キネレット皮下注 100 mg シリンジ

＜アナキンラ（遺伝子組換え）＞

第 2 部（モジュール 2）
CTD の概要（サマリー）

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

Swedish Orphan Biovitrum Japan 株式会社

Property of the SOBI group - strictly confidential

目次

2.6.6　毒性試験の概要文 8
2.6.6.1　まとめ 8
2.6.6.2　単回投与毒性試験 16
2.6.6.2.1　IL-1Ra のラットにおける単回静脈内投与毒性試験（[redacted]719-001、[redacted] Study SY05-T94-01） 16
2.6.6.2.2　IL-1Ra のカニクイザルにおける単回静脈内投与毒性試験（[redacted]719-002、[redacted] Study SY05-T94-02） 16
2.6.6.3　反復投与毒性試験 17
2.6.6.3.1　IL-1Ra の SD ラットにおける 2 週間反復皮下投与毒性試験（[redacted]SG-590r、[redacted] Study SY05-T89-10） 17
2.6.6.3.2　IL-1Ra の SD ラットにおける 2 週間反復皮下投与毒性試験（[redacted]SG-600r、[redacted] Study SY05-T89-12） 18
2.6.6.3.3　アナキンラのラットにおける 6 ヵ月間反復皮下投与毒性試験及び 1 ヵ月間回復性試験（[redacted]86533、[redacted] Study SY05-T94-04） 20
2.6.6.3.4　IL-1Ra の SD ラットにおける 2 週間反復静脈内投与毒性試験（[redacted]SG-534r、[redacted]Study SY05-T89-01） 23
2.6.6.3.5　IL-1Ra の SD ラットにおける 2 週間反復静脈内投与毒性試験（[redacted]SG-542r、[redacted]Study SY05-T89-02） 23
2.6.6.3.6　アナキンラ（皮下）及びメトトレキサート（経口）のラットにおける 4 週間反復投与毒性試験（[redacted]6271-122、[redacted]Study 960048） 24
2.6.6.3.7　IL-1Ra の SD ラットにおける 2 週間反復静脈内投与毒性試験（[redacted]SG-569r、[redacted]Study SY05-T89-05） 27
2.6.6.3.8　IL-1Ra の SD ラットにおける 2 週間反復静脈内投与毒性試験（[redacted]SG-590r、[redacted]Study SY05-T89-09） 28
2.6.6.3.9　IL-1Ra のラットにおける 2 週間反復吸入毒性試験（[redacted]92-8390、[redacted] Study SY05-T92-01） 29
2.6.6.3.10　IL-1Ra のアカゲザルにおける 2 週間反復皮下投与毒性試験（[redacted]SG-596m、[redacted] Study SY05-T89-11） 31
2.6.6.3.11　IL-1Ra のアカゲザルにおける 4 週間反復皮下投与毒性試験及び 4 週間回復性試験（[redacted]0421-01、最終試験 960040） 32
2.6.6.3.12　IL-1Ra の雄アカゲザルにおける 1 週間反復点滴静脈内投与試験（[redacted]SG-672m、[redacted]Study SY05-T90-02） 35
2.6.6.3.13　IL-1Ra の雄カニクイザルにおける 2 週間反復静脈内投与用量設定試験（[redacted]SG-543m、[redacted]SY05-T89-03 試験） 36

2.6.6.3.14 IL-1Ra のアカゲザルにおける 2 週間反復静脈内投与毒性試験及び 4 週間回復性試験（[redacted]SG-559m、[redacted]Study SY05-T89-08） 37
2.6.6.4 遺伝毒性試験 38
2.6.6.4.1 IL-1Ra の細菌を用いる復帰突然変異試験（SY05-T92-13 試験） 38
2.6.6.4.2 哺乳動物細胞を用いる染色体異常試験（SY05-T92-15 試験） 39
2.6.6.4.3 マウスリンフォーマチミジンキナーゼ試験（SY05-T92-14 試験） 41
2.6.6.4.4 IL-1Ra のマウス小核試験（SY05-T92-16 試験） 42
2.6.6.5 がん原性試験（トキシコキネティクス評価を含む） 43
2.6.6.6 生殖発生毒性試験（用量設定試験及びトキシコキネティクス評価を含む） 44
2.6.6.6.1 IL-1Ra のラットにおける受胎能、胚・胎児発生、並びに出生前及び出生後の発生に関する試験（[redacted]3249.7、[redacted]Study SY05-T93-01） 44
2.6.6.6.2 r-metHuIL-1Ra のラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（[redacted]-120047、[redacted]Study 960044） 45
2.6.6.6.3 インターロイキン-1 受容体拮抗薬（アナキンラ）のラットにおける胚・胎児発生に関する試験（[redacted]3249.5、[redacted]Study SY05-T92-03） 46
2.6.6.6.4 IL-1Ra のラットにおける出生前及び出生後の発生に関する試験（[redacted]3249.8 試験、[redacted]SY05-T93-02 試験） 47
2.6.6.6.5 IL-1Ra のウサギにおける胚・胎児発生に関する試験（[redacted]3249.6,[redacted]Study SY05-T92-04） 48
2.6.6.7 幼若動物を用いた試験 49
2.6.6.7.1 アナキンラのラットにおける 1 日 1 回及び 2 回の皮下投与試験（[redacted]Study 497888） 49
2.6.6.7.2 幼若ラットにおける 6 週間反復皮下投与毒性試験（[redacted]Study 498001） 49
2.6.6.8 局所刺激性試験 50
2.6.6.9 その他の毒性試験 51
2.6.6.9.1 IL-1Ra 及び PEG-sTNF-RI のラットにおける単回投与及び併用投与による免疫機能に及ぼす影響（[redacted]Study 100797） 51
2.6.6.9.2 IL-1Ra のラットにおける 3 日間静脈内持続投与による大腸菌クリアランス及び臓器コロニー形成に及ぼす影響に関する検討試験（SY05-T92-17） 54
2.6.6.9.3 IL-1Ra のラットにおける 3 日間静脈内持続投与による黄色ブドウ球菌クリアランス及び臓器中コロニー形成に及ぼす影響に関する検討試験（SY05-T92-18） 58
2.6.6.9.4 IL-1Ra のラットにおける 3 日間静脈内持続投与によるリステリア菌クリアランス及び臓器中コロニー形成に及ぼす影響に関する検討試験（SY05-T92-19） ... 61
2.6.6.9.5 IL-1Ra の雄アカゲザルにおける 19 日間反復静脈内投与抗原性試験（[redacted]SG-585m、[redacted]試験 SY05-T89-07） 64

2.6.6.9.6 r-metHuIL-1Ra 及び PEG r-metHu-sTNF-RI のカニクイザルにおける 1 ヵ月間反復投与毒性試験及び 1 ヵ月間回復性試験（[redacted]39-39、[redacted]Study 100484）..... 65
2.6.6.10 考察及び結論 66
2.6.6.11 参考文献 70

表目次

表 2.6.6-1 毒性試験の概要 10
表 2.6.6-2 アナキンラを 1 日 2 回 2 週間皮下投与したラットにおける投与部位の出血及び亜急性炎の発現状況（SY05-T89-10 試験） 18
表 2.6.6-3 アナキンラを 1 日 4 回で 1 又は 2 週間皮下投与したラットにおける投与部位の炎症発現状況（SY05-T89-12 試験） 19
表 2.6.6-4 アナキンラのラットにおける 6 ヵ月間皮下投与毒性試験での 慢性進行性腎症の発現頻度 22
表 2.6.6-5 ラットにおける 4 週間毒性試験及び TK 試験のデザイン 25
表 2.6.6-6 メトトレキサート経口投与と同時にアナキンラを皮下投与したときの投与 1、14 及び 28 日目の血清反応 27
表 2.6.6-7 アナキンラを 2 週間反復静脈内投与したラットにおける血管周囲の炎症の発現状況（SY05-T89-05 試験） 28
表 2.6.6-8 アナキンラを 1 日 2 回 2 週間皮下投与したサルにおける投与部位の慢性炎症の発現状況（SY05-T89-11 試験） 31
表 2.6.6-9 960040 試験におけるアカゲザルの割付 32
表 2.6.6-10 960040 試験での皮膚病変 33
表 2.6.6-11 アナキンラを 1 週間静脈内持続投与したサルにおける個々の血漿中アナキンラ濃度（SY05-T90-02 試験） 36
表 2.6.6-12 Fisher 344 ラットを用いた毒性試験の試験計画 51
表 2.6.6-13 カニクイザル 1 ヵ月毒性試験における試験デザイン 65

図目次

図 2.6.6-1 アナキンラの 3 日間持続投与後の大腸菌の血液中コロニー形成 56
図 2.6.6-2 アナキンラの 3 日間持続投与後の大腸菌の脾臓中コロニー形成 57
図 2.6.6-3 アナキンラの 3 日間持続投与後の大腸菌の肝臓中コロニー形成 57
図 2.6.6-4 アナキンラの 3 日間静脈内持続投与後の黄色ブドウ球菌の血液中コロニー形成 60
図 2.6.6-5 アナキンラの 3 日間静脈内持続投与後の黄色ブドウ球菌の脾臓及び肝臓中コロニー形成 61

図 2.6.6-6　アナキンラの 3 日間静脈内持続投与後のリステリア菌の脾臓及び肝臓中コロニー形成 63

略語・略号一覧

略語・略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
AFC	Antibody forming cell	抗体産生細胞
ALT	Alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST	Aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
b.i.d.	Twice a day	1 日 2 回
CFU	Colony forming unit	コロニー形成単位
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
CSF	Cerebrospinal fluid	脳脊髄液
DNA	Deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	エチレンジアミン四酢酸
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着測定法
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
EMS	Ethyl Methanesulfonate	メタンスルホン酸エチル
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
Ig	Immunoglobulin	免疫グロブリン
i.p.	Intraperitoneal(ly)	腹腔内
i.v.	Intravenous(ly)	静脈内
IL-1	Interleukin-1	インターロイキン-1
IL-1Ra	Interleukin-1 receptor antagonist	インターロイキン-1 受容体拮抗薬
IL-1RI	Interleukin-1 receptor type I	インターロイキン-1 受容体 I 型
IL-1RII	Interleukin-1 receptor type II	インターロイキン-1 受容体 II 型
MTX	Methotrexate	メトトレキサート
NK	Natural killer (cell)	ナチュラルキラー（細胞）
NOAEL	No observed adverse effect level	無毒性量
OD	Optical density	吸光度
PBS	Phosphate buffered saline	リン酸緩衝生理食塩液
PEG-sTNF-RI	Polyethylene glycosylated soluble tumor necrosis factor-receptor type I	ポリエチレングリコシル化可溶性腫瘍壊死因子受容体 I 型
PK	Pharmacokinetic(s)	薬物動態
r-metHuIL-1Ra	Recombinant-methionyl human interleukin-1 receptor antagonist (anakinra)	遺伝子組換えメチオニルヒトインターロイキン-1 受容体拮抗薬（アナキンラ）
s.c.	Subcutaneous(ly)	皮下

SD	Sprague-Dawley	—
TEM	Triethylenemelamine	トリエチレンメラミン
TK	Toxicokinetic(s)	トキシコキネティクス
TNF	Tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6.1 まとめ

アナキンラ（遺伝子組換え）又は遺伝子組換えヒトインターロイキン-1 受容体拮抗薬（IL-1Ra）は、遺伝子組換え DNA 技術を用いて大腸菌で生産した可溶性タンパク質である。IL- 1Ra はインターロイキン-1（IL-1）サイトカインファミリーの一員である。IL-1 シグナル伝達経路は、2 種類の作動物質である IL-1α 及び IL-1β、膜結合型及び可溶型の両方の形態で存在する 2 種類の受容体クラス（IL-1RI、IL-1RII）、並びに 1 種類の可溶性拮抗物質（IL-1Ra）からなる。様々なタイプの細胞に存在する膜結合型 IL-1RI は、IL-1α と IL-1β の最初のシグナル伝達作用を担っている。血中を循環する受容体拮抗物質は I 型受容体に結合し、IL-1α と IL-1β の作用に拮抗することにより、IL-1 を介し炎症過程を抑制する。アナキンラが IL-1Ra として作用し、サイトカインである IL-1α 及び IL-1β の作用を効率的に阻害することを示す多くの薬理試験が文献として公表されている。

関節リウマチ、クリオピリン関連周期熱症候群、家族性地中海熱、全身型若年性特発性関節炎及び成人発症スチル病など他の IL-1 が起因となる疾患の慢性炎症及びそれに伴う組織破壊を、定期的な皮下投与で制御するためにアナキンラを開発した。アナキンラは、これらの適応症の治療を目的としており、単独又は疾患修飾性抗リウマチ薬を含む他の抗リウマチ薬との併用で徴候や症状を軽減させ、構造的損傷を遅延させる。

タンパク質由来の全ての生物学的製剤と同様、アナキンラは非臨床安全性評価に用いた動物種において免疫反応を誘発する可能性がある。抗アナキンラ抗体は様々な試験で様々な程度で産生されたが、トキシコキネティクス（TK）評価においてアナキンラの明らかな曝露が確認され、アナキンラ投与による忍容性は良好であった。反復投与毒性試験はラット及びサルを用いて実施した。アナキンラはこれらの両動物種において生物学的活性を有することが知られている。アナキンラの生物学的作用は IL-1 への拮抗作用であり、アナキンラは固有の薬理活性を有していないため、高用量のアナキンラによる過度の薬理作用は予測されず、実際に観察されなかった。

大部分の試験は医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準拠して実施されたが、いくつかの試験は検討目的のために実施されたものであり、GLP に準拠して実施しなかった。試験報告書に GLP 適合性を記載している。

アナキンラの毒性試験をラットでは最長 6 ヵ月間、アカゲザルでは最長 4 週間にわたり、最高 200 mg/kg の用量の静脈内又は皮下投与で実施したが、特段の毒性は認められなかった。局所的外傷、薬物の注射部位反応、又はその両方を示す可能性のある反復投与部位に観察された局所の炎症細胞浸潤は、回復期間中に消失する傾向を示した。

アカゲザルを用いた 4 週間皮下投与毒性試験では、炎症性皮膚病変がいくつか認められたが、全ての病変が注射部位と解剖学的に関連しているわけではなかった。これらの皮膚病変の原因は特定されなかったが、実験中に皮膚から細菌が注入されたことが原因の可能性があった。サルを

用いた他の試験では、同様の病変は見られなかった。これらの病変は投与期間中又は投与後に消失した。

アナキンラは免疫調節薬であることから、宿主抵抗性、膿瘍の消失、全体的な免疫能など、免疫機能への潜在的な影響を検討したいくつかの研究では、アナキンラは感染に対する宿主抵抗性を含む免疫能を著しく損なわないことが示された。

ラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験、並びに幼若ラットを用いた毒性試験では、最高200 mg/kg/日の用量で皮下投与後、生殖発生のいずれのステージにおいてもアナキンラの毒性は認められなかった。全ての生殖発生毒性試験及び幼若動物試験の無毒性量（NOAEL）は最高用量の 200 mg/kg/日であった。これらの試験では、TK の検討は実施しなかった。遺伝毒性試験の陰性結果は、アナキンラには遺伝毒性のリスクがないことを示唆している。高用量の皮下投与での忍容性を推定するために実施したラットを用いた 6 日間投与試験（497888 試験）を除き、表 2.6.6-1 に記載した試験は GLP に準拠して実施した。

結論として、非臨床毒性試験データは、小児及び成人集団に使用されるアナキンラの安全性評価を裏付けている。

表 2.6.6-1　毒性試験の概要

Type of study	Test system (species and strain)	Method of administration	Duration of dosing (frequency)	Dose level	Test article	GLP[a]	Study number
Single-dose toxicity							
An acute intravenous toxicity study of IL-1Ra in rats	Rat, CD® BR VAF/Plus	i.v.	Single dose	0, 1.5, 15, 150, and 720 mg/kg/day	Anakinra	Yes	SY05-T94-01
An acute intravenous toxicity study of IL-1Ra in cynomolgus monkeys	Monkey, cynomolgus *(Macaca fascicularis)*	i.v.	Single dose	0, 1.5, 15, and 150 mg/kg/day	Anakinra	Yes	SY05-T94-02
Repeat-dose toxicity							
A subchronic (2 weeks, b.i.d.) subcutaneous toxicity study of IL-1Ra in Sprague-Dawley® rats	Rat, Sprague-Dawley CD® (SD) BR	s.c.	2 weeks (b.i.d.)	0, 5, 20, and 80 mg/kg/day	Anakinra	Yes	SY05-T89-10
A subchronic high-dose subcutaneous toxicity (q.i.d.) study of IL-1Ra in Sprague-Dawley rats	Rat, Sprague-Dawley	s.c.	2 weeks (q.i.d.)	0 and 120 mg/kg/day	Anakinra	Yes	SY05-T89-12
A subcutaneous 6-month toxicity study in rats treated with anakinra, including 1-month interim and 1-month recovery groups	Rat, Sprague-Dawley	s.c.	1 and 6 months (b.i.d.)	0, 2, 20, and 200 mg/kg/day	Anakinra	Yes	SY05-T94-04
An intravenous (2 weeks) systemic toxicity study of IL-1Ra in Sprague-Dawley rats	Rat, Sprague-Dawley	i.v.	2 weeks	0, 0.047, 0.231, and 1.17 mg/kg/day	Anakinra	Yes	SY05-T89-01
A subchronic (2 weeks) intravenous toxicity study of IL-1Ra in Sprague-Dawley rats	Rat, Sprague-Dawley	i.v.	2 weeks	0, 2, 5, and 20 mg/kg/day	Anakinra	Yes	SY05-T89-02

Type of study	Test system (species and strain)	Method of administration	Duration of dosing (frequency)	Dose level	Test article	GLP[a]	Study number
A 4-week toxicity and toxicokinetic study of subcutaneously administered anakinra and orally administered methotrexate in rats	Rat, Sprague-Dawley	s.c. anakinra p.o. MTX	4 weeks (q.d.)	Anakinra – 0, 1, 10, and 100 mg/kg MTX – 0, 0.04, and 0.2 mg/kg	Anakinra	Yes	960048
A subchronic (2 weeks) intravenous toxicity study of IL-1Ra in Sprague-Dawley rats	Rat, Sprague-Dawley	i.v.	2 weeks	0, 3, 10, and 30 mg/kg/day	Anakinra	Yes	SY05-T89-05
A subchronic (2 weeks) intravenous toxicity study of IL-1Ra in Sprague-Dawley rats	Rat, Sprague-Dawley	i.v.	2 weeks	0 and 30 mg/kg/day	Anakinra	Yes	SY05-T89-09
A 2-week nose-only inhalation toxicity study of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) in the rat	Rat, Sprague-Dawley	Inhalation	2 weeks	0, 0.33, and 3.2 mg/kg/day	Anakinra	Yes	SY05-T92-01
A subchronic (2 weeks, b.i.d.) systemic toxicity study of IL-1Ra in male and female rhesus monkeys following repeated subcutaneous injections	Monkey, rhesus (*Macaca mulatta*)	s.c.	2 weeks (b.i.d.)	0, 5, 20, and 80 mg/kg/day	Anakinra	Yes	SY05-T89-11
A 4-week toxicity study of IL-1Ra administered by subcutaneous injection to rhesus monkeys with a 4-week Recovery Period	Monkey, rhesus (*Macaca mulatta*)	s.c.	4 weeks	0,10, 100, and 200 mg/kg/day	Anakinra	Yes	960040
A 1-week intravenous infusion study of IL-1Ra in male rhesus monkeys	Monkey, rhesus (*Macaca mulatta*)	i.v. (CI)	1 week	0 and 150 mg/kg/day	Anakinra	Yes	SY05-T90-02
A range-finding (2 weeks) toxicity study of IL-1Ra in male cynomolgus monkeys following repeated intravenous injections	Monkey, cynomolgus *(Macaca fascicularis)*	i.v.	2 weeks	0, 0.1, 1, and 10 mg/kg/day	Anakinra	Yes	SY05-T89-03

Type of study	Test system (species and strain)	Method of administration	Duration of dosing (frequency)	Dose level	Test article	GLP[a]	Study number
A subchronic systemic toxicity study of IL-1Ra in rhesus monkeys with a Recovery Period	Monkey, rhesus (*Macaca mulatta*)	i.v.	2 weeks (b.i.d.)	0, 3, 10, and 30 mg/kg/day	Anakinra	Yes	SY05-T89-08
Genotoxicity							
A *Salmonella*/mammalian-microsome plate incorporation mutagenicity assay (Ames test) and *Escherichia coli* WP2 *uvr*A reverse mutation assay with a confirmatory assay – IL-1Ra	*E. coli* and *Salmonella typhimurium*	*In vitro*	N/A	0.1 to 5000 µg/plate (dose range-finding assay) 33 to 5000 µg/plate (mutagenicity and confirmatory assays)	Anakinra	Yes	SY05-T92-13
An in vitro mammalian cytogenetics test - IL-1Ra	CHO cells	*In vitro*	N/A	0.2 to 2000 µg/mL (initial assay) 250, 500, 1000, and 2000 µg/mL (repeat assay)	Anakinra	Yes	SY05-T92-15
A L5178Y thymidine kinase$^{+/-}$ mouse lymphoma mutagenesis assay with a confirmatory assay - IL-1Ra	Mouse lymphoma (L5178Y TK$^{+/-}$)	*In vitro*	N/A	67 to 5000 µg/mL	Anakinra	Yes	SY05-T92-14
A micronucleus cytogenetics assay in mice - IL-1Ra	Mouse, ICR	*In vivo*	Single dose	0, 500, 1000, and 2000 mg/kg/day	Anakinra	Yes	SY05-T92-16
Carcinogenicity							
No carcinogenicity studies were performed.							
Reproductive and developmental toxicity							
Fertility and general reproduction (Segment I) study of IL-1Ra administered by subcutaneous injection to rats	Rat, Sprague-Dawley Crl:CD® BR VAF/Plus®	s.c.	Males: 64 days prior to mating to Day 85 Females: 15 days prior to mating to end of lactation	0, 12.5, 50, and 200 mg/kg/day	Anakinra	Yes	SY05-T93-01

