，各有効成分の個別の試験結果と比較して，新たな毒性所見は認められなかった。これらの成績及び rHuPH20を含むペルツズマブ及びトラスツズマブのミニブタを用いた薬物動態試験（2.6.4.3.1）の結果から，PH FDC SC に関する毒性試験は不要と判断した。

2.6.6.9.1 ペルツズマブの毒性

ペルツズマブの初回承認申請時の主要な毒性試験一覧を表 2.6.6.9.1-1に示した。

表 2.6.6.9.1-1 ペルツズマブの初回承認申請時の主要な毒性試験一覧

試験項目	動物種	投与量 (mg/kg) 又は処置濃度	試験結果
反復投与毒性			
4週間 (週2回, 静脈内)	カニクイザル	0, 10, 50. 100	NOAEL: 100
7週間 (週1回, 静脈内)	カニクイザル	0, 15, 50, 150	NOAEL: 150
26週間 (週1回, 静脈内)	カニクイザル	0, 15, 50, 150	NOAEL: <15
4週間 (週1回, 皮下)	カニクイザル	0, 250	NOAEL: 250
生殖発生毒性			
胚・胎児発生 (週2回, 静脈内)	カニクイザル	0[0] [a], 10[30], 33.3[100], 100[150]	NOAEL: <10[30] (母動物, F1胎児)
その他の毒性			
溶血性・血液適合性	カニクイザル・ヒトの血液	21.6 mg/mL まで	溶血性，沈澱・凝固作用なし
組織交差反応性	カニクイザル・ヒトの正常組織	1.0, 10 µg/mL	被毛皮膚，胎盤，上皮小体，扁桃，乳腺，尿管，膀胱，腎組織等に交差反応

a: 維持用量[初回用量]

（ペルツズマブ初回申請時資料[1)] より抜粋）

ペルツズマブの毒性の概要は下記のとおりである。

- ペルツズマブをカニクイザルに 250 mg/kg の用量を週 1 回，4 週間皮下投与したときの忍容性は良好であった。
- ペルツズマブをカニクイザルに 150 mg/kg までの用量を週 1 回，最長 26 週間静脈内投与したときの忍容性は概ね良好であり，心毒性を含め，安全性薬理関連の所見も認められなかった。
- ペルツズマブに関連した所見として，7 週間及び 26 週間静脈内投与試験の全群で組織学的変化を伴わない下痢の発現頻度上昇が認められた。
- 妊娠カニクイザルを用いた胚・胎児発生に関する試験において，ペルツズマブを器官形成期（妊娠 19～50 日目）に反復静脈内投与したとき，羊水量減少及び組織学的な腎臓発育不全が認められた。母動物及び胎児において，臨床用量と関連するペルツズマブの全身曝露が確認された。
- カニクイザルを用いた毒性試験において，ペルツズマブを静脈内又は皮下投与したとき，投与部位における肉眼的（静脈内及び皮下投与）又は病理組織学的所見（静脈内投与のみ）は認められなかった。

2.6.6.9.2 トラスツズマブの毒性

トラスツズマブの初回承認申請時の主要な毒性試験一覧を表 2.6.6.9.2-1に示した。

表 2.6.6.9.2-1 トラスツズマブの初回承認申請時の主要な毒性試験一覧

試験項目	動物種	投与量 (mg/kg) 又は処置濃度	試験結果
単回投与毒性			
静脈内	マウス	0, 200	概略の致死量: >200
静脈内	アカゲザル	0, 100, 200	概略の致死量: >200
反復投与毒性			
6カ月間 (週2回, 静脈内)	マウス	0, 6, 20, 59	NOAEL: 59
4週間 (週2回, 静脈内)	アカゲザル	0, 2.35, 11.75, 23.5	NOAEL: 23.5
3カ月間 (週2回, 静脈内)	カニクイザル	0, 1, 5, 25	NOAEL: 25
6カ月間 (週1回, 静脈内)	カニクイザル	0, 1, 5, 25	NOAEL: 25
生殖発生毒性			
雄性生殖能 (静脈内)	カニクイザル	0, 2, 10, 25	NOAEL: 25
雌性生殖能 (静脈内)	カニクイザル	0, 1, 5, 25	NOAEL: 25
胚・胎児発生 (静脈内)	カニクイザル	0, 1, 5, 25	NOAEL: 25 (母動物, 胎児)
周産期及び授乳期 (静脈内)	カニクイザル	25	NOAEL: 25 (母動物, 胎児, 出生児)
局所刺激性			
ウサギ (静脈内)	ウサギ	0, 4.7 mg/mL	陰性
ウサギ (静脈内・皮下)	ウサギ	0, 5, 50, 100 mg/mL	陰性
その他の毒性			
溶血性・血液適合性	ヒト・サルの血液	4.7 mg/mL	陰性

(トラスツズマブ初回申請時資料[2)] より抜粋)

トラスツズマブの毒性の概要は下記のとおりである。

- トラスツズマブをマウス（200 mg/kg まで）及びアカゲザル（200 mg/kg まで）に単回静脈内投与したときの忍容性は良好であった。
- トラスツズマブをカニクイザルに 25 mg/kg までの用量を週 2 回，3 カ月間，又は週 1 回，6 カ月投与したときの忍容性は良好であり，心毒性を含め，安全性薬理関連の所見も認められなかった。
- 雌性カニクイザルを用いた受胎能，胚・胎児発生及び妊娠後期／胎盤移行試験において，トラスツズマブの投与による明らかな母動物毒性及び出生児毒性は認められなかった。

2.6.6.9.3 rHuPH20を含むトラスツズマブの毒性

本申請にあたり追加実施した，rHuPH20を含むトラスツズマブの皮下投与による毒性試験結果は下記のとおりである。

- カニクイザルに rHuPH20 を含むトラスツズマブを 30 mg/kg の用量で週 1 回，13 週間皮下投与したときの忍容性（安全性薬理評価を含む）は良好であった。このときのトラスツズマブの曝露量は，25 mg/kg の用量で週 1 回，6 ヵ月間静脈内投与したときの曝露量と同程度であった（表 2.6.6.9.2-2）。
- rHuPH20 を含むトラスツズマブをカニクイザルに反復皮下投与，又はウサギに単回皮下投与したときの投与局所の忍容性は良好であった。

表 2.6.6.9.2-2 カニクイザルを用いたトラスツズマブの6カ月間静脈内投与試験と rHuPH20を含むトラスツズマブの13週間皮下投与試験の曝露量の比較

試験及び用量	Day 29（5回目投与）		最終投与	
	雄	雌	雄	雌
静脈内（26週間） 25 mg/kg/週	560 ± 90.2	355 ± 33.2	438 ± 90.8	511 ± 74.7
皮下（13週間） 30 mg/kg/週	566 ± 120	497 ± 132	809 ± 113	785 ± 243

数値は各投与の投与前の血清中濃度（μg/mL，平均値 ± 標準偏差）を示す。

トラスツズマブは，カニクイザルを用いた静脈内投与による毒性試験で非常に弱い免疫原性を示した[2)]。rHuPH20 を含むトラスツズマブのカニクイザル 13 週間皮下投与試験では，抗トラスツズマブ抗体が検出されたのは休薬期間中の雌 1 例（3 検体）のみであり，投与期間中の継続的な曝露が確認された。このことから，本試験ではトラスツズマブの皮下投与による潜在的な毒性が適切に評価されたと考えられた。なお，本試験では，rHuPH20 の全身曝露は確認されなかった。試験に用いた 7/20 例（雄 3 例〔rHuPH20 を含む溶媒対照群 1 例及びトラスツズマブ群 2 例〕及び雌 4 例〔rHuPH20 を含む溶媒対照群 2 例及びトラスツズマブ群 2 例〕）で抗 rHuPH20 抗体が検出され，ヒアルロニダーゼの中和活性も認められた。しかし，rHuPH20 に対する中和抗体は，rHuPH20 の薬理作用である投与液の拡散に影響を及ぼさないことが確認されている（2.6.2.2.3.6）。

2.6.6.9.4 rHuPH20の毒性

rHuPH20の毒性は，主にカニクイザルを用いた39週間皮下投与試験及びマウスを用いた生殖発生毒性試験（胚・胎児発生に関する試験，並びに出生前及び出生後の発生に関する試験）において評価した。カニクイザルを用いた39週間投与試験では，雌雄受胎能の評価（精巣容積，精子検査，黄体形成ホルモン，月経周期，及び生殖器の病理組織学的評価）も実施した。これらの試験では，抗 rHuPH20抗体産生の評価も行った。更に，抗 rHuPH20抗体が雌雄受胎能及び胚・胎児発生に及ぼす影響について検討するため，ウサギを用いた試験を実施した。

カニクザルを用いた試験において，rHuPH20は試験に用いた最高用量である5 mg/kg まで良好な忍容性を示すことが確認された。この用量は，ヒトで用いられる最高用量（PH FDC SC の初回用量における rHuPH20含量は30000 U であり，ヒト体重を60 kg，rHuPH20の比活性を80000 U/mg〔2.3.S.4.1 (rHuPH20)〕としたときの rHuPH20の投与量は0.00625 mg/kg と算出される）よりはるかに高い用量である。また，毒性試験における rHuPH20の曝露量は，非常に高い用量（2 mg/kg 以上）を投与した個体のみで確認された。ヒトでの最高用量において，rHuPH20の全身曝露が確認される可能性は低いと考えられる。マウスの高用量投与において胚・胎児毒性が確認されたが，これは胚発生において重要な役割を果たしているヒアルロン酸に対する作用に関連する可能性が考えられた。

rHuPH20の主要な毒性試験における用量と毒性所見との関係を表 2.6.6.9.3-1に示した。

表 2.6.6.9.3-1 rHuPH20の主要な毒性試験における用量と毒性所見との関係

試験／動物種	用量[a] (mg/kg)	用量[b] (U/kg)	血漿中 rHuPH20 の AUC (U•h/mL)	主な毒性所見
カニクイザル 7日間静脈内又は皮下投与 (1日1回)	5 (静脈内) 5 (皮下)	500000 500000	8733[c] 501[c]	有害所見なし。
カニクイザル 39週間皮下投与 (週1回)	0.02 0.2 2	2000 20000 200000	NC[d] NC[d] 89.6/467[d]	有害所見なし。
マウス 胚・胎児発生, 皮下投与 (1日1回)	3 9 18	300000 900000 1800000	55.1[e] 79.0[e] 363[e]	9及び18 mg/kg で後期吸収胚の増加，母動物に有害所見なし。
マウス 出生前及び出生後の発生, 皮下投与 (1日1回)	3 6 9	300000 600000 900000	NC[f] NC[f] NC[f]	母動物及び出生児に有害所見なし。

NC: 算出せず，BLQ: 定量下限未満

a: 無毒性量に下線を付した。

b: 各試験で用いた rHuPH20 のヒアルロニダーゼ活性は約 100000～120000 U/mg であったが，この表では 100000 U/mg としての用量を表示した。

c: Day 7 の $AUC_{0\text{-}last}$（雌雄合算値）

d: 2 mg/kg 群については，Day 183 の $AUC_{0\text{-}last}$（雄/雌）を示した。なお，投与最終週（Day 267）の AUC は Day 183 よりも低値であり，抗 rHuPH20 抗体産生による影響が示唆された。また，0.02 及び 0.2 mg/kg 群ではすべての測定時点で定量下限未満であったことから，AUC は算出しなかった。

e: 妊娠 15 日目の $AUC_{0\text{-}24h}$

f: 妊娠 18 日目において，低レベルの rHuPH20 活性が一部の個体で検出されたのみであったことから，AUC は算出しなかった。

2.6.6.9.4.1 急性毒性及び反復投与毒性

rHuPH20の急性毒性試験は実施していないが，単回静脈内投与 PK 試験（2.6.4.3.3）において，マウス（0.4 mg/kg）及びカニクイザル（最高30 mg/kg）における忍容性が確認されている。また，カニクイザルを用いた反復投与毒性試験において，5 mg/kg の7日間（1日1回）静脈内又は皮下投与，及び2 mg/kg までの用量の39週間（週1回）皮下投与において，明らかな毒性所見は認められなかった。

2.6.6.9.4.2 安全性薬理

ICH S6(R1)に従い，rHuPH20の独立した安全性薬理試験は実施せず，カニクイザルを用いた39週間投与試験の中に安全性薬理に関する評価項目（心血管系〔心電図，心拍数及び血圧〕，呼吸系〔呼吸数〕，中枢神経系〔一般状態観察における行動評価〕）を組み入れた。これらの評価おいて，rHuPH20の投与に関連した作用は認められなかった。

2.6.6.9.4.3 生殖発生毒性

rHuPH20の雌雄受胎能は，カニクイザルを用いた39週間投与試験において評価した。最高用量の2 mg/kg まで，rHuPH20の投与に関連した検査項目（雌の月経周期，雄の精巣容積，精子検査〔精子濃度，運動能及び形態〕，雄の血清黄体形成ホルモン濃度，雌雄生殖器の重量及び病理学的検査〔剖検及び組織学的検査〕）の異常は認められなかった。

マウスを用いた胚・胎児発生に関する試験において，rHuPH20を妊娠6～15日目に1日1回皮下投与したとき，9 mg/kg 以上の用量で胚・胎児毒性（胚吸収の増加，軽度の出生児数減少及び胎児体重減少）が認められた。rHuPH20の投与に起因するその他の変化（形態異常及び変異）は認められなかった。rHuPH20の胎児における NOAEL は3 mg/kg であり，母動物における

NOAEL は18 mg/kg と判断された。本試験では，投与量に関連した rHuPH20の全身曝露が母動物において確認された。rHuPH20はヒアルロン酸を低分子化させるが，ヒアルロン酸は主要なグリコサミノグリカンの一つであり，胚における心臓の形成を誘導する心ゼリーの構成成分である。また，ヒアルロン酸合成酵素欠損マウスを用いた研究[13] 及びヒアルロン酸を分解した全胚を用いた研究[14] において，正常な心臓の発生におけるヒアルロン酸の重要性が示されている。これらの知見から，マウスの9 mg/kg 以上の投与で認められた胚損失は，rHuPH20が分化発達中の胚のおそらく心臓において，ヒアルロン酸を分解した結果生じたものと考えられた。なお，低用量の3及び1 mg/kg では，胚・胎児発生への影響は認められなかった。

