

スピンラザ髄注 12 mg

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.....	4
1 まとめ.....	5
2 単回投与毒性試験.....	10
2.1 成熟カニクイザルを用いた髄腔内（IT）投与による単回投与毒性試験 （396443-AS01 試験）.....	10
2.2 CD-1 マウスにおける ISIS 396443 の単回皮下投与毒性.....	12
3 反復投与毒性試験（補足的トキシコキネティクスの評価を含む）.....	13
3.1 幼若 CD-1 マウスを用いた ISIS 396443 の 13 週間皮下投与毒性試験（396443-AS07 試験）.....	13
3.2 幼若カニクイザルを用いた ISIS 396443 の 14 週間複数回腰部 IT ボーラス投与毒 性試験：4 週間中間剖検及び 12 週間回復試験（396443-AS03 試験）.....	14
3.3 幼若カニクイザルを用いた ISIS 396443 の 1 年間（53 週間）反復投与毒性試験及 び 26 週間回復期間の試験（396443-AS06 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（396443-IS02 試験）.....	22
4.2 哺乳類培養細胞を用いた <i>in vitro</i> 染色体異常試験（396443-IS03 試験）.....	23
4.3 <i>In Vivo</i> マウス小核試験（396443-AS10 試験）.....	24
5 がん原性試験.....	25
6 生殖発生毒性試験.....	26
6.1 CD-1 マウスを用いた皮下投与による受胎能及び発生毒性の併合試験 （396443-AS08 試験）.....	26
6.2 胚・胎児発生毒性.....	28
6.2.1 ニュージーランド白色ウサギを用いた ISIS 396443 の用量設定毒性試験 （396443-AS09P 試験）.....	28
6.2.2 ニュージーランド白色ウサギを用いた ISIS 396443 の皮下投与による胚・胎 児発生毒性試験（396443-AS09 試験）.....	28
6.2.3 CD-1 マウスを用いた ISIS 396443 の皮下投与による出生前及び出生後発生 試験（396443-AS12 試験）.....	29
7 局所刺激性試験.....	32
8 その他の毒性試験.....	33
8.1 CD-1 マウスを用いた ISIS 396443 の 13 週間反復投与試験及び不純物適格性評価 試験（396443-AS13 試験）.....	33
8.2 各種組織固定法を用いたカニクイザル腰部 IT ボーラス投与後のオリゴヌクレオ チド関連海馬空胞化の評価（396443-AS11 試験）.....	34
8.3 免疫毒性試験.....	35
8.4 光毒性試験.....	36
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
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
BLQ	Below limit of quantitation	検出限界以下
CNS	Central nervous system	中枢神経系
CSF	Cerebrospinal fluid	脳脊髄液
GD	Gestation Days	妊娠日齢
HED	Human equivalent dose	ヒト等価用量
IT	Intrathecal	髄腔内
IV	Intravenous	静脈内
NOAEL	No observed adverse effect level	無毒性量
NOEL	Non observed effect level	無影響量
PCEs	Polychromatic erythrocytes	多染性赤血球
PK	Pharmacokinetics	薬物動態
PND	Postnatal day	出生後日数
SC	Subcutaneous	皮下
SD	Standard Deviation	標準偏差
SMA	Spinal muscular atrophy	脊髄性筋萎縮症
SMN	Survival motor neuron	—
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
WNL	Within normal limits	正常範囲内

1 まとめ

ISIS 396443、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) の毒性プログラムは、脊髄性筋萎縮症 (SMA) の小児患者の治療における本薬の髄腔内 (IT) 長期投与の裏付けを得るため計画した。毒性試験に使用した動物種は、CD-1 マウス、Sprague Dawley 系ラット、ニュージーランド白色ウサギ、及びカニクイザルであった。これら試験の大半は、患者における治療予定投与経路である IT 投与で行った。本薬の適応患者が小児であるため、マウス及びサルの反復投与毒性試験は幼若動物を用い実施した。

SMA は *SMN1* 遺伝子のホモ接合性の欠失又は変異に起因する SMN (survival motor neuron) タンパク質の欠如によって発症する。ヒトでは、*SMN1* が存在する染色体領域の重複が認められ、*SMN1* 遺伝子の2つ目のコピーである *SMN2* が存在する。*SMN2* 遺伝子ではエクソン7の C-T 置換により選択的スプライシングが生じ、その結果として *SMN2* mRNA 転写産物の大部分がエクソン7を欠失し、不完全な短鎖タンパク質が産生される。