Type of study	Test system (species and strain)	Method of administration	Duration of dosing (frequency)	Dose level	Test article	GLP[a]	Study number
A study of fertility and early embryonic development to implantation of r-metHuIL-1Ra administered subcutaneously in rats	Rat, Sprague-Dawley Crl:CD VAF/Plus	s.c.	Males: 29 days prior to mating and throughout mating until one day prior to euthanization Females: 14 days prior to mating to Day 7 of gestation	0, 10, 100, and 200 mg/kg/day	Anakinra	Yes	960044
A developmental toxicity study in rats with IL-1Ra	Rat, Sprague-Dawley Crl:CD BR VAF/Plus	s.c.	12 days (Day 6 to Day 17 of gestation)	0, 12.5, 50, and 200 mg/kg/day	Anakinra	Yes	SY05-T92-03
A perinatal and postnatal study of IL-1Ra administered by subcutaneous injection to rats	Rat, Sprague-Dawley Crl:CD BR VAF/Plus	s.c.	15 days (Day 6 of gestation to Day 20 of lactation)	0, 12.5, 50, and 200 mg/kg/day	Anakinra	Yes	SY05-T93-02
A developmental toxicity study in rabbits with IL-1Ra	Rabbit, New Zealand White	s.c.	13 days (Day 6 to Day 18 of gestation)	0, 12.5, 50, and 200 mg/kg/day	Anakinra	Yes	SY05-T92-04
Toxicity in juvenile animals							
A feasibility study by subcutaneous injection in rats to determine the tolerability of the proposed high-dose level and confirm feasibility of once and twice daily dosing	Rat, Sprague-Dawley	s.c.	7 days (Day 4 to Day 10 postpartum for Group 1 [q.d.]) and 16 days (Day 4 to Day 19 postpartum for Group 2 [b.i.d.])	100 mg/kg/day (Group 1) 200 mg/kg/day (Group 2)	Anakinra	No	497888

Type of study	Test system (species and strain)	Method of administration	Duration of dosing (frequency)	Dose level	Test article	GLP[a]	Study number
A 6-week neonatal/juvenile study to determine the adverse effects on memory and learning functions in rats after subcutaneous injection followed by a 1-month Recovery Period	Rat, Sprague-Dawley	s.c.	6 weeks (38 days, b.i.d.)	0, 20, 60, and 200 mg/kg/day	Anakinra	Yes	498001
Local tolerance							
No local tolerance studies were conducted.							
Other toxicity studies							
Potential effects of IL-1Ra and PEG-sTNF-RI dosed singly and in combination on immune function in Fisher 344 rat	Rat, Fisher 344	s.c. (anakinra and TNF) i.v. (anti-asialo GM1 antibody) i.p. (cyclophosphamide)	21 days (b.i.d.)	Anakinra – 0, 20, and 200 mg/kg/day TNF – 5 and 50 mg/kg Anti-asialo GM1 antibody – 24 hours prior to scheduled sacrifice (Phase 1 only) Cyclophosphamide – 25 mg/kg 4 days prior to sacrifice	Anakinra	Yes	100797
A study to determine the effects of 3-day continuous infusion of IL-1Ra on *Escherichia coli* clearance and organ colonization in the rat	Rat, Tac: N(SD)fBR	i.v. (CI)	3 days	0, 173, and 346 mg/kg/day	Anakinra	Yes	SY05-T92-17
A study to determine the effects of 3-day continuous infusion of IL-1Ra on *Staphylococcus Aureus 502A* clearance and organ colonization in the rat	Rat, Tac: N(SD)fBR	i.v. (CI)	3 days	0, 173, and 346 mg/kg/day	Anakinra	Yes	SY05-T92-18

Type of study	Test system (species and strain)	Method of administration	Duration of dosing (frequency)	Dose level	Test article	GLP[a]	Study number
A study to determine the effects of 3-day continuous infusion of IL-1Ra on *Listeria Monocytogenes* clearance and organ colonization in the rat	Rat, Tac: N(SD)fBR	i.v. (CI)	3 days	0, 173, and 346 mg/kg/day	Anakinra	Yes	SY05-T92-19
An antigenicity study (19-day) of IL-1Ra in male rhesus monkeys following repeated intravenous injections	Monkey, rhesus (*Macaca mulatta*)	i.v.	19 days (q.d.)	10 mg/kg/day	Anakinra	Yes	SY05-T89-07
A 1-month toxicity study of r-metHuIL-1Ra and PEG r-metHu-sTNF-RI administered subcutaneously in cynomolgus monkeys with a 1-month Recovery Period	Monkey, cynomolgus	s.c. Anakinra – daily sTNF-RI – once weekly	1 month	Anakinra – 0 and 100 mg/kg sTNF-RI – 0, 1, 5, and 25 mg/kg	Anakinra sTNF-RI	Yes	100484

Abbreviations: b.i.d., Twice daily; CHO, Chinese hamster ovary; CI, Continuous infusion; GLP, Good Laboratory Practice; GM1, Ganglioside-monosialic acid; ICR, Institute of Cancer Research; IL-1Ra, Interleukin-1 receptor antagonist; i.p., Intraperitoneal(ly); i.v., Intravenous(ly); MTX, methotrexate; N/A, Not applicable; PEG r-metHu-sTNF-RI, Polyethylene glycosylated recombinant-methionyl human-soluble tumor necrosis factor-receptor I; PEG-sTNF-RI, Polyethylene glycosylated soluble tumor necrosis factor-receptor I; p.o., Peroral; q.d., Once daily; q.i.d., 4 times daily; r-MetHuIL-1Ra; Recombinant-methionyl human interleukin-receptor antagonist; s.c., Subcutaneous(ly); TNF, Tumor necrosis factor.

[a] "Yes" indicates study includes a GLP compliance statement.

2.6.6.2　単回投与毒性試験

2.6.6.2.1　IL-1Ra のラットにおける単回静脈内投与毒性試験（[redacted] 719-001、[redacted] Study SY05-T94-01）

SY05-T94-01 試験は、アナキンラをラットに静脈内投与したときの急性毒性を明らかにするために実施した。

試験デザイン

各群雌雄各 5 例の Charles River CD® BR VAF/Plus ラットに、アナキンラの 1.5、15、150 及び 720 mg/kg を外側尾静脈内にボーラスで 1 回静脈内投与した。被験物質は、入手した全てのロット（Lot[redacted]、Lot[redacted]、Lot[redacted]及び Lot[redacted]）を使用し、8 mL/kg の一定容量で投与した。対照群として雌雄各 5 例に、溶媒（10 mmol/L クエン酸ナトリウム、140 mmol/L NaCl 及び 0.1% w/w ポリソルベート 80、pH 6.5；Lot[redacted]）を被験物質と同じ経路及び容量で投与した。

投与後 15 日間での評価項目は、死亡、一般状態、体重、剖検及び病理組織学的検査とした。

結果及び結論

全例が試験終了まで生存した。最高 720 mg/kg の静脈内投与では、被験物質に起因する一般状態所見、体重変化、剖検所見及び病理組織学的所見は認められなかった。ラット単回投与毒性試験における概略の致死量は 720 mg/kg を超える用量と推定された。

2.6.6.2.2　IL-1Ra のカニクイザルにおける単回静脈内投与毒性試験（[redacted]719-002、[redacted] Study SY05-T94-02）

SY05-T94-02 試験は、アナキンラをサルに静脈内投与したときの急性毒性を明らかにするために実施した。

試験デザイン

雌 2 例のカニクイザルにアナキンラ（Lot[redacted]、Lot[redacted]及び Lot[redacted]）を伏在静脈内に 1 回投与した。溶媒（10 mmol/L クエン酸ナトリウム、140 mmol/L NaCl、0.1% w/w ポリソルベート 80、pH 6.5；Lot[redacted]）を投与し、その後 1.5、15 及び 150 mg/kg を漸増投与し、投与間隔は 48 時間とした。被験物質及び溶媒対照は、8 mL/kg の一定容量を 4 分間で投与した。

投与後 9 日間での評価項目は、死亡、一般状態、体重、身体検査、食欲及び剖検とした。

試験結果

両動物とも試験終了まで生存した。試験期間中のいずれの時点においても、被験物質に関連した薬理学的及び毒性徴候は観察されず、身体検査でもいかなる所見も認められなかった。いずれの動物においても食欲不振はみられなかった。

試験期間中、体重に顕著な変化及び違いは認められなかった。

剖検で肉眼的病変は観察されなかった。

結論

試験結果に基づき、アナキンラを 150 mg/kg までの用量で単回静脈内投与すると、毒性徴候及び肉眼的病理所見は認められなかった。カニクイザル単回投与毒性試験における概略の致死量は 150 mg/kg を超える用量と推定された。

さらに、アナキンラの皮下投与による急性毒性を、ラット（120 mg/kg/日；SY05-T89-12 試験）及びアカゲザル（5、20、80 mg/kg/日；SY05-T89-11 試験）を用いた 2 週間投与試験で評価した。両動物共に全身性毒性は認められず、投与局所に炎症が観察された。これらの試験では死亡は認められなかったことから、概略の致死量はラットでは 120 mg/kg 超、サルでは 80 mg/kg 超と考えられた。

2.6.6.3　反復投与毒性試験

開発の初期段階では、アナキンラが単独の薬として、あるいは標準治療に加えて使用できる薬か否かは決められておらず、最適な投与経路も不明であった。したがって、多くの反復投与毒性試験を実施した。

2.6.6.3.1　IL-1Ra の SD ラットにおける 2 週間反復皮下投与毒性試験（[redacted]SG-590r、[redacted] Study SY05-T89-10）

SY05-T89-10 試験は、ラットにアナキンラを 1 日 2 回で 2 週間皮下投与し、その毒性を検討するために実施した。

試験デザイン

各群雌雄各 10 例の Sprague -Dawley（SD）ラットにアナキンラの 0（溶媒対照）、5、20 及び 80 mg/kg/日を 1 日 2 回 2 週間投与した。投与部位は、ラット背部の 8 つの異なる所定の位置の間でローテーションさせた。1 回あたりの投与容量は 1.0 mL/kg とした。本試験で使用したアナキンラのロット番号は[redacted]、[redacted]及び[redacted]であった。溶媒は、10 mmol/L クエン酸塩、140 mmol/L NaCl、0.5 mmol/L EDTA、pH 6.5（Lot[redacted]）とした。

試験中の評価項目は、一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査及び体温とした。剖検前に、血液学的検査、凝固系検査（フィブリノーゲン、プロトロンビン時間、部分トロンボプラスチン時間）、血液生化学的検査及び尿検査を実施した。2 週間の投与期間終了後、全ての動物を剖検し、器官重量の測定及び病理組織学的検査（骨髄塗抹検査を含む）を実施した。

試験結果

試験中及び臨床病理学的検査の結果、投与に関連した毒性はみられなかった。

剖検では、雄ラットの脳及び精巣重量を除き、投与に関連した毒性は示されなかった。体重に対する雄の脳相対重量（中用量及び高用量群）及び精巣相対重量（全投与群）に、統計学的に有意な減少が認められた。脳及び精巣の絶対重量には影響はなかった。これらの相対重量の減少は、中用量及び高用量群の雄で最終体重が増加したことによる可能性が高い。これらの体重差は統計学的に有意ではなかった。さらに、中用量及び高用量群の体重は、対照群と比較して試験開始時に高かった。したがって、これらの器官重量の減少はアナキンラ投与によるものではないと結論された。

観察された病理組織学的変化は、皮下投与部位での痕跡から軽度な出血及び亜急性炎を除き、いずれも自然発生的、偶発的あるいは死戦期での変化と考えられた。表 2.6.6-2 に出血及び亜急性炎の発現率を示す。80 mg/kg/日群で出血及び炎症の発現率がわずかに高かったが、溶媒対照群の発現率と統計学的に差はなかった。

表 2.6.6-2　アナキンラを 1 日 2 回 2 週間皮下投与したラットにおける投与部位の出血及び亜急性炎の発現状況（SY05-T89-10 試験）

Group	Dose (mg/kg/day)	Hemorrhage			Subacute inflammation		
		Male	Female[a]	Total	Male	Female[a]	Total
I	Vehicle	3/10	2/10	5/20	1/10	1/10	2/20
II	5	2/10	1/9	3/19	0/10	0/9	0/19
III	20	3/10	3/9	6/19	1/10	1/9	2/19
IV	80	6/10	2/10	8/20	2/10	2/10	4/20

[a] Because several females failed to recover from ether anesthesia during the predose administration bleeding, only 9 females each were available for assignment to the 5 and 20 mg/kg/day groups
Source: Study SY05-T89-10.

結論

ラットに 2 週間 1 日 2 回皮下投与したときの NOAEL は、高用量の 80 mg/kg/日と推定された。

2.6.6.3.2　IL-1Ra の SD ラットにおける 2 週間反復皮下投与毒性試験（[redacted]SG-600r、[redacted]Study SY05-T89-12）

SY05-T89-12 試験は、ラットにアナキンラを 1 日 4 回で 1 週間及び 2 週間皮下投与したときの毒性を明確にし、高用量のアナキンラの皮下注射により炎症を惹起するか否かを判断するために実施した。

試験デザイン

各群雌雄各 10 例の SD ラットにアナキンラの 0（溶媒対照）及び 120 mg/kg/日を 2 週間皮下投与した。投与部位はラット背部の 8 つの異なる部位でローテーションさせた。1 回あたりの投与容量は 1.0 mL/kg とし、1 日 4 回投与した。使用したアナキンラのロット番号は [redacted] であった。溶媒は、10 mmol/L リン酸ナトリウム、150 mmol/L NaCl、0.1 mmol/L EDTA、pH 7.0（Lot [redacted]）とした。各群雌雄各 5 例は投与 1 週後に剖検し、残りの各群雌雄各 5 例は投与 2 週後に剖検した。

試験中の評価項目は、一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査及び体温とした。剖検前に、血液学的検査、凝固系検査（フィブリノーゲン、プロトロンビン時間、部分トロンボプラスチン時間）、血液生化学的検査及び尿検査を実施した。投与 1 週及び 2 週後に剖検し、器官重量の測定及び病理組織学的検査（骨髄塗抹標本の検査を含む）を実施した。

試験結果

試験中及び臨床病理学的検査の結果、投与に関連した毒性はみられなかった。

剖検では、一部の器官重量への影響を除き、投与に関連した毒性は認められなかった。影響は体重比器官重量（相対重量）にのみ認められた。雄では、投与 1 週後の下垂体及び脾臓相対重量は、対照群と比較してわずかではあるが有意に増加した。しかし、投与 2 週後では、下垂体、脾臓及び甲状腺相対重量はわずかではあるが有意に低下した。雌では、投与 1 週後の下垂体相対重量はわずかではあるが有意に低下した。しかし、投与 2 週後では相対重量への影響はみられなかった。これらの結果は、関連する病理組織学的変化を伴わなかったことから、毒性学的意義は乏しいと考えられた。

観察された病理組織学的変化は、皮下投与部位における痕跡から軽度の出血及び炎症を除き、いずれも自然発生的、偶発的あるいは死戦期での変化と考えられた。表 2.6.6-3 に炎症の発現率を示す。この慢性炎症はアナキンラを投与したラットでのみ観察された。その頻度は、投与 1 週後と比較して、投与 2 週後で高かった。炎症の程度は痕跡から軽度で、主な細胞はリンパ球で、若干の好酸球浸潤を伴っていた。

表 2.6.6-3　アナキンラを 1 日 4 回で 1 又は 2 週間皮下投与したラットにおける投与部位の炎症発現状況（SY05-T89-12 試験）

Group	Dose (mg/kg/day)	Sacrifice Day 8	Sacrifice Day 15
I	Vehicle	0/10	0/10
II	120	1/10	7/10

Source: Study SY05-T89-12.

結論

120 mg/kg/日の皮下投与で、投与部位に炎症が観察された。ラットに 1 日 4 回皮下投与したときの全身性毒性に対する NOAEL は 120 mg/kg/日と推定された。

2.6.6.3.3　アナキンラのラットにおける 6 ヵ月間反復皮下投与毒性試験及び 1 ヵ月間回復性試験（[redacted]86533、[redacted] Study SY05-T94-04）

SY05-T94-04 試験は、ラットにアナキンラを 4 週間又は 26 週間皮下投与したときの毒性、並びに 26 週間投与後の 1 ヵ月間休薬期間後の回復性を検討するために実施した。SY05-T94-04 試験には PK 及び TK 解析も含まれており、これらは［2.6.4.3.3.2］項に記載されている。

試験デザイン

SD ラットの各群雌雄各 20 例にアナキンラ（Lot [redacted]、Lot [redacted] 及び Lot [redacted]）の 1、10 又は 100 mg/kg/回を 1 日 2 回（1 日総投与量：2、20 及び 200 mg/kg/日）を皮下投与した。対照群（雌雄各 20 例）には、溶媒（10 mmol/L クエン酸ナトリウム、140 mmol/L NaCl、0.1% w/w ポリソルベート 80；Lot [redacted]）を投与群と同じ容量（1.1 mL/kg）で投与した。各群雌雄各 5 例を投与後 4 週の中間剖検群に割り付け、各群雌雄各 10 例を主試験群に割り付け、雌雄各 5 例を回復群に割り付けた。

試験中の評価項目は、一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査とした。剖検前に、血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査を実施した。血中アナキンラ濃度及び抗アナキンラ抗体を測定した。尿中アナキンラ濃度を測定した。動物を剖検し、器官重量測定及び病理組織学的検査を行った。

試験結果

投与後 4 週の中間剖検群では、死亡例及び本薬投与に関連した一般状態の変化は認められなかった。対照群の雄 1 例で観察された偶発的な臨床徴候は、皮膚の痂皮と左肩甲部の中等度の被毛疎であった。投与に関連すると考えられる変化は、体重、摂餌量、眼科学的所見及び尿検査データには認められなかった。

一部の血液学的検査及び血液生化学的検査パラメーターでは、投与に関連した明らかな影響が認められた。200 mg/kg/日群の雄では、対照群と比較して統計学的に有意な白血球数の増加が認められた。しかし、同じ週齢及び系統の動物の許容範囲内の値であり、この影響は雌ではみられなかった。200 mg/kg/日群の雄では ALT、200 mg/kg/日群の雌では AST の統計学的に有意な増加が認められたが、これらの値は同じ週齢及び系統の動物の許容範囲内であった。対照群と比較して、中間剖検群のその他の血液学的検査及び血液生化学的検査パラメーターに、投与に関連した影響は認められなかった。

対照群と比較して、投与群に剖検所見及び器官重量の変化は認められなかった。投与部位の蜂巣炎が、200 mg/kg/日群の 7/10 例、20 mg/kg/日群の 4/10 例、2 mg/kg/日群の 5/10 例及び対照群

の 0/10 例に認められ、被験物質による可能性が高いと考えられた。投与部位の出血が多くみられたが、投与手技によるものと考えられた。

投与後 6 ヵ月に剖検した主試験群では、対照群の雌 1 例が投与 18 週目に死亡し、2 mg/kg/日群の雌 1 例を投与 14 週に屠殺した。病理組織学的所見では、対照群の雌に播種性リンパ肉腫が認められた。2 mg/kg/日群の雌で敗血症の可能性を示唆する脾臓及び胸骨の病変が認められたが、これはアナキンラ投与と関連しないと考えられた。投与に関連した臨床徴候は認められず、投与部位の肉眼的な反応徴候も観察されなかった。対照群及び投与群で認められた偶発的な臨床徴候は、後肢又は前肢の腫脹、後肢又は前肢の使用の制限、前肢又は前足の被毛褐色染色、頸部、胸部、前肢、前足あるいは後足の被毛疎、又は頸部、前肢あるいは前足の皮膚痂皮であった。

2 及び 200 mg/kg/日群の雄では、投与 4 週目から投与期間を通じて、対照群と比較して統計学的に有意ではあるが、軽度な体重増加（投与 26 週でそれぞれ 11%及び 12%）が認められた。20 mg/kg/日群の雄では、統計学的に有意ではないものの、同様に体重の増加が認められた（投与 26 週で 4%）。これらの有意な増加は、回復期間中にもはや観察されなかった。投与期間中の摂餌量の増加は、2 及び 200 mg/kg/日群の雄では統計学的に有意で、20 mg/kg/日群の雄では、統計学的に有意ではないが、同様の増加が認められた。回復期間中では体重及び摂餌量に統計学的に有意な変化は認められなかった。

中間剖検群及び主試験群のいずれにおいても、投与と関連すると考えられる眼科学的所見、血液学的検査及び血液生化学的検査値の変化は認められなかった。

投与に関連した尿タンパクの増加が投与 26 週に見られたが、回復期間中には認められなかった。

26 週間投与後、200 mg/kg/日群の雄で腎臓重量（絶対重量及び脳重量に対する相対重量）の増加が認められた（左右腎臓の絶対重量はそれぞれ 19%及び 20%、左右腎臓の相対重量はそれぞれ 17%及び 18%）。腎臓重量の増加は、低用量群の雄の試験 27 週、回復群及び雌の全投与群では認められなかった。試験 27 週で、肝重量の増加（絶対重量及び脳重量に対する相対重量）が 200 mg/kg/日群の雄（それぞれ 34%及び 32%）及び雌（それぞれ 23%及び 26%）に認められた。2 mg/kg/日群でも雄では脳重量に対する肝相対重量の増加（20%）が見られ、20 mg/kg/日群の雌では肝臓の絶対重量、体重に対する相対重量及び脳重量に対する相対重量の増加（それぞれ 36%、29%及び 34%）が認められた。これらの肝重量の増加はいずれも、病理組織学的及び肝酵素の変化とは関連していなかった。回復期間終了時に肝重量の増加は認められなかった。

観察された剖検所見は、被験物質又は溶媒によるものではないと考えられた。投与部位に病理組織学的に観察された混合細胞浸潤の発現頻度増加は（200 mg/kg/日群の 16 例、20 mg/kg/日群の 8 例、2 mg/kg/日群の 11 例及び対照群の 6 例）、投与手技によるものと考えられ、アナキンラによる増悪も考えられる。投与後 4 週の中間剖検群でも同様の発現率の増加が認められた。200 mg/kg/日群の一部の雌で、軽微から軽度の重症度の増加が認められた。混合細胞浸潤は、主

に皮下組織内にマクロファージ、好酸球、リンパ球及び形質細胞が存在していた。休薬 1 ヵ月後に明らかに回復した。回復群の 200 mg/kg/日群の雄 1 例で、軽微な混合細胞浸潤が認められたが、この所見は 1 例で認められたのみであり、炎症性浸潤は皮下組織によくみられる所見であることから、自然発生的なものであった可能性がある。投与部位の出血が多かったが、投与手技によるものと思われた。

投与 26 週間後、200 mg/kg/日群で慢性進行性腎症の発現率のわずかな増加が認められた（表 2.6.6-4）。アナキンラ投与群では、この変化の重症度の増加が明らかであったが、この疾患過程の原因及び重症度の増加は未だ不明である。投与後 4 週の中間剖検群では慢性進行性腎症は認められなかった。重度の慢性進行性腎症は、一部の投与動物でみられるようにタンパク尿と関連している可能性がある。主試験群と回復群で動物数が異なることから、慢性進行性腎症の回復性に関して決定的な結論を下すことはできなかったが、回復群の対照群と投与群との間で病変の発現率が同程度であったことから回復が示唆された。

雄ラットは通常、慢性進行性腎症を発症する傾向があり、また、タンパク質レベルが疾患の発生率及び重症度に直接影響を及ぼすことから、本試験で認められた慢性進行性腎症は、特異的な薬理学的／毒性学的特性ではなく、アナキンラのタンパク質の性質に関連している可能性が高いと考えられる。最後に、慢性進行性腎症などの腎疾患をわずかに悪化させる薬物は、ヒトの健康へのリスク増加とは関連しない（Greaves 1990）。

表 2.6.6-4　アナキンラのラットにおける 6 ヵ月間皮下投与毒性試験での慢性進行性腎症の発現頻度

Group (Dose)	1-month Interim necropsy incidence	6-month Main necropsy incidence	1-month Recovery necropsy incidence
Group 1 males (0 mg/kg)	0/5	2/10	0/5
Group 1 females (0 mg/kg)	0/5	0/10	1/5
Group 2 males (2 mg/kg)	0/5	3/10	1/5
Group 2 females (2 mg/kg)	0/5	0/9	0/5
Group 3 males (20 mg/kg)	0/5	1/10	2/5
Group 3 females (20 mg/kg)	0/5	3/10	0/5
Group 4 males (200 mg/kg)	0/5	6/10	2/5
Group 4 females (200 mg/kg)	0/5	1/10	0/5

Source: Study SY05-T94-04.

