トフェルセン

第 2 部 CTD の概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.6 毒性試験の概要文

バイオジェン・ジャパン株式会社

目次

頁

略語・略号一覧表 3
1 まとめ 5
2 単回投与毒性試験 9
2.1 ラットを用いた単回 IT ボーラス投与毒性試験 9
3 反復投与毒性試験 11
3.1 マウスを用いた 12 週間反復 SC 投与毒性試験 11
3.2 マウスを用いた 26 週間反復 SC 投与毒性及び 8 週間回復性試験 12
3.3 カニクイザルを用いた腰髄 IT ボーラス投与によるヒト SOD1 mRNA を標的とする新規アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）の用量漸増忍容性、PK、及び薬力学スクリーニング試験 15
3.4 カニクイザルを用いた 13 週間反復 IT 投与毒性及び PK 並びに 13 週間回復性試験 16
3.5 カニクイザルを用いた 39 週間反復 IT 投与毒性及び PK 並びに 26 週間回復性試験 18
4 遺伝毒性試験 22
4.1 細菌を用いた復帰突然変異試験 22
4.2 哺乳類培養細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験 22
4.3 マウスを用いた *in vivo* 小核試験 23
5 がん原性試験 24
6 生殖発生毒性試験 25
6.1 マウスを用いた皮下投与による胚・胎児発生に関する用量設定試験 25
6.2 マウスを用いた皮下投与による受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 26
6.3 妊娠 NZW ウサギを用いた皮下投与による胚・胎児発生に関する用量設定試験 28
6.4 妊娠 NZW ウサギを用いた皮下投与による胚・胎児発生に関する試験 29
6.5 マウスを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 31
7 局所刺激性試験 33
8 その他の毒性試験 34
8.1 光毒性 34
8.2 カニクイザルを用いた腰髄 IT ボーラス投与による 13 週間反復投与不純物安全性確認毒性試験 34
9 考察及び結論 37
10 参考文献 40

略語・略号一覧表

略語・略号	略していない表現	
	英語	日本語
2'-MOE	2'-O-(2-methoxyethyl)	2'-O-(2-メトキシエチル)
aCSF	artificial cerebrospinal fluid	人工脳脊髄液
ALS	amyotrophic lateral sclerosis	筋萎縮性側索硬化症
ALT	alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
ASO	antisense oligonucleotide	アンチセンスオリゴヌクレオチド
AST	aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
$AUC_{0\text{-}24h}$	area under the concentration time curve from time 0 to 24 hours	投与後 0 時間から 24 時間までの濃度時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}48h}$	area under the concentration-time curve from 0 to 48 hours	投与後 0 時間から 48 時間までの濃度時間曲線下面積
BID	bis in die, twice a day	1 日 2 回
C_{max}	maximum observed concentration	最高濃度
CNS	central nervous system	中枢神経系
CHL	Chinese hamster lung	チャイニーズハムスター肺
CSF	cerebrospinal fluid	脳脊髄液
ECG	electrocardiogram	心電図
EEG	electroencephalogram	脳波
EFD	embryo-fetal development	胚・胎児発生
FEED	fertility and early embryonic developmental	受胎能及び初期胚発生
FOB	functional observational battery	機能観察総合評価
GD	gestation day	妊娠日数
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
HED	human equivalent dose	ヒト等価用量
h*ERG*	the human *ether-à-go-go-related gene*	ヒト *ether-à-go-go* 関連遺伝子（ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子）
IC_{50}	half-maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
IT	intrathecal	髄腔内
IV	intravenous	静脈内
LD	lactation day	授乳日数
mRNA	messenger ribonucleic acid	メッセンジャーリボ核酸

略語・略号	略していない表現	
	英語	日本語
MRT	mean residence time	平均滞留時間
NZW	New Zealand White	ニュージーランドホワイト
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
PBS	phosphate buffered saline	リン酸緩衝生理食塩液
PD	pharmacodynamic(s)	薬力学
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
PND	postnatal day	出生後日数
PPND	pre- and postnatal developmental	出生前及び出生後の発生
RNase	ribonuclease	リボヌクレアーゼ
SC	subcutaneous	皮下
SD	standard deviation	標準偏差
SOD1	superoxide dismutase 1	スーパーオキサイドジスムターゼ 1
$t_{1/2}$	elimination half-life	消失半減期
TAM	test article mixes	不純物混合被験物質
TEM	transmission electron microscopy	透過型電子顕微鏡
TK	toxicokinetic	トキシコキネティクス
T_{max}	time to reach maximum observed concentration	最高濃度到達時間
UV	ultraviolet	紫外線

1 まとめ

2’-O-(2-メトキシエチル)（2’-MOE）アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）であるトフェルセン（開発コード：BIIB067 又は ISIS 666853）の毒性試験は、野生型及びすべての変異型のスーパーオキサイドジスムターゼ 1（SOD1）の発現低下による筋萎縮性側索硬化症（ALS）の治療での長期髄腔内（IT）投与をサポートする情報を得ることを目的として実施した。供試動物には、CD-1 マウス、Sprague Dawley（SD）ラット、New Zealand White（NZW）ウサギ、及びカニクイザルを選択した。ラット及びサルを用いた毒性試験の投与経路には IT 投与を選択し、マウス及びウサギを用いた毒性試験では最大の全身曝露を得るために皮下（SC）投与を選択した。

トフェルセンの結合領域のヒトの配列との相同性は、カニクイザル以外の動物種では低く、各動物種におけるミスマッチ塩基数は、カニクイザルでは 1 塩基、ウサギ及びブタでは 4 塩基、ラットでは 6 塩基、マウスでは 7 塩基である（表 1）。

表 1 毒性試験動物種におけるトフェルセン結合領域の配列相同性

オリゴ配列：5'-CAGGATACATTTCTACAGCT-3'		
動物種	標的結合領域配列	ミスマッチ塩基数
ヒト	5'-AGCTGTAGAAATGTATCCTG-3'	0
カニクイザル	AGCTGTAGAAATGTATCTTG	1
ウサギ	GGTTGTAGACATGTAACCTG	4
ブタ	AGTTGTAGAAATTTAACTTG	4
ラット	TGCTGTTGAGATGTCCCTTG	6
マウス	GGATGAAGAGAGGCATGCTG	7

反復 IT 投与毒性試験の動物種としてカニクイザルを選択した理由は主に 2 つある。第一に、静脈内（IV）投与又は SC 投与を用いた他の ASO のプログラムから、ASO の組織分布、細胞への取り込み、代謝、及びクラス毒性（炎症誘発作用等）の感受性に関して、サルはヒトに最も類似していることである。第二に、他の標準的な毒性試験動物種と比較して、サルは神経解剖学的にヒトに近いことである。サルでは、予定臨床投与経路である IT 投与で反復投与可能であり、その投与後の生体内分布から、患者への IT 投与に関する最も適切な安全性情報が得られる。さらに、IT 投与可能な第 2 の動物種であるラットでの中枢神経系毒性を評価した試験、マウスで SC 投与による全身毒性を評価した試験、並びにマウス及びウサギを用いた SC 投与による生殖発生毒性を評価した試験を実施した。

トフェルセンの GLP 適用非臨床毒性評価は、ラットを用いた単回 IT 投与毒性試験（機能観察総合評価法を含む）、CD-1 マウスを用いた 12 及び 26 週間反復 SC 投与毒性試験、カニクイザルを用いた 13 及び 39 週間反復 IT 投与毒性試験、並びに *in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験（細菌を用いた復帰突然変異試験、哺乳類培養細胞を用いた染色体異常試験、及びマウス小核試験）を行った（表 2）。

生殖発生毒性試験は、最大の全身曝露を得るためにSC投与を選択し、マウスを用いた試験（受胎能及び初期胚発生試験、並びに出生前及び出生後の発生に関する試験）、及びウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験を実施した。

安全性薬理試験は、ラットを用いた単回投与毒性試験並びにサルを用いた13及び39週間反復投与毒性試験に組み入れ、中枢神経系（CNS）、呼吸系、及び心血管系に対する作用を評価した。すなわち、一般状態観察による呼吸系及び中枢神経系（一般感覚及び運動機能）への影響の可能性の評価、並びにカニクイザルにおける定性的及び定量的心電図（ECG）評価を行った。

がん原性試験は、生命を脅かす疾患に対する治療薬の開発に関するICH M3(R2) ガイドラインの推奨事項に従い、マウスを用いたがん原性試験を実施中である。トフェルセンは、遺伝毒性試験で陰性であり、マウスを用いた26週間反復投与毒性試験及びサルを用いた39週間反復投与毒性試験で前がん病変又は過形成の病理組織学的所見は認められなかった。さらに、SOD1 ノックダウンに関連した内分泌系又は免疫調節への影響を示唆する報告はない。2022 年に発出されたICH S1B(R1)において示されたがん原性評価に関連する基準に基づき、標的の生物学的作用、副次的薬理作用、病理組織学的所見、潜在的なホルモン作用、遺伝毒性作用及び免疫調節作用に関するデータの広範なレビュー、並びに公表文献のレビューを含む総合的な証拠の重み付け評価を行った結果、ヒトにおけるトフェルセンのがん原性リスクは低いことが示唆される。

薬物乱用に関する試験は、トフェルセンが受容体、イオンチャネル、又はトランスポーターと相互作用しないことが示され、依存性又は薬物乱用の可能性は認められなかったため、実施しなかった。トフェルセンの非臨床試験及び臨床試験において、薬物乱用を示唆する変化は認められなかった。さらに本剤の臨床投与経路及び作用機序から、トフェルセンは薬物乱用の可能性がほとんどないと予想される。本剤はIT投与製剤であるため、IV又はSC誤投与による薬物乱用の可能性は非常に低い。

バイオインフォマティクス解析により、トフェルセンの一次配列から潜在的なオフターゲット転写産物を特定した結果、SOD1 mRNA以外に0又は1塩基のミスマッチ、挿入又は欠失を有する遺伝子は見つからなかった。2塩基のミスマッチ、挿入又は欠失を有する27遺伝子が特定された（2.6.2.3.2 項及び3.3 項）。オフターゲット候補遺伝子のうちの7遺伝子は、ヒトCNS組織にはほとんど発現しておらず、データベース検索によっても、疾患あるいは生理学的変化との関連を示す報告はみられなかった。そのため、これらの遺伝子のさらなる *in vitro* 評価は行わなかった。7つのオフターゲット候補遺伝子の1つであるMIR4435-2HGは、発現増加と好酸球増加症患者との関連が報告されている［Kotzin 2016］が、一部の末梢組織で弱い発現が見られたのみであった。残りの20のRNAに対するトフェルセン処理による作用をSH-SY5Y、iCellニューロン及びA431細胞を用いた培養実験で評価し、SOD1 mRNAに対するオンターゲット作用と比較することにより影響を評価した。ヒト細胞におけるSOD1 mRNA阻害と比較して、残りのすべてのオフターゲット候補遺伝子では低下がみられなかったか、トフェルセンに対する感受性は明らかに低かった（IC_{50}値の100倍以上）（2.6.2.3.2 項及び3.3 項）。

製造工程及び原料由来の不純物の安全性を評価するために、カニクイザルを用いた13週間反復IT投与毒性試験を実施した。合計[redacted]種類の不純物を製造し、親化合物（約[redacted]%）と共に[redacted]%～[redacted]%の濃度の不純物を最大[redacted]種類含有する3種類の不純物混合被験物質（TAM）を調製した。

反復投与毒性試験に供試した ASO のロットは、初期の臨床試験でも使用されており、市販後製剤の代表的ロットとする予定である。

ヒトへの IT 投与量に対するカニクイザルへの IT 投与量を比較した安全域は、脳脊髄液（CSF）量の違い（ヒトの CSF 量はサルの約 10 倍）に基づいて算出した。最も感受性の高い動物種であるサルの用量を 10 倍してヒト等価用量（HED）換算すると、サルにおける IT 投与による無毒性量である 12 mg は、ヒトへの 120 mg の IT 投与と等価であると考えられる。したがって、非臨床試験から、1.2 倍の安全域でヒトに 100 mg のトフェルセンを投与することがサポートされる。

毒性試験の結果から、トフェルセンの安全性プロファイルは動物実験において適切に評価されたものと考える。非臨床安全性試験の結果は臨床における安全性プロファイルを裏付けるものであり、トフェルセンの販売承認を支持するものと考える。

表 2　　トフェルセンの毒性試験一覧

試験番号、試験表題	動物種	用量、投与頻度	GLP 適用
単回投与毒性試験			
666853-AS03 試験 Sprague-Dawley ラットを用いた ISIS 666853 の単回 IT ボーラス投与毒性試験	ラット	単回腰髄 IT 投与、 0、0.1、0.3、1、3 mg	適用
反復投与毒性試験			
666853-AS02 試験 CD-1 マウスを用いた ISIS 666853 の 12 週間反復 SC 投与毒性試験	マウス	SC 投与、 0、25、150 mg/kg 2 週間に 1 回（計 7 回投与）	適用
P067-[redacted]-03 試験 CD-1 マウスを用いた BIIB067 の 26 週間反復 SC 投与毒性及び 8 週間回復性試験	マウス	SC 投与、 0、6、30、150 mg/kg 2 週間に 1 回（計 14 回投与）	適用
SOD1-RS01 試験 カニクイザルを用いた腰髄 IT ボーラス投与によるヒト SOD1 mRNA を標的とする新規アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）の用量漸増忍容性、PK、及び薬力学スクリーニング試験	カニクイザル	腰髄 IT 投与、 Part A: Day 1 に 10 mg、Day 8 に 30 mg Part B: Day 1 に 10、30、60 mg、単回投与 Part C: Days 1、14、28、56、84 に 30 mg（計 5 回投与）	非適用
666853-AS01 試験 カニクイザルを用いた ISIS 666853 の 13 週間反復 IT 投与毒性及び PK 並びに 13 週間回復性試験	カニクイザル	腰髄 IT 投与、 0、4、12、35 mg 投与開始 1 ヵ月間は 2 週間に 1 回、その後は月 1 回投与（計 5 回投与）	適用
P067-[redacted]-01 試験 カニクイザルを用いた BIIB067 の 39 週間反復 IT 投与毒性及び PK 並びに 26 週間回復性試験	カニクイザル	腰髄 IT 投与、 0、4、12、35 mg 投与開始 1 ヵ月間は 2 週間に 1 回、その後は月 1 回投与（計 11 回投与）	適用
遺伝毒性試験			
666853-IS01 試験	*In vitro*	最高 5000 µg/plate	適用

試験番号、試験表題	動物種	用量、投与頻度	GLP 適用
細菌を用いた復帰突然変異試験			
666853-IS02 試験 Chinese Hamster Lung (CHL) 細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験	*In vitro*	最高 500 µg/mL	適用
P067-19-02 試験 マウスを用いた BIIB067 の *in vivo* 小核試験	マウス	SC 投与、 0、500、1000、2000 mg/kg/day (250、500、1000 mg/kg/dose BID) 単回（BID）投与	適用
生殖発生毒性試験			
P067-[redacted]-01 試験 妊娠マウスを用いた SC 投与による BIIB067 の胚・胎児発生に関する用量設定試験	マウス	SC 投与、 0、3、10、30 mg/kg GD 6～14 に 2 日間に 1 回	非適用
P067-17-02 試験 マウスを用いた SC 投与による BIIB067 の受胎能及び胚・胎児発生に関する試験	マウス	SC 投与、 0、3、10、30 mg/kg 2 日間に 1 回	適用
P067-[redacted]-01 試験 Crl:CD1(ICR)系マウスを用いた SC 投与による BIIB067 の出生前及び出生後の発生に関する試験	マウス	SC 投与、 0、3、10、30 mg/kg GD 6～22 及び PND 1～21 に 2 日間に 1 回	適用
P067-[redacted]-04 試験 妊娠 New Zealand White ウサギを用いた SC 投与による BIIB067 の胚・胎児発生に関する用量設定試験	ウサギ	SC 投与、 0、3、10、30 mg/kg GD 7～19 に 2 日間に 1 回	非適用
P067-17-05 試験 妊娠 New Zealand White ウサギを用いた SC 投与による BIIB067 の胚・胎児発生に関する試験	ウサギ	SC 投与、 0、3、10、30 mg/kg GD 7～19 に 2 日間に 1 回	適用
その他の毒性試験			
P067-[redacted]-06 試験 カニクイザルを用いた腰髄 IT ボーラス投与による BIIB067 の 13 週間反復投与不純物安全性確認毒性試験	カニクイザル	IT 投与、 TAM1 (10 mg BIIB067 + 不純物) TAM2 (10 mg BIIB067 + 不純物) TAM3 (10 mg BIIB067 + 不純物) 投与開始 1 ヵ月間は 2 週間に 1 回、 その後は月 1 回投与（計 5 回投与）	適用

BIIB067、ISIS 666853：トフェルセン；IT：髄腔内；SC：皮下；BID：1 日 2 回；GD：妊娠日数；PND：出生後日数；TAM：不純物混合被験物質

2 単回投与毒性試験

2.1 ラットを用いた単回 IT ボーラス投与毒性試験

［4.2.3.1-1］666853-AS03

本 GLP 適用試験の目的は、トフェルセンの単回 IT ボーラス投与によるラットにおける急性毒性を検討することであった。1 群雌雄各 10 例の 4 群に分けた CD® [Crl:CD®(SD)] ラットに、トフェルセンを 0.1、0.3、1.0、及び 3.0 mg の用量で、外科的に留置した IT カテーテルを介して単回投与した（表 3）。さらに、雌雄各 10 例のラットの 1 群を対照群として設定し、投薬群と同様に IT カテーテルを介して人工脳脊髄液（aCSF）を単回投与した。被験物質及び対照物質は Day 1 に投与し、動物は Day 15 に剖検した。

表 3 ラットを用いた単回 IT 投与毒性試験の試験デザイン

群	投与物質	用量 (mg)	投与経路	動物数	投与容量 (µL)
1	対照 (aCSF)	0	IT	雄 10 / 雌 10	30
2	トフェルセン	0.1	IT	雄 10 / 雌 10	30
3	トフェルセン	0.3	IT	雄 10 / 雌 10	30
4	トフェルセン	1	IT	雄 10 / 雌 10	30
5	トフェルセン	3	IT	雄 10 / 雌 10	30

aCSF：人工脳脊髄液；IT：髄腔内

生死、一般状態観察（functional observational battery［FOB］を含む）、体重、体重増加量、及び摂餌量、CSF 臨床病理検査、剖検、器官重量測定、及び病理組織学的検査によりトフェルセンの毒性を評価した。組織試料（脳、腰髄、腎臓、及び肝臓）を採取し、被験物質の生体内分布を評価した。

3 mg 群の雄 1 例が投与約 45 分後に死亡した。トフェルセンの予測される作用機序を踏まえると、ASO の生理化学的特性及び投与液濃度に関連していた可能性が最も高い。3 mg 群の生存例では、投与終了から約 25 分以内に一過性の急性触覚過敏が認められた。投与 3 時間後に実施した FOB では、3 mg 群で覚醒、歩行、自発運動、呼吸、及び感覚運動の観察項目スコアの低下が認められた。その後の試験日に同様の変化は認められなかったため、一過性の変化と判断した。

トフェルセンと関連した有害な剖検及び病理組織所見は、試験用量及び濃度では認められなかった。3 mg 群では雌雄各 1 例の脳、雌雄各 1 例の頸髄、雌 1 例の胸髄、及び雄 1 例雌 2 例の腰髄に軽微から軽度の血管周囲性単核細胞浸潤が認められた。3 mg 群の雌 3 例の脳及び雌 1 例の胸髄に空胞化／顆粒状マクロファージが認められた。同様に、Day 15 の CSF 細胞検査で、トフェルセン投与群に単核細胞の増加が認められたが、この変化の用量依存性は確認されなかった。

評価したラット CNS 組織における平均曝露量は、試験用量で用量依存的な増加が認められた。試験用量では、トフェルセンの腰髄中平均濃度は脳皮質中濃度よりも高かった（2.6.4.4.1.2 項、表 12）。これらの結果から、ラットの CNS 組織は単回 IT 投与後にトフェルセンに曝露されたことが示された。

以上、3 mg 投与動物で 1 例の早期死亡、一過性の一般状態変化（触覚過敏）、並びに覚醒、歩行、自発運動、呼吸、及び感覚運動の観察項目スコアの低下が認められたことから、ラットに単回 IT ボーラス投与したトフェルセンの無毒性量は 1 mg と判断された。

3 反復投与毒性試験

3.1 マウスを用いた 12 週間反復 SC 投与毒性試験

［4.2.3.2-1］666853-AS02

本 GLP 適用試験の目的は、トフェルセンの SC 投与による CD-1 マウスにおける全身毒性及びトキシコキネティクス（TK）を検討することであった。1 群雌雄各 10 例の CD-1 マウスに、トフェルセンを 0（対照）、25 及び 150 mg/kg の用量で、2 週間に 1 回、計 12 週間（Day 1、14、28、42、56、70、及び 84）SC 投与し、Day 86 に剖検した（表 4）。

表 4 マウスを用いた 12 週間反復投与毒性試験の試験デザイン

群	投与物質	評価項目	動物数	投与経路	用量 (mg/kg)	投与容量 (mL/kg)
1	対照 (注射用生理食塩液)	毒性	雄 10；雌 10	皮下	0	10
2	トフェルセン	毒性	雄 10；雌 10	皮下	25	10
3	トフェルセン	毒性	雄 10；雌 10	皮下	150	10
4	トフェルセン	TK	雄 27；雌 28[a]	皮下	25	10
5	トフェルセン	TK	雄 28[a]；雌 27	皮下	150	10

TK：トキシコキネティクス
[a] 第 4 群雌の投与後 30 分及び第 5 群雄の投与後 48 時間では十分な量の血漿を採取できなかったため、各群に TK 動物を追加した（試験計画書からの逸脱については Appendix 2 を参照）。

一般状態観察、体重及び摂餌量測定、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、器官重量測定、及び病理組織学的検査を実施した。血漿及び組織試料（脳、腎臓、及び肝臓）を採取し、試料中トフェルセン濃度を測定した。

本試験では死亡は認められなかった。150 mg/kg までの用量でトフェルセンの良好な忍容性が認められた。一般状態、SC 投与部位、体重、摂餌量、眼科学的検査、剖検、及び器官重量には、トフェルセン投与に関連した影響は認められなかった。

血液学的検査では、トフェルセン投与群に白血球数（-20%）、好中球数（-32%）、リンパ球数（-40%）、及び好酸球数（-52%）の低値がみられ、血液生化学的検査ではトリグリセリド（-48%）及び血液尿素窒素（-32%）の低値が認められた。これらの変化とトフェルセン投与との関連性は不明であったが、一般状態及び病理組織学的検査で明らかな変化が認められなかったことから、毒性学的意義はないと考えられた。

トフェルセン投与に関連した病理組織学的変化は主に腎臓、肝臓、脾臓、並びに顎下及び腸間膜リンパ節に認められ、他の ASO で認められているように、これらの組織における好塩基性顆粒（恐らくトフェルセン）の沈着が関連していた［Engelhardt 2016］。マクロファージ浸潤が唾液腺、ハーダー腺、眼窩外涙腺、舌、膵臓、精巣、精巣上体、前立腺、精嚢、卵巣、卵管、子宮頸管、膣、乳腺、皮下疎性結合組織、及び投与部位脂肪に認められた。いずれも有害影響ではないと判断された。

トフェルセンは SC 投与後に速やかに全身循環中に吸収され、両群ともに最高濃度到達時間（T_{max}）は 0.5 h であった。最高濃度（C_{max}）到達後、投与後 24～48 時間に血漿中濃度は急速に

低下したことから、組織中への急速かつ広範な分布が示唆された。単回 SC 投与後の血漿中 C_{max} 及び総曝露量（AUC_{0-24h} 及び AUC_{0-48h}）は、用量依存的かつ用量比例的に増加した。平均滞留時間（MRT_{0-48h}）は 2.44～2.84 h であった。見かけのクリアランス（CL/F_{0-48h}）は 867～748 mL/h/kg であった。血漿中濃度又は TK パラメータに明らかな雌雄差は認められなかった（表 5）。

表 5　　マウス 12 週間 SC 投与毒性試験における単回投与後の血漿中 TK パラメータ（雌雄合算）

群	用量 (mg/kg)	T_{max} (h)	C_{max} (μg/mL)	AUC_{0-24h} (μg*h/mL)	AUC_{0-48h} (μg*h/mL)	CL/F_{0-48h} (mL/h/kg)	MRT_{0-48h} (h)
4	25	0.50	14.9	28.4	28.8	867	2.44
5	150	0.50	83.6	198	201	748	2.84

SC 投与後のトフェルセンは腎臓及び肝臓への分布がみられたが、脳では検出されなかった（定量限界：10.0 μg/g）（2.6.4.4.1.1 項、表 11）。初回投与 48 時間後（Day 3）及び 7 回投与後（Day 86）の腎臓及び肝臓中濃度は、用量比を下回る増加を示した。腎臓及び肝臓中の T_{max} は 10 h であった。C_{max} では用量比を下回る増加が認められた。いずれの用量でも、肝臓及び腎臓中濃度に明らかな雌雄差は認められなかった。

トフェルセンは、未変化体が最も多いオリゴヌクレオチド種であり、Day 86 の腎臓及び肝臓組織中の総オリゴヌクレオチドのそれぞれ 89%及び 81%（総ピーク面積比）を占めた。ヌクレアーゼ代謝を示唆する推定オリゴヌクレオチド代謝物が、Day 86 に採取した 150 mg/kg 群の腎臓及び肝臓試料で確認された。各代謝物の平均濃度は、認められた場合でも総ピーク面積の 3%未満と微量であった。主要代謝物（総ピーク面積の平均 2%を上回る代謝物）は、N-1、N-2、N-8（肝臓のみ）、及び N-10（肝臓のみ）であった。

以上のとおり、CD-1 マウスに 12 週間反復 SC 投与した結果、トフェルセンの 150 mg/kg までの用量で毒性変化は認められず、無毒性量は 150 mg/kg と考えられた。

3.2　　マウスを用いた 26 週間反復 SC 投与毒性及び 8 週間回復性試験

［4.2.3.2-2］P067-[redacted]-03

本 GLP 試験の目的は、トフェルセンの SC 投与による CD-1 マウスにおける全身毒性及び認められた所見の可逆性を検討することであった。1 群雌雄各 15 例の CD-1 マウスに、トフェルセンを 0（溶媒）、6、30、及び 150 mg/kg の用量で、2 週間に 1 回（計 14 回投与）、26 週間反復 SC 投与した。さらに、TK 試験用サテライト群を設定し、トフェルセンの TK プロファイルを検討した。本試験の試験デザインを表 6 に示す。