マウスを用いた出生前及び出生後の発生に関する試験において，rHuPH20を妊娠6～授乳20日目まで1日1回皮下投与したとき，最高用量の9 mg/kg まで母動物及び出生児の生存及び発育（性成熟，学習及び記憶，生殖能を含む）に影響は認められず，この用量を母動物及び出生児における NOAEL と判断した。

なお，マウスを用いた胚・胎児発生に関する試験，並びに出生前及び出生後の発生に関する試験では，rHuPH20の中又は高用量を投与した母動物の数例が死亡発見又は安楽死処置された（18 mg/kg の2例、9 mg/kg の4例及び6 mg/kg の1例）が，蛋白性物質をマウスに投与した際に時々死亡が認められることがあり，この低頻度（試験群の10%未満）の死亡は，試験施設における背景データの範囲内であった。また，最高30 mg/kg を投与した胚・胎児発生に関する用量設定試験では，死亡例は認められなかった。

2.6.6.9.4.4 毒性試験における全身曝露

カニクイザル7日間静脈内及び皮下投与試験において，5 mg/kg（NOAEL）の用量における忍容性は良好であった。本試験では，静脈内投与による曝露量が皮下投与よりも約18倍高かった。また，39週間皮下投与試験では，最高用量の2 mg/kg（NOAEL）においても，一部の個体において散発的に血漿中 rHuPH20が検出されたのみであった。0.02及び0.2 mg/kg では全身曝露は確認されなかった。

マウスにおける胚・胎児発生に関する試験の3 mg/kg 以上（妊娠15日目），並びに出生前及び出生後の発生に関する試験の9 mg/kg（妊娠18日目）では，rHuPH20の全身曝露が確認された。いずれの試験における NOAEL も，ヒトでの臨床投与量（0.00625 mg/kg）と比較して極めて高い用量であった。

カニクイザルにおいて，rHuPH20は全身曝露が確認される高い用量を皮下投与しても，有害所見を惹起しないことが確認された。マウスを用いた生殖発生毒性試験では，器官形成期及び出生前後の発達期間において高い曝露量を得るため，非常に高い用量を連日投与した。全身曝露が確認された高用量において胚・胎児毒性が認められたが，ヒトの臨床用量は0.00625 mg/kg と低いことから rHuPH20の全身曝露は生じないと考えられ，胚・胎児への有害作用も生じないものと考えられた。

2.6.6.9.4.5 免疫原性

rHuPH20はヒト組換え蛋白であるため，動物において免疫原性を示す可能性が考えられるが，ヒトにおける免疫原性を予測するものではない。カニクイザル39週間投与試験の高用量の2 mg/kg では，投与開始後約3カ月でヒアルロニダーゼの中和活性が確認された。抗 rHuPH20抗体価及び中和力価は用量に依存し，概ね投与期間に応じて増加した。4週間の休薬期間後には，抗体価及び中和力価は最高値の約50%まで低下した。中和活性の存在と毒性所見との間に関連はなく，皮下注射局所における投与液の拡散にも影響は認められなかった。また，抗体産生に関連した過敏症反応の所見も認められなかった。

マウス胚・胎児発生に関する試験では，妊娠15日目の全例で抗 rHuPH20抗体の産生が確認されたが，rHuPH20の皮下投与後の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は概ね用量に応じて増加し，初回投与時（妊娠6日目）と比較して，曝露量の低下は認められなかった。一方，出生前及び出生後の発

生に関する試験（曝露評価のための追加試験）では，胚・胎児発生試験と同一の用量において，妊娠18日目の曝露がほとんど認められなかった。この時点において rHuPH20抗体が全例で陽性であったことから，特異的抗体産生により曝露量が低下した可能性が考えられた。なお，マウスを用いた薬理試験において，抗 rHuPH20抗体は，rHuPH20による皮内投与した色素の拡散作用に影響を及ぼさないことが確認されている（2.6.2.2.3.6）。

2.6.6.9.4.6 遺伝毒性及びがん原性

ICH S6(R1)及び ICH S9に準拠し，rHuPH20の遺伝毒性試験及びがん原性試験は実施していない。rHuPH20はヒト組換え蛋白であり，皮下投与局所で一過性の作用を示し，全身曝露しないことを考慮すると，rHuPH20の反復投与による発がんは生じないものと考えられた。

2.6.6.9.4.7 皮下投与による局所刺激性及び皮膚の硬結に関する評価

全体として，rHuPH20を動物に皮下投与したときの投与局所における忍容性は良好であった。rHuPH20の皮下投与による唯一の作用は，カニクイザルで2 mg/kg を投与した雌雄及び0.2 mg/kg を投与した雌雄各1/4例に認められた投与部位における可逆的かつ有害でない，軽微な血管周囲のリンパ形質細胞浸潤であった。4週間の休薬期間終了時において，2 mg/kg の雄1例のみで軽微な所見が認められ，この所見は回復性を有することが示された。この投与局所における軽微なリンパ形質細胞浸潤は予想されたものであり，ヒト蛋白をカニクイザルに皮下投与した際に時々認められることが報告されている[15)]。従って，この変化は非特異的な組織反応を示唆するものであり，所見の程度が軽微で回復性を有することから，有害な変化ではないと考えられた。

ミニブタを用いた試験において。rHuPH20は大量の IgG 溶液を皮下投与したときの投与局所の変化及び有害作用を軽減させた。具体的には，投与局所の腫脹及び硬結が生じる頻度を低下させ，また，皮膚の間質圧を低下させて皮膚局所の柔軟性を維持させた。更に，皮下に大量の IgG 溶液が存在する間の皮下の血流を改善させた。これらの結果は，rHuPH20の薬理作用を支持するものであり，毒性試験における局所刺激性評価の結果も踏まえると，rHuPH20の局所忍容性は良好であると考えられた。

2.6.6.9.4.8 ヒアルロニダーゼ PH20の各動物種における組織分布

rHuPH20とヒト PH20のアミノ酸配列は，C 末端の1つのアミノ酸を除いて同一である。すなわち，内因性 PH20はグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI)-アンカードメインを有する膜結合型分子であるが，この GPI-アンカー部の1アミノ酸の切断により，可溶型の組換え酵素である rHuPH20を作製することができる。PH20は雄性生殖器及び精子のアクロソームに発現していることが報告されており，精子の卵丘細胞層の通過により，受精を促進する作用を有する[16)]。その他，子宮[12)]，乳房[17)]，滑膜／軟骨[18)]など，他の組織における PH20遺伝子の発現の報告もいくつか認められる。精巣における明確な SPAM1/PH20の発現を示した報告[19)，20)]に対して，その他の組織における発現は確定されたものではなく，それらの組織における PH20の潜在的な機能も不明である。また，マウスの脳，培養したオリゴデンドロサイト前駆細胞（OPC），実験的自己免疫性脳脊髄炎（EME）モデルマウスの脊髄脱髄病巣，並びに多発性硬化症（MS）患者の脳における慢性皮質病巣に PH20の発現がみられることが最近報告されている[11)]。PH20の組織発現プロファイルについて理解を深め，更に，一貫性のない論文報告の内容について明確にするため，PH20の遺伝子発現に関する系統的な評価を実施した。すなわち，複数の動物種（ヒト，マウス，ウサギ）の多様な組織における発現解析を行った。解析法として，感度の高い RT-qPCR 及び RNA-seq を用いた。その結果，PH20が成体の雄性生殖器に選択的に発現していることが，ヒト，マウス及びウサギの種々の発育期の組織を用いた RT-qPCR 解析により示された。また，ヒトの成人及び胎児組織について，RNA-seq に基づく

PH20の発現プロファイルを纏めたヒートマップを作成した。このヒートマップではSPAM1/PH20を含むヒアルロニダーゼ遺伝子に加えて，ヒアルロン酸合成酵素，ハウスキーピング遺伝子，並びに PH20の発現が論文報告されている組織（神経組織など）における，組織特異的遺伝子の発現も含めた。広範な組織において，PH20以外のいくつかのヒアルロニダーゼ遺伝子の発現が確認されたが，PH20の発現は，ヒト，マウス及びウサギ成体の雄性生殖器に限定されていた。また，神経系を含む広範な組織サンプルにおいて，PH20の定量可能なシグナルは検出されなかった。成体の雄性生殖器を除き，転写及び蛋白レベルの両方で PH20の発現が検出されなかったことは，外部データベースの評価によっても裏付けられた。ヒトプロテオームのデータベース検索では，PH20の発現は成体の精巣及び精子に限定していることが示されている[21)]。以上のとおり，いくつかの高感度かつ定量的な独立した手法を用いて PH20の発現を系統的に評価した結果，PH20はヒト，マウス及びウサギ成体の雄性生殖器のみに発現していることが確認された。この結果は，抗 rHuPH20抗体を用いたヒト組織交差反応性試験の結果と一致していた。

2.6.6.9.4.9 抗 rHuPH20抗体の受胎能及び胚・胎児発生に及ぼす影響

抗 rHuPH20抗体が雄の授胎能，並びに雌の受胎能及び胚・胎児発生に及ぼす影響（出生後の評価を含む）について検討するため，ウサギを用いた GLP 下での2つの試験を実施した。具体的には，rHuPH20を投与することにより高い抗 rHuPH20抗体価を維持した性成熟ウサギを用いて，雌雄の受胎能及び胚・胎児発生の評価を行った。雌ウサギを用いた試験では，胎児における母動物由来の抗 rHuPH20抗体の移行についても評価した。

雄の精子検査及び雄の授胎能評価のための帝王切開検査において，抗 rHuPH20抗体の存在による影響は認められなかった。また，雌の試験における帝王切開パラメータ，胎児所見（胎児生存率，重量，性比，胎児の外表，内臓及び骨格検査），出産，出生児の成長及び発達（生殖器の発達，行動及び運動機能，並びに受胎能〔交配成績及び精子検査〕）のいずれにおいても，抗 rHuPH20抗体の存在による影響は認められなかった。

2.6.6.9.5 結論

PH FDC SC の独立した毒性試験は実施していないが，構成成分のペルツズマブ，トラスツズマブ及び rHuPH20について，個別の評価による毒性プロファイルが明らかにされた。また，rHuPH20を添加したトラスツズマブの皮下投与毒性試験において，新たな毒性所見は認められなかった。更に，ミニブタを用いた PK 試験において，rHuPH20を含むペルツズマブ及びトラスツズマブの併用皮下投与による忍容性を確認した。これらの非臨床試験結果から，PH FDC SC は，臨床において許容可能な安全性プロファイルを示すと考えられた。

2.6.6.10 図表

本文中に挿入した。

2.6.6.11 参考文献

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) Bookbinder LH, Hofer A, Haller MF, Zepeda ML, Keller G-A, Lim JE, et al. A recombinant human enzyme for enhanced interstitial transport of therapeutics. J Control Release. 2006;114:230-41.
4) U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Guidance for Industry. Nonclinical Studies for the Safety Evaluation of Pharmaceutical Excipients, May 2005. Available at: https://www.fda.gov/media/72260/download.
5) European Medicines Agency. Guideline on Repeated Dose Toxicity, March 2010. Available at:

https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-repeated-dose-toxicity-revision-1_en.pdf.

6) Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. J Intern Med. 1997;242:27-33.

7) Weber GC, Buhren BA, Schrumpf H, Wohlrab J, Gerber PA. Clinical Applications of Hyaluronidase. Adv Exp Med Biol. 2019;1148:255-77.

8) Gershon MD, Bursztajn S. Properties of the enteric nervous system: limitation of access of intravascular macromolecules to the myenteric plexus and muscularis externa. J Comp Neurol. 1978;180:467-88.

9) Mital P, Hinton BT, Dufour JM. The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. Biol Reprod. 2011;84:851-8.

10) Grigorieva A, Griffiths GS, Zhang H, Laverty G, Shao M, Taylor L, et al. Expression of SPAM1 (PH-20) in the murine kidney is not accompanied by hyaluronidase activity: Evidence for potential roles in fluid and water reabsorption. Kidney Blood Press Res. 2007;30:145-55.

11) Preston M, Gong X, Su W, Matsumoto SG, Banine F, Winkler C,et al. Digestion products of the PH20 hyaluronidase inhibit remyelination. Ann Neurol. 2013;73:266-80.

12) Zhang H, Martin-DeLeon PA. Mouse Spam1 (PH-20) is a multifunctional protein: Evidence for its expression in the female reproductive tract. Biol Reprod. 2003;69:446-54.

13) Camenisch TD, Spicer AP, Brehm-Gibson T, Biesterfeldt J, Augustine ML, Calabro Jr. A, et al. Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. J Clin Invest. 2000;106:349-60.

14) Baldwin HS, Lloyd TR, Solursh M. Hyaluronate degradation affects ventricular function of the early postlooped embryonic rat heart in situ. Circ Res. 1994;74:244-52.

15) Carbonatto M, Yu P, Bertolino M, Vigna E, Steidler S, Fava L, et al. Nonclinical safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of atacicept. Toxicol Sci. 2008;105:200-10.

16) Martin-DeLeon PA. Epididymal SPAM1 and its impact on sperm function. Mol Cell Endocrinol. 2006;250:114-21.

17) Beech DJ , Madan AK, Deng N. Expression of PH-20 in normal and neoplastic breast tissue. J Surg Res. 2002;103:203-7.

18) El Hajjaji H, Cole AA, Manicourt DH. Chondrocytes, synoviocytes and dermal fibroblasts express PH20, a hyaluronidase active at neutral pH. Arthritis Res Ther. 2005;7:R756-68.

19) Csòka AB, Scherer SW, Stern R. Expression analysis of six paralogous human hyaluronidase genes clustered on chromosomes 3p21 and 7q31. Genomics 1999;60:356-61.

20) Jones MH, Davey PM, Aplin H, Affara NA. Expression analysis, genomic structure, and mapping to 7q31 of the human sperm adhesion molecule gene SPAM1. Genomics 1995;29:796-800.

21) Wilhelm M, Schlegl J, Hahne H, Gholami AM, Lieberenz M, Savitski MM, et al. Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. Nature 2014;509:582-7.