SMA 患者に対する本薬の治療アプローチは、適切なスプライシングパターンに修正することにより、*SMN2* 遺伝子からの全長 SMN タンパク質産生を増加させることである。ISIS 396443 は *SMN2* 遺伝子のエクソン7のイントロン下流における特定の配列に結合するようにデザインされ、*SMN2* 転写産物におけるエクソン7含有率を増加させる。

一般的な毒性試験動物種 (マウス、ラット、イヌ、カニクイザル) は *SMN1* 遺伝子のみを有しており、薬理的活性を有する動物種を用いた ISIS 396443 の毒性評価は実施不可能である。しかしながら、スプライシングが修正された *SMN2* 転写産物は天然タンパク質であり、薬力学反応と関連する毒性の懸念はないと考えられる。したがって、毒性評価は ISIS 396443 の曝露に関連した非特異的な作用を重視した。

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2つある。第1は、静脈内 (IV) 又は皮下 (SC) 投与で実施した他のプログラムによると、ASO の組織分布、細胞取込み、代謝、クラス毒性の感受性 (例えば、炎症誘発作用) の観点から、サルはヒトに近い動物種として最も適切であること、第2は、神経解剖学的にみると、非ヒト霊長類は一般的な毒性試験動物種の中ではヒトに最も近いことである。さらに、サルでは薬物を臨床適用経路 (IT 投与) で反復投与が可能であり、IT 投与後の体内分布より、患者に対する IT 投与についての最も適切な安全性情報が得られる。

予定している患者集団 (新生児から青年の患者) を考慮して、14 週間及び 53 週間反復投与毒性試験は幼若カニクイザルを用い IT 投与により実施した (表 1)。また、最大の全身性の曝露を得られるよう、幼若 CD-1 マウスを用いた 13 週間の皮下投与試験も実施した (本試験は小児患者の治療を裏付けるため実施した)。

生殖毒性試験は、マウス (受胎能及び発生毒性、並びに出生前・出生後発生毒性) 及びウサギ (胚・胎児発生) に、最大の全身性曝露が得られる皮下投与を用いて実施した。

安全性薬理試験では呼吸系及び心血管系の作用についてラットを用い持続 IT 投与により評価した (M 2.6.2)。安全性薬理パラメータは、サルを用いた反復投与試験においても評価した (心

電図検査 [ECG] 及び中枢神経系 [CNS] への影響の評価)。ISIS 396443 の一連の遺伝毒性試験では、突然変異又は染色体異常を引き起こす可能性を、*in vitro* 試験、又は *in vivo* での小核試験により評価した (表 1)。

ISIS 396443 のがん原性については試験を実施しておらず、また、現在試験実施の計画もない。ISIS 396443 のヒトにおけるがん原性リスクは Weight-of-evidence (WOE) により評価した。がん原性評価の原則に基づく WOE 評価により、臨床適用経路である髄腔内投与を用いたがん原性試験の実施が技術的に可能ではないこと、標的に対する薬理作用 (SMN タンパク質の産生) 及び ASO の作用機序 (SMN2 遺伝子から転写される mRNA のスプライシングの修正)、並びに遺伝毒性、増殖反応、内分泌かく乱又は免疫抑制作用の可能性についての詳細なレビューを考慮した。

ISIS 396443 の薬理学的作用、及び SMN2 遺伝子による全長 SMN タンパク質の増加が SMA 患者に潜在的な発がん性を示す懸念はない。ヒトはすでに SMN1 遺伝子によって全長 SMN タンパク質を産生しており、少ない割合であるが SMN 2 転写産物もまた SMN2 遺伝子によって全長 SMN タンパク質を産生している。また、ヒトの SMN1 及び SMN2 遺伝子のコピー数には個人差があり、一部の健常人では、より高い SMN タンパク質が発現している。次に、ISIS 396443 は遺伝毒性試験で陰性であり、サル 53 週間反復投与毒性試験では前がん病変又は過形成を示す病理組織学的変化は認められていない。さらに、げっ歯類のがん原性試験において臨床投与経路 (反復 IT 投与) で試験を実施することは技術的に可能ではない。最後に、標準的なげっ歯類の非経口投与がん原性試験を実施しても、CNS 組織中での曝露量が低くなるため、ISIS 396443 のがん原性リスクを明確に示す追加情報は得られないと考えられる。

サルにおける IT 投与とヒトの IT 投与を比較した安全域は、より保守的なパラメータ (2 種の動物間での脳重量の差に対する CSF 量の差) に基づき評価した。成人での CSF 量はサルの約 10 倍大きい。サル投与量の 10 倍量が成人等価用量 (HED) である。したがって、サルでの 4 mg IT 投与は成人では 40 mg、新生児では 32 mg (0~3 ヶ月齢の新生児に関してサル投与量の 8 倍量) が等価である。