20 及び 200 mg/kg/日群では、26 週間投与後に腎臓の間質性単核細胞浸潤が増加したが、回復群では見られなかった。慢性進行性腎症の構成要素として単核細胞浸潤が頻繁に出現するにもかかわらず、炎症性浸潤はこの疾患とは関連せずに起こりうる。その他の病変は発現率が低く、ラットに見られる一般的な偶発的所見と一致していた。

結論

アナキンラを 2、20 及び 200 mg/kg/日の用量で 6 ヵ月間皮下投与した結果、雄に体重及び摂餌量の軽度な増加が認められた。主に 200 mg/kg/日群で尿タンパクの増加、投与部位の混合細胞浸潤の軽度な増加、慢性進行性腎症、腎臓及び肝臓重量の増加が見られた。これらの影響はいずれも可逆的であると考えられた。NOAEL は 20 mg/kg/日と推定された。

2.6.6.3.4　IL-1Ra の SD ラットにおける 2 週間反復静脈内投与毒性試験（[redacted]SG-534r、[redacted] Study SY05-T89-01）

ラットにアナキンラを 1 日 1 回 2 週間静脈内投与したときの毒性の用量範囲を明らかにするために実施した。

試験デザイン

アナキンラを各群雌雄各 3 例の SD ラットに 1 日 1 回 2 週間静脈内（ボーラス）投与した。アナキンラの用量は 0（溶媒対照）、0.047、0.231 及び 1.17 mg/kg/日とし、投与容量は 1.0 mL/kg/回とした。使用したアナキンラのロット番号は[redacted]、[redacted]及び[redacted]で、溶媒は PBS（10 mmol/L リン酸ナトリウム、150 mmol/L NaCl、pH 7.0；Lot [redacted]）を使用した。

試験中の評価項目は、一般状態観察、体重及び摂餌量とした。剖検前に、血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査を実施した。2 週間の投与期間終了後、全ての動物を剖検し、病理組織学的検査を実施した。

試験結果

試験期間中の検査、臨床病理検査及び病理学的検査の結果のとおり、投与に関連した毒性は認められなかった。

結論

ラットに 2 週間反復静脈内投与したときの NOAEL は、高用量の 1.17 mg/kg/日と推定された。

2.6.6.3.5　IL-1Ra の SD ラットにおける 2 週間反復静脈内投与毒性試験（[redacted]SG-542r、[redacted]Study SY05-T89-02）

SY05-T89-02 試験は、ラットにアナキンラを 1 日 1 回で 2 週間静脈内投与したときの毒性の用量範囲を明らかにするために実施した。

試験デザイン

アナキンラを各群雌雄各 5 例の SD ラットに 1 日 1 回 2 週間静脈内（ボーラス）投与した。アナキンラの投与量は 0（溶媒対照）、2、5 及び 20 mg/kg/日とし、投与容量は 2 及び 5 mg/kg/日群

では 1 mL/kg/回、0 及び 20 mg/kg/日群では 2 mL/kg/回とした。本試験に用いたアナキンラのロット番号は[redacted]、[redacted]、[redacted]及び[redacted]で、溶媒は 10 mmol/L リン酸ナトリウム、150 mmol/L NaCl、0.1 mmol/L EDTA、pH 7.0（Lot [redacted]及び Lot [redacted]）を用いた。

試験中の評価項目は、一般状態、体重、摂餌量とした。剖検前に、血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査を実施した。投与 2 週後に剖検し、器官重量測定及び病理組織学的検査（骨髄塗抹標本を含む）を実施した。

試験結果

試験期間中の検査、臨床病理検査及び病理学的検査の結果のとおり、投与に関連した毒性は認められなかった。

結論

ラットに 2 週間静脈内投与したときの NOAEL は、高用量の 20 mg/kg/日と推定された。

2.6.6.3.6　アナキンラ（皮下）及びメトトレキサート（経口）のラットにおける 4 週間反復投与毒性試験（[redacted]6271-122、[redacted] Study 960048）

アナキンラ及び MTX をラットにそれぞれ皮下及び経口で 28 日間連日投与し、標的臓器毒性に対する相互作用効果を評価し、TK プロファイルを明らかにするために実施した。GLP 非適用での血漿中 TK 及び抗体データ解析を含む 960048 試験の詳細な結果は［2.6.4.3.3.1］項に掲載している。

試験デザイン

本試験に使用したアナキンラのロット番号は[redacted]、溶媒ロット番号は[redacted]であった。アナキンラは、10 mmol/L クエン酸ナトリウム、140 mmol/L NaCl、0.5 mmol/L EDTA、0.1% w/w ポリソルベート 80、pH 6.5 で調製した。

雌 SD ラットを表 2.6.6-5 の試験デザインに従って 10 群に割り付けた［第 1～9 群は各群 5 例（毒性試験動物）及び 12 例（TK 試験動物）、第 10 群は 12 例（TK 試験動物）］。

表 2.6.6-5 ラットにおける 4 週間毒性試験及び TK 試験のデザイン

Group	Dose level		Number/group	
	Anakinra (mg/kg)[a]	Methotrexate (mg/kg)[a]	Toxicity	Toxicokinetics
1	0[b]	0[b]	5	12
2	0[c]	0.04	5	12
3	0	0.2	5	12
4	10	0[d]	5	12
5	100	0[d]	5	12
6	10	0.04	5	12
7	100	0.04	5	12
8	10	0.2	5	12
9	100	0.2	5	12
10	1	0	0	12

Source: Study 960048.
[a] The dose volume for anakinra was 1.33 mL/kg, and the dose volume for methotrexate was 10 mL/kg.
[b] Group 1 received both the carrier for methotrexate and the vehicle for anakinra.
[c] Groups 2 and 3 received the vehicle for anakinra.
[d] Groups 4, 5, and 10 received the carrier for methotrexate.

試験中の評価項目は、死亡、一般状態観察、体重、摂餌量及び眼科学的検査とした。剖検前に、血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査を実施した。TK 解析及び抗アナキンラ抗体測定を実施した。投与 29 日目に剖検し、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。

試験結果

毒性試験成績

アナキンラ 100 mg/kg/日／MTX 0.04 mg/kg/日群（第 7 群）の TK 群及びアナキンラ 1 mg/kg/日群（第 10 群）の TK 群の各 1 例がそれぞれ投与 12 日及び 15 日に死亡し、剖検した。アナキンラ 100 mg/kg/日／MTX 0.04 mg/kg/日群（第 7 群）の TK 群の 2 例目が投与 12 日に死亡し、剖検せずに廃棄した。他の全ての動物は、計画屠殺まで生存した。

皮膚蒼白が MTX 0.20 mg/kg/日群（第 3 群）の 8 例、アナキンラ 10 mg/kg/日／MTX 0.20 mg/kg/日群（第 8 群）の 3 例、アナキンラ 100 mg/kg/日／MTX 0.20 mg/kg/日群（第 9 群）の 4 例、及びアナキンラ 1 mg/kg/日群（第 10 群）の 1 例に認められた。試験期間中に死亡し、剖検された第 10 群の動物では、その他の所見として、糞便減少、呼吸の変化、唾液分泌過多、冷感などが認められた。第 3 群、第 5 群及び第 9 群の動物には、被験物質に関連した眼科学的変化や体重、体重増加量及び摂餌量に有意差は認められず、第 2 群、第 4 群、第 6 群、第 7 群及び第 8 群の動物にも顕著な差は認められなかった。

MTX の 0.20 mg/kg/日を投与した群では、臨床病理検査において、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、平均赤血球容積及び絶対網状赤血球数の減少、並びに平均赤血球ヘモグロビン濃度、血小板数、アルブミン／グロブリン比（β及びγグロブリンが軽度に低いため)、カリウムの増加など、統計学的に有意であるか、対照群と著しく異なる影響が認められた。これらの所見は、MTX の 0.20 mg/kg/日を投与した動物の約 1/2 に影響が認められた。アナキンラの併用投与はこれらの所見に影響を及ぼさなかった。赤血球への影響が最も有害な所見であり、赤血球産生の大幅な低下に続発する顕著な非再生性貧血と一致していた。100 mg/kg/日までの用量のアナキンラの投与は、臨床病理検査結果に影響を及ぼさなかった。

最終体重、絶対及び相対器官重量に、被験物質に関連した変化は認められなかった。MTX の 0.20 mg/kg/日を投与した群では、びまん性に淡色化した大腿骨骨髄の発現率の増加が認められた。病理組織学的検査では、第 3 群及び第 9 群で骨髄の細胞減少が認められ、いずれも MTX の 0.20 mg/kg/日が投与されていた。皮下投与部位の慢性活動性炎症の増加が第 5 群及び第 9 群（アナキンラ 100 mg/kg/日）でみられた。MTX 0.20 mg/kg/日群（第 3 群）で脾臓の組織球浸潤の発現率及び重症度の増加が認められた。この脾臓の変化は、アナキンラ単独又は MTX 併用投与群（第 5 群及び第 9 群）では認められなかった。

雌ラットでは、アナキンラの用量にほぼ比例したアナキンラの曝露量を示した。アナキンラの 4 週間反復投与後に血漿中アナキンラ濃度の増加が認められた。MTX の併用経口投与は、アナキンラの全身曝露量に明らかな影響を及ぼさず、アナキンラは経口投与した MTX の全身曝露量に影響を及ぼさなかった。

ELISA 法による血漿の分析では、投与 14 日には既に抗体の存在が示唆された。より大きな抗体反応を生じる能力の点でアナキンラと MTX の用量の間に明らかな相関は認められなかったが、用量依存的な抗体反応が示された。MTX と併用したアナキンラの高用量投与は、明らかに抗体価の低下に寄与した。投与 28 日までの抗体価に関して、アナキンラと MTX の溶媒を投与した動物においてのみ、明らかに用量依存的な反応が認められた。MTX を併用した中用量群では、抗体価が上昇したが、用量依存的ではなく、高用量群では抗体価に関して反対の結果が得られた。これは、IL-1Ra の用量を増加させると抗体反応が低下したという、これまでのラット試験と一致している。

表 2.6.6-6　メトトレキサート経口投与と同時にアナキンラを皮下投与したときの投与 1、14 及び 28 日目の血清反応

Anakinra dose (mg/kg)	MTX dose (mg/kg)	Number of seroactive animals		
		Day 1	Day 14	Day 28
Placebo	Placebo	0/3	0/3	0/3
1	Placebo	0/3	2/3	2/2
10	Placebo	0/3	2/3	2/3
10	0.04	0/3	3/3	3/3
10	0.20	0/3	2/3	2/3
100	Placebo	0/3	3/3	2/3
100	0.04	0/3	2/2	2/2
100	0.20	0/3	0/3	0/3

Source: Study 960048.
Abbreviations: MTX, Methotrexate; OD, Optical density.
Notes: Plasma samples were diluted 1:50 into diluent.
Samples were considered reactive when the OD ratio of post-treatment to pretreatment was greater than 2000.

結論

臨床病理検査及び病理学的検査の結果から、MTX（経口）及びアナキンラ（皮下）を雌 SD ラットに単独又は併用で 4 週間投与したときの MTX の NOAEL は 0.04 mg/kg/日と推定された。MTX の単独投与のみで認められた脾臓の組織球性炎症は、MTX とアナキンラの併用投与では認められなかった。併用投与は MTX 単独投与で誘発された変化に影響を及ぼさなかった。アナキンラ単独投与による全身性毒性の NOAEL は 100 mg/kg/日と推定され、第 5 群及び第 9 群（100 mg/kg/日のアナキンラ）では皮下投与部位に慢性活動性炎症の増加が認められた。

2.6.6.3.7　IL-1Ra の SD ラットにおける 2 週間反復静脈内投与毒性試験（[redacted]SG-569r、[redacted]Study SY05-T89-05）

ラットにアナキンラを 1 日 1 回で 2 週間静脈内投与したときの毒性を明らかにするために実施した。さらに 4 週間の回復期間を設け、毒性変化の可逆性を評価した。

試験デザイン

SD ラットにアナキンラを 2 週間毎日投与した。本試験に用いたアナキンラのロット番号は[redacted]、[redacted]及び[redacted]であった。投与経路は尾静脈内への静脈内（ボーラス）投与とし、投与用量は 0（溶媒対照）、3、10 及び 30 mg/kg/日で、投与容量は 1.0 mL/kg/回とした。溶媒は、10 mmol/L リン酸ナトリウム、150 mmol/L NaCl、0.1 mmol/L EDTA、pH 7.0（Lot [redacted]）を用いた。各群雌雄各 10 例とし、さらに雌雄各 10 例を溶媒群及び 30 mg/kg/日群の 4 週間回復群とした。

試験中の評価項目は、一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査とした。剖検前に、血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査を実施した。動物を剖検し、器官重量測定及び病理組織学的検査（骨髄塗抹を含む）を実施した。

試験結果

生存期間中の検査、臨床病理検査及び剖検では、投与に関連した毒性は認められなかった。

観察された病理組織学的変化は、痕跡から軽度の血管周囲出血及び投与部位の炎症を除いていずれも自然発生的、偶発的又は死戦期での変化によるものと考えられた。軽度の血管周囲出血は投与手技に起因し、アナキンラとの関連はないと考えられた。血管周囲の炎症病変は、亜急性又は慢性のいずれかであった。投与 2 週に屠殺した 30 mg/kg/日群では、血管周囲炎症の発現率が軽度に増加した（表 2.6.6-7）。この影響は、おそらくアナキンラ投与に関連していると考えられた。いずれのラットにも血管の炎症、血栓症、壊死の徴候は認められなかった。回復群では、血管周囲の炎症の発現率は完全に回復した（表 2.6.6-7）。

表 2.6.6-7 アナキンラを 2 週間反復静脈内投与したラットにおける血管周囲の炎症の発現状況（SY05-T89-05 試験）

Group	Dose (mg/kg/day)	Necropsied after 2 weeks dosing	Necropsied after 4 weeks Recovery period
I	Vehicle	M 1/10, F 3/10	M 0/10, F 0/10
II	3	M 2/10, F 1/10	ND
III	10	M 3/10, F 0/10	ND
i.v.	30	M 4/10, F 4/10	M 0/9[a], F 0/10

Abbreviations: F, Female; i.v. Intravenous; M, Male; ND, Not done.
[a] 1 male high-dose rat, designated for the recovery group, died during the dosing period (Day 7) due to failure to recover from anesthesia following retro-orbital sinus blood collection.
Source: Study SY05-T89-05.

結論

高用量のアナキンラ（30 mg/kg/日）は、静脈内投与部位で可逆的な血管周囲の炎症をもたらした。2 週間反復静脈内投与したときの投与部位毒性の NOAEL は中用量の 10 mg/kg/日と推定された。全身毒性の NOAEL は高用量の 30 mg/kg/日と推定された。

2.6.6.3.8 IL-1Ra の SD ラットにおける 2 週間反復静脈内投与毒性試験（[redacted]SG-590r、[redacted]Study SY05-T89-09）

原薬ロット[redacted]のアナキンラと SY05-T89-05 試験で使用した原薬ロット[redacted]のアナキンラを比較するために実施した。これらの 2 原薬ロットは、製造工程のわずかな違いのもとで製造された。2 原薬ロット間の主な差異は、溶媒中のリン酸塩からクエン酸塩への切替え、pH7.0 から

6.5 への低下及び 3 番目のイオン交換カラムの追加であった。ラットに原薬ロット[redacted]のアナキンラを 2 週間静脈内投与したときの毒性を検討した。

試験デザイン

アナキンラの 0（溶媒対照）及び 30 mg/kg/日を、各群雌雄各 10 例の SD ラットに 2 週間静脈内（ボーラス）投与した。投与容量は 1.0 mL/kg/回とした。本試験のアナキンラのロット番号は[redacted]であった。溶媒は、10 mmol/L リン酸ナトリウム、150 mmol/L NaCl、0.1 mmol/L EDTA、pH 6.5（Lot[redacted]）を用いた。

試験中の評価項目は、一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査及び体温とした。剖検前に、血液学的検査、血液生化学的検査、凝固系検査及び尿検査を実施した。投与 2 週後に剖検し、器官重量測定及び病理組織学的検査（骨髄塗抹標本を含む）を実施した。

試験結果

試験期間中の検査、臨床病理検査及び剖検では、投与に関連した毒性は認められなかった。

観察された病理組織学的変化は、30 mg/kg/日群の雌雄各 1 例の投与部位における軽微な亜急性炎症を除きいずれも、自然発生的、偶発的又は死戦期での変化によるものと考えられた。しかし、これらの所見は有意ではないと考えられた。影響が見られた動物は少なく、重症度は痕跡程度であった。アナキンラの他の静脈内投与試験でも、溶媒対照群に同程度の頻度で投与部位炎症が認められた（表 2.6.6-7）。

結論

ラットに 2 週間反復静脈内投与したときの NOAEL は 30 mg/kg/日と推定された。

2.6.6.3.9 IL-1Ra のラットにおける 2 週間反復吸入毒性試験（[redacted]92-8390、[redacted] Study SY05-T92-01）

SD ラットに液状エアゾールとして鼻部のみの吸入により投与したときのアナキンラの毒性を評価した。

試験デザイン

各群雌雄各 10 例の SD ラットにアナキンラ（Lot[redacted]及び Lot[redacted]）の目標濃度 7.5 及び 75 mg/m^3 を 1 日 2 時間、週 7 日、2 週間吸入（鼻部のみ）投与した。空気対照群は、チャンバー内で飼育室内空気のみを曝露し、溶媒対照群には、被験物質曝露群と同程度の濃度（名目上）の溶媒（10 mmol/L クエン酸塩、140 mmol/L NaCl、0.5 mmol/L EDTA、0.1% w/w ポリソルベート 80、pH 6.5；Lot[redacted]）を曝露した。曝露レベルは、1 日あたり 2 回/チェンバー、量的にモニターした。また、代表的な重量測定及びカスケードインパクターサンプルについて、

ELISA 法を用いてアナキンラ タンパク質濃度を分析した。粒子サイズ分布は Delron DCI‐6 カスケードインパクターを用いて毎日測定した。

試験中の評価項目は、一般状態観察、体重及び摂餌量とした。剖検前に血液学的検査、血液生化学的検査及び血清中抗アナキンラ抗体測定を実施した。投与 2 週間後に剖検し、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。

試験結果

アナキンラの累積平均重量曝露濃度は、空気対照群、溶媒対照群、7.5 及び 75 mg/m^3 群で、それぞれ 0、0、10 及び 99 mg/m^3 であった。空気対照群、溶媒対照群、7.5 及び 75 mg/m^3 群のアナキンラの累積平均分析曝露濃度はそれぞれ 0.000052、0.00900、8.7 及び 86 mg/m^3 であった。この結果、7.5 及び 75 mg/m^3 群の肺内沈着量はそれぞれ 0.33 及び 3.2 mg/kg/日と算出された。

溶媒対照群、7.5 及び 75 mg/m^3 群の粒子径分布（平均質量中央空気力学径）はそれぞれ 1.6、1.1 及び 1.2 ミクロンであった。大きさが 4 ミクロン以下の粒子の割合が同程度（それぞれ 87%、92%及び 88%）であったことから、3 種類のエアロゾルはいずれもラットに等しく呼吸可能であると考えられた。

試験期間中、投与に関連した死亡は認められず、理学的観察、体重、臨床病理、器官重量、剖検及び病理組織学的所見についても、投与群と対照（空気又は溶媒）群との間に顕著な差は認められなかった。

血漿中アナキンラ濃度を最終曝露（14 日）直後に測定した。0.33 mg/kg/日群（7.5 mg/m^3 群の肺内沈着量）の雄及び雌の濃度はそれぞれ 24.3 ± 26.0 及び 21.2 ± 6.4 ng/mL であり、3.2 mg/kg/日群（75 mg/m^3 群の肺内沈着量）の雄及び雌の濃度はそれぞれ 216 ± 162 及び 233 ± 152 ng/mL であった。これらは、予想されたように 2 つの曝露レベルの間で約 10 倍の差を示した。

血清中抗アナキンラ抗体（IgM 及び IgG）濃度を、投与 7 日及び 14 日に測定した。IgM 抗体は、空気対照群（投与 7 日）、0.33 mg/kg/日群（投与 7 日）、3.2 mg/kg/日群（投与 14 日）のそれぞれ 1 例のみのいずれかの時点で検出された。IgG 抗体は、投与 7 日の時点でいずれの群からも検出されなかった。投与 14 日の測定時点では、3.2 mg/kg/日群の 20 例中 6 例が抗アナキンラ IgG 抗体陽性であった。投与 14 日の他のラットは全て陰性であった。これらの結果から、3.2 mg/kg/日群で被験物質に対する免疫反応の可能性が示されたが、軽度であった。

結論

全般的に、本試験条件下でのアナキンラの NOAEL は 86 mg/m^3 又は 3.2 mg/kg/日であった。

2.6.6.3.10　IL-1Ra のアカゲザルにおける 2 週間反復皮下投与毒性試験（[redacted]SG-596m、[redacted]Study SY05-T89-11）

アカゲザルにアナキンラを 1 日 2 回 2 週間皮下投与したときの毒性を明らかにするために実施した。

試験デザイン

各群雌雄 3 例のアカゲザルにアナキンラの 0（溶媒対照）、5、20 及び 80 mg/kg/日を 2 週間皮下投与した。投与容量は 0.4 mL/kg/回とした。本試験で使用したアナキンラのロット番号は、[redacted]、[redacted]、[redacted]であった。溶媒は、10 mmol/L クエン酸ナトリウム、140 mmol/L NaCl、0.5 mmol/L EDTA、pH 6.5（Lot[redacted]）を用いた。

試験中の評価項目は、一般状態観察、体重、摂餌量、眼科学的検査、体温及び心電図検査とした。剖検前に血液学的検査、血液生化学的検査を実施した。2 週間の投与期間終了時に剖検し、器官重量測定及び病理組織学的検査（骨髄塗抹標本を含む）を実施した。

試験結果

試験期間中の検査及び臨床病理検査では、投与に関連した毒性は認められなかった。一部の臨床病理検査パラメーターで散発的な変動がみられたが、いずれも正常範囲内であり、投与に関連したものではないと判断された。

剖検では、投与に関連した変化は認められなかった。観察された病理組織学的変化は、投与部位の軽微な慢性炎症を除き、自然発生的、偶発的又は死戦期によるものと考えられた。投与部位の慢性炎症の発現状況を表 2.6.6-8 に示した。投与に関連した投与部位の慢性炎症の増加が認められた。

表 2.6.6-8　アナキンラを 1 日 2 回 2 週間皮下投与したサルにおける投与部位の慢性炎症の発現状況（SY05-T89-11 試験）

Group	Dose (mg/kg/day)	Male	Female	Total
I	Vehicle	1/3	0/3	1/6
II	5	0/3	1/3	1/6
III	20	1/3	2/3	3/6
IV	80	3/3	2/3	5/6

Source: Study SY05-T89-11.