目次

2.6.7 毒性試験概要表 4
2.6.7.1 毒性試験一覧表 4
2.6.7.2 トキシコキネティクス試験の一覧表 8
2.6.7.3 トキシコキネティクス試験成績の一覧 9
2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧 11
2.6.7.5 単回投与毒性試験 12
2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 12
2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験 13
2.6.7.7.1 rHuPH20 を含むトラスツズマブのカニクイザル 13 週間皮下投与試験（17 週間回復性試験） 13
2.6.7.7.2 rHuPH20 のカニクイザル 7 日間静脈内及び皮下投与試験 14
2.6.7.7.3 rHuPH20 のカニクイザル 39 週間皮下投与試験（4 週間回復性試験） 15
2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験 17
2.6.7.9 In Vivo 遺伝毒性試験 17
2.6.7.10 がん原性試験 17
2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 18
2.6.7.11.1 rHuPH20 の反復皮下投与によるマウス胚・胎児発生に関する予備試験 18
2.6.7.12 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 19
2.6.7.12.1 ウサギにおける抗 rHuPH20 抗体の雄授胎能及び生殖機能に及ぼす影響 19
2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 23
2.6.7.13.1 rHuPH20 の皮下投与によるマウス胚・胎児発生に関する試験 23
2.6.7.14 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 25
2.6.7.14.1 rHuPH20 の皮下投与によるマウス出生前及び出生後の発生に関する試験 25
2.6.7.14.2 rHuPH20 の皮下投与によるマウス出生前及び出生後の発生に関する試験（抗 rHuPH20 抗体の評価） 28
2.6.7.14.3 ウサギにおける抗 rHuPH20 抗体の雌受胎能，胚・胎児発生，並びに出生後の機能に及ぼす影響 32
2.6.7.15 新生児を用いた試験 41
2.6.7.16 局所刺激性試験 41
2.6.7.17 その他の毒性試験 42
2.6.7.17.1 ウサギを用いた rHuPH20 の免疫原性試験 42

2.6.7.17.2 rHuPH20 皮下投与後の皮膚の硬結に関する評価 44
2.6.7.17.3 抗 rHuPH20 抗体のヒト組織交差反応性試験 45
2.6.7.17.4 SPAM1/PH20 の各動物種における組織発現 46

表一覧

表 2.6.7.1-1 毒性試験一覧表（rHuPH20を含むトラスツズマブ） 4
表 2.6.7.1-2 毒性試験一覧表（rHuPH20） 5
表 2.6.7.2-1 トキシコキネティクス試験の一覧表（rHuPH20を含むトラスツズマブ） 8
表 2.6.7.2-2 トキシコキネティクス試験の一覧表（rHuPH20） 8
表 2.6.7.3-1 トキシコキネティクス試験成績の一覧（rHuPH20を含むトラスツズマブ） 9
表 2.6.7.3-2 トキシコキネティクス試験成績の一覧（rHuPH20） 10
表 2.6.7.4-1 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧（rHuPH20を含むトラスツズマブ） ... 11
表 2.6.7.4-2 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧（rHuPH20） 11
表 2.6.7.7.1-1 rHuPH20を含むトラスツズマブのカニクイザル13週間皮下投与試験 13
表 2.6.7.7.2-1 rHuPH20のカニクイザル7日間静脈内及び皮下投与試験 14
表 2.6.7.7.3-1 rHuPH20のカニクイザル39週間皮下投与試験（4週間回復性試験） 15
表 2.6.7.11.1-1 rHuPH20の反復皮下投与によるマウス胚・胎児発生に関する予備試験 18
表 2.6.7.12.1-1 ウサギにおける抗 rHuPH20抗体の雄授胎能及び生殖機能に及ぼす影響 19
表 2.6.7.13.1-1 rHuPH20の皮下投与によるマウス胚・胎児発生に関する試験 23
表 2.6.7.14.1-1 rHuPH20の皮下投与によるマウス出生前及び出生後の発生に関する試験 .. 25
表 2.6.7.14.2-1 rHuPH20の皮下投与によるマウス出生前及び出生後の発生に関する試験（抗 rHuPH20抗体の評価） 28
表 2.6.7.14.3-1 ウサギにおける抗 rHuPH20抗体の雌受胎能，胚・胎児発生，並びに出生後の機能に及ぼす影響 32
表 2.6.7.16-1 rHuPH20を含むトラスツズマブ皮下投与製剤のウサギ局所刺激性試験 41
表 2.6.7.17.1-1 ウサギを用いた rHuPH20の免疫原性試験 42
表 2.6.7.17.2-1 rHuPH20皮下投与後の皮膚の硬結に関する評価 44
表 2.6.7.17.3-1 抗 rHuPH20抗体のヒト組織交差反応性試験 45
表 2.6.7.17.4-1 SPAM1/PH20の各動物種における組織発現 46

略語一覧

略語	英語名	和名
AUC	area under the concentration-time curve	濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}last}$	AUC from time 0 to the last measurable time point	投与後定量可能時間までの AUC
$AUC_{0\text{-}24h}$	AUC from time 0 to 24 hours	0～24時間までの AUC
BLQ	below the limit of quantification	定量下限未満
C_{max}	maximum concentration	最高濃度
DG	day of (presumed) gestation	妊娠日数
DL	day of lactation (postpartum day)	授乳日数
DS	day of study	実験日
ECG	electrocardiogram	心電図
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
IM	intramuscular	筋肉内
IV	intravenous	静脈内
NA	not applicable	該当せず
NC	not calculable	算出せず
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
PND	postnatal day	生後日数
rHuPH20	recombinant human hyaluronidase	ボルヒアルロニダーゼ　アルファ（遺伝子組換え）
RNA-seq	RNA sequencing	RNA シークエンシング
RT-(q)PCR	reverse transcriptase-(quantitative) polymerase chain reaction	逆転写（定量的）ポリメラーゼ連鎖反応
SC	subcutaneous	皮下
SPAM	Sperm Adhesion Molecule 1	（ヒアルロニダーゼ PH20の別名）
TK	toxicokinetic(s)	トキシコキネティクス
T_{max}	time to maximum observed concentration	最高濃度到達時間
U	units of hyaluronidase activity	ヒアルロニダーゼ活性の単位
USP	United States Pharmacopeia	米国薬局方
—	no noteworthy findings	特記すべき所見なし

2.6.7 毒性試験概要表

2.6.7.1 毒性試験一覧表

表 2.6.7.1-1 毒性試験一覧表（rHuPH20を含むトラスツズマブ）

Test Article: Trastuzumab containing rHuPH20

Type of Study	Species and Strain	Method of Admin.	Duration of Dosing	Trastuzumab Doses [a]	rHuPH20 Doses	GLP Compliance	Testing Facility	Location in CTD [Report No.]
Repeat-dose toxicity [b]	Monkey, Cynomolgus	SC, once weekly	13 weeks	30 mg/kg	Approx. 0.025 mg/kg (corresponding to approx. 3000 U/kg)	Yes	[redacted]	4.2.3.2-1 [1027259]
Local tolerance [c]	Rabbit	SC	Single dose	0.5 mL corresp. to 60 mg total dose	Approx. 0.0037 mg/kg (corresponding to approx. 333 U/kg) [d]	Yes	F. Hoffmann-La Roche Ltd. Basel, Switzerland	4.2.3.6-1 [1030364]

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

a: The No Observed Adverse Effect Level is underlined.

b: The study was performed with a trastuzumab SC formulation containing approx. 12000 U/mL rHuHP20 corresponding to approx. 0.1 mg/mL of rHuPH20.

c: The study was performed with a trastuzumab SC formulation containing approx. 2000 U/mL rHuPH20 corresponding to approx. 0.022 mg/mL of rHuPH20.

d: Based on a 3 kg rabbit.

表 2.6.7.1-2 毒性試験一覧表（rHuPH20）

Test Article: rHuPH20

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	rHuPH20 Doses [a]	GLP Compliance	Testing Facility	Location in CTD [Report No.]
Repeat-Dose Toxicity	Monkey, Cynomolgus	IV and SC, once daily	7 days	5 mg/kg (580000 U/kg)	Yes	[redacted]	4.2.3.2-2 [1034926]
Repeat-Dose Toxicity	Monkey, Cynomolgus	SC, once weekly	39 weeks	0.02 mg/kg (2019.4-2320 U/kg) 0.2 mg/kg (20194-23200 U/kg) 2 mg/kg (201940-232000 U/kg)	Yes	[redacted]	4.2.3.2-3 [1017117]
Embryo-fetal Development (Dose-Range Finding)	Mouse, Crl:CD1(ICR)	SC, once daily	DG 6-15	1 mg/kg (119000 U/kg) 3 mg/kg (357000 U/kg) 10 mg/kg (1190000 U/kg) 30 mg/kg (3570000 U/kg)	No	[redacted]	4.2.3.5.2-1 [1037039]
Embryo-fetal Development	Mouse, Crl:CD1(ICR)	SC, once daily	DG 6-15	3 mg/kg (360600 U/kg) 9 mg/kg (1081800 U/kg) 18 mg/kg (2163600 U/kg)	Yes	[redacted]	4.2.3.5.2-2 [1034927]
Pre/postnatal Development	Mouse, Crl:CD1(ICR)	SC, once daily	DG 6-DL 20 or DG 22	3 mg/kg (360600 U/kg) 6 mg/kg (721200 U/kg) 9 mg/kg (1081800 U/kg)	Yes	[redacted]	4.2.3.5.3-1 [1034928]
Satellite Pre/postnatal Development	Mouse, Crl:CD1(ICR)	SC, once daily	DG 6-DL 20 or DG 22	3 mg/kg (360600 U/kg) 6 mg/kg (721200 U/kg) 9 mg/kg (1081800 U/kg)	No	[redacted]	4.2.3.5.3-2 [1065428]
Effect of Anti-rHuPH20 Antibodies on Fertility and Early Embryonic Development	Rabbit/New Zealand White [Hra:(NZW)SPF]	SC, once daily	Days 1, 8, 15, 22, 29, 43 and 57	0.76 mg/kg	Yes	[redacted]	4.2.3.5.1-1 [1067497]
Effect of Anti-rHuPH20 Antibodies on Pre/postnatal Development	Rabbit/New Zealand White [Hra:(NZW)SPF]	SC, once daily	Days 1, 8, 15, 22, 29, 42 and 59 (DG 15)	0.76 mg/kg	Yes	[redacted]	4.2.3.5.3-3 [1067461]

表 2.6.7.1-2 毒性試験一覧表（rHuPH20）（続）

Test Article: rHuPH20

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	rHuPH20 Doses [a]	GLP Compliance	Testing Facility	Location in CTD [Report No.]
Other Toxicity Studies: Immunogenicity	Rabbit/New Zealand White	SC / IM	Day 1 / Days 8, 22, 36, 57	0.1 mL rHuPH20 + 0.1 mL adjuvant	No	Halozyme Therapeutics, San Diego, CA	4.2.3.7.1-1 [1065429]
		SC	Days 1-14, 16-28, 43	0.76 mg/kg			
		SC	Days 1, 8, 15, 22, 29, 50	0.76 mg/kg			
Other Toxicity Studies: Assessment of Induration	Pig/ Yucatan Micro	SC	Single dose	Pre-Infusion Article (Left) : 14 mL of Vehicle Pre-Infusion Article (Right) : 14 mL of rHuPH20 [concentration: 160 U/mL] Infusion Test Article (Left and Right) : 300 mL of Human IgG [concentration: 10%]	No	Halozyme Therapeutics, San Diego, CA	4.2.3.7.7-1 [1075830]
Other Toxicity Studies: Assessment of Induration	Pig/ Yucatan Micro	SC	Single dose	Pre-Infusion Article (Left) : 14 mL of Vehicle Pre-Infusion Article (Right) : 14 mL of rHuPH20 [concentration: 160 U/mL] Infusion Test Article (Left and Right) : 300 mL of Human IgG [concentration: 10%]	No	Halozyme Therapeutics, San Diego, CA	4.2.3.7.7-2 [1075831]

表 2.6.7.1-2 毒性試験一覧表（rHuPH20）（続）

Test Article: rHuPH20

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	rHuPH20 Doses [a]	GLP Compliance	Testing Facility	Location in CTD [Report No.]
Other Toxicity Studies: Tissue Cross-reactivity of an Antibody to rHuPH20	Human Tissues	*In vitro*	NA	NA	No	[redacted]	4.2.3.7.7-3 [1064848]
Other Toxicity Studies: SPAM1/PH20 Expression	Human, Mouse and Rabbit Tissues	NA	NA	NA	No	Halozyme Therapeutics, San Diego, CA	4.2.3.7.7-4 [1069704] 4.2.3.7.7-5 [1069712] 4.2.3.7.7-6 [1069713] 4.2.3.7.7-7 [1069714] 4.2.3.7.7-8 [1069715] 4.2.3.7.7-9 [1069716] 4.2.3.7.7-10 [1069756] 4.2.3.7.7-11 [1070564]

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

a: For repeat-dose toxicity, the No Observed Adverse Effect Level is underlined. For reproductive toxicity studies the NOAEL refers to reproduction/developmental toxicity endpoints and not parental toxicity.

Note: Single-Dose Toxicity; A single dose pharmacokinetic study with doses up to 30 mg/kg is described 2.6.5.3.