反復投与毒性試験 (001*) で使用した ASO 原薬 (DS) ロットは、初期臨床試験においても使用した。被験物質は薬物投与に必要な正確な濃度又は高濃度 (100 mg/mL) で供給され、動物試験施設で投与に適切な濃度に希釈された。したがって、毒性試験で使用した ASO ロットは臨床試験で使用したロットであり、市販予定原薬である。

毒性プログラムの結果に基づき、動物試験の結果から ISIS 396443 の安全性プロファイルは適切であると認められた。非臨床試験の安全性プログラムの結果は、臨床での安全性プロファイルの裏付けとなり、また、ISIS 396443 の製造承認を支持している。

表 1 ISIS 396443 の毒性試験

試験番号、タイトル	動物種	投与量、頻度	GLP 適用
単回投与毒性試験			
カニクイザルを用いた ISIS 396443 の単回スローボラス腰部髄腔内投与毒性及び薬物動態試験 評価資料 [4.2.3.1-1] 396443-AS01	カニクイザル	腰部髄腔内注入、単回投与 0、1、3、7 mg/動物	適
反復投与毒性試験			
幼若 CD-1 マウスを用いた ISIS 396443 の 13 週間皮下投与毒性試験 評価資料 [4.2.3.2-3] 396443-AS07	CD-1 マウス	皮下投与、 0、1、10、50 mg/kg/ 週、13 週間	適
幼若カニクイザルを用いた ISIS 396443 の 14 週間複数回腰部髄腔内投与毒性試験；4 週間中間剖検及び 12 週間回復試験を含む 評価資料 [4.2.3.2-1] 396443-AS03	カニクイザル	腰部髄腔内注入 0、0.3 及び 1 mg 週 1 回、5 回投与した 後、隔週投与を 5 回 3 mg 週 1 回投与、15 回	適
ISIS 396443 : 幼若カニクイザルを用いた 1 年 (53 週間) 反復投与毒性試験；26 週間回復期間を含む 評価資料 [4.2.3.2-2] 396443-AS06	カニクイザル	腰部髄腔内注入 0、0.3、1、及び 4 mg、 週 1 回、5 回投与した 後、6 週間毎投与 (計 13 回)	適

表 1 ISIS 396443 の毒性試験（続き）

試験番号、タイトル	動物種	投与量、頻度	GLP 適用
生殖毒性試験			
CD-1 マウスを用いた ISIS 396443 の皮下投与による受胎能及び発生毒性の併合試験 評価資料 [4.2.3.5.1-1] 396443-AS08	CD-1 マウス	皮下投与、 0、3、10、25 mg/kg 隔日投与、 (10.5、35、87.5 mg/kg/ 週)	適
妊娠ニュージーランド白色ウサギを用いた ISIS 396443 の用量設定毒性試験 参考資料 [4.2.3.5.2-1] 396443-AS09P	ウサギ	皮下投与、 0、5、15、30 mg/kg 隔日投与、 (17.5、52.5、105 mg/kg/週)	非適用
ニュージーランド白色ウサギを用いた ISIS 396443 の皮下投与による胚・胎児発生毒性試験 評価資料 [4.2.3.5.2-2] 396443-AS09	ウサギ	皮下投与、 0、6、12、25 mg/kg 隔日投与、 (21、44、87.5 mg/kg/ 週)	適
CD-1 マウスを用いた ISIS 396443 の皮下投与による出生前及び出生後発生試験 評価資料 [4.2.3.5.3-1] 396443-AS12	CD-1 マウス	皮下投与、 0、5、20、60 mg/kg/ 週、 妊娠期間：隔日投与 授乳期間：週 1 回	適
遺伝毒性試験			
細菌を用いた復帰突然変異試験 評価資料 [4.2.3.3.1-1] 396443-IS02	<i>in vitro</i>	最大 5000 µg/プレート	適
哺乳類培養細胞を用いた <i>in vitro</i> 染色体異常試験 評価資料 [4.2.3.3.1-2] 396443-IS03	<i>in vitro</i>	最大 5000 µg/mL	適
<i>In vivo</i> マウス小核試験 評価資料 [4.2.3.3.2-1] 396443-AS10	CD-1 マウス	単回皮下投与 最大 750 mg/kg	適