結論

アナキンラの 20 及び 80 mg/kg/日の用量では、投与部位の軽微な炎症が観察された。投与部位での局所毒性に対する NOAEL は 5 mg/kg/日（低用量）と推定された。全身性毒性に対する NOAEL は 80 mg/kg/日と推定された。

2.6.6.3.11　IL-1Ra のアカゲザルにおける 4 週間反復皮下投与毒性試験及び 4 週間回復性試験（[redacted]0421-01、最終試験 960040）

アカゲザルにアナキンラを 28 日間皮下投与したときの毒性を明らかにし、4 週間の休薬期間を設けて被験物質の影響からの回復性を評価した。PK 及び TK 解析も実施し、これらについては［2.6.4.3.3.5］項に記載した。

試験デザイン

未処置のアカゲザル 32 例（開始時体重：2.9～4.2 kg）を下表に示すように体重層別で 4 群に割り付けた（表 2.6.6-9）。試験前に包括的健康スクリーニング（身体検査、血液学的検査、血液生化学的検査、血液凝固検査、尿検査、心電図、眼科学的検査を含む）を実施した。被験物質（Lot[redacted]）及び対照物質（Lot[redacted]）を、背部に 1 日 1 回 28 日間反復皮下投与した。溶媒は 10 mmol/L クエン酸ナトリウム、140 mmol/L NaCl、0.5 mmol/L EDTA、0.1% w/w ポリソルベート 80、pH 6.5 を用いた。

表 2.6.6-9　960040 試験におけるアカゲザルの割付

Group no.	Number of males/females	Dose level (mg/kg)	Dose volume (mL/kg)	Number sacrificed	
				Day 29	Day 57
1	5/5	0 (control)	2.7	3/3	2/2
2	3/3	10	0.13	3/3	NA
3	3/3	100	1.3	2/3[a]	NA
4	5/5	200	2.7	3/3	2/2

Abbreviations: NA, Not applicable; no., Number.
[a] 1 male animal in Group 3 died on Day 6 from gastric dilatation.
Source: Study 960040.

試験中の評価項目は、一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査、心電図検査、呼吸数、血圧、心拍数及び体温とした。血液学的検査、凝固系検査、血液生化学的検査及び尿検査を実施した。TK 解析及び血清中抗アナキンラ抗体測定（ELISA 法）を実施した。

高用量群の数例で皮膚病変が認められた。これらの病変のうち 3 病変は、病理組織学的検査のため、治療前に生検した。1 病変は投与部位の膿瘍と思われたが、他は投与部位での変化ではなかった（手根部、鼠径部）。排液前にこの病変から細菌培養した。

動物を剖検後、器官重量を測定し病理組織学的検査を実施した。

試験結果

投与に関連した皮膚病変が高用量群の 5/10 例で認められた。生検した 3 病変は、病理組織学的検査で主としてリンパ組織球反応を特徴とする炎症性病変であった。コアグラーゼ陽性の溶血性ブドウ球菌が 1 病変から培養された。この細菌は一般的に皮膚に認められ、投与時に注射針によって導入された可能性がある。表 2.6.6-10 に皮膚病変の発現時期、外観及び特徴をまとめた。

表 2.6.6-10 960040 試験での皮膚病変

Animal ID (Sex)	Group	First occurrence (Study Day)	Location and comments	Biopsy findings and culture results
R3905F (F)	4	15	8 to 10 cm draining lesion, right humerus area	Not done
R1PK (M)	4	19 (lesion 1) 21 AM (lesion 2) 21 PM (lesion 3)	1) 2 to 3 cm draining lesion at left medial femoral area; swollen prepuce; s.c. hemorrhage on scrotal area 2) 3 cm swelling of left dorsal carpus 3) Swollen 4th digit on right hand (drained purulent material)	Biopsy of left carpal lesion - Chronic inflammation (suppurative and lymphohistiocytic) acute hemorrhage, microabscessation
R3676M (M)	4	21	2 to 3 cm raised, red lesion on right medial tibial area; minimal serosanguineous drainage	Not done
R3590 (M)	4	23	Approx. 5 × 3 cm raised, reddened, edematous skin lesion on left inguinal area	Biopsy - inflammation (lymphohistiocytic and suppurative)
R3969F (F)	4	25	Approx. 8 cm fluctuent swelling covering 3 injection sites (abscess)	Biopsy - chronic inflammation (lymphohistiocytic and eosinophilic), edema, and acute hemorrhage Culture - Haemolytic *Staphylococcus*, coagulase positive

Abbreviations: M, male; F, Female; AM, Ante merīdiem (before midday); Approx., Approximately; ID, Identification; PM, Post merīdiem (after midday); s.c., Subcutaneous.
Source: Study 960040.

試験 29 日に屠殺した動物の皮膚病変は、局所治療により正常に回復したと思われた。高用量群の回復群の雄 1 例（R3590）の病変は試験 39 日までに消失した。この動物では、投与 23～44 日に投与部位付近の皮膚の肥厚も認められた。この肥厚は、投与部位の炎症に起因していた。そのほかに、投与に関連した一般状態の変化は認められなかった。

100 mg/kg/日群の雄 1 例（R3549）が投与 6 日に死亡した。剖検した結果、死因は急性胃拡張と胃破裂であった。急性胃拡張は旧世界ザルに散発的に起こり、病因は不明である。この動物の

死亡は投与に関連したものではないと考えられた。100 mg/kg/日以上の用量を用いた霊長類での追加試験（100484 試験）では、死亡は認められていない（[2.6.4.3.3.6］項及び［2.6.5.4］項）。

摂餌量、体重、血圧、体温、呼吸数及び心拍数に本薬投与に関連した変化は認められなかった。心電図及び眼の異常は認められなかった。また、アナキンラ投与による血液生化学的及び凝固系パラメーターへの影響は認められなかった。

投与に関連すると考えられる血液学的検査パラメーターの変化は、200 mg/kg/日群の雌雄各 1 例（R1PK：Day 28 及び R3905F：Day 14）で認められた白血球数の増加（試験前値に対して）及び雌雄各 1 例（R1PK 及び R3969F：Day 28）に認められた赤血球系パラメーター（赤血球数、ヘモグロビン及びヘマトクリット値）の減少のみであった。これらの動物のうち 1 例（R1PK）では、これに対応して網状赤血球及び有核赤血球の増加も認められた。

200 mg/kg/日群の雌 1 例（R3905F）に見られた白血球数の増加は、おそらく投与 15 日に観察された左上腕骨領域の排液創の発生と関連していた。白血球数は投与 28 日までに試験前値に戻り、皮膚病変はほぼ治癒した。雄 1 例（R1PK）で見られた白血球数の増加は、おそらく投与 28 日に見られた炎症性皮膚病変（リンパ組織球反応を特徴とする慢性炎症）に続発したものと考えられた（手根病変の生検でリンパ組織球反応が認められた）。200 mg/kg/日群の他の動物では、循環血液中の白血球数に顕著な変化はみられなかったが、数例で皮膚病変がみられ、全例の投与部位に炎症性病変が観察された。

200 mg/kg/日群の雌雄各 1 例（R1PK 及び R3969F）に認められた赤血球系パラメーターの減少は出血に起因するものであり、雄 1 例（R1PK）では手根皮膚病変の生検（投与 21 日）に伴う慢性出血及び二次的な自己外傷が認められた。雌 1 例（R3969F）で見られた赤血球系パラメーターの減少は、投与 25 日に最初に観察された背部の大きな排液性病変に関連する出血に起因していた。

尿検査において尿糖、色、透明度、ビリルビン、ケトン、比重、ウロビリノーゲン、亜硝酸塩、白血球エステラーゼ、及び尿沈渣の顕微鏡検査結果に投与に関連した影響は認められなかった。タンパク尿（微量を超えるタンパク量）が、試験前及び対照群に比べ投与群で高頻度に発現した。TK 情報（PK97038 試験）により、投与 2、15 及び 27 日の尿中に被験物質（タンパク質）の存在が確認されたことから、被験物質又は代謝物が尿中に存在したことが、タンパク尿の発現頻度増加の原因である可能性が考えられた。全ての動物の血清タンパク質（アルブミンとグロブリンの両方）濃度は正常であり、投与の影響を受けなかった。試験 29 日（最終投与は 28 日）及び 57 日（回復群）では、対照群に比してタンパク尿の増加は認められなかった。さらに、投与動物の腎臓には、タンパク尿と関連するような病理組織学的病変は認められなかった。したがって、尿タンパク陽性の結果は投与に関連するものであるが、生理学的に重要なものではないと考えられる。

尿中電解質に対する投与に関連した影響は認められなかった。尿電解質の個々の値は時間と共にかなり変動する。しかし、ばらつきは用量依存的ではなく、対照群でも同程度のばらつきが見られた。

アナキンラに対する抗体の出現率は用量と逆相関した。低用量群（10 mg/kg/日）の投与 4 週で最も高い出現率（67%）及び力価（1：400）であり、反応が弱いことを示している。また、100 及び 200 mg/kg/日群における投与 4 週の抗体産生頻度はそれぞれ 0/5 例及び 0/10 例であった。

器官重量に投与による影響は認められなかった。試験 29 日に認められた主な投与に関連した剖検所見は、アナキンラ投与群の全例で見られた投与部位の出血及び肥厚であった。これらの剖検所見の重症度は、一般に用量依存性であった。対照群の 4/6 例の投与部位における急性出血の病理組織学的所見とは対象的に、アナキンラ投与群の投与部位の病変は皮膚生検で認められた病変と類似しており、リンパ球及び空胞化組織球の浸潤を特徴とした。病変の一部に化膿性あるいは好酸球性炎症が認められた。57 日目に剖検した 200 mg/kg/日群の回復群では、投与部位の炎症が部分的又はほぼ完全に消失したことから、これらの病変は可逆的であることが示された。試験 29 日に剖検した 200 mg/kg/日群の 3/6 例で末梢リンパ節（腋窩又は鼠径）が肉眼的に肥大していた。腫大は全てのリンパ節要素の過形成が原因であり、投与部位及び他の皮膚病変における炎症に続発したものと考えられた。

結論

アカゲザルにアナキンラを 4 週間反復皮下投与した結果、忍容性は概して良好であった。アナキンラの毒性所見は、10 mg/kg/日群では投与部位に限局した炎症、200 mg/kg/日群では半数例で投与部位以外の部位にも発現した炎症性皮膚病変に限定された。これらの病変は可逆的であり、他の生理学的パラメーターの重篤な変化を伴わなかった。投与部位以外の変化に対する NOAEL は 100 mg/kg/日と推定された。

2.6.6.3.12　IL-1Ra の雄アカゲザルにおける 1 週間反復点滴静脈内投与試験（[redacted] SG-672m、[redacted] Study SY05-T90-02）

アカゲザルにアナキンラを 1 週間点滴静脈内投与したときの毒性を明らかにするために実施した。

試験デザイン

雄アカゲザルにアナキンラの 0（溶媒）及び 150 mg/kg/日を 1 週間点滴静脈内投与した。カテーテルを大腿静脈に留置し、皮下からサルの背側までトンネルを作ってスウィーベルテザリングシステムと外部ポンプに接続した。注入速度は 5 mL/h とした。本試験に使用したアナキンラのロット番号は[redacted]であった。溶媒は、10 mmol/L クエン酸塩、140 mmol/L NaCl、0.5 mmol/L

EDTA、pH 6.5（Lot[redacted]）を用いた。媒体対照群及び150 mg/kg/日群の例数はそれぞれ雄2例及び雄3例であった。

試験中の評価項目は、一般状態、体重、摂餌量とした。剖検前に血液学的検査及び血液生化学的検査を実施した。アナキンラの血漿中濃度は、ELISA法を用いて測定した。1週間の投与期間終了時に剖検し、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。

試験結果

試験期間中の検査、臨床病理検査及び病理学的検査では、投与に関連した毒性は示されなかった。病理組織学的変化は、溶媒対照群及びアナキンラ投与群の両群で認められたが、自然発生的な背景病変又はカテーテル埋め込みの外傷によるものと考えられ、投与に関連したものではなかった。

血漿中アナキンラ濃度の個別値を表 2.6.6-11 に示す。アナキンラ濃度は、4.2 µg/mL の値を示した外れ値1例を除き、13.0～30.8 µg/mL の範囲であった。対照群及び試験前の血液サンプルではアナキンラは検出されなかった。

表 2.6.6-11　アナキンラを1週間静脈内持続投与したサルにおける個々の血漿中アナキンラ濃度（SY05-T90-02 試験）

Dose (mg/kg/day)	Animal number	µg/mL			
		Day -7	Day 2	Day 4	Day 8
0	5548 5555	ns nd	nd nd	nd nd	nd nd
150	5371 5527 5570	nd nd nd	21.1 18.1 24.2	13.0 14.9 19.4	30.8 4.2 29.3

Abbreviations: nd, Not detected; ns, No sample.
Source: Study SY05-T90-02.

結論

サルに1週間点滴静脈内投与したときのNOAELは150 mg/kg/日と推定された。

2.6.6.3.13　IL-1Ra の雄カニクイザルにおける2週間反復静脈内投与用量設定試験（[redacted]SG-543m、[redacted]SY05-T89-03 試験）

サルにアナキンラを1日1回2週間静脈内投与したときの毒性の用量範囲を明らかにするために実施した。

試験デザイン

各群雄 3 例のカニクイザルにアナキンラの 0（溶媒対照）、0.1、1.0 及び 10 mg/kg/日を 2 週間反復静脈内（ボーラス）投与した。投与容量は 1.0 mL/kg/回とした。本試験に用いたアナキンラのロット番号は[redacted]、[redacted]及び[redacted]であった。溶媒は、10 mmol/L リン酸ナトリウム、150 mmol/L NaCl、0.1 mmol/L EDTA、pH 7.0（Lot[redacted]）を用いた。

試験中の評価項目は、一般状態、体重及び摂餌量とした。剖検前に血液学的検査、血液生化学的検査、凝固系検査（活性化凝固時間、フィブリノーゲン、フィブリン分解産物、部分トロンボプラスチン時間、プロトロンビン時間）及び尿検査を実施した。2 週間の投与期間終了時に剖検し、器官重量測定及び病理組織学的検査（骨髄塗抹標本を含む）を実施した。

試験結果

本試験では、一般状態や摂餌量に投与に関連した毒性は認められなかった。対照群及び中用量群で軽度な体重増加傾向、低用量群及び高用量群で軽度な体重減少傾向が認められた。これらの体重変化は、投与に関連した変化ではないと考えられた。

臨床病理検査及び剖検では、投与に関連した毒性は認められなかった。病理組織学的変化が溶媒対照群及びアナキンラ投与群の両群でみられたが、自然発生的な背景病変であると考えられた。これらの病変はアナキンラとの関連性はなかった。

結論

サルに 2 週間静脈内投与したときの NOAEL は 10 mg/kg/日（高用量）と推定された。

2.6.6.3.14　IL-1Ra のアカゲザルにおける 2 週間反復静脈内投与毒性試験及び 4 週間回復性試験（[redacted]SG-559m、[redacted]Study SY05-T89-08）

アナキンラをサルに 1 日 2 回 2 週間静脈内投与してその毒性を検討し、さらに 4 週間の回復期間を設けて毒性変化の可逆性を評価した。

試験デザイン

各群雌雄各 3 例のアカゲザルにアナキンラの 0（溶媒対照）、3、10 及び 30 mg/kg/日を 1 日 2 回 2 週間静脈内（ボーラス）投与した。さらに各群雌雄各 3 例の 4 週間回復群を溶媒対照群及び 30 mg/kg/日群に設定した。投与容量は 0.53 mL/kg/回とした。本試験に用いたアナキンラのロット番号は[redacted]、[redacted]及び[redacted]とした。溶媒は、10 mmol/L リン酸ナトリウム、150 mmol/L NaCl、0.1 mmol/L EDTA、pH 7.0（Lot[redacted]）を用いた。

試験中の評価項目は、一般状態観察、体重、摂餌量、眼科学的検査及び心電図検査とした。剖検前に血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査を実施した。動物を剖検し、器官重量測定及び病理組織学的検査（骨髄塗抹標本を含む）を実施した。

試験結果

試験中の生前検査では、投与に関連した毒性は認められなかった。血液生化学的検査では、統計学的に有意な変化が認められたが、投与との関連性がないか、正常範囲内であったことから、生物学的意義はないと判断された。

剖検後の観察では、投与に関連した毒性は認められなかった。対照群及び投与群における器官重量の変化、並びに剖検及び病理組織学的所見は、自然発生的な背景病変であると考えられた。回復群の 3 例（投与 15 日に対照群の雌雄各 1 例、投与 9 日に高用量群の雄 1 例）を細菌性赤痢のため切迫屠殺した。病理組織学的変化が、投与群と対照群の両群の投与部位に観察された。病変は静脈内投与による外傷に起因し、全群で同程度・頻度であった。

結論

サルに 1 日 2 回 2 週間静脈内投与したときの NOAEL は 30 mg/kg/日（高用量）と推定された。

2.6.6.4　遺伝毒性試験

2.6.6.4.1　IL-1Ra の細菌を用いる復帰突然変異試験（SY05-T92-13 試験）

ミクロソーム酵素の存在下及び非存在下でネズミチフス菌（*Salmonella typhimurium*）のいくつかの菌株の選択した遺伝子座及び大腸菌（*E. coli* WP2 *uvrA*）の選択した遺伝子座において、アナキンラの復帰突然変異誘発能を検討することにより、アナキンラの変異原性を評価するために実施した。

試験デザイン

アナキンラを、ネズミチフス菌のヒスチジン要求性菌株 TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び TA1538、並びに大腸菌試験菌株 WP2 *uvrA* を用いて、アロクロール誘発ラット肝ミクロソーム酵素（S9）の存在下又は非存在下で試験した。本試験で使用したアナキンラのロット番号は [redacted] であった。

本アッセイはプレート法を用いて 3 回実施した。第 1 回目の用量設定試験では、変異原性試験の用量範囲を設定した。アナキンラの 10 用量（0.10～5000 µg/plate）を S9 の存在下及び非存在下で、選択的最小寒天培地上で一晩培養した TA100 及び大腸菌と共に、1 用量あたり 1 プレートで培養した。変異原性の評価には、第 2 回目及び 3 回目の変異原性及び確認試験を用いた。S9 の存在下及び非存在下で、TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び TA1538 並びに大腸菌を用いて、適切な溶媒及び陽性対照と共にアナキンラの 5 用量段階（33～5000 µg/plate 又は 12.5～1887 µg/mL）を培養した。溶媒対照及び陽性対照の全ての用量を各 3 枚培養した。アナキンラの溶媒は、10 mmol/L クエン酸塩、140 mmol/L NaCl、0.5 mmol/L EDTA、0.1% w/w ポリソルベート 80、pH 6.5 を用いた。変異原性の検討には、S9 の非存在下又は存在下で、アナキンラを寒天培

地（全容量 2.65 mL）中で約 10^8 の細菌と 48 時間培養し、復帰変異コロニー数を測定した。アナキンラによる毒性は、バックグラウンドローンの状態を考慮して評価した。

試験結果

用量設定試験では、0.10～5000 µg/plate の用量では毒性は認められなかった。

変異原性試験では、S9 非存在下の TA1538 を除き、S9 の有無にかかわらずいずれの菌株においても陽性反応は認められなかった。プレートあたりの平均変異コロニー数の用量依存性な増加が 1000 及び 5000 µg/plate で認められ、それぞれ対照物質の 3 及び 3.5 倍であった。

確認試験では、S9 存在下でいずれの菌株においても陽性反応は認められず、S9 非存在下で TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び TA1538 において陽性反応は認められなかった。最初の試験の TA1538 でみられた変異コロニー数の用量依存性な増加の再現性はなかった。許容できない陽性対照値のため、S9 非存在下の大腸菌については評価しなかった。

3 回目の試験では、S9 非存在下で TA1538 及び大腸菌について再試験した。最初の試験では、S9 非存在下で TA1538 が用量依存性な変異コロニー数の増加を示したが、同様の結果は検証試験では確認されなかった。この所見の再現性が確認されず、他の菌株ではいかなる陽性反応も示さなかったため、この菌株を 3 回目の試験に供した。この再試験では陽性反応を示さなかった。大腸菌についても、検証試験を実施したところ、許容できない陽性対照値のため無効なアッセイと判断されたため、再度試験を実施した。再試験では陽性反応は認められなかった。

結論

本試験条件下で、アナキンラ（33～5000 µg/plate 又は 12.5～1887 µg/mL）は、S9 の有無にかかわらずいずれの試験菌株に対しても陽性反応を引き起こさないことが示された。