2.6.7.2 トキシコキネティクス試験の一覧表

表 2.6.7.2-1 トキシコキネティクス試験の一覧表（rHuPH20を含むトラスツズマブ）

Test Article: Trastuzumab containing rHuPH20

Type of Study	Test System	Method of Administration	Trastuzumab SC Doses	GLP Compliance	Location in CTD
Repeat-dose: 13-week toxicity	Monkey, Cynomolgus	Subcutaneous, Once weekly	30 mg/kg	Yes	4.2.3.2-1

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

表 2.6.7.2-2 トキシコキネティクス試験の一覧表（rHuPH20）

Test Article: rHuPH20

Type of Study	Test System	Method of Administration	rHuPH20 Doses	GLP Compliance	Location in CTD
Repeat-dose: 7-day toxicity	Monkey, Cynomolgus	Intravenous and Subcutaneous	IV: 5 mg/kg (580000 U/kg) SC: 5 mg/kg (580000 U/kg)	Yes	4.2.3.2-2
Repeat-dose: 39-week toxicity	Monkey, Cynomolgus	Subcutaneous	0.02 mg/kg (2019.4-2320 U/kg) 0.2 mg/kg (20194-23200 U/kg) 2 mg/kg (201940-232000 U/kg)	Yes	4.2.3.2-3
Repeat-dose: Embryo-fetal development	Mouse, Crl:CD1(ICR)	Subcutaneous	3 mg/kg (360600 U/kg) 9 mg/kg (1081800 U/kg) 18 mg/kg (2163600 U/kg)	Yes	4.2.3.5.2-2

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

2.6.7.3 トキシコキネティクス試験成績の一覧

表 2.6.7.3-1 トキシコキネティクス試験成績の一覧（rHuPH20を含むトラスツズマブ）

Test Article: Trastuzumab containing rHuPH20

Name	Dose / Route	Parameter		Monkey, Cynomolgus Males	Monkey, Cynomolgus Females	Type of Study
Trastztumab	30 mg/kg SC	Day 1	$AUC_{(0\text{-}168h)}$ (µg•h/mL)	48500	46300	13-week repeat dose toxicity study in monkeys
			C_{max} (µg/mL)	403	411	
		Day 29	$AUC_{(0\text{-}168h)}$ (µg•h/mL)	129000	122000	
			C_{max} (µg/mL)	955	956	
		Day 78	$AUC_{(0\text{-}168h)}$ (µg•h/mL)	174000	158000	
			C_{max} (µg/mL)	1220	1110	

表 2.6.7.3-2 トキシコキネティクス試験成績の一覧（rHuPH20）

Test Article: rHuPH20

Name	Dose / Route	Parameter		Species		Type of Study
rHuPH20				**Monkey, Cynomolgus**		
				Day 1 (M/F combined)	**Day 7 (M/F combined)**	
	5 mg/kg (580000 U/kg) IV or SC	IV:	$AUC_{0\text{-}last}$ (U•h/mL)	11800	8733	7-Day repeat dose IV and SC toxicity study
		SC:	$AUC_{0\text{-}last}$ (U•h/mL)	642	502	
		SC:	C_{max} (U/mL)	200	115	
				Male	**Female**	
	0.02 mg/kg (2019.4-2320 U/kg) SC	Below baseline plasma levels during the course of the study		No detectable plasma levels	No detectable plasma levels	39-week repeat dose toxicity study
	0.2 mg/kg (20194-23200 U/kg) SC	Below baseline plasma levels during the course of the study		No detectable plasma levels	No detectable plasma levels	
	2 mg/kg (201940-232000 U/kg) SC	Day 1	$AUC_{0\text{-}last}$ (U•h/mL)	20.5	47.8	
			C_{max} (U/mL)	12.5	20.8	
		Day 85	$AUC_{0\text{-}last}$ (U•h/mL)	177	395	
			C_{max} (U/mL)	28.8	64.7	
		Day 183	$AUC_{0\text{-}last}$ (U•h/mL)	89.6	467	
			C_{max} (U/mL)	12.0	64.2	
		Day 267	$AUC_{0\text{-}last}$ (U•h/mL)	NC	56.2	
			C_{max} (U/mL)	NC	10.0	
				Female Mouse, Crl:CD1(ICR)		
	3 mg/kg (360600 U/kg) SC	DG 6	$AUC_{0\text{-}24h}$ (U•h/mL)	5.45		Embryo-fetal development study
		DG 15	$AUC_{0\text{-}24h}$ (U•h/mL)	55.1		
	9 mg/kg (1081800 U/kg) SC	DG 6	$AUC_{0\text{-}24h}$ (U•h/mL)	45.3		
		DG 15	$AUC_{0\text{-}24h}$ (U•h/mL)	79.0		
	18 mg/kg (2163600 U/kg) SC	DG 6	$AUC_{0\text{-}24h}$ (U•h/mL)	120		
		DG 15	$AUC_{0\text{-}24h}$ (U•h/mL)	363		

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧

表 2.6.7.4-1 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧（rHuPH20を含むトラスツズマブ）

Test Article: Trastuzumab containing rHuPH20

Batch No.	Purity (%)	Specified Impurities	Type of Study	Location in CTD
[redacted](RO045-2317[redacted]) [a]	[redacted]%	Not specified	13-week repeat dose toxicity study in monkeys	4.2.3.2-1
[redacted](RO045-2317[redacted]) [b]	[redacted]%	Not specified	Local tolerance study in rabbits	4.2.3.6.1

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

a: 120 mg/mL trastuzumab plus 12000 U/mL rHuPH20 (corresponding to approx. 0.1 mg/mL rHuPH20).

b: 120 mg/mL trastuzumab plus 2000 U/mL rHuPH20 (corresponding to approx. 0.017 mg/mL rHuPH20).

表 2.6.7.4-2 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧（rHuPH20）

Test Article: rHuPH20

Batch No.	Specific Activity of rHuPH20 U/mg	Purity (%)	Specified Impurities (%) *不純物A	Specified Impurities (%) *不純物B	Type of Study	Location in CTD
[redacted]	116000	[redacted]	[redacted]	[redacted]	7-Day repeat dose IV and SC toxicity study in monkeys	4.2.3.2-2
					39-week repeat dose toxicity study in monkeys	4.2.3.2-3
[redacted]	100970	[redacted]	[redacted]	[redacted]	39-week repeat dose toxicity study in monkeys	4.2.3.2-3
	120200				Embryo-fetal development study in mice	4.2.3.5.2-2
					Pre/postnatal development study in mice	4.2.3.5.3-1
					Satellite pre/postnatal development study in mice	4.2.3.5.3-2
[redacted]	119000	[redacted]	[redacted]	[redacted]	Dose range embryo-fetal development study in mice	4.2.3.5.2-1
[redacted] (females)	NA	NA	NA	NA	Other Toxicity Studies: Immunogenicity in rabbits	4.2.3.7.1-1
[redacted] (males)	NA	NA	NA	NA		
[redacted]	126000	[redacted]	[redacted]	[redacted]	Effect of Anti-rHuPH20 Antibodies on Fertility and Early Embryonic Development in rabbits	4.2.3.5.1-1
					Effect of Anti-rHuPH20 Antibodies on Pre/postnatal Development in rabbits	4.2.3.5.3-3

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

*新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.7.5 単回投与毒性試験

該当試験なし。

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

該当試験なし。

2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験

2.6.7.7.1 rHuPH20を含むトラスツズマブのカニクイザル13週間皮下投与試験（17週間回復性試験）

表 2.6.7.7.1-1 rHuPH20を含むトラスツズマブのカニクイザル13週間皮下投与試験

Test Article: Trastuzumab containing rHuPH20

Report Title: Ro 045-2317/F03-01: A 13-Week Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study in Cynomolgus Monkeys with a 17-Week Recovery Phase

Species/Strain: Monkey/ Cynomolgus
Initial Age: Approx. 3 to 5 years
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]
Special Features: None
No Observed Adverse Effect Level: 30 mg/kg

Duration of Dosing: 13 weeks
Duration of Postdose: 17 weeks
Method of Administration: SC, once weekly
Vehicle: Ro 045-2317/F03-01 is a sterile liquid containing 120 mg/mL trastuzumab and 12,000 U/mL rHuPH20 in 20 mmol/L histidine, 210 mmol/L trehalose, 10 mmol/L methionine, and 0.04% Polysorbate 20, pH 5.5. Ro 045-2317/F02-01 control article is a sterile aqueous solution containing 12,000 U/mL rHuPH20 in 20 mmol/L histidine, 210 mmol/L trehalose, 10 mmol/L methionine, and 0.04% Polysorbate 20, pH 5.5.

Location in CTD: 4.2.3.2-1
Report No.: 1027259
GLP Compliance: Yes

Performed Examinations: Clinical observations, Body weight, Ophthalmic examinations, ECG, Blood pressure, Hematology, Clinical chemistry, Urine analysis, Organ weights, Necropsy, Histology, Toxicokinetics (trastuzumab and rHuPH20 [hyaluronidase activity] [a]), anti-trastuzumab and anti-rHuPH20 antibodies [b]

Dose (mg/kg/week) [c]		**0 (Control)**		**30**	
Number of Animals [Main (Recovery)]		**3 (2)**	**3 (2)**	**3 (2)**	**3 (2)**
Toxicokinetics (Trastuzumab)					
AUC (µg•h/mL)	Day 1	NC	NC	48500	46300
	Day 78	NC	NC	174000	158000
C_{max} (µg/mL)	Day 1	NC	NC	403	411
	Day 78	NC	NC	1220	1110
Died or Sacrificed Moribund		0	0	0	0
Noteworthy Findings		—	—	—	—
		No test article-related responses were identified in any of the following parameters: clinical observations, body weights, electrocardiography, blood pressure, ophthalmology, urinalysis, hematology, coagulation, serum chemistry, gross pathology, organ weights and histopathology.			

For standard abbreviations, see List of Abbreviations

a: Due to low plasma levels, toxicokinetic values for rHuPH20 are not included in this table.

b: Only three samples (all from the same animal) out of a total of 36 TK samples from the recovery phase showed positive for anti-Trastuzumab antibodies. Seven out of 20 animals were considered positive for anti-rHuPH20 neutralizing activity.

c: rHuPH20 dose level: 3000 U/kg in both groups.

2.6.7.7.2 rHuPH20のカニクイザル7日間静脈内及び皮下投与試験

表 2.6.7.7.2-1 rHuPH20のカニクイザル7日間静脈内及び皮下投与試験

Test Article: rHuPH20

Report Title: A 7-Day Repeat Dose Intravenous and Subcutaneous Toxicity Study of rHuPH20 in Cynomolgus Monkeys

Species/Strain:	Monkey/ Cynomolgus	**Method of Administration:**	IV or SC, once daily	**Location in CTD:**	4.2.3.2-2
Initial Age:	Approx. 3 years	**Duration of Dosing:**	7 days	**Report No.:**	1034926
Date of First Dose:	[redacted] 20[redacted]	**Duration of Postdose:**	None	**GLP Compliance:**	Yes
Special Features:	None	**Vehicle/Formulation:**	10 mM Histidine, 130 mM NaCl, pH 6.0 in sterile water for injection, USP		

No Observed Adverse Effect Level: 5 mg/kg (580000 U/kg)

Dose (mg/kg/day) [hyaluronidase activity (U/kg/day)]		**0 (IV and SC)**		**5 (IV) [580000]**		**5 (SC) [580000]**	
Number of Animals		**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**
Toxicokinetics							
$AUC_{0\text{-}last}$ (U•h/mL) [a]	Day 1	NC		11800		642	
	Day 7	NC		8733		502	
C_{max} (U/mL)	Day 1	NC		NC		200	
	Day 7	NC		NC		115	
Noteworthy Findings							
Died or Sacrificed Moribund		0	0	0	0	0	0
Body Weight		—	—	—	—	—	—
Food Consumption [biscuits]		—	—	—	—	—	—
Clinical Observations		—	—	—	—	—	—
Hematology/Coagulation		—	—	—	—	—	—
Clinical Chemistry		—	—	—	—	—	—
Urinalysis		—	—	—	—	—	—
Organ Weights		—	—	—	—	—	—
Gross Pathology		—	—	—	—	—	—
Histopathology							
Number Examined		2	2	2	2	2	2
Focal hepatocyte vacuolization: Minimal		—	—	—	—	2	—

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

a: Unit values were converted from those described in the final report (U•min/mL).

2.6.7.7.3 rHuPH20のカニクイザル39週間皮下投与試験（4週間回復性試験）

表 2.6.7.7.3-1 rHuPH20のカニクイザル39週間皮下投与試験（4週間回復性試験）

Test Article: rHuPH20

Report Title: A 39-Week Toxicity Study of rHuPH20 Administered Subcutaneously in Cynomolgus Monkeys with a Recovery Phase

Species/Strain: Monkey/ Cynomolgus **Method of Administration:** SC, once weekly **Location in CTD:** 4.2.3.2-3

Initial Age: Approx. 4 to 7 years [a] **Duration of Dosing:** 39 weeks **Report No.:** 1017117

Date of First Dose: [redacted] 20[redacted] **Duration of Postdose:** 4 weeks **GLP Compliance:** Yes

Vehicle/Formulation: 10 mM Histidine, 130 mM NaCl, pH 6.0 in sterile water for injection, USP

Special Features: Exploratory (non-GLP) additional anti-rHuPH20 antibody evaluations and histopathology of the gastrointestinal tract were conducted [b].

No Observed Adverse Effect Level: 2 mg/kg

Dose (mg/kg/week) [hyaluronidase activity (U/kg/week)]		**0**		**0.02 [2019.4 – 2320]**		**0.2 [20194 – 23200]**		**2 [201940 – 232000]**	
No. of Animals [Main (Recovery)]		**M: 4 (2)**	**F: 4 (2)**	**M: 4 (2)**	**F: 4 (2)**	**M: 4 (2)**	**F: 4 (2)**	**M: 4 (2)**	**F: 4 (2)**
Toxicokinetics									
$AUC_{0\text{-last}}$ (U•h/mL)	Day 1	NC	NC	NC	NC	NC	NC	20.5	47.8
	Day 85	NC	NC	NC	NC	NC	NC	177	395
	Day 183	NC	NC	NC	NC	NC	NC	89.6	467
	Day 267	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	56.2 [c]
C_{max} (U/mL)	Day 1	NC	NC	NC	NC	NC	NC	12.5	20.8
	Day 85	NC	NC	NC	NC	NC	NC	28.8	64.7
	Day 183	NC	NC	NC	NC	NC	NC	12.0	64.2
	Day 267	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	10.0
Noteworthy Findings [d]									
Died or Sacrificed Moribund		0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Histopathology									
Injection site, minimal perivascular lymphoplasmacytic infiltration		0/4 (Main) 0/2 (Recovery)	0/4 (Main) 0/2 (Recovery)	0/4 (Main) 0/2 (Recovery)	0/4 (Main) 0/2 (Recovery)	1/4 (Main) 0/2 (Recovery)	1/4 (Main) 0/2 (Recovery)	4/4 (Main) 1/2 (Recovery)	4/4 (Main) 0/2 (Recovery)
Additional Evaluations [e]		—	—	—	—	—	—	—	—

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

表 2.6.7.7.3-1　rHuPH20のカニクイザル39週間皮下投与試験（4週間回復性試験）（続）

a: Animals were determined to be sexually mature in pre-screen activities including examining descended testicles to meet a criterion of at least 10 mL in volume. Males were also screened for capacity to produce an ejaculate upon penile electro-stimulation according to [redacted] SOPs. Females were assessed for menstruation.
b: The following exploratory (non-GLP) evaluations of the tissues and anti-rHuPH20 antibodies from monkeys in this study were performed: cross-reactivity of anti-rHuPH20 neutralizing antibodies from cynomolgus monkey to endogenous cynomolgus monkey PH20 and cross-neutralization of monkey PH20 by antirHuPH20 antibodies; immunohistochemical analysis of cross-reactivity of anti-rHuPH20 antibodies to testis and colon enteric plexus; and evaluation of potential IgG deposition in the enteric nerve plexus, testis and epididymis.
c: Loss of hyaluronidase activity in plasma specimens following chronic repeated doses of 2.0 mg/kg was consistent with an increase in hyaluronidase neutralizing activity (neutralizing titer).
d: No test article-related responses were identified in any of the following parameters: clinical observations, menstrual monitoring, food consumption, body weights, electrocardiography (incl. heart rates), blood pressure, respiratory rate, ophthalmology, testicular volume, semen analysis (sperm concentration, motility and morphology), urinalysis, hematology, coagulation, serum chemistry, luteinizing hormone, gross pathology and organ weights.
e: The additional evaluations had no impact on the interpretation of the 39-week monkey study.
Notes: ADA levels were detected in all groups six weeks after dosing began; no hyaluronidase neutralizing activity was detected in specimens from monkeys that were dosed with the vehicle control. After 6 months, a low titer was detected in one-half of the animals that received weekly subcutaneous doses of 0.02 mg/kg. Neutralizing activity was detected in 11 of 12 animals dosed with 0.2 mg/kg/week and with 2 mg/kg/week generally after 7 months.