表 1 ISIS 396443 の毒性試験（続き）

試験番号、タイトル	動物種	投与量、頻度	GLP 適用
その他の毒性試験			
CD-1 マウスを用いた ISIS 396443 の 13 週間反復投与毒性試験及び不純物適格性評価試験 評価資料 [4.2.3.7.6-1] 396443-AS13	CD-1 マウス	皮下投与 0、5、25 mg/kg 週 1 回 13 週間投与	適
各種組織固定法を用いたカニクイザル腰部髄腔内ボラス投与後のオリゴヌクレオチド関連海馬変性の評価 参考資料 [4.2.3.7.7-1] 396443-AS11	カニクイザル	腰部髄腔内 5 mg/body 週 1 回 6 週間投与	非適用

2 単回投与毒性試験

単回投与毒性試験は成熟カニクイザルを用いた髄腔内投与により実施した(396443-AS01 試験)。げっ歯類を用いた単回投与性試験は実施していないが、ISIS396443 のげっ歯類における急性毒性は幼若 CD-1 マウスを用いた 13 週間皮下投与毒性試験(396443-AS07 試験)における初回投与後 7 日間の観察結果で評価した。

2.1 成熟カニクイザルを用いた髄腔内 (IT) 投与による単回投与毒性試験 (396443-AS01 試験)。

評価資料 [4.2.3.1-1] 396443-AS01

本試験は成熟カニクイザルに ISIS 396443 を腰部 IT 内に単回ボラス投与した後の局所及び全身性の毒性を評価する目的で行った。投与量は 1、3 及び 7 mg/回とし、本薬を 3 mg 投与したときの CNS 組織取込み及び全身性の薬物動態 (PK) を詳細に評価した (表 2)。主試験群は 7 日後 (試験 8 日) に剖検し、トキシコキネティクス (TK) 解析用動物は試験 3、21、57 及び 71 日に剖検した。

本試験デザインには詳細な身体検査及び神経学的検査を含めた。身体検査では心拍数、呼吸数、体温、歩行、性質、及び全身状態を含めた。神経学的検査では一般感覚機能、運動機能、脳反射、及び脊髄反射を評価した。

表 2 カニクイザルを用いた腰部髄腔内 (IT) にボラス投与した場合の単回投与毒性試験及び薬物動態 (PK) 試験の試験デザイン

投与段階 (mg/回)	動物数	Day 8 における剖検 ^a	TK 試験の剖検
0 (溶媒)	2M / 2F	2M / 2F	なし
1	3M / 3F	3M / 3F	なし
3	8M / 8F	3M / 3F	5M / 5F ^b
7	3M / 3F	3M / 3F	なし

^a 薬物投与は試験 1 日に実施 (腰部髄腔内に留置したカテーテルから 1 mL を約 3 分かけて投与した)

^b 薬物投与 2、20、56、及び 70 日後に TK 解析用動物を剖検した

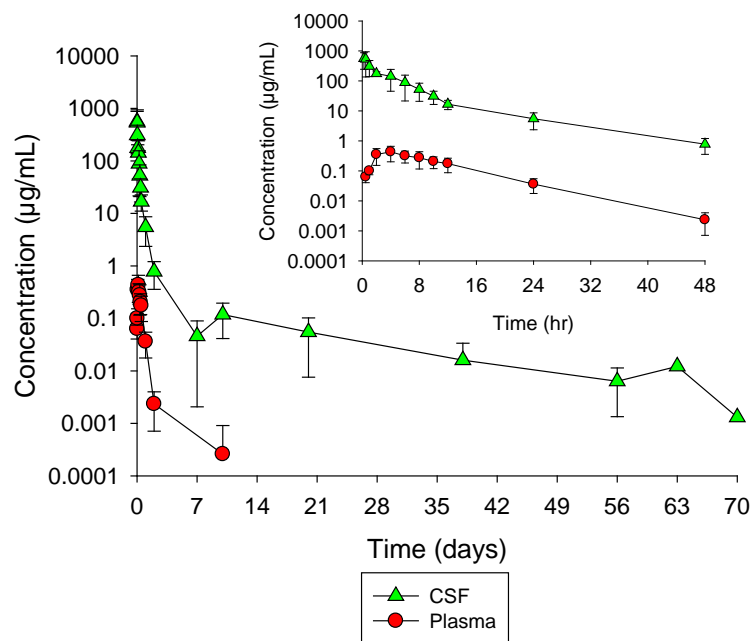
Data source: M4.2.3.1-1_Table in text (p.14)