本試験では、死亡及び一般状態の観察、体重、体重増加量、及び摂餌量の測定、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、器官重量測定、病理組織学的検査、及び TK 試験を実施した。

表 6　　マウスを用いた 26 週間反復投与毒性試験の試験デザイン

群	投与物質	用量 (mg/kg)	投与容量 (mL/kg)	投与液濃度 (mg/mL)	動物数					
					主試験		回復性試験		TK 試験	
					雄	雌	雄	雌	雄	雌
1	対照 (PBS)	0	10	0	15	15	5	5	12	12
2	トフェルセン	6	10	0.6	15	15	5	5	33	33
3	トフェルセン	30	10	3	15	15	5	5	33	33
4	トフェルセン	150	10	15	15	15	5	5	33	33

PBS：リン酸緩衝生理食塩液

本試験ではトフェルセンに関連した死亡はなかった。9 例の早期死亡（主試験動物 2 例、回復性試験動物 1 例、TK 試験動物 6 例）があった。これらの早期死亡はいずれも、剖検及び病理組織学的所見から、偶発的又は事故による死亡と判断された。

すべての用量でトフェルセンの忍容性は良好であり、一般状態、摂餌量、及び眼科学的所見に影響は認められなかった。

対照群と比較して、有害影響ではない体重の低値が 6 及び 150 mg/kg の雌に認められた（-3%～-11%）。休薬期間中も 6 及び 150 mg/kg の雌の体重低値は継続して認められた（-12%～-23%）。しかし、いずれの投薬群動物も休薬期間中に体重は増加、維持された。

トフェルセン投与に関連し、軽微な有害影響ではない 150 mg/kg の血液学的変化及び 6 mg/kg 以上の血液生化学的変化が認められた。血液学的変化は、150 mg/kg の雌雄に赤血球数（対照群の 0.98 倍）、ヘモグロビン（0.94～0.95 倍）及びヘマトクリット（0.94～0.95 倍）の低値、150 mg/kg の雄に平均赤血球容積（0.95 倍）及び平均赤血球ヘモグロビン（0.95 倍）の低値、150 mg/kg の雌雄に血小板数（雄：0.80 倍、雌：0.87 倍）の低値、並びに赤血球分布幅（雄：1.10 倍、雌：1.05 倍）の高値であった。回復性試験終了時には、赤血球分布幅及び血小板数の変化を除き、いずれの変化も認められず、回復性を示した。150 mg/kg の雌雄の赤血球分布幅は、対照群と比較して高いままであり（雄：1.12 倍、雌：1.08 倍）、血小板数（雄：0.85 倍、雌：0.94 倍）は低いままであった。さらに、30 mg/kg 以上の群の雌雄に網状赤血球数の高値（1.10～1.32 倍）が認められた。この変化は投与期間終了時には認められなかった。

血液生化学的変化は、150 mg/kg の雌雄にアラニンアミノトランスフェラーゼラーゼ（ALT、1.84 倍）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST、1.41 倍）の高値、6 mg/kg 以上の雄にリンの用量依存的な高値（1.20～1.25 倍）、30 mg/kg 以上雌及び 150 mg/kg 群の雄にグルコースの低値（それぞれ 0.81～0.89 倍）、150 mg/kg の雌雄に A/G 比の低値（雄：0.90 倍、雌：0.92 倍）であった。回復性試験終了時には、150 mg/kg 群の雄の AST（1.37 倍）を除き、いずれの変化も認められず、回復性を示した。

投与期間終了時には、トフェルセン投与に関連した病理組織学的変化が多数の組織に認められ、最も高頻度の変化はマクロファージの空胞化であり、その発現頻度及び重症度又は変化が認められた組織数は明らかな用量依存的な増加を示した。マクロファージの空胞化は小滴性で、時に微細な好塩基性顆粒を伴っており、すべての投薬群で、投与部皮膚の皮下組織（30 mg/kg 以上の雌のみ）、甲状腺（30 mg/kg 以上の雌のみ）、顎下リンパ節（30 mg/kg 以上の雌のみ）、及び唾液腺

（30 mg/kg 以上の雄のみ）、30 mg/kg 以上の群で大腿脛骨関節の滑膜、脳の脈絡叢、下垂体（雌 150 mg/kg）、膵臓、肺の大気管支周囲（雌のみ）、心臓、脾臓の赤脾髄（脾臓重量増加に関連）、肝臓のクッパー細胞（150 mg/kg の雄）、食道、膀胱、膣、胃、盲腸、結腸、腸間膜リンパ節、精嚢腺、前立腺、精巣、卵巣、及び子宮筋層、150 mg/kg 群では子宮頸部粘膜下組織、胆嚢、気管粘膜下組織（雌のみ）、及び副腎（雄のみ）に認められた。

マクロファージの空胞化は、典型的には間質にみられ、認められたいずれの臓器でも炎症性、変性性又は壊死性の変化を伴わなかった。この変化は、既知の ASO 化合物クラス関連エフェクトであり、オリゴヌクレオチドのリソソーム内蓄積［Braendli-Baiocco 2017］又はオリゴヌクレオチドの蓄積のない細胞活性化及びサイトカイン産生［Frazier 2015］の結果であり、機能障害は報告されていないことから、有害影響ではないと考えられている［Lenz 2018］。投与期間終了時にみられたトフェルセン関連のその他の変化として、30 mg/kg 以上の雌雄の腎尿細管に好塩基性顆粒の出現、30 mg/kg 以上の雄及び 150 mg/kg の雌に腎盂移行上皮細胞の空胞化、すべての用量の雌雄に膀胱移行上皮細胞の空胞化、150 mg/kg の雌雄に胸腺リンパ球成分の減少（胸腺重量低下及び小型化と関連）。150 mg/kg の雌雄の投与部位皮膚のびらん／潰瘍（擦過傷／痂皮に関連）、30 mg/kg の雄及び 150 mg/kg の雌に出血の発現頻度の増加、150 mg/kg 群の雄に混合細胞性炎症が認められた。

トフェルセンに関連したすべての変化は、8 週間の休薬後に部分的又は完全に回復した。マクロファージの空胞化は、30 mg/kg 以上で皮膚、投与部位、肝臓のクッパー細胞、精巣、及び精巣上体、150 mg/kg で唾液腺、膵臓、脳、心臓、脾臓、前立腺、及び腸間膜リンパ節に認められた。30 mg/kg 以上で膀胱移行上皮細胞の空胞化、150 mg/kg の雄 1 例に胸腺リンパ球成分の中等度減少が認められた。腎臓の好塩基性顆粒、投与部位皮膚のびらん／潰瘍、炎症、及び出血はもはや認められなかった。

トフェルセンの血漿中曝露は、すべてのトフェルセンを投与した CD-1 マウスに、Day 1 及び 183 の投与 1、2、4、8、及び 24 時間後の採血時点で認められた。TK パラメータに雌雄差はみられず、T_{max} は 1 h、T_{last} は 24 h であった。トフェルセンの全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24h}$）は、Day 1 及び 183 ともに用量依存的に増加した（表 7）。Day 1 の 30～150 mg/kg 及び Day 183 の 6～30 mg/kg の雄を除き、いずれも用量比を上回る曝露量の増加が認められた。トフェルセンの全身曝露量（C_{max}）は、Day 1 及び 183 におおむね用量比例的な増加を示した。トフェルセンを 6、30、150 mg/kg の用量で 2 週間に 1 回、26 週間反復 SC 投与した結果、トフェルセンの曝露量（$AUC_{0\text{-}24h}$）の軽度の蓄積が認められた。

表 7　　マウス 26 週間 SC 投与毒性試験における血漿中 TK パラメータ（雌雄合算）

パラメータ	検査日	トフェルセン用量		
		6 mg/kg	30 mg/kg	150 mg/kg
平均 C_{max} (µg/mL) ± SD	Day 1	2.65 ± 0.115	15.5 ± 1.98	90.7 ± 11.4
	Day 183	5.19 ± 0.974	20.3 ± 1.30	125 ± 10.9
平均 $AUC_{0\text{-}24h}$ (µg*h/mL) ± SD	Day 1	4.75 ± 0.573	34.9 ± 6.33	198 ± 7.28
	Day 183	9.67 ± 0.355	53.8 ± 2.97	380 ± 24.3

以上のとおり、トフェルセンを 6、30 及び 150 mg/kg の用量で CD-1 マウスに 2 週間に 1 回、合計 14 回、26 週間反復 SC 投与した結果、良好な忍容性が認められた。トフェルセンの投与により、150 mg/kg 群の血液学的パラメータ及び 6 mg/kg 以上の群の血液生化学的パラメータに軽微な変化がみられ、6 mg/kg 以上の群の器官重量、剖検及び病理組織学的検査に ASO 投与で既知の変化が認められた。病理組織学的変化として、マクロファージ空胞化（皮膚、投与部位、甲状腺、下顎及び腸間膜リンパ節、唾液腺、大腿脛骨関節、脳、下垂体腺、膵臓、肺、心臓、脾臓、肝臓のクッパー細胞、胆嚢、膀胱、気管、食道、胃、盲腸、結腸、副腎、精嚢、前立腺、精嚢、精巣、膣、卵巣、子宮頸部、及び子宮）、リンパ球成分減少（胸腺）、好塩基性顆粒（腎臓）、移行上皮空胞化（腎臓及び膀胱）、出血、びらん／潰瘍、及び混合細胞性炎症（投与部位）が認められた。いずれの病理組織学的変化も有害影響ではないと考えられた。本試験条件下で有害影響は認められなかったことから、無毒性量は高用量の 150 mg/kg と判断され、その用量の Day 183 における雌雄合算の平均 C_{max} は 125 µg/mL 及び平均 $AUC_{0\text{-}24h}$ は 380 µg*h/mL であった。

3.3 カニクイザルを用いた腰髄 IT ボーラス投与によるヒト SOD1 mRNA を標的とする新規アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）の用量漸増忍容性、PK、及び薬力学スクリーニング試験

［4.2.3.2-3］SOD1-RS01

本非 GLP 用量漸増試験の目的は、カニクイザルに腰髄 IT 投与した複数の新規 ASO の忍容性、薬物動態（PK）、及び薬力学（PD）特性を検討することであった。トフェルセン以外の ASO は臨床開発候補として選択されなかったため、本項には示さない。1 群雌 3 又は 4 例のカニクイザルに、トフェルセンを 0（溶媒）、10、30、及び 60 mg の用量で、単回又は 2 回（用量漸増）腰髄 IT 投与した。本試験の試験デザインを表 8 に示す。

本試験では、一般状態観察（投与後観察を含む）、詳細な身体及び神経学的検査、体重及び推定摂餌量測定、体温（直腸）測定、血液学的検査、血液生化学的検査、CSF 細胞数測定、剖検、器官重量測定、及び病理組織学的検査を実施した。

表 8　　カニクイザルを用いた用量漸増試験の試験デザイン

群	投与物質	用量 (mg)	投与日	投与容量 [a] (mL)	動物数	剖検日
1	溶媒 (aCSF)	0	Days 1、8	1	雌 4	Day 36
4	トフェルセン	10、30	10 mg (Day 1)、30 mg (Day 8)	1	雌 4	Day 36
6	トフェルセン	10	Day 1	1	雌 3	Day 14
7	トフェルセン	30	Day 1	1	雌 3	Day 14
8	トフェルセン	60	Day 1	1	雌 3	Day 14

a：投与後に 0.25 mL の a CSF をフラッシュ

本試験ではトフェルセンに関連した死亡はなかった。体重、推定摂餌量、体温、身体検査、臨床検査、剖検、及び器官重量に異常は認められなかった。

一般状態変化は、60 mg を投与した 2 例の投与約 15 分後に中等度から重度の筋収縮（筋痙攣）が認められた。これらの筋収縮はジアゼパム投与により消失したが、数日間、運動失調が残存し

た。さらに、30 mg を投与した一部の動物に一過性の反射消失（足及び膝蓋腱反射消失）が認められた。

病理組織学的所見は、用量漸増投与（10→30 mg）した 2/4 例（4 群）の海馬に軽微な限局性空胞化、別の 1 例に軽微な限局性グリオーシスが認められた。10、30、及び 60 mg の単回投与では、投与に関連した神経組織の変化は認められなかった。肝臓及び腎臓に投与に関連した変化は認められなかった。

以上、トフェルセンの 10 及び 30 mg の用量でカニクイザルに腰髄 IT 投与した結果、良好な忍容性が認められた。60 mg を単回投与した雌 2 例に、ジアゼパム投与が必要な有害で重度の一般状態変化及び神経学的変化が認められた。本試験におけるトフェルセンの腰髄 IT 投与による最大耐量は 30 mg と判断された。

3.4 カニクイザルを用いた 13 週間反復 IT 投与毒性及び PK 並びに 13 週間回復性試験

［4.2.3.2-4］666853-AS01

本 GLP 試験の目的は、カニクイザルに 13 週間反復腰髄 IT 投与後のトフェルセンの局所及び全身毒性を明らかにし、その後 13 週間の休薬により所見の回復性又は遅延発現の可能性を評価することであった。また、PK 及び PD を詳細に検討するため、追加 TK 群（5 群）の動物を複数の時点で安楽死させた。IT 投与経路は、予定臨床投与経路であるため選択した。

トフェルセンを 0（aCSF）、4、12、及び 35 mg の用量で、投与開始 1 ヵ月間は 2 週間に 1 回（Day 1、14、及び 28）、その後は月 1 回（Day 56 及び 84）の頻度で腰髄 IT ボーラス投与した。追加 TK 群には、トフェルセンを 12 mg の用量で同様に Day 1、14、及び 28 に投与した（表 9）。

試験の評価項目は、一般状態観察（投与日の投与後観察を含む）、体重及び推定摂餌量測定、身体及び神経学的検査、神経行動評価、眼科学的検査、心血管系評価（ECG 及び血圧）、臨床病理（血液、血液生化学、尿、血液ガス分析、CSF）、TK パラメータ、剖検、器官重量、並びに病理組織学的検査であった。

表 9　カニクイザルを用いた 13 週間反復投与毒性試験の試験デザイン

群	用量 (mg)	動物数		剖検日 (M/F)							
		M	F	Day 8	35	42	70	91	98	155	175
1	対照 (aCSF)	6	6	-	-	-	-	4/4	-	-	2/2
2	4	3	3	-	-	-	-	3/3	-	-	-
3	12	3	3	-	-	-	-	3/3	-	-	-
4	35	7	7	-	-	-	-	5/5	-	-	2/2
5	12	8	8	1/1	1/1	2/1	1/2	-	2/1	1/2	-

トフェルセン投与に起因する死亡、体重及び推定摂餌量変化は認められない全身毒性プロファイルが明らかにされた。神経行動評価（異常発声、覚醒、常同行動、攻撃性、姿勢、バランス／運動協調性、自発運動、振戦、痙攣／筋攣縮／単収縮、音刺激反応、新規視覚刺激、筋緊張、膝

蓋腱反射、及び足の把握反射)、CSF 細胞数、尿検査、血液ガス分析、眼科学的検査、心血管系評価 (ECG、血圧)、器官重量、及び剖検には、トフェルセン投与に関連した異常は認められなかった。

トフェルセン関連と考えられる変化として、35 mg 群の Day 28 の雌 1 例（動物番号 19351）及び Day 28、56、及び 84 の別の雌 1 例 (動物番号 19355) に一過性の活動性低下が認められた。35 mg 群の雌 3 例では、Day 86 に AST の高値がみられた。また、CSF 中総タンパク質及びアルブミンの高値が 12 mg 群の雄 2 例、雌 2 例、35 mg 群の雄全例、雌 2 例に認められた。

トフェルセンに関連した病理組織学的変化は、脳、腰髄（投与部位)、及びリンパ節に認められた。細胞質の空胞化は、すべての用量で、海馬の一部の神経細胞及びそれより軽度で近傍の大脳皮質の神経細胞に認められた。神経細胞の空胞化は、細胞の変性／壊死 (Fluoro-jade 染色で確認)、グリオーシス、又はニッスル小体消失を示す形態変化を伴わず、13 週間の休薬期間内に完全に回復した。さらに、トフェルセンの IT 投与により、投与部腰髄の髄膜に炎症性単核細胞浸潤が発現し、これはギャップマー型 ASO による局所炎症誘発作用によると考えられた。低頻度ではあるが 13 週間休薬期間終了後にも炎症性細胞浸潤の残存物が認められた。組織球の空胞化が脳血管周囲の Virchow-Robin 腔、及びリンパ節洞に認められた。この変化については 13 週間の休薬期間以内に完全に回復しなかった。回復性試験終了後に、頸髄、胸髄、及び腰髄の神経細胞の空胞化が 1 例の回復性試験動物で、主に前角神経細胞に認められた。13 週間の投与期間終了時には、いずれの個体でも同様の変化は認められなかったことから、トフェルセンとの関連性は明らかではなかった。

概して、血漿、CSF、及び組織中のオリゴヌクレオチド濃度解析の結果、トフェルセンの IT 投与によるカニクイザルにおける用量依存的な曝露が確認された。トフェルセンの単回又は反復投与により、すべての投薬群及び検査日において、血漿中 T_{max} の中央値は 1.5～4.0 h であった（表 10)。CSF 中濃度は投与後 7 日の時点で用量比を下回って増加し、全般に、血漿中濃度に比較して 7.2～10 倍の高値を示した。血漿からの急速な消失は、腎皮質及び肝臓組織への広範な取り込みと一致しており（Day 28 及び 84)、トフェルセン濃度は腎皮質で最も高く、次いで肝臓で高かった。

表 10　　サル 13 週間 IT 投与毒性試験における血漿中 TK パラメータ（雌雄合算）

群	用量 (mg)	投与日	動物数	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	$AUC_{0\text{-}48h}$ (ng*h/mL)	CL/F (mL/h)	$MRT_{0\text{-}48h}$ (h)
2	4	1	6	2760 ± 1450	1.5 (1–2)	8500 ± 3020	518 ± 165	4.12 ± 0.791
		84	6	1010 ± 492	2 (1–4)	6140 ± 2110	704 ± 190	6.29 ± 1.33
3	12	1	6	10800 ± 6070	2 (1–4)	46200 ± 13800	281 ± 86.8	4.42 ± 1.32
		84	6	6860 ± 3270	4 (2–4)	36000 ± 8630	348 ± 71.5	5.51 ± 1.10
4	35	1	14	35100 ± 11200	2 (1–4)	209000 ± 36300	172 ± 27.2	5.37 ± 0.916
		84	14	26400 ± 15700	4 (1–8)	175000 ± 42100	211 ± 47.8	6.59 ± 1.86
5	12	1	16	9660 ± 4360	2 (1–4)	48900 ± 14900	269 ± 86.5	4.87 ± 1.07
		28	14	8480 ± 6570	4 (1–4)	40100 ± 9310	325 ± 125	5.37 ± 1.63

値は平均値 ± SD。ただし、T_{max} は中央値（最小値–最大値)。CL/F は、[用量 (mg)/$AUC_{0\text{-}48h}$] より算出。

CNS 組織中の曝露量は、全般に、腰髄（IT ボーラス投与部位と一致）で最大であり、脳組織の曝露量はそれよりやや低かった。血漿、肝臓、及び腎臓の消失半減期（$t_{1/2}$）は同程度であり、CSF 及び CNS 組織ではより長い $t_{1/2}$ 値を示した（2.6.4.3.5.1 項、表 6）。例えば、CNS 組織におけるトフェルセンの推定 $t_{1/2}$ は 30.8～39.9 days であり、腎臓皮質及び肝臓における推定 $t_{1/2}$ 値は、5 群（12 mg）でそれぞれ 22.5 及び 19.8 days、4 群（35 mg）でそれぞれ 18.4 及び 15.3 days であった。CSF 及び血漿中でも同様の値が認められた。血漿中及び組織中のトフェルセン濃度の評価の結果、全般に、TK 及び生体内分布に雌雄差は認められなかった。

小脳、皮質、橋及び海馬における平均薬物濃度は、用量間（4～35 mg）で、それぞれ 9.1、11、5.4、及び 8.3 倍に増加し、用量比（8.8 倍）を上回る増加を示した。頸髄、腰髄、及び胸髄中の平均濃度は、それぞれ 6.5 倍、4.9 倍、4.6 倍の増加を示した（2.6.4.4.1.3 項、図 16 及び 17）。

予想されたとおり、トフェルセンの 13 週間反復投与により、評価した CNS 組織（皮質、小脳、海馬、橋、及び脊髄）において、SOD1 mRNA の用量依存的な低下が認められた。解析した脳領域のほとんどで SOD1 mRNA の 25%～75%の低下がみられ、前頭／運動皮質及び海馬領域で SOD1 mRNA の最大の低下がみられた。本試験における 4～35 mg の用量範囲では、腰髄で対照群.18, 1871 に比較して 50%～85%の低下が認められた。

トフェルセンを投与した動物の CSF 分析（ヘモグロビン混入補正後；評価可能試料 N = 9）では、4～35 mg 群の主試験剖検（Day 91）時に SOD1 タンパク質の 21%～46%の低下が認められた。回復性試験終了時には 35 mg 群の CSF 中 SOD1 タンパク質の 37%の低下が認められた。一方、トフェルセンを投与しなかった動物では、試験中（Day 175）に CSF 中 SOD1 タンパク質のわずかな増加（2.4%）が認められた。

神経細胞の変性／壊死が認められなかったことから、細胞質の空胞化は有害影響ではないと判断した。脳及びリンパ節における組織球の空胞化、並びに注射部位における炎症性単核細胞浸潤も有害影響ではないと判断した。したがって、本試験条件下で、カニクイザルにトフェルセンを 13 週間反復 IT 投与したときの忍容性は、最高用量（35 mg）まで良好であった。したがって、本試験の無毒性量は 35 mg と考えられた。

3.5 カニクイザルを用いた 39 週間反復 IT 投与毒性及び PK 並びに 26 週間回復性試験

［4.2.3.2-5］P067-[redacted]-01

本 GLP 試験の目的は、トフェルセンの投与により発現する局所及び全身毒性、並びに PK を評価することであった。3 用量のトフェルセンを、初期は月 2 回、その後は月 1 回の頻度で、カニクイザルに 9 ヵ月間反復腰髄 IT ボーラス投与して評価した（表 11）。

表 11　　カニクイザルを用いた 39 週間反復投与毒性試験の試験デザイン

群		投与 (IT ボーラス)			動物数		剖検		
		用量 (mg)	容量 (mL)	投与日	雄	雌	試験 26 週 中間 (D176)	試験 39 週 主試験 (D267)	試験 65 週 回復性試験 (D456)
1	対照 (aCSF)	0	1	1、15、29、57、85、113、141、169、197、225、253	4	4	NA	雄 4 雌 4	NA
2	低用量	4	1	1、15、29、57、85、113、141、169、197、225、253	4	4	NA	雄 4 雌 4	NA
3	中用量	12	1	1、15、29、57、85、113、141、169、197、225、253	4	4	NA	雄 4 雌 4	NA
4	高用量	35	1	1、15、29、57、85、113、141、169[a]、197、225、253	10	10	雄 4 雌 4	雄 4 雌 4	雄 2 雌 2

a：中間剖検の最終投与日；NA：該当なし

毒性評価は、一般状態観察、身体及び神経学的検査、体重及び摂餌量測定、眼科学的検査、神経行動評価、心血管系評価（ECG 及び血圧）、脳波（EEG）検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検、器官重量測定、及び病理組織学的検査に基づいて行った。さらに、試験期間中に TK 及びバイオマーカー分析用の血液及び CSF 試料を採取した。

本試験では、被験物質に関連した死亡は認められなかった。

体重、摂餌量、糞便の性状、ECG、血圧、神経行動評価、眼科学的検査にトフェルセン投与の影響は認められなかった。中間、主試験及び回復性試験剖検における器官重量及び剖検所見にトフェルセン投与に関連した異常は認められなかった。

35 mg を投与した雌 1 例の一般状態に有害影響が認められた。この雌では、2 回目投与後（Day 15）に一過性の筋痙攣（複数日の投与直後に発現）、麻酔からの覚醒遅延、及び間欠性振戦（投与期間の最後の数ヵ月から剖検まで）を特徴とする神経症状が認められた。ジアゼパムによる治療が複数回の投与時に必要となり、概して治療により症状が緩和した。この動物の EEG 検査では、投与後シグナルの変化（高周波帯域の変化を伴う）がみられたが、EEG 記録中の筋痙攣は発作（seizure）ではなく、覚醒に関連していた可能性があることが確認された。麻酔との相互作用の可能性があった。これらの神経症状に関連した臨床病理及び病理学的所見は認められなかった。

上記の 1 例の一過性の神経所見のほか、35 mg を投与した 4 例では、投与 4 時間後に一過性の膝蓋腱反射又は足の把握反射（片側性又は両側性）の低下が散見された。いずれも投与 8 時間後までに自然に回復し、有害影響ではないと考えられた。

4 mg 以上の動物では投与期間中、血液学的検査、血液凝固系検査、尿検査にトフェルセン関連の変化は認められなかった。血漿中補体 Bb 濃度の高値とトフェルセン投与との関連性は明らかではなかった。

トフェルセンに関連した臨床病理変化として、4 mg 以上の雄及び 12 mg 以上の雌で CSF 中のミクロアルブミン及び総タンパク質濃度の高値が Day 85 以降に認められた。これらの変化に関連

して、すべての投薬群の個体の 1 時点以上で白血球数又は赤血球数の高値が認められた。病理組織学的検査では、髄膜に単核細胞浸潤が認められた。同様の変化は対照群ではみられなかったため、トフェルセンに関連するが有害影響ではないと考えられた。

中間及び主試験剖検で、トフェルセン投与に関連した病理組織変化が脳、脊髄、脊髄神経根、及びリンパ節に認められた。

試験 26 週の中間剖検では、35 mg を投与した動物の脳及び脊髄に、神経細胞の大滴性及び小滴性空胞化、並びに単核細胞浸潤、脳及びリンパ節に空胞化マクロファージが認められた。

試験 39 週の主試験剖検では、4 mg 以上の動物の海馬神経細胞細胞質に大滴性空胞化が、12 mg 以上の動物の脳及び脊髄に用量依存的な小滴性空胞化が認められた。これらの神経細胞空胞化の出現は、細胞変性を示す形態変化と関連しなかった。

トフェルセンに関連した単核細胞浸潤は、しばしば血管周囲性細胞浸潤を伴っており、4 mg 以上を投与した動物及び対照動物の脳、脊髄、及び脊髄神経根に認められた。

4 mg 以上の動物の脳、12 mg 以上の動物の脊髄及びリンパ節、並びに 35 mg の動物の脊髄神経根で、トフェルセンに関連した空胞化マクロファージが認められた。

35 mg を投与した動物の脳及び脊髄神経細胞の小滴性空胞化、Virchow-Robin 腔及び髄膜の空胞化マクロファージは、試験 26 週の中間剖検から試験 39 週の主試験剖検までに、発現頻度及び重症度が増加した。