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験

該当試験なし。

2.6.7.9 In Vivo 遺伝毒性試験

該当試験なし。

2.6.7.10 がん原性試験

該当試験なし。

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

2.6.7.11.1 rHuPH20の反復皮下投与によるマウス胚・胎児発生に関する予備試験

表 2.6.7.11.1-1 rHuPH20の反復皮下投与によるマウス胚・胎児発生に関する予備試験

Test Article: rHuPH20

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Dosing Period	Daily Doses [hyaluronidase activity]	No. per Group	Noteworthy Findings	Location in CTD [Report No.] (GLP Compliance)
Mouse/ Crl:CD1(ICR)	Subcutaneous (10 mM Histidine, 130 mM NaCl, pH 6.0)	DG 6-15	1 mg/kg [119000 U/kg] 3 mg/kg [357000 U/kg] 10 mg/kg [1190000 U/kg] 30 mg/kg [3570000 U/kg]	8	• All mice survived to scheduled sacrifice on DG 18. All clinical observations were considered unrelated to rHuPH20 administration. • Body weights and body weight gains were unaffected by rHuPH20 administration up to 10 mg/kg/day. • At necropsy, 1/8 and 3/8 mice in the 10 and 30 mg/kg/day groups, respectively, had enlarged spleens. One of 8 mice in the 10 mg/kg/day group had a clear fluid-filled bursal cyst on the right ovary. • Pregnancy occurred in 8/8, 6/8, 6/8, 7/8 and 8/8 mice in the 0, 1, 3, 10 and 30 mg/kg/day groups, respectively. Four of 8 dams (3 of which had enlarged spleens) in the 30 mg/kg/day dose group had litters consisting of resorbed conceptuses only. One dam (with the large spleen) in the 10 mg/kg/day dose group had a litter that consisted of 68.8% resorptions. The litter size (live fetuses) of the 30 mg/kg/day dose group was reduced compared to controls. • There were no test article-related fetal gross alterations. • There were no test article-related effects on the dams or their litters in the 1 or 3 mg/kg/day dose groups.	4.2.3.5.2-1 [1037039] (Non-GLP)

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

2.6.7.12 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

2.6.7.12.1 ウサギにおける抗 rHuPH20抗体の雄授胎能及び生殖機能に及ぼす影響

表 2.6.7.12.1-1 ウサギにおける抗 rHuPH20抗体の雄授胎能及び生殖機能に及ぼす影響

Test Article: rHuPH20

Report Title: Effects of Anti-rHuPH20 Antibodies on Male Fertility and General Reproduction in the New Zealand White Rabbit

Design similar to ICH 4.1.1: Yes
Duration of Dosing: 7 doses total on DS 1, 8, 15, 22, 29, 43 and 57
Location in CTD: 4.2.3.5.1-1
Report No.: 1067497
Species/Strain: Rabbit/New Zealand White [Hra:(NZW)SPF]
Day of Mating: DG 0
GLP Compliance: Yes
Initial Age: Males: Approx. 4 months at receipt
Females: Approx. 6 months at receipt
Day of C-Section: DG 18
Method of Administration: SC
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]
Vehicle/Formulation: 10 mM Histidine, 130 mM NaCl in sterile water for Injection
Special Features: Evaluation of anti-rHuPH20 antibodies [a]. This male fertility and reproduction study evaluated semen parameters in treated males and mating outcome through implantation by conducting C-section of non-treated females that had been mated to anti-rHuPH20 antibody positive males.

Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**0.76** [b]
Males (Treated):		
Toxicokinetics	NA	NA
No. Evaluated	22	22
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0
Clinical Observations	—	—
Dermal Scoring		
Erythema: Grade 1 (No.obs./No. animals w/ obs.)	0/0	24/12 [c] **
Erythema: Grade 2 (No.obs./No. animals w/ obs.)	2/1	10/4 [c]
Erythema: Grade 3 (No.obs./No. animals w/ obs.)	0/0	2/1 [c]
Necropsy Observations	—	—
Terminal Body Weight (DS85) (mean)	3.50 kg	98.3% of control
Food Consumption (%)	—	—
Males that Mated (one pairing) - N (%)	20 (90.9%)	21 (95.4%)
Fertility Index (one pairing) - N (%)	17/20 (85.0%)	21/21 (100%)
Sperm Morphology	—	—

表 2.6.7.12.1-1 ウサギにおける抗 rHuPH20抗体の雄授胎能及び生殖機能に及ぼす影響（続）

Test Article: rHuPH20

Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.76 [b]
Males (Treated) (cont.):		
No. Evaluated	**22**	**22**
Sperm Motility and Concentration DS 37 [d]		
Number Motile	498.1 [e]	465.7 [e]
Static Count (Nonmotile)	86.9 [e]	54.5 [e,f]*
Sperm Count	280.1	318.9
Sperm Concentration	113.50	129.22
Sperm Motility and Concentration DS 49		
Number Motile	370.2 [e]	502.3
Static Count (Nonmotile)	46.3 [e]	31.3
Sperm Count	222.7	295.3
Sperm Concentration	90.22	119.64
Sperm Motility and Concentration DS 71		
Number Motile	775.4	834.5
Static Count (Nonmotile)	82.7	90.1
Sperm Count	78.5	130.0
Sperm Concentration	31.79	52.67
Additional Examinations [g]		
Anti-rHuPH20 Titer Value	—	—
Cross Reactivity of Rabbit Plasma IgG to recombinant rabbit PH20	—	—
Anti-rHuPH20 Neutralizing Activity	—	—

表 2.6.7.12.1-1　ウサギにおける抗 rHuPH20抗体の雄授胎能及び生殖機能に及ぼす影響（続）

Test Article: rHuPH20

Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.76 [b]
Females (Untreated and Mated with Treated Males)		
Caesarean Section Observations		
Fertility Index (one pairing) N (%)	17/20 (85.0%)	21/21 (100%)
No. Pregnant/No. Paired N/N (%)	17/22 (77.3%)	21/22 (95.4%)
No. Died or Sacrificed Moribund	0	1 [h]
No. Pregnant and Caesarean-Sectioned	17	20
Clinical Observations	—	—
Necropsy Observations	—	—
Gestation (DG18) Body Weight	3.64 kg	100.3% of control
Mean No. Corpora Lutea	8.9	9.6
Mean No. Implantations	7.5	8.5
Mean % Preimplantation Loss	14.6	13.2
Mean No. Viable Embryos	7.3	8.1
Mean No. Nonviable Embryos	0.2	0.4
Mean % Postimplantation Loss	3.5	4.0

* Significantly different from the control group value ($p \leq 0.05$).

**Significantly different from the control group value ($p \leq 0.01$).

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

表 2.6.7.12.1-1　ウサギにおける抗 rHuPH20抗体の雄授胎能及び生殖機能に及ぼす影響（続）

a: The following anti-rHuPH20 antibody evaluations were performed on plasma samples from rHuPH20-dosed males: anti-rHuPH20 antibody titers, cross-reactivity of rabbit antibodies to recombinant rabbit PH20 (rRbPH20), and anti-rHuPH20 neutralizing activity.
b: All rHuPH20-dosed animals had anti-rHuPH20 antibodies prior to mating and through termination.
c: These reactions were noted after the 5th dose and resolved within 4 days of each dose and were therefore not considered adverse.
d: One rabbit each in the control group and the treated group was excluded from these analyses because a semen sample could not be collected.
e: Excludes values for rabbits that had motility data that reflected drifting noncellular material.
f: This significant difference did not occur on DS 49 or DS 71 and was therefore not regarded as treatment related or adverse. No other significant difference occurred in any other sperm parameters between the two groups on any of the three days of evaluation.
g: For all male rabbits, blood samples for plasma analysis of antibodies were collected on DS 1, 8, 15, 22, 29, 43 and 57, and on the day of necropsy (DS 85). Plasma samples from rHuPH20-treated rabbits at all time points and from vehicle control-treated rabbits on DS 1 and DS 43 were assayed for the presence of anti-rHuPH20 binding antibody titers. Antibody analyses also included cross-reactivity of antibodies from rHuPH20-dosed males to recombinant rabbit PH20 (rRbPH20) at each interval and anti-rHuPH20 neutralizing activity of plasma samples from rHuPH20-dosed males on DS 43.
h: A single untreated female that was mated by a rHuPH20-treated male was found dead on DG 8. The cause of death was not determined. Because the female was not treated with rHuPH20 and an occasional death occurs in the control population, the death was not considered related to rHuPH20 treatment.

2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

2.6.7.13.1 rHuPH20の皮下投与によるマウス胚・胎児発生に関する試験

表 2.6.7.13.1-1 rHuPH20の皮下投与によるマウス胚・胎児発生に関する試験

Test Article: rHuPH20

Report Title: Subcutaneous Developmental Toxicity Study of rHuPH20 in Mice (Includes Amendment 1 and 2)

Design similar to ICH 4.1.3: Yes | **Duration of Dosing:** Once daily on DGs 6-15 (10 doses) | **Location in CTD:** 4.2.3.5.2-2

Species/Strain: Mouse/Crl:CD1(ICR) | **Day of Mating:** DG 0 | **Report No.:** 1034927

Initial Age: 63 days | **Method of Administration:** SC | **GLP Compliance:** Yes

Date of First Dose: [redacted] 20[redacted] | **Vehicle/Formulation:** 10 mM Histidine, 130 mM NaCl in Sterile Water for Injection

Special Features: None

No Observed Adverse Effect Level: F0 Females: 18 mg/kg/day; F1 Litters: 3 mg/kg/day

Dose (mg/kg/day) [hyaluronidase activity (U/kg/day)]			**0 (Control)**	**3 [360600]**	**9 [1081800]**	**18 [2163600]**
Dams:						
Toxicokinetics	$AUC_{0\text{-}24h}$ (U•h/mL)	DG6	NA	5.45	45.3	120
		DG 15	NA	55.1	79.0	363
	C_{max} (U/mL)	DG 6	NA	3.44	30.5	49.6
		DG 15	NA	20.9	17.1	99.2
No. Pregnant			24	24	23	23
No. Died or Sacrificed Moribund			0	0	2 [a]	1
No. Aborted or with Total Resorption of Litter			0	0	0	0
Clinical Observations			—	—	—	—
Necropsy Observations			—	—	—	—
Body Weight (%) [b]			49.8 g	101.4	97.6	101.6
Mean No. Corpora Lutea			13.8	13.4	13.4	13.7
Mean No. Implantations			13.6	13.0	13.0	13.4
Additional Examinations [c]						
Anti-rHuPH20 binding antibody titers						
DG 6			NA	< 1:50	< 1:50	< 1:50
DG 15			NA	1:200 – 1:1600000	1:2500 – 1:1600000	1:2500 – ≥ 1:3200000
Anti-rHuPH20 antibody isotype determination [d]						
IgG_1, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG_3			NA	+, +, +, +	+, +, +, +	+, +, +, +
IgM			NA	+/–	+/–	+/–
IgA			NA	–	–	–

表 2.6.7.13.1-1　rHuPH20の皮下投与によるマウス胚・胎児発生に関する試験（続）

Test Article: rHuPH20

Dose (mg/kg/day) [hyaluronidase activity (U/kg/day)]	**0 (Control)**	**3 [360600]**	**9 [1081800]**	**18 [2163600]**
Litters:				
No. Litters Evaluated	24	24	21	22
No. Live Fetuses	298	285	232	256
Mean Live Fetuses per Litter	12.4	11.9	11.0	11.6
Mean No. Resorptions	1.2	1.1	2.0	1.7
No. of Litters with Dead Fetuses	0	1	0	0
Mean % Postimplantation Loss	8.6	8.5	15.4	13.6
Mean Fetal Body Weight (g)	1.36	1.36	1.30 *	1.30 *
Fetal Sex Ratios (% males)	46.2	51.7	52.3	51.9
Fetal Anomalies	—	—	—	—
Litters with Fetuses with Any Alteration Observed (%)	91.7	91.7	90.5	86.4

*: $p \leq 0.05$.

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

a: During dosage administration, one mouse fell approximately 3 feet to the floor, convulsed for approximately 30 seconds and died.

b: At end of dosing period (DG 16). For controls, group means are shown. For treated groups, percent of controls are shown.

c: The level of anti-rHuPH20 (expressed as titer) and the isotype(s) of these antibodies were measured in toxicokinetics plasma samples.

d: Isotype analyses were performed on five DG 15 samples with high anti-rHuPH20 antibody titers (titers > 1:50,000).

+ = sample was positive for the indicated isotype; +/− low level of isotype was detected in sample.