2.6.6.4.2　哺乳動物細胞を用いる染色体異常試験（SY05-T92-15 試験）

CHO 細胞における染色体異常誘発能に基づきアナキンラの染色体異常誘発能を評価するために実施した。

試験デザイン

CHO-K_1 細胞（リポジトリ番号 CCL 61）は、[redacted] USA）から入手した。細胞系の核型安定性を保証するために、継代数 20 を超えた細胞は使用しなかった。

代謝活性化系として S9 を用いた。雄 SD ラットに Aroclor 1254 の 500 mg/kg を屠殺 5 日前に単回腹腔内投与して S9 を調製した。

CHO 細胞を約 5×10^5 cells/25 cm^2 のフラスコに播種し、5% ± 1 % CO_2 の加湿条件下で 37°± 1°C で 16～24 時間インキュベートした。S9 非存在下の試験では 5 mL の完全培地を、S9 存在下の試

験では 5 mL の S9 を複製フラスコに加え、これにアナキンラ（Lot [redacted]）又は溶媒（10 mmol/L クエン酸塩、140 mmol/L NaCl、0.5 mmol/L EDTA、0.1% w/w ポリソルベート 80、pH 6.5；Lot [redacted]）の 50 µL を加えて処理した。完全培地又は S9 を加えた細胞からなる未処理対照も設けた。

最初の試験は、培養した CHO 細胞を 0.2 µg/mL から 2000 µg/mL の 9 濃度のアナキンラ、陽性及び陰性対照に曝露して実施した。独立した繰り返し試験では、培養した CHO 細胞を 4 濃度のアナキンラ（250、500、1000 及び 2000 µg/mL）に曝露することにより実施した。S9 非存在下の試験では、0.5 µg/mL の Triethylenemelamine（TEM）を陽性対照として用いた。S9 存在下の試験では、陽性対照として 25 µg/mL のシクロホスファミドを用いた。

試験結果

初回試験では、0.2 µg/mL から 2000 µg/mL の 9 濃度のアナキンラで試験した。アナキンラは、200 mg/mL の原液を希釈せずに用い、試験した全ての濃度で溶媒及び処理培地に溶解した。試験した最高濃度（2000 µg/mL）の浸透圧は 290 mOsm/kg であった。採取時に実施した細胞単層の組織学的検査では、いずれの用量でも毒性は認められなかった。アナキンラ群における構造異常を有する細胞の割合は、溶媒対照よりも有意に増加しなかった（$p > 0.05$、Fisher's exact test）。TEM 群（陽性対照）の損傷細胞の割合は 76.5%で（$p \leq 0.01$、Fisher's exact test）、S9 存在下でも同様の結果が得られた。

独立した繰り返し試験では、アナキンラは 4 濃度（250、500、1000 及び 2000 µg/mL）で試験した。また、採取時の細胞単層の組織学的検査及び分裂抑制検査を行った結果、20 時間連続処理群ではいずれの用量においても毒性は認められなかった。44 時間連続処理群では、細胞単層の組織学的検査で毒性は認められなかったが、1000 µg/mL で約 20%の有糸分裂阻害が認められた。細胞数で測定した 4 時間のパルス処理における細胞増殖阻害は、評価した最高濃度（2000 µg/mL）で約 32%の有糸分裂阻害があったものの、毒性を示さなかった。アナキンラ群の構造異常を有する細胞の割合は、用量段階、曝露期間及び細胞採取時間にかかわらず、溶媒対照群を有意に上回る増加は認められなかった（$p > 0.05$、Fisher's exact test）。倍数体細胞の割合は、44 時間処理で溶媒対照群よりも有意に増加しなかった（$p > 0.05$、Fisher's exact test）。TEM 群の損傷細胞の割合は、20 時間処理群、44 時間処理群及び 4 時間パルス処理群でそれぞれ 54%、97%及び 29.5%（$p \leq 0.01$、Fisher's exact test）であった。

独立した繰り返し試験では、アナキンラを S9 存在下でも試験した。採取時に実施した細胞単層の組織学的検査では、20 時間及び 44 時間のいずれの処理群のいずれの用量においても毒性は認められなかった。細胞数で測定した 20 時間の回収における細胞増殖阻害も毒性を示さなかった。250、500、1000 及び 2000 µg/mL の分裂指数は、20 時間処理で溶媒対照群に対してそれぞれ 11%、37%、45%及び 20%低下し、44 時間処理ではそれぞれ 26%、5%、27%及び 13%低下した。アナキンラ群の構造異常を有する細胞の割合は、溶媒対照群を統計学的に上回る増加は認められなかった（$p > 0.05$、Fisher's exact test）。倍数体細胞の割合は、44 時間処理で溶媒対照群よ

りも有意に増加しなかった（$p > 0.05$、Fisher's exact test）。シクロホスファミド群の損傷細胞の割合は、20 時間及び 44 時間処理でそれぞれ 42.5%及び 99%であった（$p \leq 0.01$、Fisher's exact test）。

結論

In vitro 染色体異常試験の結果から、本試験条件下ではアナキンラ（0.2～2000 μg/mL）は、S9 の有無にかかわらず陽性反応を引き起こさなかった。

2.6.6.4.3　マウスリンフォーマチミジンキナーゼ試験（SY05-T92-14 試験）

L5178Y チミジンキナーゼ$^{+/-}$マウスリンフォーマ突然変異誘発試験をアナキンラの変異原性を評価するために実施した。この哺乳動物細胞培養系は、培養した L5178Y チミジン$^{+/-}$マウスリンフォーマ細胞のチミジンキナーゼ遺伝子座に被験物質が特異的な変異を引き起こすか否かを検討する。

試験デザイン

試験で使用したアナキンラのロット番号は[redacted]であった。

L5178Y 細胞（6×10^5 cells/mL）を、16 濃度のアナキンラ（67～5000 μg/mL）又は溶媒（10 mmol/L クエン酸塩、140 mmol/L NaCl、0.5 mmol/L EDTA、0.1% w/w ポリソルベート 80、pH 6.5；Lot [redacted] 及び Lot [redacted]）で 4 時間処理した。Aroclor 誘発ラット肝 S9 代謝活性化系（S9）の非存在下及び存在下で細胞を培養した。陽性対照として、EMS 及び 7,12-dimethyl benz(a)anthracene を使用した。培養後、細胞を洗浄し、ローラードラムで 48 時間インキュベートした。チミジンキナーゼ$^{-/-}$細胞の発現のために、細胞をトリフルオロチミジンで処理し、寒天上に 3 枚培養した。10～12 日後、プレートあたりのコロニー数をスコア化した。また、細胞生存率を測定するために、トリフルオロチミジン非存在下で 3 枚のプレートを培養した。

試験結果

アナキンラの毒性を検討するためのパイロット試験では、S9 存在下及び非存在下の培養で 5000 μg/mL まで毒性を示さなかった。溶媒対照の浸透圧は 297 mOsm/kg、最高用量（5000 μg/mL）の浸透圧は 301 mOsm/kg であった。変異原性試験に選択した濃度は、S9 非存在下及び存在下のいずれにおいても 67～5000 μg/mL とした。

2 日間培養後、S9 存在下及び非存在下の培養液の 10 濃度をクローニングのために選択した。S9 非存在下の培養液を、5000、3750、2813、2109、1582、1187、890、667、501 及び 375 μg/mL のアナキンラで処理したところ、懸濁液中で 90～102%の増殖率が得られた。S9 は懸濁液中で 90～99%の増殖率となる同じ濃度で処理した。

S9 非存在下のいずれの培養液でも、溶媒対照の平均突然変異頻度の 2 倍以上の変異頻度を示さなかった。これらの培養液の総増殖率は 93～117%であった。アナキンラ処理した培養液では用量依存的な反応は認められなかった。

S9 存在下のいずれの培養液でも、溶媒対照の平均突然変異頻度の 2 倍以上の変異頻度を示さなかった。これらの培養液の総増殖率は 86～112%であった。アナキンラ処理した培養液では用量依存的な反応は認められなかった。

アナキンラ及び陽性対照物質の毒性について、S9 存在下及び非存在下で確認試験を実施した。

2 日間培養後、S9 非存在下及び存在下で 10 用量をクローニングのために選択した。S9 非存在下で培養液を 5000、3750、2813、2109、1582、1187、890、667、501 及び 375 µg/mL のアナキンラで処理したところ、増殖率は 85～132%であった。S9 存在下で培養液を同じ濃度のアナキンラで処理したところ、増殖率は 69～111%であった。

S9 非存在下の培養液は、いずれも溶媒対照の平均突然変異頻度の 2 倍以上の変異頻度を示さなかった。これらの培養液の総増殖率は 78～141%であった。アナキンラ処理した培養液では用量依存的な反応は認められなかった。

S9 存在下の培養液は、いずれも溶媒対照の平均突然変異頻度の 2 倍以上の変異頻度を示さなかった。これらの培養の総増殖率は 75～131%であった。アナキンラ処理した培養液では用量依存的な反応は認められなかった。

結論

本試験条件下では、アナキンラ（67～5000 µg/mL）は、S9 の有無にかかわらず陽性反応を引き起こさなかった。

2.6.6.4.4　IL-1Ra のマウス小核試験（SY05-T92-16 試験）

雌雄マウスにアナキンラを単回皮下投与したときの骨髄中の小核を有する多染性赤血球の出現率を上昇させる可能性を評価するために実施した。

試験デザイン

アナキンラの毒性を検討するためにパイロット試験を行った。ICR マウスにアナキンラ（Lot [redacted]）の 500 mg/kg（雄 2 例）、1000 mg/kg（雄 2 例）及び 2000 mg/kg（雌雄各 5 例）を単回皮下投与した。投与容量は 10 mL/kg とした。溶媒は、10 mmol/L クエン酸塩、140 mmol/L NaCl、0.5 mmol/L EDTA、0.1% w/w ポリソルベート 80、pH 6.5（Lot [redacted] を用いた。3 日間の観察期間を設けた。

小核試験では、ICR マウス（各群雌雄各 5 例）にアナキンラの 0（溶媒対照）、500、1000 及び 2000 mg/kg を単回皮下投与した。投与容量及び溶媒はパイロット試験と同じとした。また、雌雄各 5 例に、陽性対照のシクロホスファミド 40 mg/kg を腹腔内投与した。

一般状態を観察し、アナキンラ群の雌雄各 5 例を投与後 24、48 及び 72 時間に二酸化炭素により安楽死させた。シクロホスファミド群は、投与後 24 時間に安楽死させた。

試験結果

パイロット試験では、いずれの用量でも死亡は認められなかった。3 日間の観察期間を通じて、全ての動物は正常であった。小核試験の最高用量は 2000 mg/kg を選択した。

小核試験では、アナキンラ群及び対照群の動物はいずれも投与後生存し、試験期間中正常であった。

アナキンラ群では、溶媒対照群と比較して全赤血球に対する多染性赤血球の割合に変化は認められず、アナキンラは赤血球産生を抑制しないことが示唆された。多染性赤血球 1000 個あたりの小核を有する多染性赤血球数は、用量段階又は骨髄採取時間にかかわらず、雌雄のいずれにおいても統計学的に増加しなかった（$p > 0.05$、Kastenbaum-Bowman tables）。シクロホスファミドは、溶媒対照群と比較して雌雄共に小核を有する多染性赤血球の有意な増加を誘発した（$p \leq 0.05$、Kastenbaum-Bowman tables）。

結論

本試験条件下では、アナキンラは 500～2000 mg/kg の単回皮下投与で、骨髄中の小核を有する多染性赤血球の発生率の有意な増加を誘発せず、雌雄 ICR マウスを用いた小核試験では陰性であると結論付けられた。

2.6.6.5　がん原性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

がん原性試験は実施しなかった。長期がん原性試験は、アナキンラのタンパク性を考慮した場合、関連性があるとはみなされなかった。ICH S6（R1）ガイドラインによれば、標準的ながん原性試験は一般にバイオテクノロジー応用医薬品には不適当である。薬理学的作用機序、観察された宿主抵抗性試験に対する最小限の影響、及び NK 細胞活性の僅かな亢進から、アナキンラ固有の発がん性の懸念はなく、更なる試験は必要ないと考えられた。

2.6.6.6　生殖発生毒性試験（用量設定試験及びトキシコキネティクス評価を含む）

2.6.6.6.1　IL-1Ra のラットにおける受胎能、胚・胎児発生、並びに出生前及び出生後の発生に関する試験（[redacted]3249.7、[redacted]Study SY05-T93-01）

雌雄ラットの生殖能に対するアナキンラの毒性を検討するために実施した。本試験は、F_0の性腺機能、発情周期、交配、受胎、分娩、授乳及び離乳、並びにF_1の生死及び発育を評価するためにデザインされた。

試験デザイン

各群雌雄各 40 例の SD ラットにアナキンラの 0（溶媒）、12.5、50 及び 200 mg/kg/日を約 12 時間間隔で 1 日 2 回皮下投与した（それぞれ 6.3、25 及び 100 mg/kg/回）。1 回あたりの投与容量は 1.18 mL/kg とした。試験に用いたアナキンラのロット番号は[redacted]、[redacted]、[redacted]、[redacted]、[redacted]及び[redacted]であった。溶媒は 10 mmol/L クエン酸ナトリウム、140 mmol/L NaCl、0.1% w/w ポリソルベート 80、pH 6.5（Lot[redacted]及び Lot[redacted]）を用いた。F_0雄は交配前 64 日から試験 85 日まで投与した。F_0雌へは交配前 15 日から、交配、妊娠及び授乳期間を通して剖検前日まで継続投与した。

毒性徴候を毎日観察して、体重及び摂餌量を所定の間隔で測定した。妊娠 20 日に各群雌 20 例を帝王切開した。胎児の性別を判定し、外表異常の有無を検査した。残りのF_0雌は分娩させ、授乳 21 日まで出生児を哺育させた。F_1の生死及び発育状態を授乳期間中に確認した。F_0雄は試験 88 日及び 89 日に剖検した。分娩したF_0雌及び出生児は授乳 21 日に剖検し、分娩しなかった雌は交尾確認後 25 日に安楽死させた。

試験結果

試験期間中、被験物質に関連した死亡や毒性徴候は認められなかった。また、体重、体重増加量及び摂餌量に関しても、生物学的に意味のある群間差は認められなかった。交尾率、受胎率、発情周期、交尾成立時間、妊娠期間及び妊娠率は群間差がなく、長期分娩や異常な営巣行動の徴候はいずれの試験群にも認められなかった。全ての帝王切開パラメーターに群間差はなかった。アナキンラ投与群の胎児に奇形や変異は観察されなかった。剖検では被験物質に関連した異常は認められなかった。F_1出生児の生存率、体重、外表観察所見及び剖検所見は授乳期間を通じて群間差はなかった。

結論

アナキンラを 200 mg/kg/日まで皮下投与した結果、F_0世代に毒性及び生殖能の障害は見られず、F_1世代の生存性及び発育にも影響は認められなかった。

2.6.6.6.2 r-metHuIL-1Ra のラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（[redacted]-120047、[redacted] Study 960044）

F_0 世代の生殖能に対するアナキンラの影響を評価した。

試験デザイン

各群雌雄各 25 例の SD ラットにアナキンラ（Lot[redacted]）を 0（溶媒対照）、10、100 及び 200 mg/kg/日（投与容量はそれぞれ 2.67、1.33、1.33 及び 2.67 mL/kg）の用量で 1 日 1 回皮下投与した。溶媒対照群には、アナキンラ賦形剤（10 mmol/L クエン酸ナトリウム、140 mmol/L NaCl、0.5 mmol/L EDTA、0.1% w/w ポリソルベート 80、pH 6.5；Lot[redacted]）を投与した。雄には、交配前 29 日から剖検前日まで投与した。雌には交配前 14 日から交尾確認雌には妊娠 7 日まで投与した。全ての動物について、外表及び行動を 1 日 2 回観察した。F_0 の体重及び摂餌量を適切な間隔で測定した。妊娠 15 日に交尾確認 F_0 雌を帝王切開した。全ての雄は、最後の雌の剖検から少なくとも 2 日後に安楽死させた。全ての雄について精子形成エンドポイントの評価を行った。脳、下垂体、卵巣、精巣、精巣上体、精嚢及び前立腺重量を記録した。

試験結果

生殖パラメーター（交尾率、受胎率、発情周期及び交尾成立日数）は、10、100 及び 200 mg/kg/日群で影響は認められなかった。

200 mg/kg/日群の雌 1 例が投与 48 日に死亡した。この死亡は、腎結石の存在に関連した腎臓の変化に起因したものであり、投与に関連したものではないと考えられた。他の動物は剖検まで生存した。10、100 及び 200 mg/kg/日群では、投与に関連した一般状態の変化は観察されなかった。交配前及び妊娠期間中の体重、体重増加量及び摂餌量に被験物質投与の影響は認められなかった。

精子形成エンドポイント（精巣及び精巣上体中精子数、精子形成率、精子運動能、精子形態）には、いずれの投与群においても被験物質投与による影響は認められなかった。雌雄ともに予定された剖検時には、被験物質に関連した異常は認められなかった。いずれの投与群においても、雌雄の器官重量に投与による影響は認められなかった。

F_1 胎児の子宮内生存率は、対照群とアナキンラ投与群で同等であった。

結論

母動物の毒性及び生殖能に対する NOAEL は 200 mg/kg/日と推定された。

2.6.6.6.3 インターロイキン-1 受容体拮抗薬（アナキンラ）のラットにおける胚・胎児発生に関する試験（[redacted] 3249.5、[redacted] Study SY05-T92-03）

妊娠ラットの器官形成期にアナキンラを皮下投与したときの胚・胎児毒性及び催奇形性を評価するために実施した。本試験では、F_0雌の分娩及び授乳、並びにF_1世代の生存性、発育、行動及び生殖能に及ぼすアナキンラの影響を評価した。

試験デザイン

各群 40 例の妊娠 SD ラットの妊娠 6～17 日にアナキンラを約 12 時間間隔で 1 日 2 回皮下投与した。総投与量は 0（溶媒対照）、12.5、50 及び 200 mg/kg/日とし、1 回あたりの投与容量は 1 mL/kg とした。本試験で用いたアナキンラのロット番号は、[redacted]、[redacted]、[redacted]、[redacted]、[redacted]及び[redacted]であった。溶媒は、10 mmol/L クエン酸塩、140 mmol/L NaCl、0.5 mmol/L EDTA、0.1% w/w ポリソルベート 80、pH 6.5（Lot[redacted]）を用いた。投与部位は、背部の 7 つの異なる所定の部位間でローテーションさせた。21 例を帝王切開し、残りの 19 例は分娩させた。

F_0雌について、一般状態を観察し、体重及び摂餌量を測定した。妊娠 20 又は 21 日に各群 40 例を剖検し、卵巣ごとに黄体数を計測した。帝王切開群では、胎児体重を個別に測定し、性別を調べ、外表、内臓及び骨格検査を実施した。分娩群（19 例/群）では、分娩時間を記録し、分娩困難及び遅延の徴候も記録した。母動物と出生児は授乳 21 日の離乳まで同居させた。異常な哺育や営巣行動を記録した。授乳 6 日に各母動物について同腹児回収検査を行い、授乳 21 日（離乳後）に母動物を安楽死させ剖検した。

F_1世代について、授乳期間及び離乳後の生存率、性別、発育、発達、機能及び行動を評価した。発達及び機能検査として、耳介展開、正向反射、断崖回避反応、開眼、驚愕反応及び聴覚反応、精巣下降及び膣開口を観察した。行動検査として、情動性のオープンフィールド試験と学習・記憶想起のための水迷路試験を実施した。選択したF_1（雌雄各 20 例/群）を交配させ、雌は分娩させて授乳 21 日まで出生児を哺育させた。その後、F_1親動物及び出生児を剖検した。

試験結果

試験期間中、死亡や毒性徴候は認められなかった。F_0母動物の体重、体重増加量、摂餌量、妊娠期間、同腹児回収及び剖検においても、意味のある群間差は認められなかった。分娩群のF_0雌のいずれにも、投与に関連した分娩遅延及び異常な営巣行動は認められなかった。帝王切開パラメーターは群間で同等であり、投与に関連した胎児に奇形及び変異は見られなかった。

F_1児の生存率、体重、外表観察所見及び剖検所見に、投与に関連した影響は認められなかった。発達、機能及び行動検査では、いずれの投与群においてもF_1世代に障害の徴候は認められなかった。F_1世代における生殖能の低下の徴候は観察されず、交尾率、受胎率、交尾成立時間、妊娠期間に群間差はなく、分娩遅延や異常な営巣行動は認められなかった。F_2児の生存率、体重、外表観察所見、剖検所見は、授乳期間を通じて群間に差はなかった。

結論

本試験結果に基づき、アナキンラはいずれの投与量においても母動物毒性及び発生毒性は認められなかった。また、F_1世代では行動、受胎能及び生殖能に障害の徴候は認められなかった。F_2児の発育・発達は授乳期間を通して正常であった。ラットの妊娠6～17日に1日2回皮下投与したときの母動物への毒性、発生毒性及び催奇形性に対するNOAELは、高用量の200 mg/kg/日と推定された。

2.6.6.6.4　IL-1Raのラットにおける出生前及び出生後の発生に関する試験（[redacted] 3249.8試験、[redacted] SY05-T93-02試験）

妊娠ラットにアナキンラを皮下投与したときの分娩及び授乳に対する毒性を評価するために実施した。本試験は、F_1世代の生存、発育、発達、行動及び生殖能に及ぼす影響を評価するためにデザインされた。

試験デザイン

各群25例の妊娠ラットの妊娠6日から授乳20日まで、アナキンラの6.3、25及び100 mg/kg/回を約12時間間隔で1日2回皮下投与した（総投与量はそれぞれ12.5、50及び200 mg/kg/日）。1回の投与容量は1.18 mL/kgとした。本試験で使用したアナキンラのロット番号は[redacted]、[redacted]及び[redacted]であった。また、雌25例の対照群には、被験物質投与群と同一試験条件下及び同じ容量で溶媒（10 mmol/Lクエン酸ナトリウム、140 mmol/L NaCl、0.1% w/wポリソルベート80、pH 6.5；Lot[redacted]）を投与した。一般状態を観察し、体重及び摂餌量を測定した。F_0雌は分娩させ、F_1出生児を哺育させた。F_1出生児の生存率、発育及び発達の指標及び行動を検査した。生存F_0雌を授乳期間終了後に安楽死させて剖検した。選択したF_1（雌雄各20例/群）を約12週齢で交配させ、F_1雌は分娩させ、F_2出生児を授乳21日まで哺育させた。F_1親動物及びF_2世代を授乳期間終了後に安楽死させて剖検した。