26 週間の回復性試験剖検では、トフェルセンの 35 mg 群における脳神経細胞の大滴性空胞化、脳、脊髄、及びリンパ節の空胞化マクロファージ、並びに脊髄の血管周囲性細胞浸潤はいずれも回復性が認められた。脳及び脊髄の神経細胞の小滴性空胞化、並びに単核細胞浸潤に回復性は認められなかった。

神経細胞又はリンパ細胞の変性はみられず、一般状態及び神経学的異常が認められなかったことから、トフェルセン投与に関連した病理組織変化はいずれも有害影響ではないと判断した。

35 mg 群の CNS 組織試料の透過型電子顕微鏡（TEM）による超微細構造解析では、中間剖検で海馬の神経細胞における単一で大きな細胞質内空胞が、中間剖検及び回復性試験剖検で海馬及び腰髄の神経細胞により小さな空胞（myelinosome と呼ばれる）が認められた。いずれの空胞も、エンドソーム／リソソーム由来を示唆する単層境界膜に覆われ、様々な量の積層状又は網状の膜構造、及び脂質又はリポフスチンを伴う又は伴わないトフェルセンの蓄積を示す可能性のある顆粒状物質を含んでいた。したがって、これらの空胞（大滴性又は小滴性）の由来は類似している可能性が考えられ、トフェルセンに関連したエンドソーム／リソソーム系内の変化である可能性がある。回復性試験剖検時の TEM 検査では、中間剖検でみられた海馬の神経細胞における大滴性空胞は認められなかった。回復性試験動物の海馬及び腰髄の神経細胞の小滴性空胞は、中間剖検に比べしばしば大きく、積層又は網状膜物質が増加し、より密な外観を呈しており、エンドソーム／リソソーム系内における脂質を伴う又は伴わないトフェルセンの持続的な蓄積又はプロセシングを示している可能性がある。

トフェルセンの単回又は反復投与では、すべての投薬群及び検査日で、血漿中 T_{max} の中央値は

2.0～4.0 h の間にあった（表 12）。CSF 中濃度は用量比を下回る増加を示し、分布後平均 CSF 濃度と血漿中濃度（投与期間中の Day 267）を比較すると、分布後 CSF 中濃度は全般に、血漿中濃度より高かった。Day 267 の 4、12、及び 35 mg 群の平均分布後 CSF 中濃度：血漿中濃度比は、それぞれ 1.45、0.599、及び 2.40 であった。

表 12　　サル 39 週間 IT 投与毒性試験における血漿中 TK パラメータ（雌雄合算）

群	用量 (mg)	検査日	動物数	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng*h/mL)	$CL/F_{0\text{-}24h}$ (mL/h)	$MRT_{0\text{-}24h}$ (h)
2	4	1	8	1250 ± 327	2.0 (1.0–4.0)	6260 ± 1160	658 ± 122	5.21 ± 0.649
		253	8	995 ± 276	2.0 (1.0–4.0)	7730 ± 3390	652 ± 388	7.7 ± 1.58
3	12	1	8	11600 ± 4240	2.0 (2.0–4.0)	45100 ± 13900	314 ± 187	4.07 ± 0.702
		253	7	4840 ± 2370	4.0 (2.0–10)	30000 ± 11100	472 ± 241	6.77 ± 2.41
4	35	1	20	29100 ± 10600	2.0 (2.0–4.0)	159000 ± 30300	229 ± 53.6	5.28 ± 1.55
		253	8	36800 ± 19900	3.0 (1.0–4.0)	179000 ± 67700	224 ± 88.6	5.51 ± 1.21

値は平均値 ± SD。ただし、T_{max} は中央値（最小値–最大値）。$CL/F_{0\text{-}24h}$ は、[Dose (mg)/$AUC_{0\text{-}24h}$]より算出。

CSF からの急速な初期の消失は、トフェルセンの CNS 組織における広範な取り込みと血漿への移行に相当しており、その後、腎皮質と肝臓組織に取り込まれ、腎皮質でトフェルセンの最高濃度が認められた。中枢神経系では、概して脊髄で最大曝露が認められた。トフェルセンの血漿中及び組織中濃度評価の結果、TK 及び生体内分布に明らかな雌雄差は認められなかった（2.6.4.3.6.2 項及び 4.1.4 項）。

トフェルセン投与動物の CNS 組織及び CSF 中の SOD1 mRNA が低下したことから、トフェルセンはカニクイザルにおいて用量依存的な薬理作用を示すことが確認された。同様に、採取した CNS の様々な部位において、SOD1 タンパク質は用量依存的に低下した。

以上、本試験条件下では、4 及び 12 mg の用量でトフェルセンを 39 週間反復投与したときの忍容性は良好であった。35 mg のトフェルセンを投与した動物に、トフェルセンに関連した神経学的所見及び CSF における炎症が認められた。35 mg のトフェルセンを投与した 1 例の神経学的所見は有害影響であった。したがって、9 ヵ月間反復 IT 投与における無毒性量は 12 mg であった。

4 遺伝毒性試験

4.1 細菌を用いた復帰突然変異試験

［4.2.3.3.1-1］666853-IS01

本 GLP 適用試験の目的は、ヒスチジン要求性ネズミチフス菌株（TA98、TA100、TA1535、及び TA1537）及びトリプトファン要求性大腸菌株（WP2*uvrA*）を用いた復帰突然変異試験により、代謝活性化系存在下及び非存在下でトフェルセンの遺伝子突然変異誘発性を評価することであった。

被験物質は本試験の濃度範囲で容易に水に溶解するため、溶媒に蒸留水を選択した。

OECD TG No. 471 及び ICH S2 (R1) ガイドラインに従い、本試験の最高濃度は 5000 µg/plate とした。本試験は 15、50、150、500、1500、及び 5000 µg/plate（1 用量につき 4 plate）の濃度で、代謝活性化系（10% S9）存在下及び非存在下で実施した。

本試験の結果、代謝活性化系の有無にかかわらず、いずれの菌株においても同時溶媒対照と比較して、復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。溶媒対照群のコロニー数は背景データの許容範囲内であり、陽性対照群では溶媒対照群と比較して復帰突然変異コロニー数が有意に増加したことから、本試験の妥当性が示された。

以上、本試験条件下では、トフェルセンは、ネズミチフス菌 4 菌株及び大腸菌 1 菌株を用いた復帰突然変異原性試験の 5000 µg/plate までの用量で陰性であると結論された。

4.2 哺乳類培養細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験

［4.2.3.3.1-2］666853-IS02

本 GLP 適用試験の目的は、外因性代謝活性化系存在下及び非存在下で、チャイニーズハムスター肺（CHL）細胞におけるトフェルセンの構造的及び数的染色体異常誘発能を評価することであった。トフェルセンは試験濃度で容易に水に溶解するため、溶媒に蒸留水を使用した。陽性対照物質には、シクロホスファミド一水和物及びメタンスルホン酸エチルを使用した。

ICH S2 (R1) ガイドラインに従い、本試験の最高濃度は 500 µg/mL とした。試験濃度は、外因性 S9 代謝活性化系存在下及び非存在下ともに、62.5～500 µg/mL とした。試験濃度範囲では、被験物質処理培養液中に沈殿は見られなかった。被験物質は 500 µg/mL までの濃度で、pH 及び浸透圧に影響しなかった。

500 µg/mL までの濃度でトフェルセンを代謝活性化系存在下で 6 時間処理後、並びに代謝活性化系非存在下で 6 及び 22 時間処理後、細胞毒性は認められなかった。代謝活性化系の有無にかかわらず、いずれの濃度のトフェルセン処理群でも、溶媒対照群と比較して構造的又は数的異常を伴う分裂中期細胞数の有意な増加は認められなかった。陽性対照群では、異常な分裂中期細胞数が有意に増加したことから、本試験結果の妥当性が示された。

本試験条件下では、トフェルセンは 500 µg/mL までの濃度で染色体異常を誘発しなかった。

4.3 マウスを用いた *in vivo* 小核試験

［4.2.3.3.2-1］P067-19-02

本 GLP 適用試験の目的は、マウス骨髄多染性赤血球における小核を検出することにより、トフェルセンの *in vivo* での染色体異常誘発能及び分裂装置損傷障害誘発能を評価することであった。溶媒にはリン酸緩衝生理食塩液（PBS）を使用した。トフェルセン及び溶媒対照物質調製液を 16 mL/kg BID の投与容量で 1 日 2 回、SC 投与した。

ICH S2 (R1) ガイドラインの推奨限界用量に従い、この本試験の最高用量は 2000 mg/kg/day とした。この本試験の用量は、0（溶媒）、500、1000、及び 2000 mg/kg/day（それぞれ 0、250、500 及び 1000 mg/kg/dose）を雄マウスに投与した。

本試験の結果、いずれの試料採取時点（24 及び 48 時間）でも、溶媒対照群と比較して、トフェルセン投与動物に小核発現頻度の有意な増加は認められなかった。陽性対照及び溶媒対照群値は、いずれも予想範囲内であり、陽性対照群では、溶媒対照群と比較して小核を有する細胞数の有意な増加が認められ、試験の正当性を示す基準をすべて満たしていた。

本試験条件下における 2000 mg/kg/day までの用量で SC 投与した本小核試験の条件下において、トフェルセンは陰性であると結論された。

5 がん原性試験

トフェルセンのがん原性の評価はマウスを用いて実施中である。

文献調査により、CuZn スーパーオキサイドジスムターゼ（CuZn SOD；SOD1）欠損マウスでは、発生及び成熟初期に明らかな異常は示さないが、生存期間が短縮し、肝臓の腫瘍性変化の発現頻度が増加することが判明している［Elchuri 2005］。SOD1 null マウスでは CuZn SOD 欠損が遍在しているが、自然発生腫瘍は肝臓のみで認められたことから、腫瘍性変化の選択性は肝組織の特殊な環境と特性に関連している可能性が示唆される［Elchuri 2005］。しかしながら、ヒト臨床では SOD1 タンパク質の完全なノックダウンは予測されない。したがって、ヒト臨床における SOD1 タンパク質発現の低下では、SOD1 null マウスで認められたような肝臓内の腫瘍性変化は生じないと予想される。これまでに実施したマウスの 6 ヵ月間反復投与毒性試験及びサルの 9 ヵ月間反復投与毒性試験では、検査を実施したいずれの組織にも過形成、前がん病変、及び腫瘍性病変は認められなかった。

6 生殖発生毒性試験

トフェルセンの生殖発生毒性試験として、CD-1 マウスを用いた受胎能及び初期胚発生試験（FEED 試験）並びに胚・胎児発生試験（EFD 試験）、CD-1 マウス及び NZW ウサギを用いた EFD 試験、CD-1 マウスを用いた出生前及び出生後発生試験（PPND 試験）を実施した。投与経路は、親動物組織（特に生殖器官）及び胎児へのトフェルセンの曝露を最大とするために SC 投与とした。

6.1 マウスを用いた皮下投与による胚・胎児発生に関する用量設定試験

［4.2.3.5.2-1］P067-[redacted]-01

本 GLP 非適用試験の目的は、次に実施するマウス EFD 試験の用量を設定するための情報を得ること、並びにトフェルセンの妊娠及び胚・胎児発生に及ぼす影響を予備的に評価することであった。本試験は、ICH S5(R2)ガイドラインにおけるステージ C～D を評価する試験デザインとした。さらに、トフェルセンの TK 特性も評価した。

推定妊娠雌 Crl:CD1(ICR)マウス合計 90 例を主試験では各群 8 例、TK 試験では第 1 群 4 例、第 2～4 群の各群 18 例の 4 用量群（第 1～4 群）に無作為割付けした。0、3、10、及び 30 mg/kg の用量でトフェルセン又は対照物質の投与液を推定妊娠 6～14 日（GD 6、8、10、12、及び 14）に 2 日に 1 回 SC 投与した（表 13）。

表 13 マウスを用いた EFD 用量設定試験の試験デザイン

群	投与物質	用量 (mg/kg)	投与濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	動物数	
					主試験 [a]	TK 試験 [b]
1	溶媒 (PBS)	0	0	2	8	4
2	トフェルセン	3	1.5	2	8	18
3	トフェルセン	10	5	2	8	18
4	トフェルセン	30	15	2	8	18

a：GD 18 に母動物を剖検
b：TK 評価のみに TK 試験動物を使用

本試験で評価したパラメータは、母動物の生存率、一般状態、体重、体重増加量、及び摂餌量、卵巣及び子宮検査、剖検、胎児体重・性別・外表評価であった。さらに、TK 解析のため、GD 6 及び GD 14 に母動物から採血した。

母動物全例が GD 18 の計画剖検まで生存した。トフェルセンに関連した一般状態の変化は認められず、母動物の平均体重、体重増加量、妊娠子宮重量、母動物の補正体重及び補正体重増加量、並びに摂餌量は全群間で同程度であった。

いずれの用量でもトフェルセンに関連した剖検所見は認められなかった。いずれの用量でも胚・胎児生存率、性比、胎児体重を含むその他の卵巣又は子宮パラメータにトフェルセンに関連した影響は認められなかった。また、トフェルセンに関連した胎児外表の奇形又は変異は認められなかった。

TK 解析では、濃度－時間プロファイル及び TK パラメータは、3～10 mg/kg の用量間ではほぼ用量比例的に増加し、10～30 mg/kg の用量間では用量比を大幅に上回って増加した（表 14）。GD 6 から GD 14 までの蓄積率は、$AUC_{0\text{-}24h}$ で 30%～100%、C_{max} で 30%～70%であり、GD 6 及び GD 14 ともに T_{max} は 1 h であった。

表 14　　マウス EFD 用量設定試験における TK パラメータの中央値

用量 (mg/kg)	測定日	T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng*h/mL)
3	GD 6	1	1216	1736
	GD 14	1	1623	2268
10	GD 6	1	3091	4597
	GD 14	1	5368	10396
30	GD 6	1	17488	32356
	GD 14	1	23140	43376

以上、妊娠マウスにトフェルセンを 0、3、10、及び 30 mg/kg の用量で GD 6～14 に、2 日に 1 回 SC 投与した。いずれの用量でも母動物の体重、体重増加量及び摂餌量、胚・胎児生存率及び胎児体重への影響はみられず、胎児の外表奇形及び変異も認められなかった。

6.2　　マウスを用いた皮下投与による受胎能及び着床までの初期胚発生並びに胚・胎児の発生に関する試験

［4.2.3.5.1-1］P067-17-02

本 GLP 適用試験の目的は、雌雄 Crl:CD1(ICR)マウスの交配前から交尾、着床、ならびに胚・胎児の発生に至るまでのトフェルセン投与に起因する毒性及び障害を評価することであった。本試験は、ICH S5(R2) ガイドラインにおけるステージ A～B を評価する試験デザインである性周期、卵管内輸送、着床及び着床前段階の胚発生に及ぼす影響、並びに雄生殖器の病理組織学的検査では検出されない機能的影響（例えば性的衝動及び精巣上体内の精子成熟）を検索し、着床～硬口蓋の閉鎖（ステージ C～D）に投与することにより、妊娠終了時に妊娠雌を介して曝露された胚・胎児の発生を評価した。さらに、トフェルセンの TK 特性も評価した。

雄（交配前 28 日から交配中、計画剖検まで）並びに雌（交配前 15 日から交配中及び GD 2、4、6、8、10、12、及び 14 まで）に、トフェルセン又は対照物質を 0、3、10、及び 30 mg/kg の用量で 2 日に 1 回 SC 投与した（表 15）。

表 15　　マウスを用いた FEED 及び EFD 試験の試験デザイン

群	投与物質	用量 (mg/kg)	投与濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	動物数	
					雄	雌
1	溶媒 (PBS)	0	0	2	22	22
2	トフェルセン	3	1.5	2	22	22
3	トフェルセン	10	5	2	22	22
4	トフェルセン	30	15	2	22	22

本試験では、一般状態、体重、体重増加量、及び摂餌量測定、性周期、交尾能及び受胎能、剖検所見、卵巣及び子宮検査（黄体数、着床数、胎盤検査、胎児生存率）、雄生殖器検査（精子運動性、精子濃度、精子形成のステージングによる定性評価）、胎児検査（性別、体重、並びに外表、内臓及び骨格検査）、器官重量、及び病理組織学的検査を評価した。0（投与前）、投与 1、2、4、8、及び 24 時間後の時点での GD 6 及び GD 14 における雌動物の TK パラメータを評価した。

投与雄動物

雄動物全例が計画剖検まで生存した。トフェルセンに関連した一般状態及び剖検の異常は、いずれの用量でも認められなかった。Day 61 における 3、10、及び 30 mg/kg 群の平均体重は、対照群のそれぞれ 100%、104%、及び 106%であった。10 及び 30 mg/kg 群では統計学的に有意な増加がみられたが、変化量が 10%未満であったことから有害影響ではないと考えられた。

交尾能、受胎能、及び精子検査パラメータにトフェルセンに関連した影響は認められなかった。

病理組織学的検査では、トフェルセンを投与した結果、10 mg/kg 以上の用量で精巣の間質組織に軽微から中等度の空胞化両染性マクロファージ、30 mg/kg で軽微から軽度の精細管変性及び精細管拡張、並びに精子細胞滞留が認められた。精巣上体では、10 mg/kg 以上で間質組織に空胞化両染性マクロファージ、30 mg/kg では上皮細胞アポトーシス、細胞残屑増加、及び精子減少が認められた。10 mg/kg でみられた病理組織変化は、1) 精巣及び精巣上体における空胞化及びマクロファージ浸潤が軽微から軽度であったこと、並びに 2) 同群ではその他の病理組織変化（アポトーシス、変性、又は精子減少）が認められなかったことから、有害影響ではないと判断した。30 mg/kg 群では、前立腺の絶対重量及び最終体重に対する相対重量が有意に増加した（対照群のそれぞれ 136%及び 127%）。この増加は、同群でみられた精巣及び精巣上体の病理組織変化によるものと考えられた。

投与雌動物

トフェルセンに関連した死亡及び早産はなかった。GD 18 の計画剖検日に分娩した 10 mg/kg 群の雌 1 例を除き、投与雌動物全例が GD 18 の計画剖検日まで生存した。GD 18 の分娩 1 例は、試験施設の背景データ範囲内であり、発生頻度に用量依存性は認められなかった。

いずれの用量でも交配前及び妊娠期間中の平均体重、体重増加量、及び摂餌量に影響は認められなかった。3、10、及び 30 mg/kg 群の Day 15 における平均体重は、対照群のそれぞれ 102%、100%、及び 102%であり、GD 18 における平均体重は対照群のそれぞれ 100%、103%、及び 104%であった。交尾所要日数、交尾率、受胎率、卵巣及び子宮パラメータ、並びに雌生殖器重量（絶対及び相対重量）に、トフェルセンに関連した影響は認められなかった。妊娠動物は、対照群、3、10、及び 30 mg/kg 群でそれぞれ 18 例（81.8%）、22 例（100%）、18 例（81.8%）、及び 18 例（81.8%）であった。

30 mg/kg 群では、胚吸収がみられた母動物数が有意に増加した（対照群の 9 例に対して 30 mg/kg 群で 17 例）。しかし、1) すべての胚・胎児が死亡又は全吸収した母動物はいなかったこと、2) 吸収数及び着床後胚損失率の母動物平均値の有意な増加（$p > 0.05$）はみられなかったこと、並びにいずれも試験施設の背景データの範囲内であったことから、トフェルセンの有害影響ではないと

考えられた。胚・胎児生存率、胎児体重、胎児の外表、内臓、及び骨格の奇形又は変異を含むその他のすべての卵巣又は子宮パラメータは、母動物へのトフェルセン投与による影響を受けなかった。胎児の平均骨化部位数は全群間で同程度であった。

以上、雄の一般毒性に対するトフェルセンの無毒性量は、30 mg/kg における前立腺重量の増加に基づき 10 mg/kg、また雄の生殖に対するトフェルセンの無毒性量は、30 mg/kg における精巣及び精巣上体の病理組織学的変化に基づき 10 mg/kg と判断された。いずれの用量でも雄の受胎能に対する影響は認められなかった。

雌の一般毒性及び生殖発生に対するトフェルセンの無毒性量は、最高用量の 30 mg/kg と判断された。

6.3 妊娠 NZW ウサギを用いた皮下投与による胚･胎児発生に関する用量設定試験

［4.2.3.5.2-2］P067-[redacted]-04

本 GLP 非適用試験の目的は、次に実施するウサギ EFD 試験の用量を設定するための情報を得ること、及びトフェルセンの妊娠及び胚・胎児発生に及ぼす影響を予備的に評価することであった。本試験は、ICH S5(R2) ガイドラインにおけるステージC～Dを評価する試験デザインとした。さらに、トフェルセンの TK 特性も評価した。

推定妊娠 NZW [Hra:(NZW) SPF]ウサギ合計 20 例を各群 5 例の 4 用量群（第 1～4 群）に無作為割付した。トフェルセン又は対照物質の投与液を GD 7～19 日に 0（溶媒）、3、10、及び 30 mg/kg の用量で 2 日に 1 回 SC 投与した（表 16）。

表 16　ウサギを用いた EFD 用量設定試験の試験デザイン

群	投与物質	用量 (mg/kg)	投与濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	動物数 [a]
1	溶媒 (PBS)	0	0	2	雌 5
2	トフェルセン	3	1.5	2	雌 5
3	トフェルセン	10	5	2	雌 5
4	トフェルセン	30	15	2	雌 5

a：GD 29 に剖検

本試験で評価したパラメータ及び評価項目は、生存率、母動物の一般状態、体重、体重増加量及び摂餌量、卵巣及び子宮検査、剖検所見、並びに胎児の体重、性別、及び外表であった。さらに、トフェルセンの TK 解析のため、GD 7 及び GD 19 に母動物から採血した。

母動物全例が GD 29 の計画剖検日まで生存した。

トフェルセンに関連した一般状態の変化は、10 及び 30 mg/kg の皮膚乾燥及び粗毛のみであり、これらは、トフェルセンの皮下投与によるものと考えられた。

母動物の平均体重、体重増加量、摂餌量にトフェルセンに関連した変化は、いずれの用量でも認められなかった。剖検では、肉眼病変はいずれの用量でも認められなかった。

胚・胎児生存数、胎児体重を含む卵巣及び子宮パラメータにトフェルセンに関連した影響は、いずれの用量でも認められなかった。また、トフェルセンに関連した胎児の外表奇形又は変異は認められなかった。

TK 解析では、濃度－時間プロファイル及び TK パラメータは、3～30 mg/kg の用量間でほぼ用量比例的な増加が示された（表 17）。

$AUC_{0\text{-}24h}$ 又は C_{max} のいずれにも GD 7 から GD 19 まで曝露の蓄積性は認められなかった。GD 7 及び GD 19 ともに T_{max} は 1～2 h であった。

表 17　　ウサギを用いた EFD 用量設定試験における平均 TK パラメータ

用量 (mg/kg)	GD	T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng*h/mL)
3	7	3.18	5686 ± 1058	15683 ± 2115
	19	3.85	3383 ± 868	18228 ± 4868
10	7	2.79	22817 ± 8578	85417 ± 41924
	19	2.84	20359 ± 2726	101183 ± 23057
30	7	2.92	63165 ± 9818	364624 ± 60327
	19	3.17	56075 ± 10208	363478 ± 52589

値は平均値 ± SD

以上、妊娠 NZW ウサギにトフェルセンを 0、3、10、及び 30 mg/kg の用量で GD 7 から GD 19 まで 2 日に 1 回 SC 投与した。10 mg/kg 以上でトフェルセンの SC 投与による二次的変化と考えられる一過性の一般状態の変化が認められた。いずれの用量でも母動物の体重、体重増加量、及び摂餌量、並びに胚・胎児の生存及び胎児体重への影響は認められず、胎児の外表奇形又は変異も認められなかった。

6.4　　妊娠 NZW ウサギを用いた皮下投与による胚・胎児発生に関する試験

［4.2.3.5.2-3］P067-17-05

本 GLP 適用試験の目的は、着床～硬口蓋閉鎖までの期間に投与することにより、妊娠雌 NZW [Hra:(NZW) SPF]ウサギ及び胚・胎児の発生に対するトフェルセンの有害影響を検索することであった。本試験は、ICH S5(R2) ガイドラインにおけるステージ C～D を評価する試験デザインとした。さらに、トフェルセンの TK 特性も評価した。

1 群雌 20 例の妊娠 NZW ウサギに、トフェルセンを 0（溶媒）、3、10、及び 30 mg/kg の用量で、GD 7～19 の期間に 2 日に 1 回 SC 投与した（表 18）。

表 18　　ウサギを用いた EFD 試験の試験デザイン

群	投与物質	用量 (mg/kg)	投与濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	動物数	
					主試験	TK 試験
1	溶媒 (PBS)	0	0	2	20	3
2	トフェルセン	3	1.5	2	20	3
3	トフェルセン	10	5	2	20	3
4	トフェルセン	30	15	2	20	3

本試験で評価したパラメータ及び評価項目は、母動物の生存率、一般状態、体重、体重増加量、及び摂餌量測定、卵巣及び子宮検査、剖検、胎児検査（体重、性別、外表、内臓、及び骨格）であった。また、GD 7 及び GD 19 の投与前、投与 1、2、6、及び 24 時間後に母動物から採血し、トフェルセンの血漿中濃度を測定した。

トフェルセンに関連した死亡はなかった。試験期間中に 2 例が早期安楽死処分された（対照群 1 例及び 3 mg/kg 群 1 例）。いずれも損傷によるものであった。これらの早期死亡は、1) 用量依存性に発生しなかったこと、2) 2 例中 1 例は対照群であったこと、及び 3) 損傷による処分であったことから、トフェルセンに関連なしと判断された。他のすべての主試験動物は、GD 29 の計画剖検まで生存した。トフェルセンに関連した一般状態の変化及び剖検所見は認められなかった。

母動物の平均体重、体重増加量、及び摂餌量に、トフェルセンに関連した変化は認められなかった。

いずれの用量でも、胚・胎児生存、並びに胎児体重を含む卵巣及び子宮パラメータに、トフェルセンに関連した影響は認められなかった。

胎児の外表、内臓、及び骨格に、トフェルセンに関連した奇形及び変異は認められなかった。胎児の平均骨化部位数は、全群間で同程度であった。

GD 7 及び GD 19 にトフェルセンを投与したときの T_{max} は、ほとんどが 1～2 h であった。全身曝露量（C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$）は、GD 7 及び GD 19 では用量依存的に増加した。GD 7 の C_{max} が 3～10 mg/kg の用量間で用量比を下回って増加したほかは、試験用量範囲全体でほぼ用量比例的な増加が認められた（2.6.4.3.4.1 項、表 5）。GD 7 及び GD 19 の終末相 $t_{1/2}$ は 2.44～2.90 h であった。トフェルセンを 3、10、及び 30 mg/kg の用量で、GD 7～19 まで 2 日に 1 回に反復 SC 投与した結果、平均 $AUC_{0\text{-}24h}$ に蓄積性は認められなかった。