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

2.6.7.14.1 rHuPH20の皮下投与によるマウス出生前及び出生後の発生に関する試験

表 2.6.7.14.1-1 rHuPH20の皮下投与によるマウス出生前及び出生後の発生に関する試験

Test Article: rHuPH20

Report Title: Subcutaneous Developmental and Perinatal/Postnatal Reproduction Toxicity Study of rHuPH20 in Mice, including a Postnatal Behavioral/Functional Evaluation

Design similar to ICH 4.1.2: Yes
Species/Strain: Mouse/Crl:CD1(ICR)
Initial Age: 63 days
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]
Special Features: None
Duration of Dosing: DG 6 through DL 20 or DG 22
Day of Mating: DG 0
Method of Administration: SC
Vehicle: 10mM Histidine, 130 mM NaCl (pH 6.5) and sterile water for injection, USP
Notes: Litters Not Culled
Location in CTD: 4.2.3.5.3-1
Report No.: 1034928
GLP Compliance: Yes

No Observed Adverse Effect Level: F0 Females: 9 mg/kg/day; F1 Generation: 9 mg/kg/day

Dose (mg/kg/day) [hyaluronidase activity (U/kg/day)]	**0 (Control)**	**3 [360600]**	**6 [721200]**	**9 [1081800]**
F_0 Females:				
No. Pregnant	22	20	21	20
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	1	2
No. with Total Resorption of Litter	0	0	1	0
Clinical Observations	—	—	—	—
Necropsy Observations	—	—	—	—
Gestation Body Weight (%) [a]	55.2 g	−1.8%	−3.3%	−1.4%
Lactation Body Weight (%) [a]	43.3 g	−2.8%	+0.5%	+4.2%
Mean Duration of Gestation (days)	19.9	19.8	19.8	20.0
Abnormal Parturition	0	0	0	0

表 2.6.7.14.1-1　rHuPH20の皮下投与によるマウス出生前及び出生後の発生に関する試験（続）

Test Article: rHuPH20

Dose (mg/kg/day) [hyaluronidase activity (U/kg/day)]	**0 (Control)**	**3 [360600]**	**6 [721200]**	**9 [1081800]**
F1 Litters (Preweaning):				
No. Litters Evaluated	22	19	20	18
Mean No. of Implantations	12.2	12.2	12.8	12.5
Mean No. Pups/Delivered Litter	11.5	11.6	11.7	12.2
Mean No. Liveborn Pups/Litter	11.5	11.6	11.7	12.0
No. of Litters with Stillborn Pups	0	0	0	1
Postnatal Survival to Day 4	96.1%	99.5% *	93.9%	100.0% *
Postnatal Survival to Weaning	99.6%	99.5%	100.0%	97.6% **
No. of Total Litter Losses	1	1	3	1
Change in Pup Body Weights [b]	+9.1 g	+9.0 g	+8.6 g	+7.9 g
Pup Sex Ratios at Birth (% Male)	52.8	43.8	51.6	48.4
Pup Clinical Signs	—	—	—	—
Pup Necropsy Observations	—	—	—	—
F1 Males (Postweaning):				
No. Evaluated Postweaning	25	25	25	24
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
Clinical Observations	—	—	—	—
Bent Tail	1	1	0	5 **
Necropsy Observations	—	—	—	—
Body Weight Change [c]	+24.6 g	+24.8 g	+25.3 g	+24.7 g
Preputial Separation (Mean age)	29.8 days	29.8 days	30.0 days	30.4 days
Motor Activity	—	—	—	—
Learning and Memory	—	—	—	—
Mean No. Days Prior to Mating	2.0	2.8	2.0	1.8
No. of Males that Mated	23	25	25	24
No. of Fertile Males	18	23	24	21

表 2.6.7.14.1-1　rHuPH20の皮下投与によるマウス出生前及び出生後の発生に関する試験（続）

Test Article: rHuPH20

Dose (mg/kg/day) [hyaluronidase activity (U/kg/day)]	0 (Control)	3 [360600]	6 [721200]	9 [1081800]
F1 Females (Postweaning):				
No. Evaluated Postweaning	23	25	25	25
No. Died	1	0	0	0
Clinical Observations	—	—	—	—
Necropsy Observations	—	—	—	—
Premating Body Weight Change [c]	+17.2 g	+16.9 g	+17.3 g	+17.9 g
Gestation Body Weight Change [d]	+26.6 g	+29.6 g	+29.0 g	+29.4 g
Vaginal Patency (Mean Age)	31.1 days	31.9 days	30.8 days	31.8 days
Motor Activity	—	—	—	—
Learning and Memory	—	—	—	—
Mean No. Days Prior to Mating	2.0	2.8	2.0	1.8
F1 Females (mating):				
No. of Females Sperm-Positive	23	25	25	25
No. of Pregnant Females	18	23	24	22
Mean No. Corpora Lutea	12.1	13.3	13.6	13.5
Mean No. Implantations	11.4	13.0	13.4	13.2
Mean % Preimplantation Loss	8.9	3.7	2.7	2.3
F2 Litters:				
Mean No. Live Conceptuses/Litter	10.4	11.6	11.2	12.0
Mean No. Resorptions	0.9	1.3	2.2	1.2
No. of Litter with Dead Conceptuses	1	1	1	0
No. Dead Conceptuses	1	1	1	0
Mean % Postimplantation Loss	7.9	11.5	17.0	9.1
Fetal Body Weights	1.33 g	1.34 g	1.35 g	1.31 g
Fetal Sex Ratios (% males)	50.7	57.2	48.2	48.0
Fetal Anomalies	—	—	—	—

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

a: At end of gestation or lactation. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

b: From birth to weaning.

c: From weaning to mating.

d: From DGs 0 to 18.

2.6.7.14.2 rHuPH20の皮下投与によるマウス出生前及び出生後の発生に関する試験（抗 rHuPH20抗体の評価）

表 2.6.7.14.2-1 rHuPH20の皮下投与によるマウス出生前及び出生後の発生に関する試験（抗 rHuPH20抗体の評価）

Test Article: rHuPH20

Report Title: Evaluation of Anti-rHuPH20 Antibodies Following Administration of rHuPH20 by Subcutaneous Injection in Mice (Developmental and Perinatal/Postnatal Reproduction Study Design)

Design similar to ICH 4.1.2: Yes
Duration of Dosing: DG 6 through DG 16, DG 18, DL 4, DL 13 or DL 21 [a]
Location in CTD: 4.2.3.5.3-2
Species/Strain: Mouse/Crl:CD1(ICR)
Day of Mating: DG 0
Initial Age: Approx. 63 days at receipt
Method of Administration: SC
Report No.: 1065428
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]
GLP Compliance: No
Notes: Litters Not Culled
Vehicle: 10mM Histidine, 130 mM NaCl (pH 6.5) and Sterile Water for Injection, USP
Special Features: Special Features: Satellite study to evaluate anti-rHuPH20 antibodies in pregnant and postpartum lactating mice and their offspring (fetuses and pups) in support of a previous GLP perinatal/postnatal development study (2.6.7.14.1) [b].

Dose (mg/kg/day) [hyaluronidase activity (U/kg/day)]	**0 (Control)**	**3 [c] [360600]**	**6 [c] [721200]**	**9 [c] [1081800]**
Anti-rHuPH20 Antibody Assessments in F_0 Females and Offspring (Fetuses/Pups)				
No. Evaluated				
DG 18 (Subset 1)	6	12	12	12
DL 6 (Subset 2A)	3	6	6	6
DL 15 (Subset 2B)	3	6	6	6
DL 23 (Subset 2C)	3	6	6	6
PND 30 and PND 60 (Subset 3)	3	6	6	6
rHuPH20 Plasma Concentrations Subset [d]	3	6	6	6
No. Died or Sacrificed [e]				
DG 18 (Subset 1)	0	0	0	0
DL 6 (Subset 2A)	0	0	1	1
DL 15 (Subset 2B)	0	0	1	1
DL 23 (Subset 2C)	0	0	1	1
PND 30 and PND 60 (Subset 3)	0	0	0	1
rHuPH20 Plasma Concentrations Subset	0	0	0	1
rHuPH20 Plasma Concentration on DG 18 and DL 21 [d]	—	—	—	—

表 2.6.7.14.2-1 rHuPH20の皮下投与によるマウス出生前及び出生後の発生に関する試験（抗 rHuPH20抗体の評価）（続）

Test Article: rHuPH20

Dose (mg/kg/day) [hyaluronidase activity (U/kg/day)]	0 (Control)	3 [c] [360600]	6 [c] [721200]	9 [c] [1081800]
Maternal Median Anti-rHuPH20 Titers [f]				
DG 18 (Subset 1)	—	51200		
DL 6 (Subset 2A)	—	819200		
DL 15 (Subset 2B)	—	1638400		
DL 23 (Subset 2C)	—	3276800		
Fetal/Pup Median Anti-rHuPH20 Titers [g]				
DG 18 (Subset 1)	—	19200		
DL 6 (Subset 2A)	—	307200		
DL 15 (Subset 2B)	—	1638400		
DL 23 (Subset 2C)	—	409600		
PND 30 (Subset 3)	—	153600		
PND 60 (Subset 3)	—	51200		
Median Anti-rHuPH20 Titers Values from Individual Pups at PND 30 and PND 60 [h]				
PND 30 (Subset 3, Male)	—	102400	153600	128000
PND 30 (Subset 3, Female)	—	204800	102400	128000
PND 60 (Subset 3, Male)	—	25600	51200	51200
PND 60 (Subset 3, Female)	—	38400	51200	19200
Incidence of Cross-Reactivity to rMuPH20 and rMuHYAL5 in Maternal Plasma Samples [i] (rMuPH20 / rMuHYAL5)				
DG 18 (Subset 1)	NA	67% / 78%		
DL 6 (Subset 2A)	NA	100% / 100%		
DL 15 (Subset 2B)	NA	100% / 100%		
DL 23 (Subset 2C)	NA	100% / 100%		
Incidence of Cross-Reactivity to rMuPH20 and rMuHYAL5 in Fetal/Pup Plasma Samples [i] (rMuPH20 / rMuHYAL5)				
DG 18 (Subset 1)	NA	10% / 50%		
DL 6 (Subset 2A)	NA	87% / 100%		
DL 15 (Subset 2B)	NA	93% / 100%		
DL 23 (Subset 2C)	NA	100% / 100%		
PND 30 (Subset 3)	NA	55% / 100%		
PND 60 (Subset 3)	NA	48% / 74%		

表 2.6.7.14.2-1　rHuPH20の皮下投与によるマウス出生前及び出生後の発生に関する試験（抗 rHuPH20抗体の評価）（続）

Test Article: rHuPH20

Dose (mg/kg/day) [hyaluronidase activity (U/kg/day)]	0 (Control)	3 [c] [360600]	6 [c] [721200]	9 [c] [1081800]
F_0 Females: Overall Assessments (Subsets 1, 2A, 2B, 2C and 3) [j]				
Clinical Observations	—	—	—	—
Necropsy Observations	—	—	—	—
Gestation Body Weight	—	—	—	—
No. Pregnant	—	—	—	—
F_0 Females: Natural Delivery Observations (Subsets 2A, 2B, 2C and 3) [j]				
Abnormal Parturition	—	—	—	—
Duration of Gestation	—	—	—	—
Litter Size	—	—	—	—
Pup Viability at Birth	—	—	—	—
Lactation Body Weight	—	—	—	—
F_1 Litters: Overall Assessments (Subsets 2A, 2B, 2C and 3) [j]				
No. Pups/Litter	—	—	—	—
No. Liveborn Pups/Litter	—	—	—	—
No. Surviving Pups/Litter	—	—	—	—
Pup Clinical Signs	—	—	—	—
Pup Body Weights/Litter	—	—	—	—
Pup Necropsy Observations	—	—	—	—

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

a: Mice in subsets 1, 2A, 2B, 2C and 3 were dosed from DG 6 through DG 16, DL 4, DL 13, DL 21 and DL 21, respectively. Plasma samples were then collected two days later to allow for a rHuPH20 washout period in order to avoid assay interference during the anti-rHuPH20 antibody evaluations. An additional subset of mice for rHuPH20 plasma concentration analysis was dosed from DG 6 through DG 18.

b: This satellite study evaluated exposure to circulating rHuPH20 antibodies in pregnant and postpartum lactating mice and their offspring (fetuses and pups) at time points that mimicked the relevant developmental stages in a prior GLP mouse perinatal/postnatal development study (Report No. 1034928). Using the same study design (e.g., species/strain of mouse and dosing regimen), test article lot number and contract research organization as Report No. 1034928, this satellite study measured anti-rHuPH20 antibody titers in maternal animals and offspring (fetuses/pups). Additionally, cross-reactivity of anti-rHuPH20 antibodies to murine PH20 and HYAL5 was performed on all maternal and offspring plasma samples that were positive for anti-rHuPH20 antibodies.

c: All rHuPH20 dosed animals had anti-rHuPH20 antibodies on DG 18 through the end of lactation on DL 23.

d: Plasma rHuPH20 concentrations were measured 2 hours postdose (± 10 min.) on DG 18 from the rHuPH20 plasma concentration subset of mice (dosed from DG 6 through DG 18) and on DL 21 from the mice in Subset 3 (dosed from DG 6 through DL 21). The 2 hour time point was estimated to be the Tmax for subcutaneous dosing

of rHuPH20. Additionally, blood was collected from pooled fetal blood samples (rHuPH20 plasma concentration subset, DG 18) and individual blood samples from 1 pup per sex per group (Subset 3, DL 21). Hyaluronidase activity was detected at low levels in a limited number of maternal mice in the rHuPH20 dose groups on DG18 and in one fetus on DG 18 and one maternal mouse on DL 21 in the 9 mg/kg rHuPH20 group. Hyaluronidase activity was below the assay limit of quantification in the other mice including the pups on DL 21.

e: Two mice in the 6 mg/kg/day dose group and three mice in the 9 mg/kg/day dose group were found dead on or after DG 17. These early deaths were not considered directly related to the test article and were likely related to the mice being unable to tolerate repeated administration of high doses of a human protein. The other three deaths (one in the 6 mg/kg/day dose group and two in the 9 mg/kg/day dose group) were unscheduled euthanizations of mice that had mistimed pregnancies (two mice) or that had presumably delivered and cannibalized its litter (one mouse).

f: Median anti-rHuPH20 antibody titers are reported by subset for all maternal mice dosed with rHuPH20 (3, 6, and 9 mg/kg dose groups). There was no significant correlation (non-parametric Spearman's correlation, p = 0.3313) between the maternal anti-rHuPH20 titer values and rHuPH20 dose group, suggesting that within the range of rHuPH20 doses administered in this study, the antibody levels in the F0 maternal animals were comparable. Thus, the median values were presented.

g: Median anti-rHuPH20 antibody titers are reported by subset for individual litters/mice across all three maternal rHuPH20 dose levels (3, 6, and 9 mg/kg). The maternal animal was dosed and maternal antibody titers were presented as a median (see footnote f). Therefore, rHuPH20 and/or anti-rHuPH20 antibodies in the fetus/pup were maternally transferred to the fetus/pup and the titer values for the litter were also presented as a median.

h: No notable differences in anti-rHuPH20 antibody titers in the pups by sex were observed.

i: A qualitative assessment of the cross-reactivity of anti-rHuPH20 antibodies to the murine homologues of PH20 (SPAM1) and HYAL5 was performed on all maternal and offspring plasma samples that were positive for anti-rHuPH20 antibodies. Incidence for maternal mice and fetuses/pups is reported for all three rHuPH20 dose levels (3, 6, and 9 mg/kg) combined. While the incidence of measured cross-reactivity declined in pup samples between PND 23 and PND 60, there was a corresponding decline in overall anti-rHuPH20 antibody titer over the same time frame. Because cross-reactivity was reported as a discrete variable (positive or negative), it is expected that reported incidence would decline as titers decreased.

j: Limited individual in-life data were collected and reviewed during this study for the purpose of ensuring that the health status of the mice with their litters were comparable to the results of the GLP perinatal/postnatal development study (2.6.7.14.1), which this satellite study supports. The in-life data measured in this satellite study were consistent with the GLP study, in which the NOAEL for rHuPH20 was 9 mg/kg, the highest dose evaluated.