試験結果

試験期間中、投与に関連した死亡や毒性徴候は認められなかった。F_0母動物の体重、体重増加量、摂餌量、妊娠期間、分娩、営巣行動、剖検所見に、意味のある群間差は認められなかった。

F_1出生児の生存率、性比、外表観察、発達、機能及び行動検査、剖検所見に、投与に関連した影響は認められなかった。F_1出生児の発育期及び生殖期に、毒性徴候や意味のある体重及び体重増加量の差は認められなかった。F_1世代の交尾率、受胎率、交尾成立時間及び妊娠期間に毒性学的に意義のある変化は見られなかった。F_1雌では分娩遅延は認められず、投与に起因すると考えられる異常な営巣行動も観察されなかった。F_2世代の生存率、体重、外表観察所見、性比、剖検所見に、有意な群間差はなかった。

結論

アナキンラを妊娠ラットに1日2回皮下投与しても、母動物に毒性は認められず、F_1出生児に悪影響は見られなかった。F_1世代では、行動、受胎能及び生殖能に障害を示す徴候は認められなかった。したがって、ラットにおける母動物の毒性及び発生毒性に対するNOAELは、200 mg/kg/日と推定された。

2.6.6.6.5 IL-1Raのウサギにおける胚・胎児発生に関する試験（[redacted]3249.6,[redacted]Study SY05-T92-04）

妊娠ウサギの器官形成期にアナキンラを皮下投与したときの、胚・胎児毒性及び催奇形性を評価するために実施した。

試験デザイン

人工授精した各群20例のNew Zealand White雌ウサギの妊娠6～18日にアナキンラを約12時間間隔で1日2回投与した。投与量は、0（溶媒対照）、12.5、50及び200 mg/kg/日とし、1回の投与容量は0.5 mL/kgとした。試験で使用したアナキンラのロット番号は[redacted]、[redacted]及び[redacted]であった。溶媒は、10 mmol/Lクエン酸塩、140 mmol/L NaCl、0.5 mmol/L EDTA、0.1% w/wポリソルベート80、pH 6.5のLot[redacted]とした。投与部位は、背部の7つの異なる所定の位置間でローテーションさせた。

一般状態を観察し、体重及び摂餌量を測定した。妊娠29日に全てのウサギを剖検し、卵巣ごとに黄体数を計測した。肉眼的変化が認められた場合は、病理組織学的検査を実施した。帝王切開し、胎児体重を個別に測定して性別を調べ、外表、骨格及び内臓検査を実施した。

試験結果

試験期間中の検査では、投与に関連した母体への毒性は認められなかった。

雌の剖検では、対照群、12.5及び200 mg/kg/日群で投与部位に隣接した皮下出血の発現率が低かった。また、12.5 mg/kg/日群の1例及び200 mg/kg/日群の20例全例の投与部位に隣接して、周囲に発赤を伴う又は伴わない白褐色硬結領域を特徴とする皮下病変が認められた。投与部位の病理組織学的検査では慢性炎症及び出血が観察され、200 mg/kg/日群の3例で軽微から軽度の壊死が認められた。

帝王切開データには、投与による影響は認められなかった。投与に関連した胎児の奇形や変異は認められなかった。

結論

ウサギの妊娠6～18日に1日2回皮下投与したときの母動物への全身性毒性、発生毒性及び催奇形性に対するNOAELは、高用量の200 mg/kg/日と推定された。

2.6.6.7　幼若動物を用いた試験

2.6.6.7.1　アナキンラのラットにおける 1 日 1 回及び 2 回の皮下投与試験（[redacted] Study 497888）

アナキンラの高用量の忍容性を確定し、幼若ラットへのアナキンラの 1 日 1 回及び 1 日 2 回皮下投与の実施可能性を確認するために実施した（GLP 非適用）。

試験デザイン

各群雌雄各 4 例の幼若 SD ラットにアナキンラの 100 mg/kg/回（容量：2 mL/kg）を 1 日 1 回（第 1 群）又は 1 日 2 回（第 2 群）皮下投与した。被験物質はアナキンラ 50 mg/mL を使用した。幼若ラットの出生後 4 日から 10 日まで（第 1 群）又は 19 日まで（第 2 群）毎日投与した。

死亡及び瀕死状態を観察し、投与日には 1 日を通して投与に対する反応を検査した。投与終了後、全動物を屠殺した。

試験結果

いずれのアナキンラ投与動物にも、一般状態及び体重への影響は認められなかった。

結論

幼若ラットにアナキンラを 1 日 1 回又は 1 日 2 回皮下投与したとき、100 mg/kg の用量では良好な忍容性を示した。

2.6.6.7.2　幼若ラットにおける 6 週間反復皮下投与毒性試験（[redacted] Study 498001）

幼若ラットにアナキンラを 1 日 2 回皮下投与し、1 ヵ月間の回復期間を設けて学習及び記憶機能に及ぼす影響を明らかにするために実施した。さらに、血清及び脳脊髄液（CSF）中アナキンラ濃度を測定した。

試験デザイン

各群雌雄各 20 例の SD ラットの出生後 7 日（出生日：0 日）から少なくとも出生後 44 日まで、アナキンラの 10、30 及び 100 mg/kg を 1 日 2 回皮下投与した（それぞれ 20、60 及び 200 mg/kg/日）。投与容量は 2 mL/kg とした。対照群には、溶媒（10 mmol/L クエン酸緩衝液、140 mmol/L NaCl、0.5 mmol/L EDTA、0.1% w/w ポリソルベート 80、pH 6.5）を皮下投与した。

一般状態、体重、複式 Y 字型水迷路試験（学習機能）及び剖検所見を評価した。対照群及び高用量群に各群雌雄各 5 例のサテライト群を設け、後の重量測定及び薬物濃度測定のために脳、肝臓、血清及び CSF サンプルを採取した。

試験結果

血清中アナキンラ濃度より、全ての 200 mg/kg/日群の動物はアナキンラに曝露されており、動物間のばらつきは低いことが示された。200 mg/kg/日群のアナキンラ濃度は 15～33 μg/mL の範囲であり、投与 2 時間後の平均値は 22 μg/mL であった。高用量群の CSF 中アナキンラ濃度は 0.13～0.22 μg/mL で、平均値は 0.18 μg/mL（血清中濃度の約 1%）であった。対照群の血清及び CSF サンプルからアナキンラは検出されなかった。

アナキンラ投与に対する反応の徴候は、対照群と比較したとき、60 及び 200 mg/kg/日群で、鼻口部被毛の赤色染色及び湿潤を示した動物の発現率の増加が認められた。

体重増加に投与の影響は認められなかった。

全てのアナキンラ投与群において、投与期間中及び回復期間中の複式 Y 字型迷路学習試験の結果は同程度であった。

全てのアナキンラ投与群における肝臓及び脳絶対重量は対照群と同等で、脳相対重量（体重あたり）も対照群と同等であった。

結論

SD ラットの出生後 7 日から少なくとも 44 日までアナキンラの 200 mg/kg/日までの用量を 1 日 2 回皮下投与した結果、忍容性は良好であった。雄では 200 mg/kg/日群、雌では 60 及び 200 mg/kg/日群で、毒性とはみなされない一般状態所見（被毛染色及び湿潤）の増加が観察されたが、全例で休薬により回復した。アナキンラ投与群では、溶媒対照群と比較して、投与最終週及び 1 ヵ月間回復期間後のいずれにおいても、海馬依存性記憶・学習機能検査に有害影響の徴候は認められなかった。

2.6.6.8 局所刺激性試験

単独の局所刺激性試験は実施しなかった。ラット及びサルの反復投与毒性試験における皮下及び静脈内投与部位の病理組織学的検査では、両動物種に皮下投与したときの投与部位、ラットに静脈内投与したときの血管周囲に、亜急性ないし慢性の炎症が観察された。これらの病変の出現率及び重症度は用量増加と共に増加する傾向が見られた。対照群では炎症が時折に起こり、製剤の成分（Bendele 1995）によるものと考えられる。2 週間未満の投与試験では、皮下投与部位の炎症は確認されなかったが、ラットを用いた 6 ヵ月間投与試験及びサルを用いた 1 ヵ月間投与試験では、試験した全ての用量で炎症が認められた。投与部位の炎症は可逆的であった。動物試験で認められた投与部位の炎症とアナキンラの臨床試験で認められた注射部位反応との関係は、炎症性成分が共有されている可能性があるものの不明である。

2.6.6.9　その他の毒性試験

2.6.6.9.1　IL-1Ra 及び PEG-sTNF-RI のラットにおける単回投与及び併用投与による免疫機能に及ぼす影響（[redacted] Study 100797）

IL-1Ra を雌ラットに 1 日 1 回少なくとも 21 日間皮下投与したとき、PEG-sTNF-RI を週 2 回で 3 週間皮下投与したとき、及び両薬物を少なくとも 21 日間併用投与したときの IL-1Ra による免疫調節を評価するために実施した。選択したアッセイの組み合わせは、全体的な免疫能に対する影響を推定し、宿主細胞抵抗性に関与する細胞型に対する影響を評価するためにデザインされた。

試験デザイン

本試験は 2 相に分けて実施した。NK 細胞応答アッセイ、マイトジェン反応の *in vitro* 評価、血清及び抗体分析、脾臓及び胸腺の細胞密度及び生存率、脾臓及び胸腺重量、並びに血液学的検査を第 1 相で評価し、抗ヒツジ赤血球抗体産生細胞（AFC）アッセイ、脾臓の細胞密度及び生存率、並びに脾臓重量を第 2 相で評価した。

雌 F344 ラットを、第 1 相で 11 群、第 2 相で 10 群に割り付けた（12 例/群/フェーズ）。各段階において、第 1 群から第 9 群は投与群とし、第 10 群（第 1 相及び第 2 相）及び第 11 群（第 1 相）は免疫機能検査の陽性対照とした。被験物質及び対照物質を表 2.6.6-12 に従い投与した。

表 2.6.6-12　Fisher 344 ラットを用いた毒性試験の試験計画

Test article dose	PEG-sTNF-RI placebo	PEG-sTNF-RI 5 mg/kg/day	PEG-sTNF-RI 50 mg/kg/day
IL-1Ra placebo	Group 1	Group 4	Group 5
IL-1Ra 20 mg/kg/day	Group 2	Group 6	Group 8
IL-1Ra 200 mg/kg/day	Group 3	Group 7	Group 9

Source: Study 100797.
Abbreviations: IL-1Ra, Interleukin-1 receptor antagonist; PEG-sTNF-RI, Polyethylene glycosylated soluble tumor necrosis factor-receptor I.

各フェーズにおいて、IL-1Ra プラセボ、20 mg/mL の IL-1Ra 及び 200 mg/mL の IL-1Ra を、0.5 mL/kg/回の容量で 1 日 2 回 21 日間皮下投与した。PEG-sTNF-RI プラセボ、PEG-sTNF-RI の 5 mg/mL 及び PEG-sTNF-RI の 30 mg/mL をそれぞれ 1.67、1.0 及び 1.67 mL/kg/回の容量で、投与 1、4、8、11、15 及び 18 日に皮下投与した。

第 1 相では、第 10 群に抗アシアロ GM1 抗体（NK 細胞アッセイの陽性対照）0.5 mL を、計画屠殺の約 24 時間前に尾静脈内投与した。第 11 群には、25 mg/kg のシクロホスファミド（有糸分裂誘発試験の陽性対照）を、予定屠殺前に連続 4 日間、1 日 1 回腹腔内投与した。

第 2 相では、計画屠殺の 4 日前に、全例に 0.5 mL のヒツジ赤血球を尾静脈内投与して免疫した。第 10 群には、予定屠殺前に連続 4 日間、シクロホスファミドの 25 mg/kg を 1 日 1 回腹腔内投与した。

死亡及び瀕死状態の観察、及び一般状態（ケージサイド）観察を行い、異常所見を記録した。毎週 1 回及び屠殺日に、各動物について詳細な観察を行い、異常所見及び正常の徴候を記録した。体重及び摂餌量を測定し、第 1 相の最終投与翌日（試験 22 日）に、一晩絶食させた動物を麻酔して血漿分析及び臨床病理検査のために採血し、体重測定して剖検した。第 2 相の試験 22 日に、動物を安楽死させ、体重測定して剖検した。剖検時に、胸腺（第 1 相）及び脾臓（第 1 相及び第 2 相）の重量を測定した。肉眼的異常部位（第 1 相及び第 2 相）、投与部位（第 1 相）及び腎臓（第 1 相）を採取して保存した。脾臓（第 1 相及び第 2 相）及び胸腺（第 1 相）の単細胞懸濁液を調製し、細胞密度及び生存率を測定した。

試験結果

各相の全動物が予定屠殺時まで生存した。被験物質に関連した臨床症状は認められなかった。体重、体重変化量及び摂餌量に、被験物質に関連した影響は認められなかった。

IL-1Ra の 200 mg/kg/日単独皮下投与、及び PEG-sTNF-RI との併用皮下投与（第 3、7 及び 9 群）で、絶対好酸球数の軽度増加が認められた。

PEG-sTNF-RI の 200 mg/kg/日単独皮下投与、及び IL-1Ra との併用皮下投与（第 3、7 及び 9 群）で、絶対リンパ球数の軽度増加が認められた。

抗アシアロ GM1 抗体の静脈内投与（第 10 群）では、リンパ球及び好酸球数の減少により、血小板数と白血球数が中等度に低下した。

シクロホスファミドの腹腔内投与（第 11 群）では、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリットの軽度低下、絶対網状赤血球数の重度低下、血小板数の中等度低下、好中球数、リンパ球数、単球数及び好酸球数の減少による白血球数の重度低下が認められた。

第 1 相では、陽性対照群（第 10 群：抗アシアロ GM1 抗体、第 11 群：シクロホスファミド）で統計学的に有意な影響として、胸腺絶対重量及び胸腺相対重量（対体重比）の減少が認められた。脾臓絶対重量及び脾臓相対重量は、第 10 群では統計学的に有意に増加し、第 11 群では減少した。

第 2 相では、第 5、6、7、8、9 及び 10 群（シクロホスファミド）に、被験物質に関連した脾臓絶対重量の減少が認められた。これらの減少は第 5、6、7、8 及び 10 群で統計学的に有意であった。第 5、6、7、8、9 及び 10 群では、被験物質に関連した統計学的に有意な脾臓相対重量（対体重比）の減少が認められた。第 1 相及び 2 相の残りの投与群では、最終体重及び器官重量に対する被験物質関連の影響は認められなかった。最終屠殺した動物の剖検所見は非特異的であり、被験物質との関連性はないと考えられた。病理組織学的検査は実施しなかった。

概して、IL-1Ra の単独投与又は PEG-sTNF-RI の 5 mg/kg/日との併用投与は、NK 細胞媒介細胞毒性の増加傾向と関連していた。この増強は、100：1 のエフェクター：標的細胞比で第 7 群（200 mg/kg IL-1Ra/5 mg/kg PEG-sTNF-RI）でのみ統計学的に有意であった。

IL-1Ra を投与した動物の細胞は、リンパ球増殖に対して限定的な影響を示し、唯一の統計学的に有意な影響は、200 mg/kg の IL-1Ra を投与した動物における抗 CD3 媒介増殖の減少であった。PEG-sTNF-RI 単独投与及び IL-1Ra との併用投与動物において、本試験で採用したいずれかの分裂促進因子による活性化後に、統計学的に有意な増殖活性の減少が様々な例で認められた。一般に、この増殖の減少は、最適濃度で分裂促進刺激された培養で観察された。PEG-sTNF-RI の用量と増殖低下の程度との間に明らかな用量相関性は認められなかった。

第 1 相の IL-1Ra の 20 及び 200 mg/kg/日群（第 2 及び第 3 群）並びに PEG-sTNF-RI の 5 mg/kg/日群（第 4 群）において、脾臓から採取した総生存細胞数に有意な影響は認められなかった。対照的に、PEG-sTNF-RI の 50 mg/kg/日群（第 5 群）又は IL-1Ra と PEG-sTNF-RI の任意の組合せの群（第 6～9 群）のいずれかの群の動物では、脾臓から採取した総生存細胞数に統計学的に有意な減少が認められた。第 2 相（免疫化）では、第 4、5、8 及び 9 群で、脾臓の生存細胞の回復性が減少した。シクロホスファミドの投与により、両相において脾臓の生存細胞の回復性が顕著に減少した。

胸腺から採取した生存細胞は、第 7、8 及び 9 群で統計学的に有意に減少していた。陽性対照群（第 10 及び 11 群）では、いずれも臓器から採取した総生存細胞数の回復性が有意に減少し、シクロホスファミド群で最も減少の程度が大きかった。

生体色素排除法によって評価した細胞生存率は、いかなる被験物質及び対照物質の投与によっても影響されなかった。

IL-1Ra の 20 及び 200 mg/kg/日並びに PEG-sTNF-RI の 5 mg/kg/日の投与では、AFC の誘導に有意な影響を及ぼさなかった。ラットに PEG-sTNF-RI の 50 mg/kg/日を単独投与又は IL-1Ra と併用投与したところ、AFC 反応の明らかな低下が認められたが、統計学的に有意ではなかった。この減少を AFC／10^6 生存脾細胞として表した場合、全脾臓細胞数の減少が補正されるため、AFC／脾臓と比較してそれほど顕著ではなかった。特に、PEG-sTNF-RI の 50 mg/kg/日の投与後に観察された減少の程度は、IL-1Ra の 20 及び 200 mg/kg/日のいずれの併用投与時にも変化は認められなかった。

結論

IL-1Ra の少なくとも 21 日間の投与で、NK 細胞活性の軽度な増強を除き、雌ラットにおける免疫系の構造及び機能にほとんど影響は認められなかった。PEG-sTNF-RI の少なくとも 21 日間の投与では、リンパ球数の増加、脾臓及び胸腺細胞数の減少、分裂促進刺激後のリンパ球増殖の散発的な減少、脾臓の絶対及び相対重量の減少（免疫化した動物のみ）、並びに AFC 誘導の軽度で統計学的に有意ではない減少など、いくつかの免疫機能パラメーターの調節が認められた。概

して、PEG-sTNF-RI 投与に関連する免疫調節は 50 mg/kg/日の用量でより明らかであった。これは AFC アッセイで最も明らかであったが、AFC の減少は統計学的に有意ではなかった。PEG-sTNF-RI 投与に関連して観察された影響で、IL-1Ra との併用投与により増悪したものは認められず、免疫調節作用は PEG-sTNF-RI に固有のものである可能性が示唆された。

雄 SD ラットにおける PEG-sTNF-RI の PK に対するアナキンラの反復投与の影響（100557 試験）は、［2.6.4.3.3.4］項及び［2.6.5.4］項でも報告している。アナキンラは、血清中濃度が 1 週間で約 20000 ng/mL、1 ヵ月間で 10600～290000 ng/mL の場合、PEG-sTNF-RI の静脈内投与の動態を変化させなかった。

2.6.6.9.2　IL-1Ra のラットにおける 3 日間静脈内持続投与による大腸菌クリアランス及び臓器コロニー形成に及ぼす影響に関する検討試験（SY05-T92-17）

アナキンラ投与開始から 2 時間後に致死量未満の量の大腸菌（*Escherichia coli*）を静脈内投与した雄ラットにおける、アナキンラの 3 日間静脈内持続投与による細菌クリアランス及び臓器中コロニー形成に及ぼす影響を明確にするために実施した。

試験デザイン

各群 10 例計 30 例の雄 SD ラットに、大腿静脈留置カテーテルを外科的に装着し、投与まで生理食塩水を持続投与した。第 1 群（対照群）には溶媒を 1 mL/kg/hour の速度で 72 時間持続投与した。溶媒は、10 mmol/L クエン酸ナトリウム、140 mmol/L NaCl、0.5 mmol/L EDTA、0.1% w/w ポリソルベート 80、pH 6.5（Lot [redacted]）であった。第 2 及び 3 群には、アナキンラ（14.4 mg/mL）をそれぞれ 0.5 及び 1.0 mL/kg/hour の速度で 72 時間持続投与した（1 日あたりの投与量はそれぞれ 173 及び 346 mg/kg/日）。本試験で使用したアナキンラのロット番号は [redacted] であった。これらの用量は、それぞれ 15 及び 30 µg/mL の血中濃度を得るために選択した。投与開始後 2 時間の時点で、全例に 0.6×10^7 CFU の大腸菌（[redacted]、カタログ番号 [redacted]）を尾静脈内に 1 mL の容量で単回静脈内投与した。大腸菌の用量は、感染 3 日後に脾臓及び肝臓のコロニーが形成されるような致死量未満の感染を引き起こす用量を選択した。予備試験では、1.4×10^5～1.4×10^8 CFU の大腸菌を投与した。この大腸菌株の 1.1×10^8 CFU の投与では、重度の臨床徴候（被毛粗剛及び円背位）を示し、5 例中 1 例が投与 2 日で死亡した。本試験の目標細菌量は 1×10^7 CFU であり、予備試験で死亡に至った用量よりも 1 桁少なかった。この細菌量は、対照群の全てのラットで確実な致死量未満とするために設定した。ただし、実際の細菌量は 0.6×10^7 CFU であった。本試験では抗生物質は使用しなかった。一般状態を毎日観察し、試験 4 日に全動物を安楽死させ、血液、脾臓及び肝臓の組織サンプルを採取した。血液及び脾臓と肝臓のホモジネートの希釈液（0［未希釈］、10^{-1}、10^{-2} 及び 10^{-3}）を培養して組織内細菌数を測定した。

試験 4 日のアナキンラの持続投与を中止する直前に、アナキンラ濃度を測定するために各ラットから血漿を採取した。

統計解析

データは、血液では CFU/mL、脾臓及び肝臓では CFU/gm として示した。20 コロニー未満の血液寒天培地を定量下限未満とし、これらのサンプルには 0 CFU/mL 又は CFU/gm を割り当てた。

定量可能な（少なくとも 20 コロニー／プレート）感染サンプルの割合について群間差を検定するため、Fisher の直接確率検定を用いた。Fisher の直接確率検定は、アナキンラが大腸菌の感染率に及ぼす影響の指標となるが、コロニー数の定量限界により、Fisher の直接確率検定によるこれらのデータの解釈は限定的になる。CFU/gm データは正規分布していなかったため、Wilcoxon の順位和検定を用いてデータを更に解析した。群間は対比較で行った。