以上、妊娠雌 NZW ウサギにトフェルセンを 0、3、10、及び 30 mg/kg の用量で、GD 7～19 まで 2 日に 1 回 SC 投与した。トフェルセン投与による死亡、母動物の一般状態、体重、体重増加量、及び摂餌量への影響は認められなかった。胚・胎児の生存及び胎児体重へのトフェルセンの影響はみられず、胎児の外表、内臓、及び骨格の奇形又は変異は認められなかった。これらの結果に基づき、トフェルセンの母動物及び発生に対する無毒性量は 30 mg/kg と判断された。この用量の GD 19 における平均血漿 C_{max} は 41100 ng/mL、$AUC_{0\text{-}24h}$ は 283000 ng*h/mL であった（2.6.4.3.4.1 項、表 5）。

6.5 マウスを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

［4.2.3.5.3-1］P067-[redacted]-01

本 GLP 適用試験の目的は、Crl:CD1(ICR)雌マウスに着床から授乳、離乳までの期間、2 日に 1 回 SC 投与したときの雌動物及び曝露を受けた雌動物からの出生児の発生に及ぼすトフェルセンの有害影響を検索することであった。本試験は、ICH S5(R2)ガイドラインにおけるステージ C～F を評価する試験デザインとしたが、帝王切開胎児（ステージ C～D）の評価は別試験で実施したため、本試験には含めなかった。この期間中に誘発された影響が遅延して発現する可能性を考慮して、F1 世代マウスの性成熟まで観察した。

未交配 Crl:CD1(ICR)雌マウス合計 100 例を試験施設で同系統の無処置雄マウスと交配し、1 群 25 例で 4 用量群（1 群～4 群）に無作為に割付けた。トフェルセン又は対照物質を F0 母動物に GD 6 から GD 22 及び授乳 1 日（LD 1）から離乳（LD 21/PND 21）までの期間、0（溶媒）、3、10、及び 30 mg/kg の用量で 2 日に 1 回 SC 投与した（表 19）。投与容量は直近の記録体重に合わせ、各投与日のほぼ同時刻に投与した。投与時刻に分娩中の母動物には次の投与日まで投与しなかった。F1 児にはトフェルセン又は対照物質を直接投与しなかったが、母動物の妊娠中（子宮内曝露）及び授乳期間中の母動物の乳汁を介して曝露された可能性がある。

表 19 マウスを用いた PPND 試験の試験デザイン

群	投与物質	用量 (mg/kg)	投与濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	動物数
1	溶媒 (PBS)	0	0	2	25
2	トフェルセン	3	1.5	2	25
3	トフェルセン	10	5	2	25
4	トフェルセン	30	15	2	25

F0 母動物について評価したパラメータ及び評価項目は、生存率、一般状態観察、体重、体重増加量、及び摂餌量測定、分娩、自然分娩及び同腹児の観察、母動物の哺育行動、TK 解析用試料採取、乳汁分析、剖検、卵巣及び子宮検査（着床数）であった。

F1 児について評価したパラメータ及び評価項目は、生存率、一般状態、体重、体重増加量、離乳前の発生指標、摂餌量、性成熟、自発運動量、Morris 水迷路、生殖能、剖検、器官重量（雄のみ）、卵巣及び子宮内容物であった。

F0 雌マウス

F0 母動物では、いずれの用量群でもトフェルセン投与による死亡はなかった。0、3、10、及び 30 mg/kg 群のそれぞれ 1、2、0、及び 2 例の母動物は計画剖検まで生存しなかった。0、3、及び 30 mg/kg 群のそれぞれ 1、1、及び 2 例の母動物は死亡が発見され、3 mg/kg 群の 1 例は一般状態悪化のため安楽死させた。これらの死亡は、1) 1 例の死亡は対照群で発生したこと、2) 死亡動物数が用量群間で同程度であったこと、及び 3) 死亡日に用量依存性が認められなかったことから、トフェルセンと関連なしと判断された。他の母動物はすべて LD 21 の計画剖検まで生存した。

トフェルセンに関連した一般状態の変化は、いずれの用量でも F0 母動物に認められなかった。

平均体重、体重増加量、摂餌量、及び剖検所見は、用量群間で同程度であった。

妊娠は、0、3、10、及び 30 mg/kg 群 F0 母動物の 22～25 例（88.0%～100.0%）で確認された。F0 母動物又は離乳前の F1 出生児の自然分娩又は同腹児パラメータにトフェルセンに関連した影響は認められなかった。

F1 雌雄マウス

いずれの用量でも、トフェルセンに関連した F1 離乳児の死亡はなかった。

3 及び 10 mg/kg 群の雌それぞれ 1 例に早期死亡が発生した。3 mg/kg 群の雌 F1 児（動物番号 3342）は PND 43 に死亡が発見され、10 mg/kg 群の雌 F1 児（動物番号 3369）は PND 29 に死亡が発見された。いずれも一般状態、体重に特記すべき変化は認められなかった。また、いずれも剖検所見に異常はみられなかった。これらの死亡は、1) 用量依存性がなかったこと及び 2) 各用量群で 1 例の事象であったことから、いずれもトフェルセンに関連なしと考えられた。他の F1 児はすべて計画剖検時まで生存した。

トフェルセンを 30 mg/kg までの用量で母動物に投与した結果、体重、体重増加量、及び離乳後の摂餌量に影響は認められなかった。包皮分離日又は膣開口日、若しくはいずれかの検査日の平均体重に用量群間の差は認められなかった。

トフェルセンを 30 mg/kg までの用量で母動物に投与した結果、F1 児の歩行又は微細運動、学習及び記憶、交尾及び受胎能、又は剖検所見に影響は認められなかった。F1 雄マウスの最終体重、並びに精巣上体及び精巣の平均絶対及び相対重量、又は帝王切開時の評価パラメータに群間の差は認められなかった。

トフェルセンを投与した F0 母動物の LD 21 における肝臓では、トフェルセンは測定可能レベルであったが、F1 児の肝臓及び脳組織では検出されなかった。

LD 13 の投与後、トフェルセンを投与したすべての動物の乳汁中にトフェルセンが検出された。

以上に基づき、F0 及び F1 動物に対する無毒性量は 30 mg/kg と判断された。

7 局所刺激性試験

反復 IT 投与後の局所刺激性については、サルを用いた 13 週間及び 39 週間反復投与毒性試験で評価した。トフェルセンの反復投与部位である腰髄では、硬膜外及び硬膜内に炎症細胞浸潤が認められた。これらは、主にリンパ球及びマクロファージからなる単核細胞であり、軽微から中等度の変化であった。少数例でのみ発現した変化ではあったが、いずれもトフェルセン投与群で発現したことから、トフェルセンに関連ありと判断された。投与部位における炎症誘発作用は、リボヌクレアーゼ（RNase）H 依存的 ASO では既知の事象であり、恐らく自然免疫細胞の活性化によるものである。

8 その他の毒性試験

8.1 光毒性

トフェルセンは、化学構造にヌクレオチド部分を含むことから予測されるとおり、261 nm にピークを有する UV 吸収性を示す。IT 投与によるドラッグデリバリーでは、皮膚中トフェルセン濃度は低いと予想される。カニクイザルを用いた 13 週間及び 39 週間反復 IT 投与毒性試験では、トフェルセンの光毒性を示唆する変化（紅斑、そう痒及び浮腫）は認められなかった。

8.2 カニクイザルを用いた腰髄 IT ボーラス投与による 13 週間反復投与不純物安全性確認毒性試験

［4.2.3.7.6-1］P067-[redacted]-06

本 GLP 適用試験の目的は、製造工程由来不純物、原料由来不純物又は分解生成物不純物が高濃度に含有する 3 種のトフェルセン（10 mg/回）の不純物混合被験物質（TAM）をカニクイザルに 13 週間（Day 1、15、29、57 及び 85）反復 IT 投与したときに発現する毒性を評価することであった。合計[redacted]種類の不純物を配合し、親化合物（約[redacted]%）と共に[redacted]%～[redacted]%の含量の不純物を最大[redacted]種類含有する 3 種類の TAM を調製した（表 21）。

aCSF（対照）、TAM1、TAM2、又は TAM3 を投与する 4 群（4 例/性/群）にカニクイザル 32 例（雄 16 例及び雌 16 例）を割り付けた（表 20）。投与は、無傷脊髄針を用いて L4/L5 椎間（又は必要に応じて L3/L4 椎間）の腰髄レベルで経皮的 IT 投与により行った。投与容量は 1 mL とし、0（対照群）又は 10 mg（TAM 投与群）の用量で 1 分間かけて緩徐ボーラス投与した後、0.25 mL の aCSF でフラッシュした。動物は最終投与の 1 週間後（Day 92）に剖検した。

表 20 サルを用いた不純物安全性確認試験の試験デザイン

群	投与物質	用量 (mg/dose)	投与容量 (mL)	投与濃度 (mg/mL)	動物数
1	対照 (aCSF)	0	1	0	雄 4、雌 4
2	TAM1	10	1	10	雄 4、雌 4
3	TAM2	10	1	10	雄 4、雌 4
4	TAM3	10	1	10	雄 4、雌 4

表 21 不純物混合被験物質（TAM）における不純物含量

TAM1		TAM2		TAM3	
不純物	含量 (%)	不純物	含量 (%)	不純物	含量 (%)
FLP	[redacted]	FLP	[redacted]	FLP	[redacted]
*不純物E	[redacted]	*不純物F	[redacted]	*不純物K	[redacted]
*不純物B	[redacted]	*不純物G	[redacted]	*不純物L	[redacted]
*不純物C	[redacted]	*不純物H	[redacted]	*不純物M	[redacted]
*不純物D	[redacted]	*不純物I	[redacted]	*不純物N	[redacted]

TAM1		TAM2		TAM3	
不純物	含量 (%)	不純物	含量 (%)	不純物	含量 (%)
*不純物E	[redacted]	*不純物J	[redacted]	-	

FLP = 全長物質；*不純物A = [redacted]；*不純物D,= [redacted]；*不純物G = [redacted]；*不純物J = [redacted]；[redacted]；*不純物F = [redacted]、*不純物B = [redacted]、[redacted]；*不純物I = [redacted]；[redacted]；*不純物H = [redacted]；*不純物C = [redacted]；*不純物M = [redacted]；[redacted]；*不純物L = [redacted]；*不純物N = [redacted]；[redacted]；*不純物E = [redacted]

本試験で評価したパラメータ及び評価項目は、一般状態観察、身体及び神経学的検査、体重及び摂餌、眼科学的検査、ECG、臨床病理パラメータ（血液、血液凝固、血液生化学及び尿検査）、CSF 細胞数及び生化学、TK パラメータ（血液及び CSF）、剖検、器官重量、並びに病理組織学的検査であった。

本試験で早期死亡はなかった。一般状態、体重、摂餌、身体検査、神経学的検査、眼科学的検査、ECG パラメータ、血液、血液生化学、血液凝固、CSF 細胞数及び生化学、尿検査、器官重量、剖検、及び病理組織にトフェルセンの有害影響は認められなかった。

TAM3 投与では、対照群と比較して、脊髄反射（屈筋反射、会陰反射）の一過性の低下又は消失、姿勢反射（自己受容性姿勢反射）、及び一過性の一般注意／運動機能異常が認められた。いずれも一過性であり歩行機能に影響が認められなかったことから、有害影響ではないと判断した。

TAM1、2、及び 3 投与では、CSF 中の総タンパク質及びアルブミンの軽度の高値が認められた。これらの所見に関連した一般状態、剖検所見、及び病理組織学的所見は認められなかったことから、有害影響ではないと判断した。

TAM 投与に関連した病理組織学的変化として、脳、投与部位、脊髄、後根神経節、及び交感神経節に神経細胞の小滴性又は大滴性空胞化、空胞化マクロファージの血管周囲性浸潤、並びに血管周囲性単核細胞浸潤の発現頻度及び重症度の増加が認められた。顎下及び腸間膜リンパ節における空胞化マクロファージの浸潤、肝クッパー細胞の好塩基性顆粒は、いずれの TAM 投与でも認められた。総じて、3 種類の TAM 投与によりみられたトフェルセン関連変化の発現頻度及び重症度に明らかな差は認められなかった。

TAM1～3 を 10 mg/回の用量で Day 1、15、29、57、及び 85 に経皮的 IT 投与したすべてのカニクイザルに血漿中曝露が認められ、投与 48 時間後まで全例の血漿中濃度が定量可能であった。Day 1 及び 85 の T_{max} は、動物番号 4004 の T_{max} が 12 h であった以外は、全般に 1～4 h であった。3 種の TAM 間で曝露量に明らかな差は認められず、両採取日の雌雄の曝露量は類似していた（表 22）。Day 1 及び 85 の平均 $t_{1/2}$ は 7.07～10.9 h、平均 Cl/F は 207～406 mL/h、平均 Vd/F は 2610～5550 mL であった。Day 1 と比較して、TAM1～3 の 5 回 IT 投与後の Day 85 の曝露量に蓄積性は認められなかった。平均蓄積比は R_{Cmax} で 0.455～1.65、R_{AUC} で 0.560～1.43 であった。

表 22　　サル不純物安全性確認試験における血清中平均 TK パラメータ（雌雄合算）

検査日	群	用量 (mg/dose)	T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-t} (ng*h/mL)	$t_{1/2}$ (h)
Day 1	2	10	2.88 ± 1.55	6470 ± 3710	43500 ± 17800	8.02 ± 1.31
	3	10	2.50 ± 1.60	8150 ± 3040	44200 ± 6270	9.61 ± 2.99
	4	10	2.50 ± 1.60	7170 ± 3690	45800 ± 12900	8.56 ± 1.15
Day 85	2	10	4.00 ± 0.0	5450 ± 1880	43600 ± 12500	10.6 ± 3.03
	3	10	3.25 ± 1.39	6370 ± 4480	35900 ± 15300	9.14 ± 1.83
	4	10	4.63 ± 3.16	3810 ± 3060	33400 ± 20200	9.25 ± 3.28

値は平均値 ± SD

CSF 中トフェルセン濃度は、Day 15、29、57、及び 85 の全例で定量可能であり、曝露量に不純物混合被験物質（TAM1、TAM2、及び TAM3）間及び雌雄間で同程度であった（表 23）。

表 23　　サル不純物安全性確認試験における CSF 中平均 TK パラメータ

検査日	投与物質	性別	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-tau} (ng*h/mL)
Day 1	TAM1	雄	8050	50200
		雌	4900	36800
		雄 ＋ 雌	6470	43500
	TAM2	雄	7460	43500
		雌	8830	45000
		雄 ＋ 雌	8150	44200
	TAM3	雄	7050	43800
		雌	7300	47800
		雄 ＋ 雌	7170	45800
Day 85	TAM1	雄	4750	40100
		雌	6160	47000
		雄 ＋ 雌	5450	43600
	TAM2	雄	4190	33200
		雌	8540	38700
		雄 ＋ 雌	6370	35900
	TAM3	雄	5110	41000
		雌	2520	25800
		雄 ＋ 雌	3810	33400

以上、TAM1、2、及び 3 をカニクイザルに 10 mg の用量で 13 週間（計 5 回）腰髄 IT 投与したときの忍容性は良好であり、有害影響は認められなかった。本試験条件下では、各 TAM の無毒性量はいずれも 10 mg と判断され、TAM1、2、及び 3 における雌雄合算 C_{max} はそれぞれ 5450、6370、及び 3810 ng/mL、AUC_{0-tau} は 43600、35900、及び 33400 ng*h/mL であった。

9 考察及び結論

トフェルセンの毒性プログラムは、ALS 治療のための長期 IT 投与をサポートするために計画された。トフェルセンは第 2 世代の ASO であり、SOD1-ALS 患者の SOD1 mRNA 分解を媒介して SOD1 タンパク質レベルを低下させる。トフェルセンはヒト SOD1 mRNA の 3'-非翻訳領域に結合するため、野生型及び変異型の両 SOD1 の発現を低下させることが期待される。ASO の組織分布、細胞取り込み、代謝、及びクラス毒性に対する感受性については、サルはヒトに類似性が最も高い。さらに、サル IT ボーラス投与し、ヒトに外挿可能な用量－曝露量－反応関係を確立することができたことから、詳細な安全性評価が行われた。マウス及びラットを用いた追加の毒性試験により、反復投与後の CNS 及び全身に対するオフターゲット作用を明らかにした。

単回投与毒性試験はラット、反復投与毒性試験はマウス（12 及び 26 週間）及びカニクイザル（13 及び 39 週間）を用いて実施した。生殖発生毒性試験はマウス及びウサギを用いて実施した。トフェルセンの遺伝毒性は、細菌を用いた変異原性試験、哺乳類培養細胞を用いた染色体異常試験、及びマウスを用いた小核試験の組み合わせにより評価した。さらに、製造工程由来不純物及び分解生成物不純物の安全性評価として、カニクイザルを用いた 13 週間反復投与毒性試験を実施した。

カニクイザルの反復投与毒性試験の投与経路は、臨床投与経路に合わせ、腰髄緩徐 IT ボーラス投与とした。単回 IT 投与後のトフェルセンの CNS 毒性はラットでも評価し、2 種の動物種で臨床投与経路による評価を行った。マウスの反復投与毒性試験の投与経路は、最大の全身曝露を得るために SC 投与とした。マウス及びウサギの生殖発生毒性試験では、親動物及び胎児にトフェルセンの最大の全身曝露を得るために SC 投与とした。

安全性薬理パラメータは、ラットの単回投与毒性試験及びサルの反復（13 及び 39 週間）投与毒性試験の一部として評価した。また、心血管系の安全性に対する潜在的影響を評価するために、*in vitro* h*ERG* 試験を実施した。ラットでは、3 mg（1500 mg HED）投与群で覚醒、歩行、自発運動、呼吸、及び感覚運動の低下が認められた。サルの試験ではいずれも、安全性薬理パラメータに対するトフェルセンの作用は認められなかった（2.6.2.4 項）。

ラットにトフェルセンを単回 IT ボーラス投与した試験では、最高用量（3 mg）を投与した 20 例中 1 例が早期に死亡した。この用量は 1500 mg のヒト用量（第 III 相臨床試験の最高用量 100 mg の 15 倍）に相当する。3 mg 群では、投与約 25 分後に一過性急性の触覚過敏が認められた。3 mg 群では、投与 3 時間後に覚醒、歩行、自発運動、呼吸、及び感覚運動の低下も認められた。その後の試験日には一般状態の変化は認められず、一過性の影響が示唆された。無毒性量は 1 mg と判断された。

マウスにトフェルセンを 26 週間反復 SC 投与した試験では、忍容性が認められ、試験の最高用量（150 mg/kg）が無毒性量と考えられた。

カニクイザルに亜慢性（13 週間）及び慢性（9 ヵ月間）反復 IT 投与した試験では、神経行動に影響が認められた。13 週間試験では、高用量（35 mg）群の雌 2 例に一過性の一般状態の変化（活動性低下）が認められたが、有害影響ではないと判断された。9 ヵ月間試験では、35 mg 群の雌 1 例の一般状態に有害影響が認められた。この雌では、2 回目の投与後に一過性の筋痙攣（複数日

の投与直後に発現)、麻酔からの覚醒遅延、及び間欠性の振戦（投与期間の最後の数ヵ月から剖検まで）を特徴とする神経症状が認められた。EEG 検査で筋痙攣は発作ではないことが確認され、臨床病理及び病理学的検査に関連する所見は認められなかった。無毒性量は 12 mg と判断され、HED に換算すると 120 mg となる（サルからヒトへの CSF 量換算)。

マウスを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生並びに胚・胎児の発生に関する試験では、トフェルセンに関連した影響として、30 mg/kg（100 mg 投与時のヒト曝露量［AUC］の 55 倍）群で、精巣及び精巣上体の病理組織変化、並びに精巣上体の精子減少が認められた。ただし、当該試験では、受胎能及び初期胚発生に対するトフェルセンの影響は認められなかった。

ウサギを用いた胚・胎児の発生に関する試験では、死亡、一般状態における有害影響、母動物体重、体重増加量、及び摂餌量に対するトフェルセンの影響は認められなかった。胚・胎児の生存及び胎児体重に対するトフェルセンの影響は認められず、胎児の外表、内臓、及び骨格の異常及び変異に対する影響も認められなかった。これらの結果に基づき、母動物及び胚・胎児発生に対するトフェルセンの無毒性量は最高用量の 30 mg/kg であった。

マウスを用いた出生前及び出生後の発生に関する試験では、トフェルセンを 2 日に 1 回投与した結果、いずれの用量でも F0 母動物の死亡及び一般状態の変化は認められなかった。また、F0 母動物の自然分娩及び同腹児パラメータに対するトフェルセンの影響は認められなかった。F1 児における離乳前の発達パラメータに対するトフェルセンに関連した影響は認められなかった。30 mg/kg の高用量投与母動物からの F1 児の離乳後の F1 マウスの歩行又は微細運動、学習及び記憶、交尾及び受胎能、剖検又は卵巣及び子宮内パラメータを含む、F1 児の発生及び成長に対するトフェルセンに関連した影響は認められなかった。

トフェルセンを投与した F0 母動物の LD 21 における肝臓では、トフェルセンは測定可能レベルであったが、F1 出生児の肝臓及び脳組織では検出されなかった。LD 13 の投与後に、トフェルセンを投与したすべての動物の乳汁中にトフェルセンが検出された。LD 13 の投与後に、トフェルセンを投与したすべての動物の乳汁中にトフェルセンが検出された。

トフェルセンは、細菌を用いた復帰突然変異試験、CHL 細胞を用いた染色体異常試験、及び *in vivo* マウス小核試験で遺伝毒性を示さなかった。したがって、トフェルセンは変異原性又は染色体異常誘発性を示さないと判断された。

トフェルセンのがん原性試験はマウスを用いて実施中である。CuZn スーパーオキサイドジスムターゼ（CuZn SOD；SOD1）欠損マウスは、発生及び成熟初期に明らかな異常を示さなかったが、寿命の短縮及び肝臓の腫瘍性変化の発現頻度が増加したと報告されている［Elchuri 2005］。SOD1 null マウスでは CuZn SOD 欠損が遍在しているが、自然発生腫瘍は肝臓のみで認められ、腫瘍性変化発現の選択性に肝臓組織の特殊な環境及び特徴が関連している可能性が示唆されている［Elchuri 2005］。これまでに実施したげっ歯類の 26 週間毒性試験及びサルの 39 週間毒性試験で評価したいずれの組織にも、過形成、前がん病変、及び腫瘍性病変は認められていない。

製造工程由来不純物、原料由来不純物又は分解生成物不純物の安全性を確認するため、カニクイザルを用いた 13 週間反復投与毒性試験を実施した。合計 14 種類の不純物を配合し、親化合物（約 70%）と共に 2.5%～3.0%の含量の不純物を最大 5 種類含有する 3 種類の TAM を調製した。

カニクイザルに TAM を 13 週間投与したときの忍容性は良好であり、有害影響は認められなかった。当該試験条件下では、それぞれの TAM の無毒性量は 10 mg であった。

長期反復投与毒性試験における無毒性量は、マウスで 150 mg/kg、サルで 12 mg であった。最も感受性の高い動物種であるサルでは、無毒性量である 12 mg の HED は 120 mg に換算される。

以上、毒性プログラムの成績に基づき、トフェルセンの安全性プロファイルは、*in vitro* 及び *in vivo* 試験により適切に評価されている。臨床 IT 用量に対するサル IT 用量の安全域をサルの CSF 量の差（ヒト CSF 量はサルの約 10 倍）に基づいて算出した。非臨床安全性プログラムの成績は、臨床プログラムをサポートし、トフェルセンの承認申請及び添付文書を裏付ける適切な安全性データを提供するものである。

10 参考文献

Braendli-Baiocco A, Festag M, Dumong Erichsen K, Persson R, Mihatsch MJ, Fisker N, et al. From the cover: The minipig is a suitable non-rodent model in the safety assessment of single stranded oligonucleotides. Toxicol Sci. 2017;157(1):112-28.

Elchuri S, Oberley TD, Qi W, Eisenstein RS, Roberts LJ, Remmen HV, et al. CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. Oncogene. 2005;24(3):367-80.

Engelhardt JA. Comparative renal toxicopathology of antisense oligonucleotides. Nucleic Acid Ther. 2016;26(4):199-209.

Frazier KS. Antisense oligonucleotide therapies: the promise and the challenges from a toxicologic pathologist's perspective. Toxicol Pathol. 2015;43(1):78-89.

Kotzin JJ, Spencer SP, McCright SJ, Kumar DBU, Collet MA, Mowel WK, et al. The long non-coding RNA *Morrbid* regulates Bim and short-lived myeloid cell lifespan. Nature. 2016;537(7619):239-43.

Lenz B, Braendli-Baiocco A, Engelhardt J, Fant P, Fischer H, Francke S, et al. Characterizing adversity of lysosomal accumulation in nonclinical toxicity studies: Results from the 5th ESTP International Expert Workshop. Toxicol Pathol. 2018;46(2):224-46.