2.6.7.14.3 ウサギにおける抗 rHuPH20抗体の雌受胎能，胚・胎児発生，並びに出生後の機能に及ぼす影響

表 2.6.7.14.3-1 ウサギにおける抗 rHuPH20抗体の雌受胎能，胚・胎児発生，並びに出生後の機能に及ぼす影響

Test Article: rHuPH20

Report Title: Effects of Anti-rHuPH20 Antibodies on Female Fertility and Embryo-Fetal Development with Postnatal Assessments in the New Zealand White Rabbit

Design similar to ICH 4.1.3: Yes
Species/Strain: Rabbit/New Zealand White [Hra:(NZW)SPF]
Initial Age: Approx. 6 months at receipt
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]
Duration of Dosing: 7 doses total on DS 1, 8, 15, 22, 29, 42 and 59 (DG 15)
Day of Mating: DG 0
Day of C-Section: DG 29 (Subgroup A only)
Method of Administration: SC
Vehicle/Formulation: Vehicle/Formulation: 10 mM Histidine, 130 mM NaCl in sterile water for Injection
Location in CTD: 4.2.3.5.3-3
Report No.: 1067461
GLP Compliance: Yes

Special Features: Evaluation of anti-rHuPH20 antibodies, including satellite groups for assessment in fetuses and pups [a]. Postnatal observations of F1 generation were conducted preweaning through adulthood to include sexual maturation, neurobehavioral testing and assessment of fertility and mating outcome.

Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**0.76** [b]
Female Fertility and Embryo-fetal Phase with Postnatal Assessments: Overall Assessments (Subgroups A and B)		
Does:		
Toxicokinetics	NA	NA
No. Assigned to Main Study	44	44
No. Died or Sacrificed Moribund	1 [c]	1 [d]
No. Aborted or with Total Resorption of Litter	1 [e]	0
Clinical Observations	—	—
Dermal Scoring		
Erythema: Grade 1	—	—
Erythema: Grade 2	—	—
Erythema: Grade 3	—	—

表 2.6.7.14.3-1 ウサギにおける抗 rHuPH20抗体の雌受胎能，胚・胎児発生，並びに出生後の機能に及ぼす影響（続）

Test Article: rHuPH20

Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.76 [b]
Female Fertility and Embryo-fetal Phase with Postnatal Assessments: Overall Assessments (Subgroups A and B)(cont.)		
Does (cont.):		
Premating Body Weight (%) [f,g]	3.63 kg	98.9%
Gestation Body Weight (%) [h,i]	4.02 kg	100%
Premating Food Consumption (%) [j]	145.2 g/day	98.2%
Gestation Food Consumption (%) [k]	140.8 g/day	102.9%
Mean No. Days Prior to Mating [l]	NA	NA
No. of Females that Mated - N (%) [m]	48/50 (96%)	49/49 (100%)
Fertility Index - N (%) [m]	45/50 (90%)	43/49 (87.8%)
No. Pregnant / No. Mated - N (%) [m]	45/48 (93.8%)	43/49 (87.8%)
Additional Examinations [n]		
Maternal Anti-rHuPH20 Median Titer Value		
DS 8	NA	1600
DS 15	NA	51200
DS 22	NA	409600
DS 29	NA	3276800
DS 42	NA	3276800
DG 15	NA	3276800
DG 29	NA	3276800
DL 4	NA	819200
DL 29	NA	409600
Cross Reactivity of Plasma IgG to Recombinant Rabbit PH20	—	—
rHuPH20 Neutralizing Activity	—	—
rRbPH20 Neutralizing Activity	—	—
Dermal Scoring		
Erythema: Grade 1-3	—	—
Necropsy Observations	—	—
Premating Body Weight (%) [f,g]	3.63 kg	98.9%
Gestation Body Weight (%) [h,i]	4.02 kg	100%

表 2.6.7.14.3-1　ウサギにおける抗 rHuPH20抗体の雌受胎能，胚・胎児発生，並びに出生後の機能に及ぼす影響（続）

Test Article: rHuPH20

Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.76 [b]
Female Fertility and Embryo-fetal Phase (Subgroup A)		
Does:		
No. Pregnant/No. Assigned to Study – N/N (%)	22/22 (100%)	22/22 (100%)
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0
No. Aborted or with Total Resorption of Litter	0	0
Clinical Observations	—	—
Premating Food Consumption (%) [j]	145.2 g/day	98.2%
Gestation Food Consumption (%) [k]	140.8 g/day	102.9%
Mean No. Corpora Lutea	9.3	9.2
Mean No. Implantations	7.6	7.4
Mean % Preimplantation Loss [o,p]	14.6%	19.8%
Litters (Caesarean-Delivered on DG 29):		
No. Litters Evaluated	22	22
Mean Litter Size	7.2	7.0
Mean No. Total Resorptions	0.4	0.3
No. of Litters with Dead Fetuses	0	0
Mean % Postimplantation Loss [q]	5.7%	3.7%
Mean Live Fetal Body Weight (g)	46.91	47.37
Fetal Sex Ratios (Mean % male fetuses/litter)	41.2%	53.8% [r]
Fetal Anomalies		
Gross External	—	—
Visceral Anomalies	—	—
Skeletal Anomalies	—	—

表 2.6.7.14.3-1　ウサギにおける抗 rHuPH20抗体の雌受胎能，胚・胎児発生，並びに出生後の機能に及ぼす影響（続）

Test Article: rHuPH20

Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.76 [b]
Postnatal Development Phase (Subgroup B)		
F_0 Females:		
No. Pregnant/No. Assigned to Study – N/N (%)	18/22 (81.8%)	15/21 (71.4%)
No. Died or Sacrificed Moribund	1 [c]	1 [d]
No. Aborted or with Total Resorption of Litter	1 [e]	0
Clinical Observations	—	—
Dermal Scoring		
Erythema: Grade 1-3	—	—
Necropsy Observations	—	—
Gestation Body Weight (%) [f,g]	4.02 kg	100%
Lactation Body Weight (%) [s]	3.60 kg	104%
Gestation Food Consumption (%)	140.8 g/day	103%
Lactation Food Consumption (%) [t]	199.4 g/day	106%
Mean No. Duration of Gestation (days)	32.2	32.1
Abnormal Parturition	—	—

表 2.6.7.14.3-1　ウサギにおける抗 rHuPH20抗体の雌受胎能，胚・胎児発生，並びに出生後の機能に及ぼす影響（続）

Test Article: rHuPH20

Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.76 [b]
Postnatal Development Phase (Subgroup B)(cont.)		
F1 Litters (Preweaning):		
No. Litters Evaluated	16	15
Mean No. of Implantations/Litter	7.2	7.1
Mean No. Pups/Litter	7.1	7.1
Mean No. Liveborn Pups/Litter	7.0	7.1
No. of Litters with Stillborn Pups	1	0
Postnatal Survival to Day 4	95.5%	96.2%
Postnatal Survival to Weaning	96.3%	93.1%
No. of Total Litter Losses	0	0
Change in Pup Weight/Litter (PND 4-29)	+468.7 g	+485.8 g
Pup Sex Ratios on PND 4 (% males)	43.2%	52.3%
Pup Clinical Signs	—	—
Developmental Landmark Parameters		
Eye Opening	—	—
Air Righting	—	—
Acoustic Startle	—	—
Hair Growth	—	—
Pupil Constriction	—	—
Additional Examinations [u]		
F1 Generation Anti-rHuPH20 Median Titer Value		
DG 20	NA	204800
DL 4	NA	3276800
DL 29	NA	409600

表 2.6.7.14.3-1 ウサギにおける抗 rHuPH20抗体の雌受胎能，胚・胎児発生，並びに出生後の機能に及ぼす影響（続）

Test Article: rHuPH20

Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.76 [b]
Postnatal Development Phase (Subgroup B)(cont.)		
F_1 Males (Postweaning):		
No. Evaluated	22	22
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0
Clinical Observations	—	—
Necropsy Observations	—	—
Body Weight Change (PND 36-90)	+3.02 kg	+2.82 kg
Food Consumption (PND 36-190)	141.4 g/day	138.5 g/day
Mean Age of Preputial Separation (days)	84 days	76.6 days
Sensory Function	—	—
Motor Activity	—	—
No. of Males that Mated	19	19
No. of Fertile Males	19	15
Additional Examinations [u]		
Organ Weights (Reproductive) [v]	—	—
Sperm Morphology	—	—
Sperm Motility and Concentration		
Number Motile	—	—
Static Count (Nonmotile)	—	—
Sperm Count	—	—
Sperm Concentration	—	—
F1 Generation Anti-rHuPH20 Median Titer Value		
DS 42	NA	76800
DS 62	NA	12800
DS 92	NA	3200
Day of Mating (~ DS 152)	NA	200
DG 18 (female)	NA	Negative
DS 189-195 (male)	NA	Negative

表 2.6.7.14.3-1 ウサギにおける抗 rHuPH20抗体の雌受胎能，胚・胎児発生，並びに出生後の機能に及ぼす影響（続）

Test Article: rHuPH20

Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.76 [b]
Postnatal Development Phase (Subgroup B)(cont.)		
F1 Females (Postweaning) [w]:		
No. Evaluated	22	22
No. Died or Sacrificed Moribund	0	1 [x]
Clinical Observations	—	—
Necropsy Observations	—	—
Body Weight Change (PND 36-155)	+2.92 kg	+2.78 kg
Gestation Body Weight Change	+0.34 kg	+0.37 kg
Food Consumption (PND 36-155)	143.3 g/day	141.4 g/day
Gestation Food Consumption	158.4 g/day	158.7 g/day
Mean Age of Vaginal Patency (days)	37.6 days	37.9 days
Sensory Function	—	—
Motor Activity	—	—
No. of Females Sperm Positive	20	21
No. Pregnant	19	17
Mean No. Corpora Lutea	10.0	10.5
Mean No. Implantations	7.0	9.6** [y]
Mean % Preimplantation Loss	27.2%	7.6%** [y]
No. of Rabbits with any Nonviable Embryos (%)	9 (47.4%)	9 (52.9%)
No. of Rabbits with all Nonviable Embryos (%)	1 (5.3%)	0 (0%)
No. of Rabbits with Viable Embryos (%)	18 (94.7%)	17 (100%)
Additional Examination [u]		
F1 Generation Anti-rHuPH20 Median Titer Value		
DS 42	NA	76800
DS 62	NA	12800
DS 92	NA	3200
Day of Mating (~ DS 152)	NA	200
DG 18 (female)	NA	Negative
DS 189-195 (male)	NA	Negative

表 2.6.7.14.3-1 ウサギにおける抗 rHuPH20抗体の雌受胎能，胚・胎児発生，並びに出生後の機能に及ぼす影響（続）

Test Article: rHuPH20

Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.76 [b]
Postnatal Development Phase (Subgroup B)(cont.)		
F2 Litters:		
Mean No. of Viable Embryos per Litter	6.4	8.6* [y]
Mean No. of Non-viable Embryos per Litter	0.6	1.0
Mean % Postimplantation Loss	14.5%	10.7%

* Statistically significant at $p \leq 0.05$.

** Statistically significant at $p \leq 0.01$.

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

a: The following anti-rHuPH20 antibody evaluations were performed on maternal animals: anti-rHuPH20 antibody titers, cross-reactivity of antibodies to recombinant rabbit PH20 (rRbPH20) and anti-rHuPH20 neutralizing activity. Anti-rHuPH20 antibody titers were also evaluated in fetuses.

b: All rHuPH20 dosed animals had anti-rHuPH20 antibodies prior to mating and through termination.

c: Rabbit found dead on DG 31.

d: Rabbit found dead on DS 9 (during the treatment phase, prior to mating). This mortality was not directly attributed to rHuPH20 treatment. Death was likely related to dehydration and/or hypersensitivity from the administration of a human protein.

e: Rabbit aborted and was euthanized on DG 22.

f: Just prior to mating (DS 42). For controls, group mean is shown. For the treated group, percent difference from control group is shown.

g: Mean maternal body weight was calculated based on all surviving F0 animals in the main study (subgroup A and subgroup B) at DS 42.

h: At end of gestation (DG 29). For controls, group mean is shown. For the treated group, percent difference from control group is shown.

i: Mean maternal body weight was calculated based on all surviving F0 animals in the study (subgroup A and subgroup B) at DG 29.

j: DS 1-42. For controls, group mean is shown. For the treated group, percent difference from control group is shown.

k: DG 0-29. For controls, group mean is shown. For treated groups, percent of control is shown.

l: The buffer control-treated and rHuPH20-treated females were mated to non-treated male breeders on DS 44.

m: The number of animals evaluated for mating and fertility parameters include satellite females that were used to determine anti-rHuPH20 antibody titers in maternal and fetal plasma at DG 20.

n: Anti-rHuPH20 antibody titers were measured in female rabbit plasma samples at weekly intervals from baseline through DS 29, on DS 42, and in maternal plasma on DG 15 and DG 29. A satellite group of 3 additional rabbits per group per interval was included to assess maternal and fetal/pup levels of anti-rHuPH20 antibodies on DG 20 and PND 4. In addition, cross reactivity of plasma IgG to recombinant rabbit PH20 (rRbPH20) was evaluated at the same intervals and in vitro neutralization of recombinant human hyaluronidase activity was evaluated on DS 42, DG 15 and DG 29, while in vitro neutralization of recombinant rabbit hyaluronidase activity was evaluated on DS 42, DG 15, DG 29 and DL4. In the buffer control-treated animals, antibody testing was performed at baseline on DS 1 and again at DG 29.

o: Preimplantation Loss calculated as: [(Number of corpora lutea – Number of implantations) / Number of corpora lutea] x 100.
p: Preimplantation loss between the rHuPH20 group and the control group was not statistically different and values are within the historical control range of the testing facility.
q: Postimplantation Loss calculated as: [(Number of implantations – Number of live embryos) / Number of implantations] x 100.
r: Statistically significant at $p \leq 0.05$. However, the mean % male fetuses (and range per study) for the Historical Control Data of the testing facility is 46.1% (38.2 – 56.7%). The difference in sex ratio between the rHuPH20 treatment group and controls was attributed to normal variation based on the wide range in the historical controls.
s: At end of lactation. For controls, group mean is shown. For the treated group, percent difference from control group is shown.
t: DL 1-10. Maternal food values were not tabulated on DL 10-29, because it was presumed that the pups began to consume maternal food after DL10. For controls, group mean is shown. For the treated group, percent difference from control group is shown.
u: Anti-rHuPH20 antibody titers were measured in F1 generation plasma samples during the preweaning period (PND 4, 29). The persistence of these antibodies through juvenile development (PND 42, 62, 92) and at sexual maturity (Day of Mating, ~PND 152) was also evaluated. F1 generation maternal titers were also measured in mated females at necropsy/Caesarean section during gestation (DG 18), and in F1 generation males at termination (PND 189-195).
v: Organ weights were collected for the following male reproductive organs: testes, epididymides, seminal vesicles with and without fluid, and prostate. Organ weight and ratios (%) of organ weight to terminal body weight were performed. Anti-rHuPH20 antibody exposure did not affect absolute or relative organ weights for the organs collected.
w: F1 female mating and fertility outcomes were evaluated at mid-gestation (DG 18). The Caesarean-section observations included corpora lutea, implantations, viable embryos, and pre- and post-implantation loss.
x: Rabbit was found dead on Postpartum Day 69.
y: Changes in Caesarean-sectioning parameters were not considered related to anti-rHuPH20 antibodies.