ISIS 396443 の単回 IT 投与において良好な忍容性が認められたが、7 mg 群では 6 例中 1 例 (高用量投与群、雄 1 例) に急性で一過性の変化が認められた。具体的には、これらの変化は、薬物投与 2 時間後の右体側での皮膚反射及び尾の反射の低下であった。投与 4 時間後、右後肢に固有受容器反射の反応低下が認められた。しかし、これらの神経学的症状は投与 6 時間後までに完全に回復した。7 mg 群のほかの動物又は低用量の 2 群の動物には、薬物投与と関連した一般状態及び神経学的症状は観察されなかった。

血漿中、CSF (以上[M2.6.4.3.1])、CNS 組織、及び肝臓 (以上[M2.6.4.4.1.1]) における ISIS 396443 曝露は用量依存的であった。IT 投与後、オリゴヌクレオチドは CSF から脳・脊髄内に分布し、正常な CSF ターンオーバーを介して全身循環へ移行した。ISIS 396443 の血漿中曝露量は CSF 中曝露量に比べて相対的に低値であった (図 1)。個々の TK 解析用動物では全般的に IT 投与後 15 分

に CSF 中濃度のピークを認め、血漿中の C_{max} は IT 投与後 2~5 時間に認められた (図 1)。被験物質について求められた CSF クリアランス値は最初の 24 時間 (1.9 mL/hr ; 3 mg IT 投与) では、既知の CSF ターンオーバー速度 (1.8~2.4 mL/hr、Artru 1999) と同様であり、このことは、相対的に CSF の薬物クリアランスの大部分が CSF のターンオーバーによるものであることを示唆している。

図 1 カニクイザルを用いた単回 3 mg IT ポーラス投与後の CSF 及び血漿中 ISIS 396443 濃度 (平均 ± SD)



Data source: M4.2.3.1-1_Appendix F_Figure 1

CNS 組織への分布は脊髄及び脳を含め広範囲であった。CSF 中濃度の最も高い部位は脊髄腰部であり、これは IT 投与の投与部位であった (表 3)。3 mg 投与時の組織からのクリアランスは緩徐であり、推定消失半減期は CNS 組織で 31~54 日、肝臓で約 12 日であった (396443-AS01)。

表 3 カニクイザルにおける CNS 組織及び肝臓中 ISIS 396443 濃度

組織	ISIS 396443 の平均濃度 (µg/g) 及び (SD) ^a		
	1 mg	3 mg	7 mg
脊髄腰部	8.33 (4.89)	19.2 (7.55)	19.6 (14.3)
脊髄胸部	6.07 (4.26)	10.3 (5.04)	18.4 (19)
脊髄頸部	2.72 (0.68)	5.6 (2.91)	10.7 (5.43)
小脳	1.43 (1.31)	5.07 (3.14)	8.75 (10.7)
大脳皮質	2.42 (1.37)	6.98 (3.63)	12.8 (12.4)
脳橋	1.46 (1.08)	3.51 (1.66)	4.92 (3.22)
肝臓	1.89 (0.40)	9.95 (8.48)	36.0 (25.9)

^a 試験 8 日に剖検した動物から得られた数値

Data source: M4.2.3.1-1_Appendix F_Table 5

ISIS 396443 に起因する毒性所見は認められなかった。死亡例はなく、体重への影響、ECG 変化、CSF の生化学的検査又は臨床病理検査（血液生化学的検査、血液学的検査、凝固検査、尿検査）への影響、補体活性化への影響、全身性炎症は認められなかった。これらの動物の臓器重量への影響又は病理組織学的変化は認められなかった。重要なことは、被験物質投与動物の脳又は脊髄に退行性変化は観察されず、神経細胞の喪失も認められなかった。

要約すると、ISIS 396443 の単回投与は良好な忍容性を示したが、最高用量の 7 mg 群では 6 例中 1 例に脊髄下部反射における一過性の影響を認めた。IT 投与は、脊髄及び脳の様々な部位に被験物質を分布させるために適切な投与経路であることが示された。組織内消失半減期は、IT 投与による反復投与試験を計画するための情報として利用した。

2.2 CD-1 マウスにおける ISIS 396443 の単回皮下投与毒性

ISIS396443 のげっ歯類における急性毒性は幼若 CD-1 マウスを用いた 13 週間皮下投与毒性試験 (試験番号 396443-AS07)における初回投与後の 7 日間の観察結果から評価した。ISIS396443、0、1、10、50 mg/kg を CD-1 マウスに皮下投与後、生死、一般状態、体重及び摂餌量を 2 回目投与までの 7 日間の観察結果から、死亡及び切迫屠殺例は認められず、何ら異常所見は認められなかった。