トフェルセン

第 2 部 CTD の概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.7 毒性試験概要表

バイオジェン・ジャパン株式会社

目次

頁

1 毒性試験：一覧表 3
2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表 4
3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧 5
4 毒性試験：使用ロット 6
5 単回投与毒性試験 7
6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 9
7 反復投与毒性試験：重要な試験 10
7.1 マウスを用いた 12 週間反復投与毒性試験 10
7.2 マウスを用いた 26 週間反復投与毒性試験 17
7.3 カニクイザルを用いた 13 週間反復投与毒性試験 28
7.4 カニクイザルを用いた 9 ヵ月間反復投与毒性試験 35
8 *In Vitro* 遺伝毒性試験 46
8.1 細菌を用いた復帰突然変異試験 46
8.2 哺乳類細胞を用いた染色体異常試験 48
9 *In Vivo* 遺伝毒性試験 50
10 がん原性試験 51
11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 52
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 53
13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 56
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 58
15 新生児を用いた試験 62
16 局所刺激性試験 63
17 その他の毒性試験 64

1 毒性試験：一覧表

一覧表　　被験物質：トフェルセン（BIIB067）

試験の種類／動物種／系統	投与方法	投与期間	用量	GLP 適用	試験施設	試験番号	CTD における記載箇所
単回投与毒性							
Sprague-Dawley ラット	腰髄 IT ボーラス	単回	0, 0.1, 0.3, 1, 3 mg	適用	[redacted]	666853-AS03	4.2.3.1-1
反復投与毒性							
CD-1 マウス	皮下	12 週間	0, 25, 150 mg/kg	適用	[redacted]	666853-AS02	4.2.3.2-1
CD-1 マウス	皮下	26 週間	0, 6, 30, 150 mg/kg	適用	[redacted]	P067-[redacted]-03	4.2.3.2-2
カニクイザル	腰髄 IT ボーラス	13 週間	Part A：10 mg (試験 1 日), 30 mg (試験 8 日) Part B：10, 30, 60 mg (試験 1 日, 単回投与) Part C：30 mg (試験 1, 14, 28, 56, 84 日, 5 回投与)	非適用	[redacted]	SOD1-RS01	4.2.3.2-3
カニクイザル	腰髄 IT ボーラス	13 週間	0, 4, 12, 35 mg	適用	[redacted]	666853-AS01	4.2.3.2-4
カニクイザル	腰髄 IT ボーラス	9 ヵ月間	0, 4, 12, 35 mg	適用	[redacted]	P067-[redacted]-01	4.2.3.2-5
遺伝毒性							
ネズミチフス菌及び大腸菌を用いた復帰突然変異試験	*In vitro*	48 時間, プレート法	0, 15, 50, 150, 500, 1500, 5000 µg/plate	適用	[redacted]	666853-IS01	4.2.3.3.1-1
CHL 細胞を用いた染色体異常試験	*In vitro*	±S9: 6 時間 −S9: 22 時間	0, 125, 250, 500 µg/mL	適用	[redacted]	666853-IS02	4.2.3.3.1-2
マウスを用いた小核試験	皮下	単回 (BID)	0, 500, 1000, 2000 mg/kg	適用	[redacted]	P067-19-02	4.2.3.3.2-1
生殖発生毒性試験							
CD-1 マウス	皮下	約 2 週間	0, 3, 10, 30 mg/kg	非適用	[redacted]	P067-[redacted]-01	4.2.3.5.2-1
CD-1 マウス	皮下	約 8 週間 (雄) 約 6 週間 (雌)	0, 3, 10, 30 mg/kg	適用	[redacted]	P067-17-02	4.2.3.5.1-1
CD-1 マウス	皮下	約 6 週間	0, 3, 10, 30 mg/kg	適用	[redacted]	P067-[redacted]-01	4.2.3.5.3-1
New Zealand White ウサギ	皮下	約 2 週間	0, 3, 10, 30 mg/kg	非適用	[redacted]	P067-[redacted]-04	4.2.3.5.2-2
New Zealand White ウサギ	皮下	約 2 週間	0, 3, 10, 30 mg/kg	適用	[redacted]	P067-17-05	4.2.3.5.2-3
その他の毒性試験							
カニクイザルを用いた不純物の安全性確認	腰髄 IT ボーラス	13 週間	10 mg BIIB067 + 不純物	適用	[redacted]	P067-[redacted]-06	4.2.3.7.6-1

CHL = チャイニーズハムスター肺; IT = 髄腔内

2　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表

トキシコキネティクス試験の一覧表　　被験物質：トフェルセン（BIIB067）

試験の種類	試験系	投与方法	用量	GLP 適用	試験番号	CTD における記載箇所
12 週間反復投与／TK 試験	CD-1 マウス	皮下	0, 25, 150 mg/kg	適用	666853-AS02	4.2.3.2-1
26 週間反復投与／TK 試験	CD-1 マウス	皮下	0, 6, 30, 150 mg/kg	適用	P067-[redacted]-03	4.2.3.2-2
13 週間反復投与／TK 試験	カニクイザル	髄腔内	0, 4, 12, 35 mg	適用	666853-AS01	4.2.3.2-4
39 週間反復投与／TK 試験	カニクイザル	髄腔内	0, 4, 12, 35 mg	適用	P067-[redacted]-01	4.2.3.2-5

3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧

トキシコキネティクス試験成績の一覧　　被験物質：トフェルセン（BIIB067）

試験の種類	用量	試験 1 日：$AUC_{0\text{-}24h}$ (μg*h/mL)		投与期間	GLP 適用	試験番号
		雄	雌			
マウスを用いた 26 週間反復皮下投与毒性試験	0	BLQ	BLQ	26 週間	適用	P067-[redacted]-03
	6 mg/kg	5.33 ± 0.385 [a]	4.18 ± 0.572 [a]			
	30 mg/kg	41.2 ± 1.58 [a]	28.6 ± 1.82 [a]			
	150 mg/kg	190 ± 12.6 [a]	205 ± 10.1 [a]			
カニクイザルを用いた 9 ヵ月間反復 IT 投与毒性試験	0	BLQ	BLQ	39 週間	適用	P067-[redacted]-01
	4 mg	5.69 ± 0.908 [b]	6.84 ± 1.20 [b]			
	12 mg	36.4 ± 15.6 [b]	53.8 ± 2.30 [b]			
	35 mg	143 ± 31.3 [b]	176 ± 19.2 [b]			

BLQ：定量下限未満、NA＝該当なし
[a] 平均値 ± 標準誤差
[b] 平均値 ± 標準偏差

4 毒性試験：使用ロット

被験物質：トフェルセン（BIIB067）

バッチ番号	純度 (%)	不純物 (%) [a] *不純物O	*不純物D	*不純物F	*不純物B	*不純物P	*不純物I	*不純物Q	*不純物H	*不純物C	*不純物L	試験番号	試験の種類
[redacted]	[redacted]											666853-AS03	単回投与毒性
												666853-AS02	反復投与毒性
												666853-AS01	反復投与毒性
												666853-IS01	遺伝毒性
												666853-IS02	遺伝毒性
												P067-[redacted]-01	反復投与毒性
												P067-17-02	生殖発生毒性
												P067-17-05	生殖発生毒性
												P067-[redacted]-01	生殖発生毒性
												P067-[redacted]-04	生殖発生毒性
[redacted]	[redacted]											P067-[redacted]-03	反復投与毒性
												P067-[redacted]-06	その他の毒性
												P067-19-02	遺伝毒性 [b]
												P067-[redacted]-01	生殖発生毒性 [b]
												P067-19-04	安全性薬理

[a] [redacted]

[b] 原薬ロット [redacted] 及び [redacted] は P067-[redacted]-01 及び P067-19-02 試験に使用するために混ぜ合わせた（それぞれ [redacted] w/w）

[redacted]

*新薬承認情報提供時に置き換え

5 単回投与毒性試験

試験表題: An Acute Toxicity Study of ISIS 666853 Administered Intrathecally via Single Bolus Dose to Sprague-Dawley Rats
被験物質: トフェルセン（ISIS 666853）
動物種／系統: CD® [Crl:CD®(SD)] ラット
投与期間: 1 日 (単回投与)
試験番号: 666853-AS03
試験開始週齢: 約 6 週齢 (入荷時)
休薬期間: NA
CTD における記載箇所: 4.2.3.1-1
初回投与年月日: 20[redacted] 年 [redacted] 月 [redacted] 日
投与方法: 髄腔内カテーテル
GLP 適用: 適用
対照物質／投与形態: 人工脳脊髄液 (aCSF)／溶液
特記事項: なし
無毒性量: 1 mg (33.3 mg/mL 溶液の 0.03 mL)

用量:	0 (Control, Group 1)		0.1 mg (Group 2)		0.3 mg (Group 3)		1.0 mg (Group 4)		3.0 mg (Group 5)	
動物数	雄：10	雌：10	雄：10	雌：10	雄：10	雌：10	雄：10	雌：10	雄：10	雌：10
組織中濃度 (μg/g ± SD) [a]										
脳皮質										
Day 15	NA	NA	2.63 ± 1.05	2.28 ± 0.625	5.89 ± 4.80	4.62 ± 3.92	4.19 ± 4.06	10.6 ± 6.63	15.8 ± 8.28	18.2 ± 14.5
腰髄										
Day 15	NA	NA	11.3 ± 8.97	9.84 ± 5.10	14.9 ± 4.70	15.6 ± 4.02	19.9 ± 7.94	27.3 ± 5.17	28.6 ± 15.1	39.1 ± 19.4
死亡動物数	0	0	0	0	0	0	0	0	1 [b]	0
一般状態	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
機能観察総合評価 (分類別項目) Day 1 [c]										
一般覚醒 (0-5) [d]	2.8	2.9	2.8	2.9	2.8	2.9	2.9	3.0	2.2*	2.5
歩行 (0-3) [d]	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1	0.0	0.1	0.2	1.3**	1.2**
自発運動 (0-3) [d]	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7*	0.1
呼吸 (0-4) [d]	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.2
感覚運動温度反応 (sec)	7.952	9.830	10.682	10.395	8.719	10.178	8.558	12.047	11.988*	19.829*
摂餌量	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
体重	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
脳脊髄液 (CSF) 分析	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
剖検	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
器官重量	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

5. 単回投与毒性試験（666853-AS03）（続き）

用量:	0 (Control, Group 1)		0.1 mg (Group 2)		0.3 mg (Group 3)		1.0 mg (Group 4)		3.0 mg Group 5)	
動物数	雄：10	雌：10	雄：10	雌：10	雄：10	雌：10	雄：10	雌：10	雄：10	雌：10
病理組織学的検査										
脳										
単核細胞浸潤										
軽微	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
軽度	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
空胞化／顆粒状マクロファージ										
軽微	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
脊髄, 頸部										
単核細胞浸潤										
軽微	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
軽度	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
脊髄, 腰部										
単核細胞浸潤										
軽微	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
軽度	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
空胞化／顆粒状マクロファージ										
軽微	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
脊髄, 胸部										
単核細胞浸潤										
軽度	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

NA：該当なし、-：特記すべき変化なし、*p < 0.05, **p < 0.01

[a] 投薬群は群平均値を示す、対照群の試料は分析しなかった。

[b] ISIS 666853、3 mg 群の雄 1 例が投与約 45 分後に死亡した。ISIS 666853 の予測される作用機序を考慮すると、ASO の生理化学的特性に関連しており、投与液濃度に関連した変化と推察された。

[c] 群平均値を示す。

[d] Cochran Mantel Haenszel test による検定結果 (p < 0.05)

6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

重要な試験以外の試験　　被験物質：トフェルセン（ISIS 666853）

動物種／系統	投与方法 (対照物質／投与形態)	投与期間	用量 (mg)	性別及び 1 群の動物数	最大耐量 (mg)	特記すべき所見	試験番号
カニクイザル	腰椎髄腔内投与 (aCSF／溶液)	13 週間まで	Part A：10 mg (Day 1), 30 mg (Day 8) Part B：10, 30, 60 mg (Day 1, 単回投与) Part C：30 mg (Day 1, 14, 28, 56, 84, 5 回投与)	Part A/B: 雌：3-4 Part C: 雌：8	30	60 mg 群の 2 例で投与約 15 分後に中等度から重度の筋収縮（痙攣）が認められた。これらの筋収縮はジアゼパム投与により消失したが、数日間にわたり運動失調が認められた。	SOD1-RS01

7 反復投与毒性試験：重要な試験

7.1 マウスを用いた 12 週間反復投与毒性試験

試験表題：A 12-Week Repeat Dose Toxicity Study of ISIS 666853 Administered by Subcutaneous Injection in CD1 Mice
被験物質：トフェルセン（ISIS 666853）
動物種／系統：Crl:CD-1(ICR)マウス　投与期間：12 週間
試験番号：666853-AS02
試験開始週齢：7 週齢 (入荷時)　休薬期間：NA
CTD における記載箇所：4.2.3.2-1
初回投与年月日：20[redacted]年[redacted]月[redacted]日～[redacted]月[redacted]日　投与方法：主試験用動物は 2 週間に 1 回皮下投与 (Day 1, 14, 28, 42, 56, 70, 及び 84)、TK 用動物は単回皮下投与
対照物質／投与形態：注射用生理食塩液、USP／溶液
GLP 適用：適用
特記事項：ISIS 666853 はスーパーオキサイドジスムターゼ 1 mRNA を標的とするヒト特異的アンチセンスオリゴヌクレオチドである。毒性評価には 1 群雌雄各 10 例を Groups 1 (対照), 2 (25 mg/kg [12.5 mg/kg/week])及び 3 (150 mg/kg [75 mg/kg/week]) に設定した。血漿及び組織中 TK 評価用に Groups 4 (25 mg/kg [12.5 mg/kg/week])及び 5 (150 mg/kg [75 mg/kg/week])には、1 群雌雄各 27 例 (各試料採取時点に雌雄各 3 例)を設定した。サテライト TK 評価動物は病理検査を行わなかった。ISIS 666853 はげっ歯類では薬理活性を示さない。
無毒性量：150 mg/kg (75 mg/kg/week)

用量／週	0 (Control, Group 1)		12.5 mg/kg (Group 2)		75 mg/kg (Group 3)	
対照物質又は被験物質	注射用生理食塩液, USP		ISIS 666853		ISIS 666853	
動物数 (合計)	雄：10	雌：10	雄：10	雌：10	雄：10	雌：10
試験終了時 (Day 86 剖検)	10	10	10	10	10	10
血漿中トキシコキネティクス (雌雄合算)：Day 1 (N = 6／採取時点)						
C_{max} (μg/mL ± SD)	NA		14.9 ± 2.92		83.6 ± 11.3	
T_{max} (h)	NA		0.50		0.50	
$AUC_{0\text{-}48h}$ (μg*h/mL)	NA		28.8		201	
組織中トキシコキネティクス (雌雄合算)：Day 1 (N = 6 or 5[§]／採取時点) [a]						
C_{max} (μg/mg ± SD)	NA		腎臓：192 ± 41.9, 肝臓：48.5 ± 4.57		腎臓§：252 ± 78.6, 肝臓：105 ± 13.2	
T_{max} (h)	NA		腎臓：10, 肝臓：10		腎臓：10, 肝臓：24	
組織中濃度 (雌雄合算)：Day 86 (最終投与 48 時間後, N = 12) (μg/g ± SD) [a]						
腎臓	NA		150 ± 67.3		281 ± 126	
肝臓	BLQ		55.6 ± 12.6		184 ± 41.3	

7.1　マウスを用いた 12 週間反復投与毒性試験（666853-AS02）（続き）

用量／週	0 (Control, Group 1)		12.5 mg/kg (Group 2)		75 mg/kg (Group 3)	
対照物質又は被験物質	注射用生理食塩液, USP		ISIS 666853		ISIS 666853	
動物数（合計）	雄：10	雌：10	雄：10	雌：10	雄：10	雌：10
試験終了時 (Day 86 剖検)	10	10	10	10	10	10
一般状態	-	-	-	-	-	-
皮下投与部位						
脱毛 (発現動物数, 発現日)	-	-	-	-	-	1 (Day 84)
摂餌量	-	-	-	-	-	-
体重	-	-	-	-	-	-
眼科学的検査	-	-	-	-	-	-
血液学的検査 (Day 86)						
白血球数 (10^3/μL ± SD)	6.28 ± 2.00	5.42 ± 1.12	4.52 ± 0.63	3.98 ± 1.06	4.83 ± 1.73	3.32 ± 0.76*
好中球数 (10^3/μL ± SD)	1.27 ± 1.01	0.78 ± 0.23	0.91 ± 0.26	0.55 ± 0.10	0.74 ± 0.47	0.53 ± 0.04*
リンパ球数 (10^3/μL ± SD)	4.73 ± 1.68	4.20 ± 0.95	3.29 ± 0.31	3.18 ± 0.93	3.70 ± 1.10	2.53 ± 0.71*
好酸球数 (10^3/μL ± SD)	-	0.27 ± 0.10	-	0.14 ± 0.05*	-	0.13 ± 0.06*
血液生化学的検査 (Day 86)						
トリグリセリド (mg/dL ± SD)	141 ± 29	106 ± 37	77 ± 30**	83 ± 15	73 ± 16**	70 ± 18
血液尿素窒素 (mg/dL ± SD)	24 ± 3	22 ± 4	21 ± 2	16 ± 2*	19 ± 1**	15 ± 1**
剖検所見	-	-	-	-	-	-
器官重量	-	-	-	-	-	-
病理組織学的検査：発現動物数						
腎臓						
尿細管上皮好塩基性顆粒						
少数, 軽微	0	0	0	0	3	0
多巣性, 軽微	0	0	0	7	3	3
多巣性, 軽度	0	0	0	0	2	5

7.1　マウスを用いた 12 週間反復投与毒性試験（666853-AS02）（続き）

用量／週	0 (Control, Group 1)		12.5 mg/kg (Group 2)		75 mg/kg (Group 3)	
対照物質又は被験物質	注射用生理食塩液, USP		ISIS 666853		ISIS 666853	
動物数（合計）	雄：10	雌：10	雄：10	雌：10	雄：10	雌：10
試験終了時 (Day 86 剖検)	10	10	10	10	10	10
病理組織学的検査：発現動物数（続き）						
肝臓						
クッパ―細胞肥大						
少数, 軽微	0	0	1	0	4	7
限局性, 軽微	0	0	0	1	1	0
多巣性, 軽微	0	0	0	0	1	0
多巣性, 軽度	0	0	0	0	1	0
小肉芽腫						
少数, 軽微	0	0	0	1	1	0
限局性, 軽微	0	0	0	0	1	5
多巣性, 軽微	0	1	0	0	0	0
下顎リンパ節						
洞マクロファージ肥大						
少数, 軽微	0	0	4	0	2	3
多巣性, 軽微	0	0	2	0	5	5
多巣性, 軽度	0	0	0	0	2	2
多巣性, 中等度	0	0	0	0	1	0
腸間膜リンパ節						
洞マクロファージ肥大						
軽微	0	0	1	0	0	0
少数, 軽微	0	0	4	0	3	2
多巣性, 軽微	0	0	1	1	2	5
多巣性, 軽度	0	0	0	0	3	1
多巣性, 中等度	0	0	0	0	1	0

7.1　マウスを用いた 12 週間反復投与毒性試験（666853-AS02）（続き）

用量／週	0 (Control, Group 1)		12.5 mg/kg (Group 2)		75 mg/kg (Group 3)	
対照物質又は被験物質	注射用生理食塩液, USP		ISIS 666853		ISIS 666853	
動物数（合計）	雄：10	雌：10	雄：10	雌：10	雄：10	雌：10
試験終了時 (Day 86 剖検)	10	10	10	10	10	10
病理組織学的検査：発現動物数（続き）						
脾臓						
赤脾髄マクロファージ肥大						
多巣性, 軽微	0	1	0	0	3	3
多巣性, 軽度	0	0	0	0	5	4
多巣性, 中等度	0	0	0	0	1	0
ハーダー腺						
被膜マクロファージ肥大						
少数, 軽微	0	0	0	0	1	1
多巣性, 軽微	0	0	0	0	1	0
涙腺						
間質マクロファージ肥大						
少数, 軽微	0	0	4	3	2	4
多巣性, 軽微	0	0	2	0	7	4
多巣性, 軽度	0	0	0	0	0	1
舌						
間質マクロファージ肥大						
少数, 軽微	0	0	0	2	3	4
多巣性, 軽微	0	0	1	0	0	1

7.1　マウスを用いた 12 週間反復投与毒性試験（666853-AS02）（続き）

用量／週	0 (Control, Group 1)		12.5 mg/kg (Group 2)		75 mg/kg (Group 3)	
対照物質又は被験物質	注射用生理食塩液, USP		ISIS 666853		ISIS 666853	
動物数（合計）	雄：10	雌：10	雄：10	雌：10	雄：10	雌：10
試験終了時 (Day 86 剖検)	10	10	10	10	10	10
病理組織学的検査：発現動物数（続き）						
膵臓						
間質マクロファージ肥大						
少数, 軽微	0	0	6	3	2	0
多巣性, 軽微	0	0	2	1	4	4
多巣性, 軽度	0	0	0	0	0	1
唾液腺						
被膜マクロファージ肥大						
少数, 軽微	0	0	1	2	4	2
多巣性, 軽微	0	0	1	0	3	3
多巣性, 軽度	0	0	0	0	2	0
精巣						
間質マクロファージ肥大						
少数, 軽微	0	NA	1	NA	2	NA
多巣性, 軽微	0	NA	0	NA	6	NA
多巣性, 軽度	0	NA	0	NA	1	NA
精巣上体						
間質マクロファージ肥大						
少数, 軽微	0	NA	2	NA	4	NA
多巣性, 軽微	0	NA	0	NA	5	NA

7.1　マウスを用いた 12 週間反復投与毒性試験（666853-AS02）（続き）

用量／週	0 (Control, Group 1)		12.5 mg/kg (Group 2)		75 mg/kg (Group 3)	
対照物質又は被験物質	注射用生理食塩液, USP		ISIS 666853		ISIS 666853	
動物数（合計）	雄：10	雌：10	雄：10	雌：10	雄：10	雌：10
試験終了時 (Day 86 剖検)	10	10	10	10	10	10
病理組織学的検査：発現動物数（続き）						
前立腺						
間質マクロファージ肥大						
少数, 軽微	0	NA	0	NA	5	NA
多巣性, 軽微	0	NA	0	NA	3	NA
精嚢						
間質マクロファージ肥大						
少数, 軽微	0	NA	0	NA	3	NA
卵巣						
間質マクロファージ肥大						
少数, 軽微	NA	5	NA	8	NA	4
限局性, 軽微	NA	1	NA	0	NA	0
多巣性, 軽微	NA	1	NA	0	NA	6
卵管						
壁マクロファージ肥大						
少数, 軽微	NA	0	NA	3	NA	6
多巣性, 軽微	NA	0	NA	0	NA	2
子宮						
子宮筋層マクロファージ肥大						
少数, 軽微	NA	0	NA	2	NA	4
多巣性, 軽微	NA	0	NA	0	NA	6

7.1　マウスを用いた 12 週間反復投与毒性試験（666853-AS02）（続き）

用量／週	0 (Control, Group 1)		12.5 mg/kg (Group 2)		75 mg/kg (Group 3)	
対照物質又は被験物質	注射用生理食塩液, USP		ISIS 666853		ISIS 666853	
動物数（合計）	雄：10	雌：10	雄：10	雌：10	雄：10	雌：10
試験終了時 (Day 86 剖検)	10	10	10	10	10	10
病理組織学的検査：発現動物数（続き）						
子宮頸部						
壁マクロファージ肥大						
少数, 軽微	NA	0	NA	2	NA	8
多巣性, 軽微	NA	0	NA	0	NA	1
多巣性, 軽度	NA	0	NA	0	NA	1
膣						
壁マクロファージ肥大						
少数, 軽微	NA	0	NA	3	NA	6
乳腺						
間質マクロファージ肥大						
少数, 軽微	NA	0	NA	0	NA	1
多巣性, 軽微	NA	0	NA	0	NA	2
投与部位						
皮下マクロファージ肥大						
少数, 軽微	0	0	2	2	5	5
多巣性, 軽微	0	0	1	1	1	1
多巣性, 軽度	0	0	0	0	1	2

NA：該当なし、SD：標準偏差、-：特記すべき所見なし、*p < 0.05、**p < 0.01 (Dunnett 2 sided)
[a] すべての脳試料中濃度は定量下限未満。

7.2 マウスを用いた 26 週間反復投与毒性試験

試験表題：BIIB067: A GLP 26-Week Repeat Dose Toxicity Study when Administered by Subcutaneous Injection in CD-1 Mice with an 8-Week Recovery Period
被験物質：トフェルセン（BIIB067）
動物種／系統：Crl:CD1(ICR)マウス
投与期間：26 週間 (2 週間に 1 回、14 回投与)
試験番号：P067-[redacted]-03
試験開始週齢：10 週齢 (投与開始時)
休薬期間：8 週間
CTD における記載箇所：4.2.3.2-2
初回投与日：20[redacted] 年 [redacted] 月 [redacted] 日
投与方法：皮下
溶媒／投与形態：リン酸緩衝生理食塩液 (10 mM sodium phosphate, 144 mM sodium chloride, pH 7.4)／溶液
GLP 適用：適用
特記事項：なし
無毒性量：150 mg/kg/dose

用量 (mg/kg/dose)	0 (Control)		6		30		150	
動物数	雄：	雌：	雄：	雌：	雄：	雌：	雄：	雌：
主試験	15	15	15	15	15	15	15	15
回復性試験	5	5	5	5	5	5	5	5
トキシコキネティクス	12	12	33	33	33	33	33	33
血漿中トキシコキネティクス：								
$AUC_{0\text{-}24h}$ (µg*h/mL)								
Day 1	BLQ	BLQ	5.33	4.18	41.2	28.6	190	205
Day 183	BLQ	BLQ	9.87	9.18	51.1	57.0	405	356
C_{max} (µg/mL)								
Day 1	BLQ	BLQ	2.76	2.54	17.5	13.6	79.2	102
Day 183	BLQ	BLQ	4.21	6.16	19.3	21.9	114	136

7.2　マウスを用いた 26 週間反復投与毒性試験（P067-[redacted]-03）（続き）

用量 (mg/kg/dose)	0 (Control)		6		30		150	
動物数	雄：	雌：	雄：	雌：	雄：	雌：	雄：	雌：
主試験	15	15	15	15	15	15	15	15
回復性試験	5	5	5	5	5	5	5	5
トキシコキネティクス	12	12	33	33	33	33	33	33
特記すべき所見								
死亡／瀕死	0	0	1 [a]	3 [a]	1 [a]	1 [a]	1 [a]	2 [a]
体重 (Day 182) (%) [b]	48.73 g	46.79 g	-	-9.3	-	-	-	-11.3
体重増加量 (Day -1 to 182) (%) [b]	13.53 g	18.64 g	-	-23.2	-	-	-	-26.6
摂餌量	-	-	-	-	-	-	-	-
一般状態	-	-	-	-	-	-	-	-
眼科学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-
血液学的検査(Day 184) [g]								
赤血球数 (10^6/μL)	8.279	8.851	-	-	-	-	0.98	0.98
ヘモグロビン (g/dL)	12.45	13.56	-	-	-	-	0.94	0.95
ヘマトクリット (%)	40.55	43.59	-	-	-	-	0.94	0.95
平均赤血球容積 (fL)	49.10	49.29	-	-	-	-	0.95*[c]	0.97
平均赤血球血色素量 (pg)	15.09	15.34	-	-	-	-	0.95*[c]	0.97
赤血球分布幅 (%)	12.65	12.56	-	-	-	-	1.10**[c]	1.05*[c]
血小板数 (10^3/μL)	1310.5	1156.1	-	-	-	-	0.80**[c]	0.87
血液生化学的検査(Day 184) [g]								
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (U/L)	55.5	66.9	-	-	-	-	1.41*[c]	1.25*[c]
アラニンアミノトランスフェラーゼ (U/L)	26.3	31.1	-	-	-	-	1.84**[d]	1.43*[c]
グルコース (mg/dL)	203.5	230.0	-	-	-	0.89	0.85	0.81**[c]
アルブミン／グロブリン比	1.61	2.25	-	-	-	-	0.90	0.92
リン (mg/dL)	7.25	8.73	1.20	-	1.22	-	1.25	-