試験結果

アナキンラの持続投与及び大腸菌の投与では、死亡はなく忍容性が得られた。尿の染色、陰茎からの分泌物、被毛粗剛、流涙、眼分泌物、赤又は黒色鼻汁及び紅涙などの異常な臨床所見はカテーテル挿入と関連しており、アナキンラ投与や細菌感染による変化ではないと考えられた。

血液、脾臓及び肝臓の CFU データをそれぞれ図 2.6.6-1、図 2.6.6-2 及び図 2.6.6-3 に示した。

溶媒群及び低用量（173 mg/kg/日）群では、血液中 CFU は検出されなかった（図 2.6.6-1）。高用量（346 mg/kg/日）群の 8 例中 3 例で血液中 CFU が検出された（一部の血液サンプルが凝固し、培養できなかったため、全群から血液サンプルは得られなかった）。脾臓では、対照群の 10 例中 2 例、低用量群の 10 例中 3 例及び高用量群の 10 例中 8 例で CFU が検出された（図 2.6.6-2）。肝臓では、対照群の 10 例中 1 例、低用量群の 10 例中 2 例及び高用量群の 10 例中 5 例で CFU が検出された（図 2.6.6-3）。

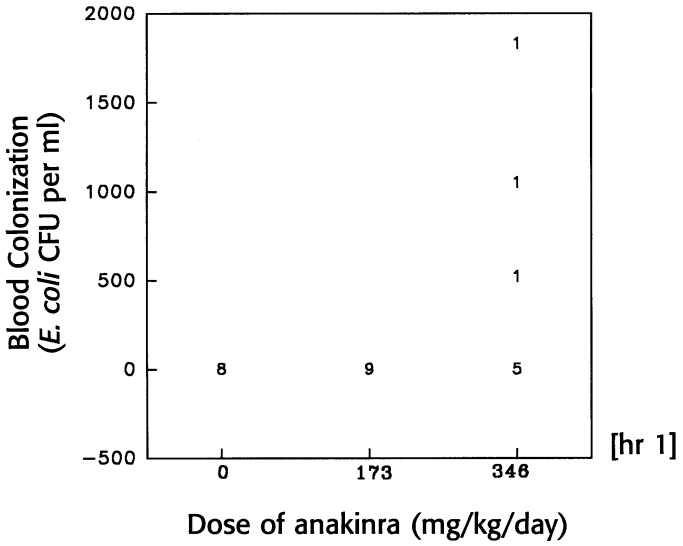
血液、脾臓及び肝臓の CFU データについて Fisher の直接確率検定を行った結果、脾臓では対照群と高用量群との間で有意差（$p = 0.020$）が見られ、低用量群と高用量群との間には境界線上の有意差（$p = 0.070$）が認められた。肝臓（$p = 0.14$）と血液（$p = 0.20$）には対照群と高用量群の間に有意差は認められなかった。いずれのパラメーターにも、対照群と低用量群との間に統計学的な有意差は認められなかった。

Wilcoxon の順位和検定では、脾臓の CFU/gm は高用量群では対照群よりも有意に高値であった（$0.01 < p < 0.05$）。低用量群と高用量群の脾臓には有意差はなかった（$0.10 < p < 0.20$）。肝臓では、高用量群と対照群の間で有意な増加は見られなかった（$0.10 < p < 0.20$）。血液では、統計学的に有意な影響は見られなかった（$p > 0.20$）。

血漿中アナキンラ濃度は、低用量（173 mg/kg/日）群で 51.1 μg/mL、高用量（346 mg/kg/日）群で 59.5 μg/mL であった。技術的な誤りにより、これらの血漿サンプルは解凍され、不確定の

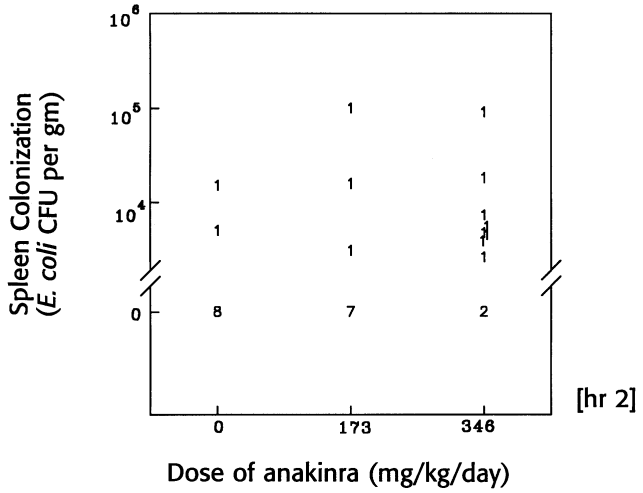
時間（24～48 時間）常温で放置された。これらの時間枠におけるラット血漿中のアナキンラの常温での安定性は不明であるため、報告された血漿中アナキンラ濃度は信頼できない可能性がある。これらの用量のアナキンラを用いて得られた血漿濃度のより正確な表示については、後述する黄色ブドウ球菌及びリステリア菌の宿主抵抗性試験の血漿中アナキンラ濃度データを参照のこと。

図 2.6.6-1 アナキンラの 3 日間持続投与後の大腸菌の血液中コロニー形成



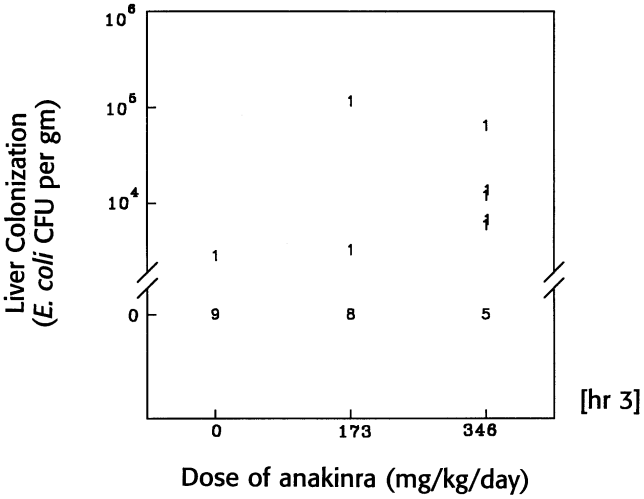
Source: Study SY05-T92-17.
Abbreviations: CFU, Colony forming unit; *E. coli*, *Escherichia coli*; hr, Hour; i.v., Intravenous.
Notes: Rats were treated with anakinra by continuous i.v. infusion for 3 days. At 2 hours after the initiation of treatment, the rats were challenged with 0.6×10^7 CFU of *E. coli*. After 3 days of treatment, the CFU/mL was determined for the blood. The numbers on the graph indicate the number of rats with that CFU/mL value.

図 2.6.6-2 アナキンラの 3 日間持続投与後の大腸菌の脾臓中コロニー形成



Source: Study SY05-T92-17.
Abbreviations: CFU, Colony forming unit; *E. coli*, *Escherichia coli*; hr, Hour; i.v., Intravenous.
Notes: Rats were treated with anakinra by continuous i.v. infusion for 3 days. At 2 hours after the initiation of treatment, the rats were challenged with 0.6×10^7 CFU of *E. coli*. After 3 days of treatment, the CFU/gm was determined for the spleen. The numbers on the graph indicate the number of rats with that CFU/gm value.

図 2.6.6-3 アナキンラの 3 日間持続投与後の大腸菌の肝臓中コロニー形成



Source: Study SY05-T92-17.
Abbreviations: CFU, Colony forming unit; *E. coli*, *Escherichia coli*; hr, Hour; i.v., Intravenous.
Notes: Rats were treated with anakinra by continuous i.v. infusion for 3 days. At 2 hours after the initiation of treatment, the rats were challenged with 0.6×10^7 CFU of *E. coli*. After 3 days of treatment, the CFU/gm was determined for the liver. The numbers on the graph indicate the number of rats with that CFU/gm value.

結論

ラットにアナキンラを 173 及び 346 mg/kg/日の用量で 3 日間静脈内持続投与したところ、相当量の血漿中アナキンラ濃度が認められた。アナキンラ投与は、大腸菌感染ラットにおける異常な臨床徴候の発現率に影響を及ぼさなかった。アナキンラ投与では、大腸菌感染による死亡は認められなかった。

低用量（173 mg/kg/日）群では、血液、脾臓及び肝臓における大腸菌のコロニー形成にいかなる変化も認められなかった。しかし、高用量（346 mg/kg/日）群では、血液及び臓器中コロニー形成の発現率の増加、並びに脾臓中 CFU/gm 数の統計学的に有意な増加を示した。血液中 CFU/mL、肝臓中 CFU/gm は増加傾向を示した。

高用量群では、大腸菌感染による死亡は認められなかった。同様の試験として、ラットの大腸菌誘発死亡率に対する酢酸鉛とカドミウムの影響試験が実施されている（Kim 1995）。この試験では、異なる大腸菌株の 2×10^8 CFU を投与したところ、対照群では死亡は認められなかった。この投与量は、本試験と同様に、対照群の 8 例中 1 例に死亡をもたらした投与量（2×10^9）よりも 1 桁低かった。2×10^8 CFU を投与したラットでは、酢酸鉛 20 mg/kg とカドミウム 6 mg/kg の単回静脈内投与でほぼ 100%の死亡率であった。この試験では、感染モデルが死亡率をエンドポイントとして用いることにより、化学的に誘発された宿主抵抗性の低下を検出できることを示した。この試験を陽性対照として用いたところ、アナキンラの投与では、死亡率で測定した宿主抵抗性の臨床的に有意な障害は認められなかった。

高用量（346 mg/kg/日）のアナキンラ投与により、血液及び組織中の CFU 検出率が増加した。検出率は脾臓でのみ統計学的に有意であった。CFU の変化による毒性徴候及び死亡は認められなかった。

2.6.6.9.3 IL-1Ra のラットにおける 3 日間静脈内持続投与による黄色ブドウ球菌クリアランス及び臓器中コロニー形成に及ぼす影響に関する検討試験（SY05-T92-18）

アナキンラ投与開始から 2 時間後に、致死量未満の黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）を静脈内投与した雄ラットにおける、アナキンラの 3 日間持続静脈内投与による細菌クリアランス及び臓器中コロニー形成に対する影響を明らかにするために実施した。

試験デザイン

各群 10 例計 30 例の雄 SD ラットに、大腿静脈留置カテーテルを外科的に装着し、投与まで生理食塩水を持続投与した。第 1 群（対照群）には溶媒を 1 mL/kg/hour の速度で 72 時間持続投与した。溶媒は、10 mmol/L クエン酸ナトリウム、140 mmol/L NaCl、0.5 mmol/L EDTA、0.1% w/w ポリソルベート 80、pH 6.5（Lot[redacted]）であった。第 2 及び 3 群には、アナキンラ（14.4 mg/mL）をそれぞれ 0.5 及び 1.0 mL/kg/hour の速度で 72 時間持続投与した（1 日投与量はそれぞれ 173 及び 346 mg/kg/日）。本試験に用いたアナキンラのロットは[redacted]であった。こ

れらの用量は、それぞれ 15 及び 30 μg/mL の血中濃度を得るために選択した。投与開始後 2 時間の時点で、全例に 10^8 CFU の黄色ブドウ球菌（502A 株、[redacted]カタログ番号[redacted]）を尾静脈内に 1 mL の容量で単回静脈内投与した。黄色ブドウ球菌の用量は、感染 3 日後に脾臓及び肝臓のコロニーが形成されるような致死性未満の感染を引き起こす用量を選択した。予備試験では、7.9×10^6～6.9×10^8 CFU の黄色ブドウ球菌を投与した。7.9×10^6 CFU の投与では、一般状態の変化は認められなかった。他の全ての用量（2.1×10^7～6.9×10^8）では、被毛粗剛、嗜眠、運動失調及び削痩などの一般状態の変化が観察されたが、死亡は見られなかった。対照群における細菌の非致死量を保証するために、本試験では 1×10^8 CFU の細菌量を使用した。本試験では抗生物質は使用しなかった。一般状態を毎日観察し、試験 4 日に全動物を安楽死させ、血液、脾臓及び肝臓の組織サンプルを採取した。血液及び脾臓と肝臓のホモジネートの希釈液（0［未希釈］、10^{-1}、10^{-2} 及び 10^{-3}）を培養して組織内細菌数を測定した。

試験 4 日のアナキンラの持続投与を中止する直前に、アナキンラ濃度を測定するために各ラットから血漿を採取した。

統計解析

データは、血液では CFU/mL、脾臓及び肝臓では CFU/gm として示した。20 コロニー未満の未希釈検体の血液寒天培地を定量下限未満とし、これらのサンプルには 0 CFU/mL 又は CFU/gm を割り当てた。未希釈サンプルではコロニー数が多すぎて計測不能であったが、1：10 希釈サンプルでは 20 未満の血液寒天培地は 1：10 の値から定量した。

定量可能な感染サンプルの割合について群間差を検定するため、Fisher の直接確率検定を用いた。Fisher の直接確率検定は、アナキンラが黄色ブドウ球菌の感染率に及ぼす影響の指標となるが、コロニー数の定量限界により、Fisher の直接確率検定によるこれらのデータの解釈は限定的になる。CFU/gm データは正規分布していなかったため、Wilcoxon の順位和検定を用いてデータを更に解析した。群間は一対比較した。

試験結果

アナキンラの持続投与及び黄色ブドウ球菌の投与では、死亡はなく忍容性が得られた。被毛粗剛、削痩、眼脂、鼻汁などの異常な臨床所見は、細菌感染に関連すると考えられた。細菌感染に対するこれらの反応にアナキンラ投与の影響は見られなかった。

血液の CFU データを図 2.6.6-4 に、脾臓と肝臓の CFU データを図 2.6.6-5 に示した。

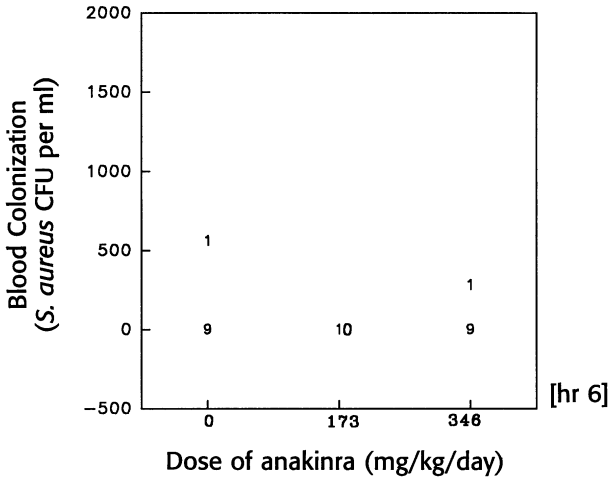
血液中 CFU が定量可能であったのは、対照群の 1 例のみで、低用量（173 mg/kg/日）群では全く認められず、高用量（346 mg/kg/日）群では 1 例であった（図 2.6.6-4）。Fisher の直接確率検定又は Wilcoxon の順位和検定により、群間に統計学的有意差は認められなかった。

対照群の 1 例を除いて、全てのラットの脾臓及び肝臓中 CFU が定量された。Fisher の直接確率検定では、群間差は認められなかった。2 検体を除いて全て定量可能であったため、脾臓と肝

臓のいずれのデータも図 2.6.6-5 では平均 CFU/gm ± SEM で示した。Wilcoxon の順位和検定を用いたところ、群間に統計学的有意差は認められなかった。

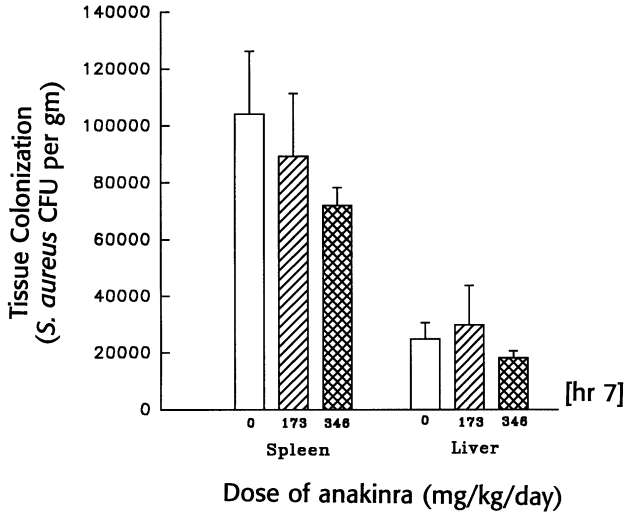
血漿中アナキンラ濃度は、低用量（173 mg/kg/日）群で 29.5 μg/mL、高用量（346 mg/kg/日）群で 61.3 μg/mL であった。

図 2.6.6-4　アナキンラの 3 日間静脈内持続投与後の黄色ブドウ球菌の血液中コロニー形成



Source: Study SY05-T92-18.
Abbreviations: CFU, Colony forming unit; hr, Hour; i.v., Intravenous; *S. aureus*, *Staphylococcus aureus*.
Notes: Rats treated with anakinra by continuous i.v. infusion for 3 days. At 2 hours after the initiation of treatment, the rats were challenged with 10^8 CFU of *S. aureus*. After 3 days of treatment, the CFU/mL was determined for the blood. The numbers on the graph indicate the number of rats with that CFU/mL value. There were no statistically significant differences between the groups.

図 2.6.6-5 アナキンラの 3 日間静脈内持続投与後の黄色ブドウ球菌の脾臓及び肝臓中コロニー形成



Source: Study SY05-T92-18.
Abbreviations: CFU, Colony forming unit; hr, Hour; i.v., intravenous; *S. aureus*, *Staphylococcus aureus*; SEM, Standard error of the mean.
Notes: Rats were treated with anakinra by continuous i.v. infusion for 3 days. At 2 hours after the initiation of treatment, the rats were challenged with 10^8 CFU of *S. aureus*. After the 3 days of treatment, the CFU/gm was determined for the spleen and liver. The values represent the mean ± SEM of the CFU/gm for 10 rats in a group. There were no statistically significant differences between the groups.

結論

ラットにアナキンラを 173 及び 346 mg/kg/日の用量で 3 日間静脈内持続投与したところ、臨床的に有意な血漿中アナキンラ濃度を示した。アナキンラ投与は、黄色ブドウ球菌感染ラットにおける異常な臨床徴候の発現率に影響を及ぼさなかった。アナキンラ投与では、黄色ブドウ球菌感染後の死亡や血液中 CFU/mL 及び臓器中 CFU/gm の変化は認められなかった。

2.6.6.9.4 IL-1Ra のラットにおける 3 日間静脈内持続投与によるリステリア菌クリアランス及び臓器中コロニー形成に及ぼす影響に関する検討試験（SY05-T92-19）

アナキンラ投与開始から 2 時間後に、致死量未満のリステリア菌（*Listeria monocytogenes*）を静脈内投与した雄ラットにおける、アナキンラの 3 日間静脈内持続投与による細菌クリアランス及び臓器中コロニー形成に及ぼす影響を明らかにするために実施した。

試験デザイン

各群 10 例計 30 例の雄 SD ラットに、大腿静脈留置カテーテルを外科的に装着し、投与まで生理食塩水を持続投与した。第 1 群（対照群）には溶媒を 1 mL/kg/hour の速度で 72 時間持続投与した。使用した溶媒は、10 mmol/L クエン酸ナトリウム、140 mmol/L NaCl、0.5 mmol/L EDTA、

0.1% w/w ポリソルベート 80、pH 6.5（Lot[redacted]）であった。第 2 及び 3 群には、アナキンラ（14.4 mg/mL）をそれぞれ 0.5 及び 1.0 mL/kg/hour の速度で 72 時間持続投与した（1 日投与量はそれぞれ 173 及び 346 mg/kg/日）。本試験に用いたアナキンラのロットは[redacted]であった。これらの用量は、それぞれ 15 及び 30 µg/mL の血中濃度を得るために選択した。投与開始後 2 時間の時点で、全例に 3.0×10^6 CFU のリステリア菌（[redacted]、カタログ番号[redacted]）を尾静脈内に 1 mL の容量で単回投与した。リステリア菌の用量は、感染 3 日後に脾臓及び肝臓のコロニーが形成されるような致死性未満の感染を引き起こす用量を選択した。予備試験では、1.7×10^5～3.6×10^7 CFU のリステリア菌で検討した。3.6×10^7 CFU の投与では、重度の臨床徴候（削痩及び被毛粗剛）を示し、5 例中 1 例は投与後 3 日以内に死亡した。本試験では予備試験で死亡に至った細菌量よりも 1 桁少ない 3×10^6 CFU を使用した。この細菌量を用いて、対照群の全ラットで致死量未満であることを保証した。本試験では抗生物質を使用しなかった。一般状態を毎日観察し、試験 4 日に全動物を安楽死させ、血液、脾臓及び肝臓の組織サンプルを採取した。血液及び脾臓と肝臓のホモジネートの希釈液（0［未希釈］、10^{-1}、10^{-2} 及び 10^{-3}）を培養することにより、組織内細菌数を測定した。

試験 4 日のアナキンラの持続投与の中止直前に、各ラットから血漿を入手し、アナキンラ濃度を測定した。

統計解析

データは、血液では CFU/mL、脾臓及び肝臓では CFU/gm として示した。20 コロニー未満の血液寒天培地を定量下限未満とし、これらのサンプルには 0 CFU/mL 又は CFU/gm を割り当てた。

CFU/gm データは正規分布しないため、データの解析には Wilcoxon の順位和検定（ノンパラメトリック解析）を用いた。群間は一対比較した。

試験結果

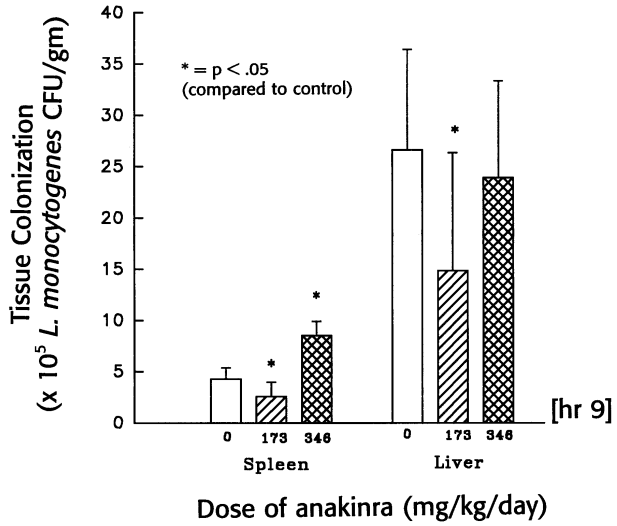
アナキンラの持続投与及びリステリア菌の投与では、死亡はなく忍容性が得られた。眼や鼻からの分泌物、流涙などの異常な臨床所見は、カテーテル挿入と細菌感染に関連しており、アナキンラ投与による変化ではないと考えられた。

脾臓及び肝臓の CFU データを図 2.6.6-6 に示した。

いずれの群においても、細菌感染後 3 日の血液中 CFU は定量できなかった。しかし、脾臓及び肝臓中 CFU には、統計学的に有意な影響（$p \leq 0.05$）が見られた。脾臓中 CFU は、低用量（173 mg/kg/日）群で 40%減少したが、高用量（346 mg/kg/日）群では 2 倍の増加を示した。肝臓中 CFU は、低用量群では対照群と比較して 45%低値を示したが、高用量群では影響は認められなかった。

血漿中アナキンラ濃度は、低用量（173 mg/kg/日）群で 13.1 µg/mL、高用量（346 mg/kg/日）群で 20.6 µg/mL であった。

図 2.6.6-6 アナキンラの 3 日間静脈内持続投与後のリステリア菌の脾臓及び肝臓中コロニー形成



Source: Study SY05-T92-19.
Abbreviations: CFU, Colony forming unit; *L. monocytogenes*, *Listeria monocytogenes*; hr, Hour; i.v., Intravenous; SEM, Standard error of the mean.
Notes: Rats were treated with anakinra by continuous i.v. infusion for 3 days. At 2 hours after the initiation of treatment, the rats were challenged with 3.0×10^6 CFU of *L. monocytogenes*. After 3 days of treatment, the CFU/gm was determined for the spleen and liver. The values represent the mean ± SEM for 10 rats/group.
* = $p < 0.05$ as compared to the control group (0 mg/kg/day), using the Wilcoxon Rank-Sum test.