3 反復投与毒性試験（補足的トキシコキネティクスの評価を含む）

主要な反復投与毒性試験は、単一の動物種としてカニクイザルを用い IT 投与により行った。若齢患者に対する全身曝露時の安全性データを補足するため、CD-1 マウスを用いた毒性試験を行った。2 項に記載したとおり、CSF への IT 投与は CSF のターンオーバーを介して全身性曝露を生じるが、血漿中薬物濃度は CSF 中での測定濃度に比べて明らかに低い。マウスでは反復 IT 投与が技術的に可能ではないため、被験物質の全身性曝露を最大にする目的で皮下 (SC) 投与による 13 週間の試験を行った。

3.1 幼若 CD-1 マウスを用いた ISIS 396443 の 13 週間皮下投与毒性試験 (396443-AS07 試験)

評価資料 [4.2.3.2-3] 396443-AS07

小児患者に ISIS 396443 を投与するための全身性曝露の安全域と関連する安全性データを得るため、幼若 CD-1 マウスを用いた SC 投与による 13 週間毒性試験を行った。本薬の SC は出生後 4 日 (PND 4) から開始し、4 週間 (PND 4~25) は週 1 回投与、それ以降は隔週投与とし、最終投与日は PND 95 であった。投与量は溶媒、1、10、及び 50 mg/kg/回とした (表 4)。

表 4 幼若 CD-1 マウスにおける 13 週間皮下投与の試験デザイン

投与量 (mg/kg)	動物数	週 1 回の皮下投与	隔週の皮下投与 ^a
0 (溶媒)	10M / 10F	PND 4、11、18、25	PND 39、53、67、81、95
1	10M / 10F		
10	10M / 10F		
50	10M / 10F		

^a PND 97 に剖検した (最終投与の 2 日後)

Data source: M4.2.3.2-3_Table in text (pp.22-23)

毒性学的評価として、生存期間中の観察 (体重、摂餌量、一般状態、眼科学的検査)、臨床病理検査 (血液学的検査及び血液生化学検査)、及び剖検時評価 (肉眼的観察、器官重量、病理組織学的検査) を行った。ISIS 396443 の組織内濃度測定用に、6 例/性/群の動物から肝臓を採取した。

10 及び 50 mg/kg 群 (1 mg/kg 群の曝露量は検出限界以下) の動物から採取した肝臓では、ISIS 396443 の曝露量に用量依存的増加が認められた (表 5)。

表 5 剖検時 (PND 97 日) のマウス肝臓中 ISIS 396443 濃度

性別	肝臓における平均濃度 ^a		
	1 mg/kg	10 mg/kg	50 mg/kg
雌	BLQ ^b	44.0 (10.4)	220 (13.1)
雄	BLQ	45.2 (4.85)	214 (35.8)

^a 平均値及び (SD) を示す

^b 検出限界以下 (10 µg/g)

Data source: M4.2.3.2-3_Text Table 1 and Appendix I_Table A

ISIS 396443 はすべての投与量で良好な忍容性が認められた。瀕死あるいは死亡例、一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査 (剖検の 5 又は 6 日前に検査)、血液学的検査、血液生化学的検査、

又は剖検時の肉眼的観察について、いずれも被験物質の影響は認められなかった。1 mg/kg/回では雌マウス 1 例が PND 84 に死亡したが、死因は悪性リンパ腫であった。低用量群動物にこの早期死亡例が認められたが、本試験のほかの動物にはリンパ球増殖性の変化又は多臓器性のリンパ組織球性浸潤を示す所見は認められなかったため、この早期死亡例は、偶発的な所見であり、被験物質と関連しないと考えられた。

幼若マウスの発達又は性成熟に対する明確な影響は認められなかった。被験物質に関連した病理組織学的所見が 50 mg/kg 群の雄の肝臓（クッパー細胞肥大）及び雌雄のリンパ節（マクロファージ空胞化）に認められ、これらの所見は、これら 2 つの臓器での器官重量の増加と関連した。10 mg/kg 群の雄及び 50 mg/kg 群の雌雄では脾臓重量の増加が認められ、これらの所見はマウスにおける ASO の SC 投与による既知の炎症誘発作用と一致する。10 及び 50 mg/kg 群の腎臓では、小さな円形的好塩基性顆粒が皮質近位尿細管上皮の細胞内又は管腔内に認められた。これらの顆粒はヘマトキシリンに染色されたヌクレチドであることが知られている（Henry 2008）。これらの病理組織学的所見はこの種の薬剤クラスで予測される所見であり、壊死、変性又は炎症性変化を伴わなかったため、これらの所見は有害ではないと考えられた。このように、幼若動物で観察された影響は成熟動物で報告された影響と同様であった。これらの結果に基づき、NOAEL は負荷及び維持用量である 50 mg/kg と考えられた。