7.2 マウスを用いた 26 週間反復投与毒性試験（P067-[redacted]-03）（続き）

用量 (mg/kg/dose)	0 (Control)		6		30		150	
動物数	雄：	雌：	雄：	雌：	雄：	雌：	雄：	雌：
主試験	15	15	15	15	15	15	15	15
回復性試験	5	5	5	5	5	5	5	5
トキシコキネティクス	12	12	33	33	33	33	33	33
器官重量 (%) [b]								
脾臓								
絶対重量	0.11 g	0.13 g	-	-	-	-	+35.9*[e]	+35.8
対体重比	0.22%	0.29%	-	-	-	-	+36.9*[e]	+48.1**[f]
対脳重量比	20.59%	24.58%	-	-	-	-	+31.0	+36.6*[e]
胸腺								
絶対重量	0.02 g	0.03 g	-	-	-	-	-30.9	-33.0
対体重比	0.04%	0.06%	-	-	-	-	-32.2*[e]	-25.2
対脳重量比	3.50%	5.46%	-	-	-	-	-34.4*[e]	-32.5
剖検								
子宮頸部								
肥厚	NA	0	NA	0	NA	1	NA	2
腎臓								
淡色化	0	0	0	2	0	5	0	4
投与部位								
痂疲, 暗調	0	0	0	0	0	0	3	0
暗色巣	1	2	0	2	3	5	5	9
胸腺								
小型	1	0	2	0	1	2	7	2
病理組織学的検査 [h]								
脳								
マクロファージ空胞化	(0)	(0)	(0)	(0)	(5)	(9)	(15)	(13)
軽微	0	0	0	0	5	9	13	13
軽度	0	0	0	0	0	0	2	0
子宮頸部								
マクロファージ空胞化	NA	(0)	NA	(0)	NA	(0)	NA	(7)
軽微	NA	0	NA	0	NA	0	NA	5
軽度	NA	0	NA	0	NA	0	NA	2

7.2　マウスを用いた 26 週間反復投与毒性試験（P067-[redacted]-03）（続き）

用量 (mg/kg/dose)	0 (Control)		6		30		150	
動物数	雄：	雌：	雄：	雌：	雄：	雌：	雄：	雌：
主試験	15	15	15	15	15	15	15	15
回復性試験	5	5	5	5	5	5	5	5
トキシコキネティクス	12	12	33	33	33	33	33	33
病理組織学的検査[h]（続き）								
精巣上体								
マクロファージ空胞化	(0)	NA	(0)	NA	(13)	NA	(15)	NA
軽微	0	NA	0	NA	13	NA	1	NA
軽度	0	NA	0	NA	0	NA	14	NA
胆嚢								
マクロファージ空胞化	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)	(9)
軽微	0	0	0	0	0	0	2	9
副腎								
マクロファージ空胞化	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)	(0)
軽微	0	0	0	0	0	0	1	0
軽度	0	0	0	0	0	0	1	0
前立腺								
マクロファージ空胞化	(0)	NA	(0)	NA	(11)	NA	(15)	NA
軽微	0	NA	0	NA	11	NA	12	NA
軽度	0	NA	0	NA	0	NA	3	NA
唾液腺, 下顎								
マクロファージ空胞化	(0)	(0)	(0)	(2)	(5)	(6)	(13)	(14)
軽微	0	0	0	2	5	6	9	13
軽度	0	0	0	0	0	0	4	1
精嚢								
マクロファージ空胞化	(0)	NA	(0)	NA	(11)	NA	(15)	NA
軽微	0	NA	0	NA	11	NA	14	NA
軽度	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
甲状腺								
マクロファージ空胞化	(0)	(0)	(1)	(0)	(4)	(4)	(8)	(15)
軽微	0	0	1	0	4	4	8	15

7.2　マウスを用いた 26 週間反復投与毒性試験（P067-[redacted]-03）（続き）

用量 (mg/kg/dose)	0 (Control)		6		30		150	
動物数	雄：	雌：	雄：	雌：	雄：	雌：	雄：	雌：
主試験	15	15	15	15	15	15	15	15
回復性試験	5	5	5	5	5	5	5	5
トキシコキネティクス	12	12	33	33	33	33	33	33
病理組織学的検査[h]（続き）								
心臓								
マクロファージ空胞化	(0)	(0)	(0)	(0)	(10)	(7)	(15)	(14)
軽微	0	0	0	0	10	7	10	11
軽度	0	0	0	0	0	0	5	3
大腿脛骨関節								
マクロファージ空胞化	(0)	(0)	(0)	(0)	(6)	(11)	(14)	(15)
軽微	0	0	0	0	6	11	13	12
軽度	0	0	0	0	0	0	1	3
下垂体								
マクロファージ空胞化	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(4)	(7)
軽微	0	0	0	0	1	0	4	7
食道								
マクロファージ空胞化	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)	(3)	(10)
軽微	0	0	0	0	1	1	3	10
腎臓								
移行上皮細胞空胞化	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(9)	(5)
軽微	0	0	0	0	1	0	9	5
尿細管好塩基性顆粒	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(10)	(11)	(14)
軽微	0	0	0	0	1	10	10	10
軽度	0	0	0	0	0	0	1	4
盲腸								
マクロファージ空胞化	(0)	(0)	(0)	(0)	(7)	(15)	(11)	(15)
軽微	0	0	0	0	7	15	10	10
軽度	0	0	0	0	0	0	1	5
結腸								
マクロファージ空胞化	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(4)	(4)	(7)
軽微	0	0	0	0	1	4	4	7

7.2　マウスを用いた 26 週間反復投与毒性試験（P067-[redacted]-03）（続き）

用量 (mg/kg/dose)	0 (Control)		6		30		150	
動物数	雄：	雌：	雄：	雌：	雄：	雌：	雄：	雌：
主試験	15	15	15	15	15	15	15	15
回復性試験	5	5	5	5	5	5	5	5
トキシコキネティクス	12	12	33	33	33	33	33	33
病理組織学的検査[h]（続き）								
肝臓								
マクロファージ空胞化	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)	(12)	(15)
軽微	0	0	0	0	0	2	5	4
軽度	0	0	0	0	0	0	7	11
肺								
マクロファージ空胞化	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(12)
軽微	0	0	0	0	0	1	0	12
下顎リンパ節								
洞マクロファージ空胞化	(0)	(0)	(1)	(0)	(4)	(9)	(13)	(12)
軽微	0	0	1	0	4	9	8	11
軽度	0	0	0	0	0	0	5	1
腸間膜リンパ節								
洞マクロファージ空胞化	(0)	(0)	(0)	(0)	(4)	(3)	(15)	(15)
軽微	0	0	0	0	4	3	3	6
軽度	0	0	0	0	0	0	12	9
卵巣								
空胞化	NA	(0)	NA	(0)	NA	(4)	NA	(3)
軽微	NA	0	NA	0	NA	4	NA	0
軽度	NA	0	NA	0	NA	0	NA	3
膵臓								
マクロファージ空胞化	(0)	(0)	(0)	(0)	(10)	(12)	(15)	(15)
軽微	0	0	0	0	10	12	11	9
軽度	0	0	0	0	0	0	4	6

7.2　マウスを用いた 26 週間反復投与毒性試験（P067-[redacted]-03）（続き）

用量 (mg/kg/dose)	0 (Control)		6		30		150	
動物数	雄：	雌：	雄：	雌：	雄：	雌：	雄：	雌：
主試験	15	15	15	15	15	15	15	15
回復性試験	5	5	5	5	5	5	5	5
トキシコキネティクス	12	12	33	33	33	33	33	33
病理組織学的検査[h]（続き）								
投与部位								
出血	(2)	(1)	(0)	(2)	(4)	(4)	(5)	(7)
軽微	2	1	0	2	3	4	4	7
軽度	0	0	0	0	1	0	1	0
マクロファージ空胞化	(0)	(0)	(12)	(11)	(13)	(14)	(15)	(15)
軽微	0	0	10	11	6	8	4	6
軽度	0	0	2	0	6	6	4	9
中等度	0	0	0	0	1	0	7	0
皮膚, びらん／潰瘍	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(3)	(1)
軽微	0	0	0	0	0	0	0	1
軽度	0	0	0	0	0	0	1	0
中等度	0	0	0	0	0	0	2	0
皮下組織炎症, 混合細胞性	(1)	(5)	(2)	(3)	(2)	(5)	(7)	(3)
軽微	1	4	2	3	0	4	3	1
軽度	0	1	0	0	2	1	4	2
皮膚炎症, 混合細胞性	(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(2)	(0)
軽微	0	0	1	0	0	0	0	0
軽度	0	0	0	0	0	0	2	0
皮膚								
皮下組織,マクロファージ空胞化	(0)	(0)	(2)	(0)	(11)	(14)	(15)	(14)
軽微	0	0	1	0	4	11	2	3
軽度	0	0	1	0	6	3	7	10
中等度	0	0	0	0	1	0	6	1
脾臓								
マクロファージ空胞化	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(7)	(15)	(15)
軽微	0	0	0	0	1	7	1	2
軽度	0	0	0	0	0	0	14	13

7.2　マウスを用いた 26 週間反復投与毒性試験（P067-[redacted]-03）（続き）

用量 (mg/kg/dose)	0 (Control)		6		30		150	
動物数	雄：	雌：	雄：	雌：	雄：	雌：	雄：	雌：
主試験	15	15	15	15	15	15	15	15
回復性試験	5	5	5	5	5	5	5	5
トキシコキネティクス	12	12	33	33	33	33	33	33
病理組織学的検査[h]（続き）								
胃								
マクロファージ空胞化	(0)	(0)	(0)	(0)	(9)	(10)	(9)	(15)
軽微	0	0	0	0	9	10	7	9
軽度	0	0	0	0	0	0	2	6
精巣								
マクロファージ空胞化	(0)	NA	(0)	NA	(11)	NA	(15)	NA
軽微	0	NA	0	NA	10	NA	0	NA
軽度	0	NA	0	NA	1	NA	9	NA
中等度	0	NA	0	NA	0	NA	6	NA
胸腺								
リンパ球減少	(1)	(0)	(0)	(1)	(0)	(2)	(6)	(4)
軽微	1	0	0	1	0	1	6	4
軽度	0	0	0	0	0	1	0	0
気管								
マクロファージ空胞化	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)
軽微	0	0	0	0	0	0	0	1
膀胱								
マクロファージ空胞化	(0)	(0)	(0)	(0)	(4)	(7)	(12)	(15)
軽微	0	0	0	0	4	7	11	6
軽度	0	0	0	0	0	0	1	9
移行上皮細胞空胞化	(0)	(0)	(2)	(1)	(13)	(12)	(15)	(14)
軽微	0	0	2	1	11	11	0	1
軽度	0	0	0	0	2	1	15	13
膣								
マクロファージ空胞化	NA	(0)	NA	(0)	NA	(4)	NA	(15)
軽微	NA	0	NA	0	NA	4	NA	9
軽度	NA	0	NA	0	NA	0	NA	6

7.2　マウスを用いた 26 週間反復投与毒性試験（P067-[redacted]-03）（続き）

用量 (mg/kg/dose)	0 (Control)		6		30		150	
動物数	雄：	雌：	雄：	雌：	雄：	雌：	雄：	雌：
主試験	15	15	15	15	15	15	15	15
回復性試験	5	5	5	5	5	5	5	5
トキシコキネティクス	12	12	33	33	33	33	33	33
病理組織学的検査[h]（続き）								
子宮								
マクロファージ空胞化	NA	(0)	NA	(0)	NA	(10)	NA	(15)
軽微	NA	0	NA	0	NA	8	NA	1
軽度	NA	0	NA	0	NA	2	NA	13
中等度	NA	0	NA	0	NA	0	NA	1
回復性試験								
体重 (Day 238) (%)[b]	51.74 g	47.62 g	-	-10.0	-	-	-	-21.8
体重増加量 (Day 182 to 238) (%)[b]	0.46 g	4.08 g	-	-32.4	-	-	-	-77.2
血液学的検査 (Day 239)[g]								
赤血球分布幅 (%)	12.96	12.50	-	-	-	-	1.12**[c]	1.08
血小板数 ($10^3/\mu L$)	1304.2	1044.0	-	-	-	-	0.85	0.94
網状赤血球数 ($10^9/L$)	240.98	303.48	-	-	-	-	1.32*[d]	1.10
血液生化学的検査[g] (Day 239)								
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(U/L)	52.0	57.6	-	-	-	-	1.37	-
器官重量 (%)[b]								
胸腺								
絶対重量	0.02 g	0.03 g	-	-	-	-	-40.2	-21.8
対体重比	0.04%	0.06%	-	-	-	-	-43.2	-25.2
対脳重量比	4.46%	4.88%	-	-	-	-	-48.8	-23.0
剖検								
胸腺								
小型	0	0	1	0	1	0	3	1
病理組織学的検査[h]								
脳								
マクロファージ空胞化	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)
軽微	0	0	0	0	0	0	1	0

7.2　マウスを用いた 26 週間反復投与毒性試験（P067-[redacted]-03）（続き）

用量 (mg/kg/dose)	0 (Control)		6		30		150	
動物数	雄：	雌：	雄：	雌：	雄：	雌：	雄：	雌：
主試験	15	15	15	15	15	15	15	15
回復性試験	5	5	5	5	5	5	5	5
トキシコキネティクス	12	12	33	33	33	33	33	33
病理組織学的検査[h]（続き）								
精巣上体								
マクロファージ空胞化	(0)	NA	(0)	NA	(1)	NA	(5)	NA
軽微	0	NA	0	NA	1	NA	5	NA
前立腺								
マクロファージ空胞化	(0)	NA	(0)	NA	(0)	NA	(3)	NA
軽微	0	NA	0	NA	0	NA	3	NA
唾液腺, 下顎								
マクロファージ空胞化	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)
軽微	0	0	0	0	0	0	0	1
心臓								
マクロファージ空胞化	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)	(2)
軽微	0	0	0	0	0	0	2	2
肝臓								
クッパ―細胞空胞化	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(3)	(4)	(3)
軽微	0	0	0	0	0	2	4	3
軽度	0	0	0	0	0	1	0	0
腸間膜リンパ節								
マクロファージ空胞化	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(4)	(1)
軽微	0	0	0	0	0	0	4	1
膵臓								
マクロファージ空胞化	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(3)	(2)
軽微	0	0	0	0	0	0	3	2
投与部位								
マクロファージ空胞化	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)	(2)	(0)
軽微	0	0	0	0	1	1	2	0
皮膚								
皮下組織,マクロファージ空胞化	(0)	(0)	(0)	(0)	(3)	(1)	(4)	(3)
軽微	0	0	0	0	3	1	4	3

7.2　マウスを用いた 26 週間反復投与毒性試験（P067-[redacted]-03）（続き）

用量 (mg/kg/dose)	0 (Control)		6		30		150	
動物数	雄：	雌：	雄：	雌：	雄：	雌：	雄：	雌：
主試験	15	15	15	15	15	15	15	15
回復性試験	5	5	5	5	5	5	5	5
トキシコキネティクス	12	12	33	33	33	33	33	33
病理組織学的検査[h]（続き）								
脾臓								
マクロファージ空胞化	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(5)	(4)
軽微	0	0	0	0	0	0	4	3
軽度	0	0	0	0	0	0	1	1
精巣								
マクロファージ空胞化	(0)	NA	(0)	NA	(3)	NA	(5)	NA
軽微	0	NA	0	NA	3	NA	5	NA
胸腺								
リンパ球減少	(1)	(1)	(1)	(0)	(0)	NE	(2)	(1)
軽微	1	1	1	0	0	NE	1	0
軽度	0	0	0	0	0	NE	0	1
中等度	0	0	0	0	0	NE	1	0
膀胱								
移行上皮細胞空胞化	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)	(0)	(0)	(2)
軽微	0	0	0	0	2	0	0	2

-：異常なし、BLQ：定量下限 (0.0005 µg/mL) 未満、NA：該当なし、NE：非実施、$AUC_{0\text{-}24h}$：投与 0 時間から 24 時間後までの濃度時間曲線下面積、C_{max}：最高血中濃度

[a] 本試験では BIIB067 に関連した死亡は認められなかった。早期死亡例が 9 例（主試験動物 2 例、回復性試験動物 1 例、TK 試験動物 6 例）認められた。死亡例の剖検及び病理組織学的検査の結果から、いずれも偶発的又は事故による死亡と判断した。

[b] 対照群は平均値を示す。投与群は対照群との差を%で示す。

* 対照群との統計学的有意差を示す (*$p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; [c] Anova & Dunnett, [d] Kruskal Wallis & Dunn, [e] Dunn, [f] Dunnett)

[g] 対照群は平均値を示す。投与群は対照群の平均値の倍数(×)を示す。

[h] 括弧内の数値は発現動物数を示す。

7.3 カニクイザルを用いた 13 週間反復投与毒性試験

試験表題：A toxicity and pharmacokinetics study of ISIS 666853 in the cynomolgus monkey following repeat-dose intrathecal injection for 13-weeks with a 13-week recovery phase
被験物質：トフェルセン（ISIS 666853）
動物種／系統：カニクイザル
投与期間：13 週間
試験番号：666853-AS01
試験開始時年齢：2～3 歳
休薬期間：13 週間
CTD における記載箇所：4.2.3.2-4
初回投与日：20[redacted] 年 [redacted] 月 [redacted] 日
投与方法：腰椎髄腔内ボーラス投与
GLP 適用：適用
対照物質／投与形態：aCSF, 市販品 (Sigma Aldrich)／溶液
特記事項：Ethovision は投与期間前に使用した。本試験では Ethovision による評価は実施していない。
無毒性量：35 mg

用量 (mg)	0 (Control)		4		12		35		12 (TK group)	
動物数	雄：6	雌：6	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3	雄：7	雌：7	雄：8	雌：8
主試験 (Day 91)	4	4	3	3	3	3	5	5	-	-
回復性試験 (Day 175)	2	2	-	-	-	-	2	2	-	-
剖検 (Day 8)	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
剖検 (Day 35)	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
剖検 (Day 42)	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1
剖検 (Day 70)	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2
剖検 (Day 98)	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1
剖検 (Day 155)	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2
血漿中トキシコキネティクス (雌雄合算)										
C_{max} (ng/mL ± SD)										
Day 1	NA		2760 ± 1450		10800 ± 6070		35100 ± 11200		9660 ± 4360	
Day 84	NA		1010 ± 492		6860 ± 3270		26400 ± 15700		8480 ± 6570	
$AUC_{0\text{-}48h}$ (ng*h/mL ± SD)										
Day 1	NA		8500 ± 3020		46200 ± 13800		209000 ± 36300		48900 ± 14900	
Day 84	NA		6140 ± 2110		36000 ± 8630		175000 ± 42100		40100 ± 9310	

7.3　カニクイザルを用いた 13 週間反復投与毒性試験（666853-AS01）（続き）

用量 (mg)	0 (Control)		4		12		35		12 (TK group)	
動物数	雄：6	雌：6	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3	雄：7	雌：7	雄：8	雌：8
CSF 中濃度 (ng/mL) (雌雄合算)										
Day 1	NA		NA		NA		0.298 ± 0.429		0h NA 4h 481000 ± 460000 8h 84600 ± 150000 16h 6970 ± 5790 24h 7420 ± 7100 168h 19.3 ± 12.8	
Day 14	NA		3.98 ± 2.49		16.9 ± 8.11		27.1 ± 24.4		10.7 ± 9.00	
Day 28	NA		10.6 ± 6.23		35.6 ± 29.3		44.3 ± 31.2		0h 22.7 ± 9.14 168h 26.3 ± 8.67 336h 50.6 ± 32.6 1008h 14.2 ± 6.65 1680h 8.65 ± 4.71 3048h 2.94 ± 1.64	
Day 56	NA		12.0 ± 7.47		48.1 ± 49.3		54.0 ± 33.9		NA	
Day 84	NA		0h 10.8 ± 8.64 168h 19.6 ± 17.6		0h 43.0 ± 41.3 168h 95.0 ± 55.1		0h 75.3 ± 51.8 168h 163 ± 114 672h 96.5 ± 83.0 2184h 9.09 ± 2.78		NA	
投与前血漿中濃度 (ng/mL) (雌雄合算)										
Day 1	NA		NA		NA		NA		NA	
Day 14	NA		0.426 ± 0.339		1.67 ± 0.496		4.49 ± 1.29		2.11 ± 0.762	
Day 28	NA		0.576 ± 0.294		2.23 ± 0.447		6.08 ± 2.23		3.53 ± 1.08	
Day 56	NA		0.183 ± 0.285		1.55 ± 0.53		6.67 ± 2.87		NA	
Day 84	NA		0.292 ± 0.497		414 ± 999[a]		9.32 ± 8.76		NA	

7.3　カニクイザルを用いた 13 週間反復投与毒性試験（666853-AS01）（続き）

用量 (mg)	0 (Control)		4		12		35		12 (TK group)	
動物数	雄：6	雌：6	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3	雄：7	雌：7	雄：8	雌：8
組織中濃度 (雌雄合算)										
トキシコキネティクス – 組織										
脳 小脳 (ng/g) – Day 1	NA		NA		NA		NA		9640 ± 4400	
脳 皮質 (ng/g) – Day 1	NA		NA		NA		NA		13600 ± 8900	
脳 海馬 (ng/g) – Day 1	NA		NA		NA		NA		20000 ± 18900	
脳 橋 (ng/g) – Day 1	NA		NA		NA		NA		4160 ± 1550	
頸部脊髄 (ng/g) – Day 1	NA		NA		NA		NA		7520 ± 2690	
胸部脊髄 (ng/g) – Day 1	NA		NA		NA		NA		13600 ± 3080	
腰部脊髄 (ng/g) – Day 1	NA		NA		NA		NA		14500 ± 139	
腎臓皮質 (ng/g) – Day 1	NA		NA		NA		NA		203000 ± 4150	
肝臓 (ng/g) – Day 1	NA		NA		NA		NA		42300 ± 17900	
脳 小脳 (ng/g) – Day 28	NA		NA		NA		NA		168h 15800 ± 12800 336h 10300 ± 9980 1008h 15300 ± 11000 1680h 11400 ± 10500 3048h 2420 ± 364	
脳 皮質 (ng/g) – Day 28	NA		NA		NA		NA		168h 15000 ± 14300 336h 11500 ± 11200 1008h 11800 ± 8390 1680h 8120 ± 8060 3048h 2090 ± 386	
脳 海馬 (ng/g) – Day 28	NA		NA		NA		NA		168h 11300 ± 8450 336h 4570 ± 4010 1008h 11000 ± 8670 1680h 3170 ± 2360 3048h 2150 ± 791	
脳 橋 (ng/g) – Day 28	NA		NA		NA		NA		168h 6150 ± 1270 336h 5960 ± 6150 1008h 3930 ± 2320 1680h 3410 ± 2260 3048h 651 ± 58.2	

7.3　カニクイザルを用いた 13 週間反復投与毒性試験（666853-AS01）（続き）

用量 (mg)	0 (Control)		4		12		35		12 (TK group)	
動物数	雄：6	雌：6	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3	雄：7	雌：7	雄：8	雌：8
トキシコキネティクス – 組織（続き）										
頸部脊髄 (ng/g) – Day 28	NA		NA		NA		NA		168h 10100 ± 4120 336h 8980 ± 5020 1008h 8130 ± 4290 1680h 5520 ± 2120 3048h 1790 ± 528	
胸部脊髄 (ng/g) – Day 28	NA		NA		NA		NA		168h 24700 ± 2930 336h 20700 ± 6850 1008h 13900 ± 5600 1680h 11000 ± 3460 3048h 2730 ± 611	
腰部脊髄 (ng/g) – Day 28	NA		NA		NA		NA		168h 21400 ± 9130 336h 31200 ± 11600 1008h 23500 ± 11200 1680h 15500 ± 2560 3048h 4840 ± 982	
腎臓皮質 (ng/g) – Day 28	NA		NA		NA		NA		168h 189000 ± 65500 336h 122000 ± 71200 1008h 30600 ± 13800 1680h 18200 ± 9380 3048h 2400 ± 364	
肝臓 (ng/g) – Day 28	NA		NA		NA		NA		168h 52900 ± 9630 336h 62300 ± 37100 1008h 7420 ± 6550 1680h 1060 ± 654 3048h 310 ± 253	
脳 小脳 (ng/g) – Day 84	NA		7190 ± 3320		21200 ± 15300		168h 65700 ± 29100 2184h 12400 ± 1870		NA	
脳 皮質 (ng/g) – Day 84	NA		7170 ± 5020		34200 ± 19300		168h 76600 ± 31300 2184h 14900 ± 7650		NA	
脳 海馬 (ng/g) – Day 84	NA		5980 ± 3630		18100 ± 14600		168h 49900 ± 18600 2184h 9520 ± 3030		NA	
脳 橋 (ng/g) – Day 84	NA		5060 ± 2630		11500 ± 3930		168h 27200 ± 8900 2184h 5590 ± 708		NA	

7.3　カニクイザルを用いた 13 週間反復投与毒性試験（666853-AS01）（続き）

用量 (mg)	0 (Control)		4		12		35		12 (TK group)	
動物数	雄：6	雌：6	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3	雄：7	雌：7	雄：8	雌：8
トキシコキネティクス – 組織（続き）										
頸部脊髄 (ng/g) – Day 84	NA		7650 ± 3760		23200 ± 11400		168h 50100 ± 18900 2184h 8750 ± 2820		NA	
胸部脊髄 (ng/g) – Day 84	NA		14900 ± 6660		32200 ± 10000		168h 68800 ± 21900 2184h 11400 ± 4420		NA	
腰部脊髄 (ng/g) – Day 84	NA		20700 ± 5940		49700 ± 12100		168h 101000 ± 25000 2184h 19200 ± 2660		NA	
腎臓皮質 (ng/g) – Day 84	NA		93300 ± 23500		178000 ± 35700		168h 329000 ± 76500 2184h 13800 ± 9830		NA	
肝臓 (ng/g) – Day 84	NA		10200 ± 5790		50400 ± 10200		168h 144000 ± 46000 2184h 3200 ± 2130		NA	
補体 Bb 平均濃度										
Day 1, 投与前	1		1		1		1		NA	
Day 84, 投与前	0.802		1.180		1.034		1.093		NA	
Day 1, 4h	1.388		1.076		1.329		1.898		NA	
Day 84, 4h	1.068		1.287		1.284		1.807		NA	
Day 1, 24h	1.020		1.124		1.380		1.669		NA	
Day 84, 24h	1.035		1.202		1.483		1.475		NA	
CSF ヘモグロビン分析、CSF バイオマーカー分析										
SOD1 protein % (d91/d0)	NA		20.84↓		38.07↓		45.77↓		NA	
SOD1 protein % (d175/d0)	2.46↑		NA		NA		36.73↓		NA	
死亡・瀕死	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
一般状態	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
体重	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
摂餌量	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
身体検査	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	NA
神経学的検査	両側性又は片側性の膝蓋腱反射の低下又は消失が一部の動物でみられたが、投与前及び投与中に発現し、被験物質及び対照物質投与動物にも認められた。さらに、これらは一過性の事象であった。								NA	NA
一過性の活動性低下	-	-	-	-	-	-	-	2	NA	NA
全身性の軽度振戦	-	-	-	-	-	-	-	1	NA	NA
跛行	-	-	-	-	-	-	-	1	NA	NA
神経行動評価	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	NA
眼科学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	NA
心電図検査	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	NA