2.6.7.15 新生児を用いた試験

該当試験なし。

2.6.7.16 局所刺激性試験

表 2.6.7.16-1 rHuPH20を含むトラスツズマブ皮下投与製剤のウサギ局所刺激性試験

Test Article: Trastuzumab containing rHuPH20

Species/Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation/Concentration)	Doses and Dose Volume	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Location in CTD [Report No.] (GLP Compliance)
New Zealand white rabbit Crl:KBL(NZW)	SC, Physiological saline injected into contra-lateral injection site as control. Trastuzumab 120 mg/mL 20 mM Histidine/ Histidine HCl buffer pH 5.5 210 mM Trehalose 10 mM Methionine 0.04% Polysorbate 20 2000 U/mL rHuPH20 (RO0452317[redacted])	60 mg corresponding to 0.5 mL The animals received 0.5 mL per injection corresponding to a dose of 60 mg trastuzumab and approx. 1000 U rHuPH20 (corresponding to approx. 333 U/kg, approx. 0.011 mg, approx. 0.0037 mg/kg for a 3 kg rabbit).	6 Males 3 animals were terminated 24 h after dosing and 3 animals were terminated 96 h after dosing.	• Well tolerated, no difference to physiological saline controls (based on clinical observations, histopathological examinations of injection sites and local lymph nodes)	4.2.3.6-1 [1030364] (GLP)

For standard abbreviations, see List of Abbreviations

2.6.7.17 その他の毒性試験

2.6.7.17.1 ウサギを用いた rHuPH20の免疫原性試験

表 2.6.7.17.1-1 ウサギを用いた rHuPH20の免疫原性試験

Test Article: rHuPH20

Report Title: Antibody Response Against rHuPH20 in New Zealand White Rabbits Following Three Separate Immunization Procedures

Species/Strain: Rabbit/New Zealand White
Initial Age: Unknown
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]
Duration of Dosing: Group 1 (Day 1, Days 8, 22, 36, 57) , Groups 2 & 3 (Days 1-14, 16-28, 43) , Group 4 (Days 1, 8, 15, 22, 29, 50) [a]
Method of Administration: SC/IM (Group 1); SC (Groups 2, 3, 4) [b]
Vehicle: 10mM Histidine, 130 mM NaCl (pH 6.5) and sterile water for injection, USP
Location in CTD: 4.2.3.7.1-1
Report No.: 1065429
GLP Compliance: No
Special Features: Evaluation of the incidence, time course and magnitude of circulating anti-rHuPH20 antibodies in non-pregnant female NZW rabbits after SC or IM administration of rHuPH20 in support of GLP studies (2.6.7.12.1, 2.6.7.14.3).

Group No. [c]	**Group 1**	**Group 2**	**Group 3**	**Group 4**
No. Evaluated	4	2	5	5
Median Anti-rHuPH20 Titer Values	Study Day (Titer)	Study Day (Titer)	Study Day (Titer)	Study Day (Titer)
	Predose (negative)	Predose (negative)	Predose (negative)	Predose (negative)
	33 (76800)	16 (negative)	16 (102400)	19 (128000)
	43 (307200)	30 (negative)	30 (1638400)	36 (614400)
	57 (307200)	43 (negative)	43 (1638400)	50 (819200)
	71 (3276800)	57 (negative)	57 (1638400)	64 (819200)
	85 (1228800)	71 (negative)	71 (819200)	78 (409600)
	99 (819200)	85 (negative)	85 (409600)	92 (409600)
	113 (614400)	99 (negative)	99 (204800)	106 (204800)
	126 (1228800)	112 (negative)	112 (409600)	119 (204800)

表 2.6.7.17.1-1 ウサギを用いた rHuPH20の免疫原性試験（続）

Test Article: rHuPH20

Group No. [c]	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
No. Evaluated	4	2	5	5
Incidence of Cross-Reactivity to rRbPH20 at Each Time Point (Group 4 only)				
SD 19	NA	NA	NA	100% (5/5)
SD 36	NA	NA	NA	100% (5/5)
SD 50	NA	NA	NA	100% (5/5)
SD 64	NA	NA	NA	100% (5/5)
SD 78	NA	NA	NA	100% (5/5)
SD 92	NA	NA	NA	100% (5/5)
SD 106	NA	NA	NA	100% (5/5)
SD 119	NA	NA	NA	80% (4/5)

For standard abbreviations, see List of Abbreviations.

a: Female NZW rabbits were dosed with rHuPH20 using one of three different dosing regimens: (1) intermittently with adjuvant (Group 1), with a booster injection on DS 57; (2) SC without adjuvant at a dose level of 0.76 mg/kg once daily for 28 days, with a booster injection on DS 43 (Group 3); or (3) SC once weekly without adjuvant for five weeks, with a boost on DS 50 (Group 4). Group 2 animals received once daily SC administration of the rHuPH20 vehicle for 28 days.

b: On Study Day 1, Set 1 (Group 1) animals received SC injections; on subsequent dosing days, these animals received IM injections. Beginning on Study Day 1, Set 2 animals (Groups 2 and 3) received daily subcutaneous injections of test materials for 28 days. Beginning on Study Day 1, Set 3 animals (Group 4) received weekly SC injections of rHuPH20 for five weeks.

c: Group 1 animals received rHuPH20 administered with a Freund's adjuvant immunization protocol, with a booster injection on DS 57. Group 2 animals received once daily SC administration of the rHuPH20 vehicle for 28 days. Group 3 animals received once daily SC administration of 0.76 mg/kg rHuPH20 without adjuvant for 28 days, with a booster injection on DS 43. Group 4 animals received once weekly SC administration of 0.76 mg/kg rHuPH20 without adjuvant for 5 weeks, with a booster injection on DS50.

2.6.7.17.2 rHuPH20皮下投与後の皮膚の硬結に関する評価

表 2.6.7.17.2-1 rHuPH20皮下投与後の皮膚の硬結に関する評価

Test Article: rHuPH20

Species/ Strain	Method of Administration	Test Article	No. of Animals	Noteworthy Findings	Location in CTD [Report No.] (GLP Compliance)
Pig (*Sus scrofa domestica*) : Yucatan Micro	Subcutaneous infusion [Flow rate: 300 mL/hr]	Pre-Infusion Article (Left) : 14 mL of Vehicle Pre-Infusion Article (Right) : 14 mL of rHuPH20 [concentration: 160 U/mL] Infusion Test Article (Left and Right) : 300 mL of Human IgG [concentration: 10%]	3/group Each group sacrificed 1, 4 or 8 days after SC infusion	• rHuPH20 produces less local swelling and significantly reduces the incidence of induration associated with a large subcutaneous delivery of IgG. • rHuPH20 decreases interstitial pressure and maintains local skin pliability, suggesting that less force or pressure is being applied to the structures in the hypodermis during and after infusion. • Histological findings and immunofluorescent staining show that rHuPH20 increases dispersion of fluid at the local infusion site.	4.2.3.7.7-1 [1075830] (Non-GLP)
Pig (*Sus scrofa domestica*) : Yucatan Micro	Subcutaneous infusion [Flow rate: 300 mL/hr]	Pre-Infusion Article (Left) : 14 mL of Vehicle Pre-Infusion Article (Right) : 14 mL of rHuPH20 [concentration: 160 U/mL] Infusion Test Article (Left and Right) : 300 mL of Human IgG [concentration: 10%]	5	• rHuPH20 produces less local swelling and reduces the incidence of induration associated with a large subcutaneous delivery of IgG. • The reduction of induration directly correlated with the ability to maintain blood perfusion at the local infusion site, as measured by laser doppler imaging.	4.2.3.7.7-2 [1075831] (Non-GLP)

2.6.7.17.3 抗 rHuPH20抗体のヒト組織交差反応性試験

表 2.6.7.17.3-1 抗 rHuPH20抗体のヒト組織交差反応性試験

Test Article: Anti-rHuPH20 antibody

Species/Strain	Method of Administration	Test Article	Concentration (µg/mL)	Noteworthy Findings	Location in CTD [Report No.] (GLP Compliance)
Human Tissues	In vitro	Anti-rHuPH20 antibody (Rabbit polyclonal)	1.25	· Anti-rHuPH20 antibody immunoreactivity is limited to germinal epithelium in the central portion of the seminiferous tubules (late stages of spermatogenesis) and the cytoplasm of enteric plexus neurons of the esophagus and colon.	4.2.3.7.7-3 [1064848] (Non-GLP)

2.6.7.17.4 SPAM1/PH20の各動物種における組織発現

表 2.6.7.17.4-1 SPAM1/PH20の各動物種における組織発現

Test Article: NA

Analytical Methods	Species/Tissues Examined	Noteworthy Findings	Location in CTD [Report No.] (GLP Compliance)
RT-qPCR	Enteric neural plexus of human colon	• There is no *SPAM1/PH20* expression detected at the mRNA level in the enteric neural plexus of adult human colon.	4.2.3.7.7-4 [1069704] (Non-GLP)
RT-qPCR	Human adult and fetal tissues	• The results re-affirmed the presence of endogenous *SPAM1* mRNA transcripts in adult human testis and identified additional tissues where low-levels of *SPAM1* mRNA transcripts could be detected. • In contrast to a recent report of murine *Spam1* expression in oligodendrocyte precursor cells and the corpus callosum in adult human brain, the results from this RT-qPCR study provides no evidence for *SPAM1* expression in any human neuronal tissues including the corpus callosum.	4.2.3.7.7-5 [1069712] (Non-GLP)
RT-qPCR	Embryonic, developing testis, developing brain, and adult mouse tissues	• The results suggest that the expression of murine *Spam1* and *Hyal5* occurs predominantly in the testis and begins ~ 2-3 weeks after birth. In addition, both genes are also expressed in the epididymis although at ~ 250-350 fold lower levels as compared to testis. There is also low expression of *Spam1* in the ovary (~2000 fold lower compared to testis). • Contrary to previously published reports, there does not appear to be expression of murine *Spam1* in tissues of the female reproductive tract (i.e., cervix, uterus, and vagina) or the corpus callosum of the brain.	4.2.3.7.7-6 [1069713] (Non-GLP)
RT-PCR	Corpus callosum of murine brain	• When performed with all three primer sets, the predicted PCR amplicon products were observed in RNA from all three testis samples. The three cortex samples, as expected, were negative and no products were observed. • In contrast to the results observed in a previous publication, no amplicon products, which would indicate the presence of *PH20/SPAM1* transcripts, were observed in any of the three corpus callosum samples using any of the primer sets.	4.2.3.7.7-7 [1069714] (Non-GLP)
RT-qPCR	Specific rabbit tissues including testis and enteric neural plexus of the colon	• Rabbit *Spam1* expression was only detected in testis and not in any of the other tissues assessed including enteric neural plexus of adult rabbit colon and corpus callosum.	4.2.3.7.7-8 [1069715] (Non-GLP)

表 2.6.7.17.4-1　SPAM1/PH20の各動物種における組織発現（続）

Test Article: NA

Analytical Methods	Species/Tissues Examined	Noteworthy Findings	Location in CTD [Report No.] (GLP Compliance)
RT-qPCR	Fetal and adult tissues of the New Zealand white rabbit	• In the embryonic tissues, *Spam1* was detected only in the placenta and at low levels. Beginning at gestation day 14, *Spam1* was detected and similar expression levels were detected through gestation day 23. By gestation day 26 expression of *Spam1* was no longer detected in the placenta. • *Spam1* expression was not detected in whole embryo samples from gestation days 11, 14, and 17. • *Spam1* expression in developing juvenile corpus callosum, cortex, epididymis, and testis was also examined. In one, two, three, and four month old corpus callosum and cortex samples no *Spam1* expression was detected. • In the developing testis *Spam1* expression was not detected at one or two months of age but by three months there was low expression. By four months of age the expression was dramatically increased and the level of expression was comparable to those previously observed in adult testis of age greater than five months (4.2.3.7.7-8). • *Spam1* was first detected in the epididymis at four months of age. • Finally, in the thirteen adult tissues screened, *Spam1* expression was detected only in the testis.	4.2.3.7.7-9 [1069716] (Non-GLP)
RNA-seq	Various adult and fetal tissues from human, mouse, and rabbit	• *SPAM1* was not expressed in any human, murine, or rabbit tissues other than tissue of the adult male reproductive tract (i.e., testis). • *SPAM1/PH20* was not expressed in developing mouse or human brain or in the enteric neural plexus (ENP), based on the lack of measureable levels of steady-state mRNA transcripts.	4.2.3.7.7-10 [1069756] (Non-GLP)
In situ hybridization	Human colon ENP and testis	• The proprietary in situ hybridization methodology used in this study showed that human *PH20/SPAM1* mRNA was readily detected in localized domains in two human testis sections. • In contrast, human *PH20/SPAM1* mRNA expression was not observed in any of the six human colon ENP sections.	4.2.3.7.7-11 [1070564] (Non-GLP)