3.2 幼若カニクイザルを用いた ISIS 396443 の 14 週間複数回腰部 IT ボーラス投与毒性試験：4 週間中間剖検及び 12 週間回復試験（396443-AS03 試験）

評価資料 [4.2.3.2-1] 396443-AS03

本試験の目的は、幼若カニクイザルに ISIS 396443 を腰部 IT ボーラス投与した場合の局所及び全身性の毒性を評価することであった。初回投与時のカニクイザルの月齢は 9～10 ヶ月齢、体重は 1.0～1.6 kg であった。投与量は 0.3、1 及び 3 mg/回であり、投与には留置したカテーテルを介したスローボーラス投与を用いた（表 6）。最低用量である 0.3 mg 群の脊髄中薬物濃度は、マウスモデル（SMN2 トランスジェニックマウス）を用いた薬理試験で観察された薬理活性濃度と類似すると予測された。最高用量（3 mg）は、成熟サルを用いた単回投与毒性/PK 試験（2 項参照）の 7 mg 投与で認めた急性で一過性の症状により、制限された。毒性発現の可能性のある曝露量に達するよう、臨床予定用法より頻回に投与した。0.3 mg 及び 1 mg 投与動物には、週 1 回を 5 回の負荷用量を投与し、その後 IT 投与を隔週で 5 回以上行った。最高用量である 3 mg/回群動物には、週 1 回を 15 週間で 45 mg の総投与量を IT 投与した。

表 6 カニクイザルを用いた 14 週間 IT 投与試験の試験デザイン

投与量 (mg/回) ^a	累積投与量 (mg/動物)	動物数	動物の剖検		
			中間 (試験 36 日) ^b	投与終了時 (試験 106 日)	回復期 (試験 183 日)
0 (溶媒)	0 ^c	8M / 9F	3M / 3F	3M / 4F	2M / 2F
0.3	3 ^c	6M / 7F	3M / 3F	3M / 4F	なし
1	10 ^c	6M / 7F	3M / 3F	3M / 4F	なし
3	45 ^d	8M / 9F	3M / 3F	3M / 4F	2M / 2F

^a 試験第 1 日に 0.75 mL の IT 投与液量を約 3 分間かけて投与した

^b 第 5 回目の投与、試験 29 日の 1 週間後に剖検した

^c 週 1 回投与を 5 回 (試験 1、8、15、22、29 日) 及び隔週投与 5 回 (試験 43、57、71、85、99 日) 投与した

^d 週 1 回投与を 15 回 (試験 1、8、15、22、29、36、43、50、57、64、71、78、85、92 及び 99 日) 投与した

Data source: M4.2.3.2-1_Table in text (p.25)

毒性学的評価には、生存期間中の観察 (体重、摂餌量、一般状態、眼科学的検査及び心電図検査)、臨床病理学的検査及び剖検時の評価 (肉眼的観察、臓器重量、病理組織学的検査) を含めた。また、本試験デザインには詳細な身体及び神経学的検査を含めた。身体検査には心拍数、呼吸数、体温、歩行、性質、一般状態を含めた。神経学的検査には、一般感覚 (意識レベル、追跡) 及び運動機能、脳反射 (瞳孔反射、眼輪筋反射、角膜反射)、及び脊髄反射 (膝蓋腱反射、皮膚反射、固有受容器反射、足の感覚反射・尾の反射) の評価を含めた。

CSF (腰部及び大槽)、血漿、CNS 組織、及び肝臓中の ISIS 396443 曝露量を確認した (M 2.6.4)。CSF 中薬物濃度は、2 回の IT 投与 (4 週又は 14 週の投与) の 7 日後に測定した。CSF 中濃度測定は投与後 7 日目に実施したため、CSF 中濃度は予想されたピーク値以下に十分低下しており、単回 IT 投与試験における試験 7 日での CSF 値と同様であった (図 1)。

血漿中濃度は 1 回目、5 回目及び最終投与後 (0.3 及び 1 mg 群では 10 回目の投与、3 mg 群では 15 回目) に測定した。単回投与毒性試験/PK 試験でみられたように、血漿中 T_{max} は IT ボーラス投与後、約 2~5 時間後であった。血漿中濃度は全測定時点で CSF 中濃度に比べて低値を示した。血漿曝露量 (C_{max} 及び AUC₀₋₂₄) は投与量に対しほぼ線形を示し、投与量に依存して増加した。