7.3　カニクイザルを用いた 13 週間反復投与毒性試験（666853-AS01）（続き）

用量 (mg)	0 (Control)		4		12		35		12 (TK group)	
動物数	雄：6	雌：6	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3	雄：7	雌：7	雄：8	雌：8
血圧測定	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	NA
尿検査	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	NA
血液学的検査, Day 86										
赤血球数	軽度↓	軽度↓	軽度↓	軽度↓	軽度↓	軽度↓	軽度↓	軽度↓	NA	NA
ヘモグロビン	軽度↓	軽度↓	軽度↓	軽度↓	軽度↓	軽度↓	軽度↓	軽度↓	NA	NA
ヘマトクリット	軽度↓	軽度↓	軽度↓	軽度↓	軽度↓	軽度↓	軽度↓	軽度↓	NA	NA
網状赤血球数	軽度↑	軽度↑	軽度↑	軽度↑	軽度↑	軽度↑	軽度↑	軽度↑	NA	NA
血液生化学的検査, Day 86										
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ	-	-	-	-	-	-	-	3↑	NA	NA
凝固系検査	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	NA
CSF 生化学的検査, Day 91										
総タンパク	-	-	-	-	2↑	2↑	7↑	2↑	NA	NA
アルブミン	-	-	-	-	2↑	2↑	7↑	2↑	NA	NA
血液ガス	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	NA
主試験										
評価動物数	4	4	3	3	3	3	5	5	NA	NA
器官重量	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	NA
剖検	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	NA
病理組織学的検査										
脳										
神経細胞空胞化	-	-	-	1	2	-	4	4	NA	NA
腰部脊髄	-	-	腰部脊髄（IT ボーラス投与部位）の硬膜外、硬膜内／髄膜に炎症性細胞浸潤が認められた。軽微から中等度の単核細胞（主にリンパ球及びマクロファージ）浸潤であり、髄膜に限定されていた。脊髄実質には炎症性細胞浸潤及びグリア細胞の反応は認められなかった。							
リンパ節										
組織球／マクロファージの空胞化及び肥大	-	-	-	1	散発的	-	4	4	NA	NA
回復性試験										
評価動物数	2	2	NA	NA	NA	NA	2	2	NA	NA
器官重量	-	-	NA	NA	NA	NA	-	-	NA	NA
剖検	-	-	NA	NA	NA	NA	-	-	NA	NA

7.3　カニクイザルを用いた 13 週間反復投与毒性試験（666853-AS01）（続き）

用量 (mg)	0 (Control)		4		12		35		12 (TK group)	
動物数	雄：6	雌：6	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3	雄：7	雌：7	雄：8	雌：8
病理組織学的検査										
脳										
血管周囲組織球空胞化	-	-	NA	NA	NA	NA	-	1	NA	NA
腰部脊髄										
炎症細胞浸潤	-	-	NA	NA	NA	NA	1	1	NA	NA
神経細胞空胞化	-	-	NA	NA	NA	NA	-	1	NA	NA
リンパ節	回復性試験群の雌雄で類洞空胞化組織球の肥大が様々なリンパ節で認められた。									

-：特記すべき所見なし、NA：該当なし

[a] 動物番号 19288 の投与前及び投与 1 時間後の測定値は同群のほかの動物とは一貫性がない濃度であった。

7.4 カニクイザルを用いた９ヵ月間反復投与毒性試験

試験表題：A toxicity and pharmacokinetics study in the cynomolgus monkey following repeat-dose intrathecal injection of BIIB067 for 9 months with a 6-month recovery phase
被験物質：トフェルセン（BIIB067）
動物種／系統：カニクイザル
投与期間：9 ヵ月間
試験番号：P067-[redacted]-01
試験開始時年齢：2～4 歳
休薬期間：6 ヵ月間
CTD における記載箇所：4.2.3.2-5
初回投与日：20[redacted] 年 [redacted] 月 [redacted] 日
投与方法：腰椎髄腔内ボーラス投与
GLP 適用：適用
対照物質／投与形態：aCSF／溶液
特記事項：なし
無毒性量：12 mg

用量 (mg/animal)	0 (Control)		4		12		35	
動物数	雄：4	雌：4	雄：4	雌：4	雄：4	雌：4	雄：10	雌：10
トキシコキネティクス – 血漿								
Day 1								
C_{max} (ng/mL)	-		1250 ± 327		11600 ± 4240		29100 ± 10600	
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng*h/mL)	-		6260 ± 1160		45100 ± 13900		159000 ± 30300	
Day 253								
C_{max} (ng/mL)	-		995 ± 276		4840 ± 2370		36800 ± 19900	
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng*h/mL)	-		7730 ± 3390		30000 ± 11100		179000 ± 67700	
トキシコキネティクス – CSF								
Day 1								
CSF 中 BIIB067 濃度 (ng/mL)	-		BLQ		BLQ		1.09 ± 1.92	
Day 253								
CSF 中 BIIB067 濃度 (ng/mL)	-		14.3 ± 4.62		33.4 ± 21.2		76.4 ± 73.7	

7.4　カニクイザルを用いた 9 ヵ月間反復投与毒性試験（P067-[redacted]-01）（続き）

用量 (mg/animal)	0 (Control)		4		12		35	
動物数	雄：4	雌：4	雄：4	雌：4	雄：4	雌：4	雄：10	雌：10
トキシコキネティクス – 組織								
脳 小脳	-		6550 ± 4430		20500 ± 12800		33500 ± 22100	
脳 皮質	-		7430 ± 4590		27800 ± 16400		39100 ± 27400	
脳 海馬	-		4590 ± 2890		13200 ± 9350		24300 ± 15500	
脳 髄質	-		4560 ± 2510		11700 ± 5580		21000 ± 15700	
頸部脊髄	-		7900 ± 3930		17000 ± 8940		32800 ± 20600	
胸部脊髄	-		13600 ± 7840		28800 ± 14900		53000 ± 33300	
腰部脊髄	-		23100 ± 8180		44400 ± 15300		110000 ± 63100	
肝臓	-		4690 ± 2790		29800 ± 21000		92700 ± 54800	
腎臓	-		57100 ± 19600		67600 ± 14600		219000 ± 91500	
	-		CSF からの急速な初期クリアランスは、CNS 組織への BIIB067 の広範な取り込みと血漿への移行に相当しており、その後、腎皮質及び肝組織に取り込まれ、BIIB067 の最高濃度は腎皮質で認められた。CNS では、最高濃度は脊髄で認められ、脳組織間の濃度は類似していた。BIIB067 の血漿中及び組織中濃度評価の結果、全般に TK 及び生体内分布に雌雄差は認められなかった。					
主試験成績								
死亡状況	-	-	-	-	-	1#	-	1##
一般状態	-	-	-	-	-	-	-	##
体重	-	-	-	-	-	-	-	-
摂餌量	-	-	-	-	-	-	-	-
身体検査	-	-	-	-	-	-	-	-
神経学的検査								
一過性の膝蓋腱反射又は足の把握反射（片側性又は両側性）の消失	-	-	-	-	-	-	所見あり	所見あり
神経行動評価	-	-	-	-	-	-	-	-
体温	-	-	-	-	-	-	-	-
眼科学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-
心電図検査	-	-	-	-	-	-	-	-
血圧	-	-	-	-	-	-	-	-
脳波検査	-	-	-	-	-	-	-	-
血液学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-
血液凝固系検査	-	-	-	-	-	-	-	-
血液生化学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-

7.4　カニクイザルを用いた 9 ヵ月間反復投与毒性試験（P067-[redacted]-01）（続き）

用量 (mg/animal)	0 (Control)		4		12		35	
動物数	雄：4	雌：4	雄：4	雌：4	雄：4	雌：4	雄：10	雌：10
尿検査	-	-	-	-	-	-	-	-
CSF 生化学的検査								
総タンパク	-	-	↑+	-	↑++*	↑	↑+++***	↑
ミクロアルブミン	-	-	↑+	-	↑++*	↑	↑+++***	↑
CSF 総細胞数								
白血球数	-	-	↑	↑	↑	↑	↑	↑
赤血球数	-	-	↑	↑	↑	↑	↑	↑
血漿中補体分析	-	-	-	-	-	-	-	-
中間試験								
評価動物数	NA	NA	NA	NA	NA	NA	4	4
器官重量	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-	-
剖検	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-	-
病理組織学的検査								
脳								
神経細胞大滴性空胞化								
軽微	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2	1
軽度	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	2
神経細胞小滴性空胞化								
軽微	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	1
マクロファージ空胞化								
軽微	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2	1
軽度	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2	1
髄膜マクロファージ空胞化								
軽微	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2	1
マクロファージ色素沈着								
軽微	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	0
髄膜単核細胞浸潤								
軽微	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	1
軽度	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2	3
血管周囲細胞浸潤								
軽微	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2	0
軽度	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	2

7.4　カニクイザルを用いた 9 ヵ月間反復投与毒性試験（P067-[redacted]-01）（続き）

用量 (mg/animal)	0 (Control)		4		12		35	
動物数	雄：4	雌：4	雄：4	雌：4	雄：4	雌：4	雄：10	雌：10
脳（続き）								
髄膜細胞増加								
軽微	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	0
軽度	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0	3
頸部脊髄								
単核細胞浸潤								
軽微	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	2
胸部脊髄								
神経細胞小滴性空胞化								
軽微	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	0
単核細胞浸潤								
軽微	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	1
腰部脊髄								
神経細胞小滴性空胞化								
軽微	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	2
単核細胞浸潤								
軽度	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	0
中等度	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0	1
脊髄神経根								
単核細胞浸潤								
軽微	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2	2
軽度	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	2
下顎リンパ節								
マクロファージ空胞化								
軽微	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2	2
腸間膜リンパ節								
マクロファージ空胞化								
軽微	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0	3
軽度	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3	1
腋窩リンパ節								
マクロファージ空胞化								
軽微	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2	2
軽度	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	1

7.4　カニクイザルを用いた 9 ヵ月間反復投与毒性試験（P067-[redacted]-01）（続き）

用量 (mg/animal)	0 (Control)		4		12		35	
動物数	雄：4	雌：4	雄：4	雌：4	雄：4	雌：4	雄：10	雌：10
鼠径リンパ節								
マクロファージ空胞化								
軽微	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	3
軽度	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2	1
電子顕微鏡検査								
海馬								
細胞質内空胞 – 単一, 大型	NA	NA	NA	NA	NA	NA	所見あり	所見あり
神経細胞-小型の細胞質内単膜結合構造	NA	NA	NA	NA	NA	NA	所見あり	所見あり
血管周囲空胞化マクロファージ-多数の細胞質内単膜結合構造	NA	NA	NA	NA	NA	NA	所見あり	所見あり
腰部脊髄								
血管周囲空胞化マクロファージ-多数の細胞質内単膜結合構造	NA	NA	NA	NA	NA	NA	所見あり	所見あり
上衣上皮細胞 – 単膜結合空胞	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-	所見あり
主試験								
評価動物数	4	4	4	4	4	3	4	4
器官重量	-	-	-	-	-	-	-	-
剖検	-	-	-	-	-	-	-	-
病理組織学的検査								
脳								
神経細胞大滴性空胞化								
軽微	0	0	1	3	1	1	1	0
軽度	0	0	0	0	0	0	0	2
神経細胞小滴性空胞化								
軽微	0	0	0	0	1	0	0	2
軽度	0	0	0	0	0	1	1	1
中等度	0	0	0	0	0	0	1	1
マクロファージ空胞化								
軽微	0	0	1	4	4	2	1	0
軽度	0	0	0	0	0	0	0	3
中等度	0	0	0	0	0	0	1	1

7.4　カニクイザルを用いた 9 ヵ月間反復投与毒性試験（P067-[redacted]-01）（続き）

用量 (mg/animal)	0 (Control)		4		12		35	
動物数	雄：4	雌：4	雄：4	雌：4	雄：4	雌：4	雄：10	雌：10
髄膜マクロファージ空胞化								
軽微	0	0	4	2	3	3	3	1
軽度	0	0	0	0	0	0	1	2
中等度	0	0	0	0	0	0	0	1
マクロファージ色素沈着								
軽微	0	0	0	1	1	1	2	2
髄膜単核細胞浸潤								
軽微	1	0	2	4	1	0	3	1
軽度	0	0	2	0	2	3	1	3
血管周囲細胞浸潤								
軽微	0	0	2	2	1	0	1	2
軽度	0	0	1	0	1	1	0	0
髄膜細胞増加								
軽度	0	0	1	0	1	0	0	1
頸部脊髄								
神経細胞小滴性空胞化								
軽微	0	0	0	0	0	1	1	1
軽度	0	0	0	0	0	0	0	3
単核細胞浸潤								
軽微	0	0	3	1	0	3	0	2
軽度	0	0	0	0	1	0	0	0
中等度	0	0	0	0	1	0	0	0
血管周囲細胞浸潤								
軽微	0	0	1	0	0	0	0	0
マクロファージ空胞化								
軽微	0	0	0	0	1	0	0	0
胸部脊髄								
神経細胞小滴性空胞化								
軽微	0	0	0	0	0	1	0	0
軽度	0	0	0	0	0	0	2	4

7.4　カニクイザルを用いた 9 ヵ月間反復投与毒性試験（P067-[redacted]-01）（続き）

用量 (mg/animal)	0 (Control)		4		12		35	
動物数	雄：4	雌：4	雄：4	雌：4	雄：4	雌：4	雄：10	雌：10
単核細胞浸潤								
軽微	0	0	2	2	0	1	0	1
軽度	0	0	0	0	1	0	0	0
中等度	0	0	0	0	1	0	0	0
血管周囲細胞浸潤								
軽微	0	0	1	0	0	0	0	0
腰部脊髄								
神経細胞小滴性空胞化								
軽微	0	0	0	0	2	2	1	1
軽度	0	0	0	0	1	0	2	3
単核細胞浸潤								
軽微	1	0	2	2	2	0	3	1
軽度	0	0	1	0	2	2	0	2
血管周囲細胞浸潤								
軽微	0	0	1	0	0	0	1	0
マクロファージ空胞化								
軽微	0	0	0	0	0	1	2	2
軽度	0	0	0	0	0	1	0	0
脊髄神経根								
単核細胞浸潤								
軽微	1	1	1	3	0	0	3	1
軽度	0	0	2	0	1	2	1	2
中等度	0	0	0	0	1	1	0	0
マクロファージ空胞化								
軽微	0	0	0	0	0	0	1	1
軽度	0	0	0	0	0	0	1	2
下顎リンパ節								
マクロファージ空胞化								
軽微	0	0	0	0	0	0	0	3
軽度	0	0	0	0	0	0	2	0

7.4　カニクイザルを用いた 9 ヵ月間反復投与毒性試験（P067-[redacted]-01）（続き）

用量 (mg/animal)	0 (Control)		4		12		35	
動物数	雄：4	雌：4	雄：4	雌：4	雄：4	雌：4	雄：10	雌：10
腸間膜リンパ節								
マクロファージ空胞化								
軽微	0	0	0	0	0	0	1	1
軽度	0	0	0	0	0	0	2	1
腋窩リンパ節								
マクロファージ空胞化								
軽微	0	0	0	0	0	0	1	0
軽度	0	0	0	0	0	0	2	4
鼠径リンパ節								
マクロファージ空胞化								
軽微	0	0	0	0	0	1	0	1
軽度	0	0	0	0	0	0	3	3
回復性試験								
評価動物数	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2	2
器官重量	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-	-
剖検	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-	-
病理組織学的検査								
脳								
神経細胞大滴性空胞化								
軽微	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	0
神経細胞小滴性空胞化								
軽微	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	0
軽度	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	1
マクロファージ空胞化								
軽微	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2	1
髄膜マクロファージ空胞化								
軽微	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	0
髄膜単核細胞浸潤								
軽微	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	2
軽度	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	0
血管周囲細胞浸潤								
軽微	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0	1

7.4　カニクイザルを用いた 9 ヵ月間反復投与毒性試験（P067-[redacted]-01）（続き）

用量 (mg/animal)	0 (Control)		4		12		35	
動物数	雄：4	雌：4	雄：4	雌：4	雄：4	雌：4	雄：10	雌：10
頸部脊髄								
神経細胞小滴性空胞化								
軽微	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	0
軽度	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	1
単核細胞浸潤								
軽微	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	0
胸部脊髄								
神経細胞小滴性空胞化								
軽度	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2	2
単核細胞浸潤								
軽微	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	1
腰部脊髄								
神経細胞小滴性空胞化								
軽度	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2	1
中等度							0	1
単核細胞浸潤								
軽微	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2	2
マクロファージ空胞化								
軽微	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0	1
軽度	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	0
脊髄神経根								
単核細胞浸潤								
軽微	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	0
軽度	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	2
腸間膜リンパ節								
マクロファージ空胞化								
軽度	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	0
腋窩リンパ節								
マクロファージ空胞化								
軽微	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0	2

7.4　カニクイザルを用いた 9 ヵ月間反復投与毒性試験（P067-[redacted]-01）（続き）

用量 (mg/animal)	0 (Control)		4		12		35	
動物数	雄：4	雌：4	雄：4	雌：4	雄：4	雌：4	雄：10	雌：10
鼠径リンパ節								
マクロファージ空胞化								
軽微	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-	1
電子顕微鏡検査								
海馬								
神経細胞-小型の細胞内単膜結合構造	NA	NA	NA	NA	NA	NA	所見あり	所見あり
血管周囲空胞化マクロファージ-多数の細胞質内単膜結合構造	NA	NA	NA	NA	NA	NA	所見あり	所見あり
腰部脊髄								
血管周囲空胞化マクロファージ-多数の細胞質内単膜結合構造	NA	NA	NA	NA	NA	NA	所見あり	所見あり
特殊検査								
組織中 SOD1 mRNA 分析	-	-	投与した動物の CNS 組織中 SOD1 mRNA が低下し、6 ヵ月の休薬後にベースライン値に復帰したことから、BIIB067 はカニクイザルに薬理活性を示すことが確認された。					
CSF 中 SOD1 タンパク分析	-	-	複数の用量群から採取した CSF のスーパーオキサイドジスムターゼ 1 (SOD1) タンパク質分析の結果、用量依存的な SOD1 タンパク質濃度の低下が認められた。このことから、BIIB067はカニクイザルに薬理作用を有することが示された。回復性試験では、SOD1 タンパク濃度の休薬後の回復が認められた。					

-：特記すべき所見なし、+： 軽度、++：中等度、+++：高度、NA：該当なし
*p≤0.05、*** p≤0.001 (ANOVA & Dunnett's, Rank-transformed data)

7.4　カニクイザルを用いた 9 ヵ月間反復投与毒性試験（P067-[redacted]-01）（続き）

用量 (mg/animal)	0 (Control)		4		12		35	
動物数	雄：4	雌：4	雄：4	雌：4	雄：4	雌：4	雄：10	雌：10

[#] 12 mg 群の雌 1 例（動物番号 70130F）は、大腿骨の開放性脱臼を伴う骨端骨折のため、投与期間中 Day 64 に瀕死状態となり安楽死させた。この損傷に関連した臨床検査値の変化として、炎症に一致する好中球絶対数の中等度増加、脱水に一致するクレアチニン及び尿素の増加が認められた。剖検では、骨折間隙内の顕著な出血及び中等度の急性炎症を伴う骨端成長板の骨折が認められた。骨折は事故によるものであったため、この症例は被験物質とは関連なしと判断された。

[##] 動物番号 70148F では、投与開始前及び Day 1 の初回投与後（麻酔用のケタミン及びドミトール投与、髄腔内試料採取及び投与終了後の解毒用のアチパメゾール投与を要した）に所見はなかった。Day 15 の 2 回目投与後の解毒剤投与後、髄腔内投与の覚醒期に頸部及び背部の筋痙攣が認められた。動物は覚醒用ケージ内で横臥時に、頭部を後方に反らして後弓反張様姿勢を示したが、呼吸及び瞳孔径は正常に見えた。獣医師の指示により低用量のジアゼパムを投与した結果、この処置により症状が緩和した。その後、一過性の後肢の運動制限が観察された。投与後には軽度の活動性低下及び腹臥位がみられ、獣医診察では肛門反射及び両側性の足の把握反射の一過性の低下が認められた。Day 29 の 3 回目投与後、投与後の麻酔覚醒中に、振戦を伴う筋痙攣（頸部及び背部の筋肉：後弓反張様姿勢）が認められた。獣医師の指示により、ジアゼパム投与を行った結果、症状が緩和した。その後、この日に一過性の後肢の運動制限が観察された。Day 57 の 4 回目投与後、解毒剤投与が麻酔開始 35 分後にわずかに遅れた（eNote の計画及び記録による）。しかし、投与後の麻酔からの覚醒中に、振戦を伴う筋痙攣（頸部及び背部の筋肉：後弓反張様姿勢）が観察された。獣医師の指示によりジアゼパム投与した結果、症状は緩和した。この日に一過性の後肢の運動制限が観察された。Day 85 の 5 回目投与後、投与後の覚醒時に筋痙攣（頸部及び背部の筋肉：後弓反張様姿勢）及び身震いが認められた。ジアゼパム投与により症状は緩和され、投与後に一過性の後肢の運動制限が観察された。Day 113 の投与前の詳細な状態観察中に、後肢に軽度の振戦が認められた。Day 113 の 6 回目投与では、ケタミン及びメデトミジン投与による麻酔が不完全であった。獣医師の指示により、髄腔内投与できるようにするために、低用量のジアゼパム投与により鎮静させた。解毒剤は投与しなかった。このとき、投与後覚醒まで筋痙攣は認められなかった。投与直後に、軽度で一過性の後肢の運動制限が観察された。Day 141 の 7 回目投与では、計画された解毒剤の投与は行わず、eNote に記録した。このとき、ビデオ録画（文書化の補助／参照用）を含む詳細な状態観察を行い、ジアゼパム投与は行わなかった。覚醒までの観察期間中に、筋痙攣（頸部及び背部の筋肉：後弓反張様姿勢、一過性、数秒から数分）及び後肢の振戦が複数回観察された。その後、ケージ内で一過性の後肢の運動制限が認められた。Day 169 の 8 回目投与後、解毒剤は投与しなかった（計画及び逸脱について記録した）。代わりに、見込まれる症状の緩和を目的として、投与直後にジアゼパムの予防的投与を行った。しかし、投与後、後弓反張様姿勢での横臥（背部及び頸部の筋肉の一過性であるが持続的な強直性筋痙攣）、筋痙攣、全身性振戦、及び後肢の間欠性振戦が観察された。Day 197 の投与前の詳細な状態観察中、脚の軽度の振戦が認められた。Day 197 の 9 回目投与後、解毒剤は投与しなかったが、投与終了直後にジアゼパムの予防的投与を行った。しかし、覚醒までの観察中に、筋痙攣（頸部及び背部の筋肉：後弓反張様姿勢、一過性）及び下肢の振戦が複数回認められた。その後、ケージ内で後肢の運動制限が観察されたが、一過性であり 48 時間後に緩和した。投与期間の Day 202 から剖検まで、軽度の間欠性振戦が観察された。Day 225 の 10 回目投与後、解毒剤は投与しなかったが、投与終了直後にジアゼパムの予防的投与を行った。しかし、覚醒までの観察中に、筋痙攣（頸部及び背部の筋肉：後弓反張様姿勢、一過性）及び後肢の振戦が観察され、両後肢の運動不能も観察された。Day 253 の最後（11 回目）の投与では、投与のための鎮静前に EEG 検査を行った。CSF 採取及び投与後に、動物の覚醒後であったが、対照群との適切な比較を行うため、（メデトミジン作用を軽減する）解毒剤を投与した。EEG 検査のために動物を保定していたため、投与後の状態観察は限定的であった。しかし、振戦及び頸部の筋痙攣が認められた。

8 *In Vitro* 遺伝毒性試験

8.1 細菌を用いた復帰突然変異試験

試験表題：ISIS 666853: Bacterial Reverse Mutation Assay
試験の種類：細菌を用いた復帰突然変異試験
系統：*Salmonella typhimurium* (TA1535, TA1537, TA98, TA100) 及び *Escherichia coli* (WP2*uvrA*)
代謝活性化系：Aroclor 1254 誘導ラット肝臓 S9mix (cofactor: S9 画分=9:1 [v/v])
独立した試験数：1
同型培養数：4 plates
分析細胞数／培養：NA
被験物質：トフェルセン（ISIS 666853）
試験番号：666853-IS01
CTD における記載箇所：4.2.3.3.1-1
GLP 適用：適用
試験開始日：20[redacted] 年 [redacted] 月 [redacted] 日

溶媒：被験物質：蒸留水 (DW)、陽性対照：DMSO (2-nitrofluorene [2-NF], 9-aminoacridine [9-AA], 4-nitroquinoline *N*-oxide [4NQO], 2-aminoanthracene [2-AA], benzo(a)pyrene [BP]) and DW (sodium azide [SA])
処理：代謝活性化系 (S9, 10% v/v) 存在下及び非存在下でプレート法により 48 時間処理。
細胞毒性：いずれの菌株にも、抗菌作用（毒性）は代謝活性化系の有無にかかわらず最高濃度まで認められなかった。いずれの濃度でも混濁又は沈殿は認められなかった。
遺伝毒性：陰性

代謝活性化系	被験物質	処理濃度 (µg/plate)	復帰突然変異コロニー数／plate (mean ± SD)				
			TA1535	TA1537	TA98	TA100	WP2 *uvrA*
非存在下	DW	0	11 ± 1	8 ± 1	20 ± 1	132 ± 6	25 ± 4
	ISIS 666853	15	11 ± 3	8 ± 1	21 ± 4	139 ± 8	26 ± 1
		50	12 ± 2	9 ± 2	18 ± 1	136 ± 6	28 ± 3
		150	13 ± 1	8 ± 2	20 ± 3	136 ± 10	25 ± 1
		500	13 ± 2	8 ± 1	19 ± 1	137 ± 10	25 ± 2
		1500	11 ± 1	9 ± 1	19 ± 2	135 ± 6	25 ± 4
		5000	12 ± 3	9 ± 2	20 ± 1	138 ± 7	24 ± 3
	SA	0.5	220 ± 13			363 ± 47	
	2-NF	2			304 ± 18		
	9-AA	50		357 ± 23			
	4NQO	1					135 ± 8
	2-AA [a]	2	11 ± 1				
	BP [a]	2			18 ± 3		