結論

ラットにアナキンラを 173 及び 346 mg/kg/日の用量で 3 日間静脈内持続投与したところ、臨床的に有意な血漿中アナキンラ濃度を示した。アナキンラ投与は、リステリア菌感染ラットにおける異常な臨床所見の発現率に影響を及ぼさなかった。アナキンラ投与では、リステリア菌感染後の死亡は認められなかった。

いずれの群からも血液中に定量可能な細菌は見られず、血液から細菌が除去されたこと、またこの除去に対するアナキンラの影響もみられなかったことを示している。脾臓の CFU データでは対照的な結果が見られ、低用量（173 mg/kg/日）群は CFU の減少を示したが、高用量（346 mg/kg/日）群では CFU は増加した。その増加量は対照群の約 2 倍であった。この CFU の減少と増加は、これらの細菌感染モデルに固有の変動性を反映した可能性がある。

他の試験では、リステリア菌感染マウスを実験的に操作したところ、死亡が見られるまでに脾臓及び肝臓のコロニー形成が大幅に増加したことが示されている（Havell 1987）。ウサギ抗組換えマウス腫瘍壊死因子を投与した感染マウスの脾臓及び肝臓では、死亡が見られる以前に、組織コロニー形成がそれぞれ 10^3 及び 10^4 倍増加した。このことは、この試験でみられた高用量のア

ナキンラを投与したラットにおける脾臓中コロニー形成の約 2 倍の増加は、臨床的に重要ではないことを示している。

リステリア菌感染後のアナキンラ投与による死亡はなく、一般状態の変化もなかった。リステリア菌感染モデルにおける死亡は感度の高いエンドポイントである。例えば、Morahan ら（Morahan 1979）の研究によると、δ-9-テトラヒドロカンナビノール 150 mg/kg を投与したリステリア菌感染マウスは、対照群よりも 2.5 桁低い LD_{50} を示した。この試験では、致死量より約 1 桁低い細菌量のリステリア菌をラットに投与した。アナキンラ投与により、Morahan らの試験と同程度の宿主抵抗性の低下が認められた場合には、臨床徴候及び死亡の変化が認められたと考えられる。

これらの結果を総合すると、アナキンラ投与は、リステリア菌に対する宿主抵抗性に対して臨床的に有意な影響を及ぼさなかったことが示唆された。

2.6.6.9.5　IL-1Ra の雄アカゲザルにおける 19 日間反復静脈内投与抗原性試験（[redacted] SG-585m、[redacted]試験 SY05-T89-07）

19 日間反復静脈内投与後のアナキンラの免疫原性及び一部の毒性評価項目を明らかにするために実施した。本稿では、試験の説明と毒性試験結果を示す。

試験デザイン

4 例の雄アカゲザルにアナキンラを 19 日間毎日静脈内（ボーラス）投与した。投与 1 、10、12、14 及び 19 日に動物から採取した血清サンプルの抗薬物抗体の測定を外部依頼した。アナキンラの用量は 10 mg/kg/日とし、投与容量は 1.0 mL/kg/回とした。溶媒対照群は設定しなかった。本試験に用いたアナキンラのロット番号は[redacted]であり、溶媒は 10 mmol/L リン酸ナトリウム、150 mmol/L NaCl、0.1 mmol/L EDTA、pH 7.0 であった。

一般状態観察、体重測定、臨床病理検査（血液学的及び血液生化学的検査）を実施した。剖検及び病理組織学的検査は実施しなかった。

試験結果

一般状態、体重及び臨床病理検査値は正常範囲内であった。

結論

雄アカゲザルにアナキンラを 19 日間反復投与したとき、一般状態、体重及び臨床病理検査値に有害な影響は認められなかった。

2.6.6.9.6　r-metHuIL-1Ra 及び PEG r-metHu-sTNF-RI のカニクイザルにおける 1 ヵ月間反復投与毒性試験及び 1 ヵ月間回復性試験（[redacted]39-39、[redacted] Study 100484）

カニクイザルを用いて、PEG r-metHu-sTNF-RI（PEG-sTNF-RI）とアナキンラを併用したときの 1 ヵ月間の毒性及び TK を評価することであった。100484 試験の TK 評価の詳細な結果は、［2.6.4.3.3.6］項及び［2.6.5.4］項に記載した。

試験デザイン

アナキンラ（Lot[redacted]）は毎日皮下投与し、sTNF-RI（Lot[redacted]）は週 1 回皮下投与した。試験デザインを表 2.6.6-13 に示す。

表 2.6.6-13　カニクイザル 1 ヵ月毒性試験における試験デザイン

Group	Test article	Dose mg/kg	No. of animals Day 28 necropsy	No. of animals Recovery Period
1	Anakinra sTNF-RI	0 0	2 males 2 females	1 male 1 female
2	Anakinra sTNF-RI	0 1	2 males 2 females	1 male 1 female
3	Anakinra sTNF-RI	0 5	2 males 2 females	1 male 1 female
4	Anakinra sTNF-RI	0 25	3 males 3 females	1 male 1 female
5	Anakinra sTNF-RI	100 0	2 males 2 females	1 male 1 female
6	Anakinra sTNF-RI	100 1	2 males 2 females	1 male 1 female
7	Anakinra sTNF-RI	100 5	2 males 2 females	1 male 1 female
8	Anakinra sTNF-RI	100 25	3 males 3 females	1 male 1 female

Source: Study 100484.
Abbreviations: No., Number; sTNF-RI, Soluble tumor necrosis factor-receptor I.

一般状態観察、体重及び摂餌量測定、バイタルサイン検査（体温、心拍数、呼吸数、血圧及び心電図）、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、抗アナキンラ及び sTNF-RI 抗体測定、アナキンラ及び sTNF-RI の TK 評価、並びに病理学的検査（剖検、器官重量及び病理組織学的検査）を実施した。

試験結果

投与期間及び回復期間を通じて、いずれの群においても死亡は認められなかった。一般状態、摂餌量、体重、バイタルサイン、尿検査、血液学的検査及び血液生化学的検査において、いずれの群においても被験物質に関連した異常は認められなかった。

第 5～8 群（アナキンラ 100 mg/kg の単独又は sTNF-RI との併用投与）の全例で尿中総 β2-ミクログロブリンの増加が認められた。N-アセチルグルコサミニダーゼを含む他の尿検査パラメーターには影響は見られず、腎機能障害が β2-ミクログロブリン増加の原因ではないことが示唆された。さらに、この変化を説明できる病理学的変化は認められなかった。いずれの群においても血清中 β2-ミクログロブリン濃度に影響は認められなかった。アナキンラは腎臓で広範囲にろ過されるため、β2-ミクログロブリンの増加は近位尿細管による β2-ミクログロブリンの再吸収の減少の結果である可能性がある。

投与に関連した剖検所見は投与部位の出血であり、投与後 28 日の剖検では対照群を含む全群で認められた。病理組織学的検査では、単核細胞を含む炎症細胞浸潤と投与部位の出血が全群で認められたが、重症度は高用量の併用群で高い傾向が見られた。第 4 群（25 mg/kg の sTNF-RI）及び第 8 群（100 mg/kg のアナキンラ及び 25 mg/kg の sTNF-RI）では尿細管空胞化が観察されたが、この病変の発現率は第 8 群（6 例中 2 例）の方が第 4 群（6 例中 5 例）より低かった。TNF-RI 単独群で観察された尿細管空胞化の発現率及び重症度は、同様の用量で実施された過去の試験の結果と一致している。投与部位の出血は、回復群の剖検で第 3 群の雄 1 例に認められた。いずれの群においても 1 ヵ月間の回復期間後に近位尿細管の空胞化は認められなかった。

アナキンラ投与群（第 5～8 群）のいずれの群においても、ほとんどの動物で抗アナキンラ抗体は検出されず（投与 1 ヵ月後で 1 群あたり 1 例以下）、検出された抗体反応の力価は低値であった（≤1:400）。抗 sTNF-RI 抗体は、sTNF-RI を投与した全群で検出された。投与 1 ヵ月後の抗体産生率は投与量と反比例して変化する傾向があった（第 2、3 及び 4 群の発現率はそれぞれ 67%、50%及び 38%）。アナキンラを併用投与した群も同様の傾向を示したが、併用群の抗体産生率は sTNF-RI 単独群よりも高かった。sTNF-RI 単独投与群とアナキンラとの併用投与群の力価はおおむね同程度であった。

結論

アナキンラと sTNF-RI の併用投与では、有意な相互作用毒性は認められなかった。本試験の所見は、サルにおけるアナキンラ及び sTNF-RI の既知の毒性プロファイルと一致している。PEG-sTNF-RI の複数回皮下投与は、アナキンラの複数回皮下投与での TK に明らかな影響を及ぼさなかった。

2.6.6.10 考察及び結論

GLP 適用非臨床試験の動物種としてラット及びサルを選択した。アナキンラは、試験した他の全ての動物種と同様にこれら両動物種において生理活性を有する。ラットは、医薬品の安全性

評価に用いられる標準的なげっ歯類であり、多くの薬理試験で使用されてきたことから選択した。サルは、ヒトと系統発生的に類似していること、及びアナキンラが霊長類において生物学的活性を有することから、非げっ歯類として選択した。ほとんどの非臨床関節炎モデルはラットで試験され、頻度は低いが一部はマウスで実施されている。

ラット（1.5、15、150 及び 720 mg/kg）及びカニクイザル（1.5、15 及び 150 mg/kg）に単回静脈内投与したときのアナキンラの影響を評価した。アナキンラの薬理作用に起因する毒性徴候、体重変化、剖検所見及び病理組織学的変化は認められなかった。

アナキンラの 14 日間反復皮下投与では、ラットに最高 120 mg/kg/日（1 日 4 回）、アカゲザルに最高 80 mg/kg/日（1 日 2 回）の用量で全身性毒性は認められなかった。局所毒性は、投与部位の炎症に限定され、軽微～軽度の慢性炎症であった。溶媒群ではアナキンラ投与群よりも投与部位の炎症の発現率及び重症度は低かったが、投与部位の炎症の少なくとも一部は投与による外傷又は溶媒成分によるものであった可能性がある。アナキンラ投与 14 日後の局所炎症反応に対する NOAEL はラットで 80 mg/kg/日、サルで 5 mg/kg/日と推定された。

ラットにアナキンラを 2、20 及び 200 mg/kg/日の用量で 6 ヵ月間 1 日 2 回反復皮下投与したとき、全ての用量で投与部位の炎症が観察された。200 mg/kg/日での全身性毒性は腎臓に限定され、腎臓重量の増加、タンパク尿及び慢性進行性腎症が投与 6 ヵ月後の主な所見であった。雄への影響は雌よりも重度であった。腎毒性は、投与 1 ヵ月後の中間剖検時及び 1 ヵ月間の休薬期間後には明らかではなかった。

アカゲザルを用いたアナキンラの 28 日間 1 日 1 回反復皮下投与試験において、200 mg/kg/日の用量で 10 例中 5 例に投与 2～3 週後に皮膚病変（投与部位を含む）が認められ、病変部生検の組織学的検査で慢性リンパ組織球性炎症であることが明らかとなった。培養した 3 病変のうち 2 病変には微生物は存在していなかった。病変は消毒液等で局所的に治療され、剖検時には正常に治癒していた。全身性毒性に対する NOAEL は 100 mg/kg/日と推定され、投与局所への影響に対する NOAEL は 10 mg/kg/日未満であった。

アカゲザルの 28 日間投与試験における NOAEL は 100 mg/kg/日と推定され、14 日間投与試験の NOAEL（80 mg/kg）とほぼ同程度であった。ラットとアカゲザルの 1 ヵ月間投与試験で同程度の NOAEL（100 mg/kg/日）であり、いくつかの理由（倫理的、実用的、統計学的妥当性、両動物種で同様な薬理作用）により、長期試験（6 ヵ月間投与毒性試験）では 1 種の動物種（ラット）で妥当であると判断した。ICH S6（R1）ガイドラインでは、「短期の一般毒性試験における毒性評価に 2 種の動物種が必要となる場合でも、両動物種が同様の毒性所見を示した場合は、より長期の一般毒性試験では通常 1 種類の動物種で十分と考えられる。」と記載しており、さらに、当該ガイドラインの補遺で「この場合、非げっ歯類を使用する科学的根拠がなければ、げっ歯類を使用すべきである。」と言及している。

アナキンラの 14 日間反復静脈内投与試験では、30 mg/kg/日までの用量で全身性毒性は認められなかったが、ラットのみで投与部位に血管周囲炎が認められた。静脈内投与時の全身性毒性に

対する NOAEL は 30 mg/kg/日以上と推定された。投与部位の局所毒性に対する NOAEL はラットで 10 mg/kg/日、サルで 30 mg/kg/日と推定された。また、アナキンラの 150 mg/kg/日をサルに 1 週間点滴静脈内投与しても、投与に関連した影響は認められなかった。

開発初期には、アナキンラの適応症が定まっていなかったため、静脈内と皮下投与の両投与経路で試験した。アカゲザルの 2 週間投与試験では、NOAEL は静脈内投与で 30 mg/kg、皮下投与で 80 mg/kg と推定された。静脈内投与ではより高い曝露量が得られるため、どのような毒性が発現するかを観察するのにも適している。

反復投与毒性試験の曝露量に基づく安全域は次のとおり推定した。

ヒト曝露量については、アナキンラを 100 mg の用量で投与したときの C_{max} は 773 ng/mL、$AUC_{0-\infty}$は 10188 ng·h/ml であった（20000268 試験）。

ラットを用いた 6 ヵ月間投与毒性試験（SY05-T94-04 試験）では、アナキンラの 20 mg/kg（NOAEL）を皮下投与したときの投与 2 時間後の平均血漿中濃度は 16415 ng/mL であった。雌ラットを用いた 4 週間投与毒性試験（960048 試験）では、アナキンラの 100 mg/kg（NOAEL）を皮下投与したときの C_{max} は 210000 ng/mL、AUC_{0-24} は 1440000 ng·h/mL であった。したがって、ラット 6 ヵ月間投与試験の血漿中濃度で比較した場合の安全域は約 21 倍、ラット 4 週間投与試験の C_{max} で比較した場合の安全域は約 272 倍、同試験の AUC で比較した場合の安全域は約 141 倍であった。

サルを用いた 4 週間投与毒性試験（960040 試験）では、アナキンラの 100 mg/kg（NOAEL）を皮下投与したときの 28 日目における C_{max} は 38390 ng/mL、AUC_{0-24} は 375600 ng·h/mL であった。これにより、サルの C_{max} で比較した場合の安全域は約 50 倍、AUC で比較した場合の安全域は約 37 倍であった。

アナキンラのラットにおける受胎能及び初期胚の発生、胚・胎児発生、並びに出生前及び出生後の発生に及ぼす影響を、生殖及び発達の適切な期間に 12.5、50 及び 200 mg/kg/日の用量で（1 日 2 回）皮下投与することにより評価した。最高 200 mg/kg/日の用量で実施したこれらの試験のいずれにおいても、有害作用は認められなかった。さらに、ウサギの胚・胎児発生に対する影響を評価するため、アナキンラを 12.5、50 及び 200 mg/kg/日の用量で皮下投与した。アナキンラの 200 mg/kg/日までの用量では、ウサギの胚・胎児発生への影響は認められなかった。

アナキンラの変異原性を、3 つの *in vitro* 試験及び 1 つの *in vivo* 試験により評価した。アナキンラは 5000 μg/plate までの濃度でネズミチフス菌及び大腸菌を用いる復帰突然変異試験において復帰変異コロニー数を増加させなかった。また、アナキンラは 5000 μg/mL までの濃度で変異マウスリンパ腫細胞数を増加させなかった。アナキンラの染色体異常誘発能を CHO 細胞で評価したが、2000 μg/mL までの濃度で染色体異常に対して影響を及ぼさなかった。各群雌雄各 5 例のマウスにアナキンラを 500、1000 及び 2000 mg/kg の用量で単回皮下投与して *in vivo* での突然変異誘発能を小核試験で評価した結果、2000 mg/kg まで陰性であった。

2 年間がん原性試験は実施しなかった。しかしながら、アナキンラが新規又は既存の腫瘍と相互作用する可能性を、直接的な腫瘍発生（変異原性又はがん原性）、直接的な腫瘍刺激（腫瘍細胞受容体刺激を介して）及び腫瘍増殖に対する間接的な作用（免疫調節など）という側面に特に重点を置いて検討した。

アナキンラは遺伝子組換えヒトタンパク質であるため、直接的な DNA 損傷剤である可能性は低く、製剤の成分も同様である。アナキンラは一連の変異原性試験で評価され、変異原性は有していないと判断された。また、SD ラットに最高 200 mg/kg/日のアナキンラを 6 ヵ月間反復投与した試験では、アナキンラに関連した前腫瘍性病変も腫瘍も認められなかった。したがって、アナキンラが直接的な腫瘍発生に関与しているという証拠はない。

アナキンラは理論的には、腫瘍細胞上の IL-1 受容体を活性化することによって腫瘍の成長を刺激する可能性がある。しかし、アナキンラが IL-1RI に結合しても、シグナル伝達を引き起こすリガンド-受容体複合体を形成できないと考えられる。腫瘍細胞株を用いたアナキンラの *in vitro* 試験では、アナキンラの増殖作用は実証されていない。

アナキンラはまた、免疫調節を介して腫瘍の成長に間接的な影響を及ぼす可能性がある。ラット及びサルを用いた毒性試験では、免疫抑制の証拠は認められなかった。さらに、アナキンラは、マウスにおける Keyhole Limplet Haemocyanin に対する抗体産生や細胞溶解性 T リンパ球反応などの特異的な免疫応答に影響を及ぼさず、免疫能が維持されていることが示された。したがって、アナキンラは腫瘍細胞を認識して排除する免疫システムの能力を大きく損なうことはないと考えられる。

アナキンラは、ラットに最高 346 mg/kg/日の用量で 3 日間持続静脈内投与したとき、大腸菌、黄色ブドウ球菌及びリステリア菌に対する宿主抵抗性に様々な影響を示した。ラットにアナキンラを投与した結果、大腸菌の静脈内投与に対する宿主抵抗性が軽度に低下した（血液、脾臓及び肝臓で明らかなコロニー形成）。一方、リステリア菌では、脾臓のみが高用量でコロニー形成を示し、黄色ブドウ球菌では、血液、肝臓及び脾臓においてコロニーを形成しなかった。

膿瘍の進行と消失モデルにおいて、膿瘍誘発剤として黄色ブドウ球菌を用いて、アナキンラのラット膿瘍の大きさ、悪性度及び消失までの時間に及ぼす影響を検討した。アナキンラは 2、20 及び 200 mg/kg/日の用量で 7 日間、1 日 2 回皮下投与した。投与群及び対照群の腫脹面積に有意差は認められなかったが、20 及び 200 mg/kg/日のアナキンラによる腫瘍の悪性度は、多くの日で対照群よりも有意に上昇した。病理組織学的検査では、投与群と対照群の間で膿瘍の形態に差は認められなかった。アナキンラ投与による膿瘍の消失に有意な影響は認められなかった。

種々の免疫機能試験でアナキンラを添加又は投与しても、これらの試験に影響を及ぼさないか、わずかに阻害されるだけであった。いくつかの免疫機能試験では、阻害なし又はある程度阻害されるという矛盾する結果が報告された。まとめると、これらの試験結果は、免疫系の機能的側面に対するアナキンラの明確な又は強力な阻害作用を示していない。

アナキンラ投与の結果、少なくとも 2 週間の試験で検討した全ての用量群で抗体反応が認められた。ラット 6 ヵ月試験及びサル 1 ヵ月試験の抗体データを解析した結果、持続投与により抗体反応が維持されないことが示唆されている。抗体価は投与量増加に伴い低下し、投与約 1 ヵ月後には明らかに低下した。

アナキンラの 200 mg/kg/日までの用量で 6 ヵ月間投与した毒性試験の成績は、アナキンラの作用が臨床安全性プロファイルと一致しており、全身性毒性はほとんどないか全くないが、局所的な投与部位への影響が認められた。

2.6.6.11 参考文献

Bendele A, Colloton M, Vrkljan M, Morris J, Sabados K. Cutaneous mast cell degranulation in rats receiving injections of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist (rhIL-1Ra) and/or its vehicle: possible clinical implications. J Lab Clin Med. 1995;125(4):493-500.

Greaves. Urinary Tract. In: Esteviar ed. Histopathology of Pre-clinical Toxicology Studies. 1990:497-554.

Havell EA. Production of tumor necrosis factor during murine listeriosis. J Immunol. 1987;139(12):4225-4231.

Kim DC, Reitz B, Carmichael DF, Bloedow DC. Kidney as a major clearance organ for recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. J Pharm Sci 1995;84:575-580.

Morahan P, Klykken P, Smith S, Harris L, Munson A. Effects of cannabinoids on host resistance to Listeria monocytogens and herpes simplex virus. Infect Immun 1979;670-674.