8.1 細菌を用いた復帰突然変異試験（666853-IS01）（続き）

代謝活性化系	被験物質	処理濃度 (μg/plate)	復帰突然変異コロニー数／plate (mean ± SD)				
			TA1535	TA1537	TA98	TA100	WP2 *uvrA*
存在下 [b]	DW	0	12 ± 1	13 ± 1	33 ± 4	150 ± 4	27 ± 3
	ISIS 666853	15	11 ± 1	13 ± 3	36 ± 2	150 ± 6	27 ± 3
		50	14 ± 1	13 ± 1	31 ± 3	155 ± 3	28 ± 3
		150	11 ± 1	13 ± 1	33 ± 5	151 ± 5	27 ± 4
		500	11 ± 2	12 ± 1	33 ± 5	146 ± 5	32 ± 2
		1500	12 ± 1	13 ± 1	34 ± 3	148 ± 4	28 ± 2
		5000	11 ± 2	12 ± 1	30 ± 1	151 ± 5	29 ± 4
	2-AA	2	164 ± 21				
	2-AA	4					78 ± 12
	BP	2		43 ± 6	174 ± 17	656 ± 51	

SD：標準偏差、SA：Sodium azide、2-NF：2-Nitrofluorene、9-AA：9-Aminoacridine、4NQO：4-Nitroquinoline N-oxide、2-AA：2-Aminoanthracene、BP：Benzo(a)pyrene
[a] 代謝活性化系非存在下における代謝活性確認のため、TA98 及び TA1535 にそれぞれ BP 及び 2-AA を処理した。
[b] S9 mix は 10% v/v S9 を含む。

8.2 哺乳類細胞を用いた染色体異常試験

試験表題：ISIS 666853: *In Vitro* Chromosome Aberration Assay in Chinese Hamster Lung (CHL) Cells
試験の種類：染色体異常試験　　独立して実施した試験数：1
系統：チャイニーズハムスター肺細胞 (CHL)　　同型培養数：2
代謝活性化系：Aroclor 1254 誘導ラット肝臓 S9　　分析細胞数／培養：150 分裂中期細胞
溶媒：被験物質：蒸留水 (DW)、陽性対照：DW - cyclophosphamide monohydrate (CPA)、ethyl methanesulfonate (EMS)
処理：代謝活性化系存在下及び非存在下で 6 時間処理、代謝活性化系非存在下で 22 時間処理
細胞毒性：ISIS 666853 の 500 µg/mL までの濃度で細胞毒性は認められなかった。
遺伝毒性：陰性

被験物質：トフェルセン（ISIS 666853）
試験番号：666853-IS02
CTD における記載箇所：4.2.3.3.1-2
GLP 適用：適用
処理日：20[redacted] 年 [redacted] 月 [redacted] 日

代謝活性化系	被験物質	濃度 (µg/mL)	6 時間処理			
			細胞毒性 [a] (対照に対する%)	異常細胞数平均% [b]	異常数／150 細胞 [b]	倍数体細胞数／150 分裂中期細胞
非存在下	DW	0	100	0.5	0.5	2.0
	ISIS 666853	125	99	1.0	1.0	1.0
		250	98	2.0	2.0	1.0
		500	95	0.0	0.0	1.5
	EMS	800	66	33.5 **	38.0	1.0
存在下 [c]	DW	0	100	0.5	0.5	0.0
	ISIS 666853	125	101	1.5	3.0	0.5
		250	104	0.5	0.5	0.5
		500	101	2.5	2.5	1.5
	CPA	6	56	38.0 **	48.0	2.0

8.2　　哺乳類細胞を用いた染色体異常試験（666853-IS02）（続き）

代謝活性化系	被験物質	濃度 (μg/mL)	22 Hours Treatment			
			細胞毒性 [a] (対照に対する%)	異常細胞数平均% [b]	異常数／150 細胞 [b]	倍数体細胞数／150 分裂中期細胞
非存在下	DW	0	100	0.0	0.0	2.5
	ISIS 666853	125	96	0.5	0.5	1.0
		250	97	1.5	2.0	1.0
		500	94	0.5	0.5	0.5
	EMS	600	36	44.5 **	56.5	1.0

EMS：Ethyl methanesulfonate、CPA：Cyclophosphamide monohydrate
統計解析には SAS software (version 9.2) を使用した。
被験物質群と溶媒対照群の比較：χ^2 検定 (有意水準 0.05 で有意差がみられなかったため Fisher's exact test は実施しなかった)。陽性対照群と溶媒対照群の比較：Fisher's exact test; ** $p < 0.01$
[a] 相対的細胞集団倍加 (RPD) を指標とした。
[b] ギャップを除く。
[c] S9 mix の S9 の最終濃度は 3% v/v とした。

9 *In Vivo* 遺伝毒性試験

試験表題：BIIB067: *In Vivo* Mammalian Erythrocyte Micronucleus Assay in Mice
試験の種類：骨髄小核試験
動物種／系統／性：Hsd:ICR (CD-1) 雄マウス
週齢：6 週齢
評価した細胞：多染性赤血球 (PCE)
分析細胞数／動物：4000 PCE
投与方法：1 日 2 回投与、約 2 時間間隔
試料採取時間：投与 24 及び 48 時間後
投与経路：皮下
溶媒：被験物質：リン酸緩衝生理食塩液 (PBS [10 mM sodium phosphate, 144 mM sodium chloride pH 7.4 ± 0.5])、陽性対照：Cyclophosphamide (CP) [a]
給餌条件：自由摂取
被験物質：トフェルセン（BIIB067）
試験番号：P067-19-02
CTD における記載箇所：4.2.3.3.2-1
GLP 適用：適用
投与日：20[redacted] 年 [redacted] 月 [redacted] 日

特記事項：投与液の分析及び生体試料分析
毒性／細胞毒性：本試験のいずれの用量でも死亡は認められなかった。一般状態の変化として、粗毛、立毛、細目が認められた。
対照群と比較して被験物質群では PCE/EC 比の低下が認められなかったことから、細胞毒性を誘発しないことが示された。
遺伝毒性：対照群と比較して被験物質群では小核を有する PCE の発現頻度の統計学的に有意な増加は認められなかった。(ANOVA followed by Dunnett's post-hoc analysis, $p > 0.05$).
曝露の確認：すべての被験物質群のマウスの肝臓試料中に BIIB067 が確認された。対照群のマウスの肝臓試料中に BIIB067 は検出されなかった。

[a] BioReliance 試験番号 AF65AY.123M012.BTL で作製した陽性対照スライド (固定及び未染色) を用いて、計測を検証した。

試料採取時間	対照物質／被験物質	用量 (mg/kg/day)	性別／動物数／群	%MnPCE (Mean ± SD)	MnPCE 数／PCE 数
投与 24 時間後	PBS	0	雄：6	0.08 ± 0.04	19/24000
	BIIB067	500	雄：6	0.11 ± 0.06	26/24000
		1000	雄：6	0.09 ± 0.05	20/24000
		2000	雄：6	0.09 ± 0.02	21/24000
	Cyclophosphamide	50	雄：5	1.72 ± 0.38**	344/20000
投与 48 時間後	PBS	0	雄：6	0.12 ± 0.03	29/24000
	BIIB067	2000	雄：6	0.06 ± 0.02	15/24000

PCE：多染性赤血球、MnPCE：小核を有する PCE
*$p < 0.05$ or **$p < 0.01$, One-Way ANOVA with Post-Hoc Dunnett's Test or T-Test

10　　がん原性試験

該当資料なし

11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

重要な試験以外の試験　　被験物質：トフェルセン（BIIB067）

動物種／系統	投与方法 (溶媒／投与形態)	投与期間	用量 (mg/kg)	動物数／群	特記すべき所見	試験番号
マウス／Crl:CD1(ICR)	皮下 (リン酸緩衝生理食塩液／溶液)	妊娠 6～14 日	0, 3, 10, 30	雌：8	なし	P067-[redacted]-01
ウサギ／New Zealand White	皮下 (リン酸緩衝生理食塩液／溶液)	妊娠 7～19 日	0, 3, 10, 30	雌：5	なし	P067-[redacted]-04

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

試験表題：BIIB067: A Fertility and Embryo-Fetal Development Study by Subcutaneous Injection in Mice
試験計画 ICH S5 4.1.1：準拠
動物種／系統：マウス／Crl:CD1(ICR)
試験開始時日齢 (入荷時)：
　雄：68 日齢
　雌：61 日齢
初回投与年月日：
　雄：20[redacted] 年 [redacted] 月 [redacted] 日
　雌：20[redacted] 年 [redacted] 月 [redacted] 日
投与期間：
　雄：交配 28 日間前から交配中、剖検まで。2 日に 1 回投与。
　雌：交配 15 日間前から交配中、GD 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14。2 日に 1 回投与。
交尾成立日：GD 0
帝王切開日：GD 18
投与方法：皮下
溶媒／投与形態：リン酸緩衝生理食塩液 (10 mM sodium phosphate, 144 mM sodium chloride, pH 7.4)／溶液
被験物質：トフェルセン（BIIB067）
試験番号：P067-17-02
CTD における記載箇所：4.2.3.5.1-1
GLP 適用：適用
特記事項：生体試料分析、病理組織学的検査、精子検査、トキシコキネティクス評価
無毒性量：F0 雄：10 mg/kg、F0 雌：30 mg/kg、F1 児：30 mg/kg

用量 (mg/kg)	0 (Control)	3	10	30
雄親動物				
評価動物数	22	22	22	22
死亡・瀕死動物数	0	0	0	0
一般状態	-	-	-	-
剖検	-	-	-	-
腎臓腫大	1 [a]	0	0	0
体重 (%) [b]	40.4 g	+0.990	+4.21*	+6.44**
体重増加量 (%) [b]	3.8 g	+13	+47*	+74**
摂餌量 (%) [b]	6.0 g/day	+6.7	+6.7	+6.7
平均交尾所要日数	1.8	2.0	2.2	2.6
交尾雄動物数	22	22	22	22
受胎雄動物数	18	22	18	18

12　　生殖発生毒性試験：受胎能及び胚・胎児発生に関する試験（P067-17-02）（続き）

用量 (mg/kg)	0 (Control)	3	10	30
雄親動物（続き）				
生殖器官器官重量 (g)				
左精巣 (g)	0.1323	0.1287	0.1331	0.1523**
右精巣 (g)	0.1362	0.1340	0.1378	0.1554**
右精巣上体 (g)	0.0573	0.0589	0.0578	0.0659**
前立腺 (g)	0.0488	0.0544	0.0457	0.0666**
器官重量対体重比 (%)				
右精巣上体 (%)	142.521	144.282	138.238	153.512*
前立腺 (%)	122.460	133.490	109.262	155.370*
運動精子性 (%)	85.7	85.8	89.0	88.6
精子密度 (100 万個/g 組織)	2313.64	2769.20	2281.50	2952.65
雌親動物				
血漿中トキシコキネティクス				
C_{max} (ng/mL) - GD6	-	963	3630	16400
$AUC_{0\text{-}last}$ (ng*h/mL) - GD 6	-	1810	8460	52300
C_{max} (ng/mL) - GD 14	-	1390	5860	12800
$AUC_{0\text{-}last}$ (ng*h/mL) - GD 14	-	3420	17200	50500
評価動物数	22	22	22	22
死亡・瀕死動物数	0	0	1 [c]	0
剖検	-	-	-	-
交配前体重 (%) [b]	29.2 g	-2.05	0	+1.71
交配前体重増加量 (%) [b]	1.5 g	-67**	+6.7	+67**
妊娠中体重 (%) [b]	63.2 g	+0.316	+2.85	+3.64
妊娠中体重増加量 (%) [b]	33.3 g	+2.10	+5.71	+3.90
交配前摂餌量 (%) [b]	5.8 g/day	-5.2	-5.2	+1.7
妊娠中摂餌量 (%) [b]	6.8 g/day	+1.5	-1.5	-5.9
交配前性周期	-	-	-	-
平均交尾所要期間	1.8	2.0	2.2	2.6
精子が確認された雌動物数	22	22	22	22
妊娠動物数	18	22	18	18
流産又は全胚吸収母動物数	0	0	0	0
平均黄体数	15.5	15.7	15.2	15.3
平均着床数	14.8	14.5	14.5	14.2
平均着床前胚損失率 (%)	4.4	6.9	4.2	6.6

12　生殖発生毒性試験：受胎能及び胚・胎児発生に関する試験（P067-17-02）（続き）

用量 (mg/kg)	0 (Control)	3	10	30
雌親動物（続き）				
平均生存胚数	13.9	13.5	13.0	12.8
平均死亡胚数	0	1	0	0
平均吸収胚数	0.8	1.0	1.5	1.4
平均着床後胚損失率 (%)	5.6	6.5	10.4	9.7

-：特記すべき所見なし、GD ××：妊娠××日

*：p≤0.05, **：p≤0.01 (Dunnett' test / Dunn's test) 、対照群と比較して統計学的有意差あり。

[a] 雄動物番号 3020 で左腎臓腫大。

[b] 対照群は平均値を示す。投与群は対照群との差を%で示す。

[c] 母動物番号 3166 は妊娠 18 日に出産し安楽死させた。

13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

試験表題：BIIB067: An Embryo-Fetal Development Study by Subcutaneous Injection in Pregnant New Zealand White Rabbits
試験計画 ICH S5 4.1.3：準拠
動物種／系統：ウサギ／New Zealand White [Hra:(NZW) SPF]
試験開始時月齢：6 ヵ月齢 (入荷時)
初回投与日：20[redacted] 年 [redacted] 月 [redacted] 日
特記事項：トキシコキネティクス評価
無毒性量：F_0 母動物：30 mg/kg、F_1 胎児：30 mg/kg

投与期間：妊娠 7～19 日、2 日に 1 回 (妊娠 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 日)
交尾成立日：GD 0
帝王切開日：GD 29
投与方法：皮下
溶媒／投与形態：リン酸緩衝生理食塩液 (10 mM sodium phosphate, 144 mM sodium chloride, pH 7.4)／溶液

被験物質：トフェルセン（BIIB067）
試験番号：P067-17-05
CTD における記載箇所：4.2.3.5.2-3
GLP 適用：適用

用量 (mg/kg/dose)	0 (Control)	3	10	30
母動物：				
血漿中トキシコキネティクス				
C_{max} (ng/mL) - GD 7	-	14200	19900	60900
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng*h/mL) - GD 7	-	41900	131000	454000
C_{max} (ng/mL) - GD 19	-	4140	11900	41100
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng*h/mL) - GD 19	-	23800	87500	283000
妊娠動物数	19	20	20	19
死亡・瀕死動物数	1 [a]	1 [b]	0	0
流産又は全胚吸収母動物数	-	-	-	-
分娩母動物数	-	-	-	-
一般状態	-	-	-	-
体重 (%) [c] – GD 28	3646.58 g	-0.64	-1.57	-0.45
体重増加量 (%) [c] – GD 7 to 20	284.62 g	-12.13	-0.02	-3.53
体重増加量 (%) [c] – GD 7 to 28	434.17 g	-13.29	-8.58	-12.48
摂餌量 (%) [c] – GD 7 to 20	164.9 g/animal/day	-4.0	-1.7	-0.9
摂餌量 (%) [c] – GD 7 to 28	155.0 g/animal/day	-5.7	-2.6	-5.4
平均黄体数	10.4	9.7	11.0	10.1
平均着床数	9.4	9.0	9.9	9.1
平均着床前胚損失率 (%)	9.36	7.08	9.03	9.58

13　生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験（P067-17-05）（続き）

用量 (mg/kg/dose)	0 (Control)	3	10	30
胎児：				
評価母動物数	18	19	20	19
平均生存胎児数	9.3	8.9	9.5	8.6
平均吸収胚数	0.2	0.1	0.4	0.5
死亡胎児を有する母動物数	0	0	0	0
平均着床後胚死亡率 (%)	1.85	1.00	3.98	5.05
平均胎児体重 – 雌雄合算 (%) [c]	42.616 g	+1.976	-5.010	-0.485
胎児の性比 (% 雄)	52.65	47.01	49.83	52.35
胎児の異常				
外表異常	-	-	-	-
内臓異常	-	-	-	-
骨格異常	-	-	-	-
平均骨化部位数	-	-	-	-

-：特記すべき所見なし、GD ××：妊娠××日

[a] 対照群の雌、動物番号 8914 を背部及び右後肢の大きな裂傷のため、妊娠 12 日計画外安楽死させた。

[b] 3 mg/kg 群の雌、動物番号 8936 を右前肢運動制限のため、妊娠 7 日に安楽死させた。

[c] 対照群は平均値を示す。投薬群は対照群との差を%で示す。

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

試験表題：BIIB067: A Subcutaneous Developmental and Perinatal/Postnatal Reproduction Study in Crl:CD1(ICR) Mice, Including a Postnatal Behavioral/Functional Evaluation
被験物質：トフェルセン（BIIB067）
試験計画 ICH S5 4.1.2：準拠
投与期間：妊娠 6～22 日及び分娩後 1～21 日まで。2 日に 1 回投与。
試験番号：P067-[redacted]-01
動物種／系統：マウス／Crl:CD1(ICR)
交尾成立日：GD 0
CTD における記載箇所：4.2.3.5.3-1
同腹児数の調整：離乳時 (PND 21)。25 出生児/性/群以上を選択。可能な場合は 1 出生児/性/母動物以上を選択。
開始時日齢：約 62 日齢 (入荷時)
投与方法：皮下
GLP 適用；適用
初回投与日：20[redacted]年[redacted]月[redacted]日
溶媒／投与形態：リン酸緩衝生理食塩液 (10 mM sodium phosphate, 144 mM sodium chloride, pH 7.4)／溶液
特記事項：生体試料分析
無毒性量：F_0 母動物：30 mg/kg、F_1 児雄：30 mg/kg、F_1 児雌：30 mg/kg

用量 (mg/kg)		0 (Control)	3	10	30
F_0 母動物	生体試料分析 (N = 5～7/群)				
	BIIB067 濃度 (Mean ± SD)				
	乳汁 - LD 13 (ng/mL)	<LLOQ [a]	22.2 ± 33.7	96.9 ± 114.0	88.3 ± 54.9
	肝臓 - LD 21 (µg/g)	<LLOQ	48.2 ± 10.9	127.2 ± 18.5	352.2 ± 111.5
	妊娠動物数	24	22	22	25
	死亡・瀕死動物数 [b]	1	2	0	2
	一般状態	-	-	-	-
	剖検	-	-	-	-
	妊娠期間体重 – GD 18 (%) [c]	54.6 g [d]	+4.40 [d]	+4.03 [d]	+4.21 [d]
	妊娠期間体重増加量 – GD 0-18 (g)	+29.6 [d]	+31.6 [d]	+31.2 [d]	+31.5 [d]
	授乳期間体重 – LD 21 (%) [c]	40.6 g	+3.20 [d]	+5.17	+6.90 [d]
	授乳期間体重増加量 – LD 1-21 (g)	+6.1	+6.9 [d]	+7.9	+7.6 [d]
	妊娠期間摂餌量 – GD 3-18 (%) [c]	7.2 g/day [d]	+2.78 [d]	+2.78 [d]	+2.78 [d]
	授乳期間摂餌量 – LD 1-12 (%) [c, e]	17.5 g/day	+5.71	+6.29	+2.86 [d]
	平均妊娠期間 (日)	19.8	19.8	19.8	19.8
	異常分娩	-	-	-	-

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（P067-[redacted]-01）（続き）

用量 (mg/kg)		0 (Control)	3	10	30
F_1 出生児	評価母動物数	23	21	22	25
(離乳前)	平均着床数	12.4	13.2	12.6	12.4
	平均出生児数／母動物	12.0	12.2	12.0	12.0
	平均生存出生児数／母動物	12.0	12.1	12.0	11.7
	平均死亡出生児数／母動物	0.0	0.1	0.0	0.2
	出生 4 日後生存率	11.9	12.0	11.9	11.2 [f]
	離乳時生存率	11.7	11.9 [f]	11.6	11.0 [f]
	平均出生児体重 - PND 4 (g)	2.7	2.7	2.7	2.7 [f, g]
	平均出生児体重 - PND 21 (g)	9.4	9.6 [f]	9.9	9.8 [f, g]
	出生児性比 (% 雄)	53.2	45.7 [f]	43.8	49.7 [f, g]
	反射及び身体的発達 [h]	-	-	-	-
	出生児一般状態	-	-	-	-
	出生児剖検	-	-	-	-
F_1 雄	生体試料分析 (N = 3/群)				
(離乳後)	BIIB067 濃度 (µg/g) - PND 21				
	脳	<LLOQ	NA	NA	<LLOQ
	肝臓	<LLOQ	NA	NA	<LLOQ
	離乳後評価動物数	25	25	25	25
	死亡・瀕死動物数	0	0	0	0
	一般状態	-	-	-	-
	剖検	-	-	-	-
	器官重量 [i]	-	-	-	-
	体重 – PND 120 (%) [j]	40.3 g	+3.23	+2.98	+2.73 [k]
	摂餌量 – PND 35-92 (%) [j, l, m]	7.8 g/day	+29.49	+10.26	+5.13
	包皮分離平均日齢 (日)	36.8	37.2	37.4*	37.7*
	自発運動量 (PND 60 ± 2)	-	-	-	-
	Morris 水迷路 (PND 65-90)	-	-	-	-
	平均交尾所要日数	2.0	2.8	3.6	3.0
	交尾雄動物数	25	24	23	25
	受胎雄動物数	24	22	23	24

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（P067-[redacted]-01）（続き）

用量 (mg/kg)		0 (Control)	3	10	30
F_1 雌	生体試料分析 (N = 3/群)				
(離乳後)	BIIB067 濃度 (µg/g) - PND 21				
	脳	<LLOQ	NA	NA	<LLOQ
	肝臓	<LLOQ	NA	NA	<LLOQ
	評価動物数	25	24	24	25
	死亡・瀕死動物数	0	1 [n]	1 [n]	0
	一般状態	-	-	-	-
	剖検	-	-	-	-
	交配前体重 – PND 92 (%) [o, q]	30.9 g	+1.29 [p]	-2.27 [p]	-0.97
	交配前摂餌量 – PND 35-92 (%) [o, m]	8.4 g/day	-1.19 [l]	+14.29 [l]	-2.38
	妊娠期間体重 – GD 13 (%) [o, r]	45.4 g	-0.44 [p]	-2.42 [p]	+2.64
	妊娠期間摂餌量 – GD 0-13 (%) [o, r]	8.7 g/day [l]	+2.30 [p]	+12.64 [p]	+8.05
	膣開口平均日齢 (日)	29.1	29.0	28.3	27.9*
	自発運動量 (PND 60 ± 2)	-	-	-	-
	Morris 水迷路 (PND 65-90)	-	-	-	-
	平均交尾所要日数	2.0	2.8	3.6	3.0
	交尾日が確認された雌動物数	23	20	18	25
	総妊娠動物数 (帝王切開又は自然分娩)	24	22	23	24
	帝王切開妊娠動物数 - GD 13	23	19	20	24
	平均黄体数	15.0	15.6	15.4	17.2
	平均着床数	13.7	14.2	14.0	15.6
	平均着床前胚死亡率 (%)	9.9	8.4	8.2	9.3

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（P067-[redacted]-01）（続き）

用量 (mg/kg)		0 (Control)	3	10	30
F_2 胎児	平均生存胚数／母動物	12.6	12.8	11.9	14.0
	平均死亡胚数	1.1	1.3	2.0	1.6
	平均着床後胚死亡率 (%)	7.7	11.3	14.7	9.7
	胎児の異常	-	-	-	-

-：特記すべき所見なし、GD ××： 妊娠××日、NA：該当なし、PND ××：出生後××日、SD：標準偏差
*：$p \leq 0.05$ Kruskal-Wallis & Dunn
<LLOQ：定量下限未満 (乳汁：理論的濃度 1.25 ng/mL、肝臓：理論的濃度 10.0 µg/g)
[a] 異常試料で再測定用試料不十分のため、動物番号 1902, 1903, 1904 を除外した。
[b] いずれの投薬群の F0 母動物にも BIIB067 関連の死亡は認められなかった。
[c] 妊娠期間又は授乳期間終了時。対照群は平均値を示す。投与群は対照群との差を%で示す。統計学的有意差は実測値に基づく (%ではない)。
[d] 死亡動物、瀕死動物、分娩中又は分娩後の動物（妊娠期間のみ）を除く。
[e] 出生児は授乳 12 日以降に母動物用飼料を摂取し始めると考えられるため、授乳 12～21 日の摂餌量は示さなかった。
[f] 母動物が死亡した出生児は安楽死させたため除外した。
[g] 母動物番号 1998 のデータは生存児がいないため除外した。
[h] 立ち直り反応、耳介開展、聴覚性驚愕反射、眼瞼開裂、正向反射を含む。
[i] 精巣、精巣上体、前立腺。
[j] 離乳後観察期間終了時。対照群は平均値を示す。投与群は対照群との差を%で示す。統計学的有意差は実測値に基づく (%ではない)。
[k] 出生後 118 日に計画剖検した動物番号 3300 を除く。
[l] 不正確に記録されたと考えられる値又は飼料のこぼれに関連した値は除外した。
[m] 摂餌量は各マウスの出生後日数から 1 週間に 1 回測定したため、出生後 85～92 日が出生日の最も遅いマウスにおける同居前の摂餌量測定の最終期間である。
[n] 被験物質に関連した死亡ではないと考えられた。
[o] 交配前期間又は妊娠期間終了時。対照群は平均値を示す。投与群は対照群との差を%で示す。統計学的有意差は実測値に基づく (%ではない)。
[p] 死亡又は瀕死動物は除外した。
[q] 体重は各マウスの出生後日数から 1 週間に 1 回測定したため、出生後 92 日が出生日の最も遅いマウスにおける同居前の体重測定の最終日である。
[r] 交尾日が確認できなかったマウスは除外した。

15　　新生児を用いた試験

該当資料なし

16　　局所刺激性試験

該当資料なし

17　その他の毒性試験

被験物質：トフェルセン（BIIB067）

動物種／系統	投与方法 (対照物質／投与形態)	投与期間	用量 (mg)	性別及び 1 群の動物数	特記すべき所見	試験番号
カニクイザル	髄腔内投与 (aCSF／溶液)	13 週間	10	雄：4、雌：4	なし	P067-[redacted]-06