脊髄及び脳組織中薬物濃度は 4 又は 14 週間の複数回投与により増加した。14 週時及び回復期間の測定値を表 7 に示す。CNS 組織中薬物濃度は回復期間終了後も高濃度のままであった。組織における ISIS 396443 の長い半減期を反映して蓄積と低クリアランスが認められた。

表 7 カニクイザルへの反復 IT ポーラス投与後の CNS 組織及び肝臓中 ISIS 396443 濃度

組織	剖検日	平均濃度 (µg/g) 及び(SD)		
		0.3 mg	1 mg	3 mg
脊髄腰部	106	31.9 (15.5)	78.6 (53.3)	169 (54.2)
	183	na ^a	na	242 (246)
脊髄胸部	106	20.2 (4.6)	38.4 (7.1)	101 (46.5)
	183	na	na	107 (35.2)
頸椎脊髄頸部	106	10.6 (6.2)	26.8 (6.4)	82.8 (27.8)
	183	na	na	69.1 (4.9)
小脳	106	15 (10.2)	23.7 (20.1)	51.2 (15.9)
	183	na	na	65.3 (21.5)
大脳皮質	106	15.2 (3.9)	35.4 (13.7)	166 (45.8)
	183	na	na	122 (26.3)
脳橋	106	7 (2.4)	13 (3.7)	45.9 (18.4)
	183	na	na	32.4 (18.5)
肝臓	106	1.9 (0.38)	42.5 (40.9)	115 (65.1)
	183	na	na	8.52 (6.2)

^ana, 該当なし (回復試験動物なし)

Data source: M4.2.3.2-1_Table in text (p.59)

ISIS 396443 を 10 回 (0.3、及び 1 mg) 又は 15 回 (3 mg) の IT 投与したところ、良好な忍容性が認められたが、最高用量の 3 mg 群の数例の動物には投与後 4 時間に脊髄下部反射に対する一過性の影響が認められた。具体的には、これらの変化は、皮膚 (左右両側) 反射、足の感覚反射 (左右)、尾の反射の消失などであった。高用量群のサルにおけるこれら所見の発現頻度は 2/17 例 (試験 1 日)、6/17 例 (試験 29 日)、2/11 例 (試験 99 日) であった (試験 36 日に 6 例の動物を計画中間剖検に供した)。これらの変化は 3 mg での投与期間を通じて類似していたため、蓄積性はなく、総脊髄組織中濃度とは無関係と考えられた。試験期間を通じて、脳反射、一般感覚、又は運動機能のパラメータについては、すべての用量群において影響を認めなかった。

瀕死又は死亡例はなく、体重、摂餌量、又は身体検査についても薬物投与と関連した影響は認められなかった。血液学的検査、血液生化学的検査、CSF 中の総細胞数、CSF の生化学的パラメータ、補体の活性化 (CSF 又は血漿中) には、薬物投与に関連した変化は認められなかった。肉眼的観察又は臓器重量に被験物質に起因する変化は認められなかった。病理組織学的検査を行った末梢 (CNS 以外) の器官又は組織に影響は認められなかった。

週 1 回の IT 投与を 15 回した後、最も一貫して認められた薬物投与と関連した顕微鏡変化は、海馬下部での限局性の空胞の出現であった。当該所見は 5 回の投与後 7 日目 (試験 36 日の剖検時) には観察されなかったが、試験 106 日に剖検した動物に認められた (表 8)。5 段階の分類 (表 8 の脚注を参照) を用いた、海馬の空胞の程度は極微から軽微の範囲であった。

表 8 14 週間試験におけるカニクイザルの海馬に観察された病理組織学的変化

剖検時点	投与レジメン (IT ボーラス投与)	投与量 (mg/回)	累積 投与量	海馬での病理組織学的変化 ^a	
				空胞化 ^b	細胞壊死
試験 36 日	週 1 回投与 5 回	0.3	1.5 mg	なし	なし
		1	5 mg	なし	なし
		3	15 mg	なし	なし
試験 106 日	週 1 回投与 5 回	0.3	3 mg	なし	なし
	隔週投与 5 回	1	10 mg	7 例中 1 例 (極微)	なし
	隔週投与 15 回	3	45 mg	7 例中 7 例; (極 微~軽微)	ニューロン壊死 (1 個); 7 例中 1 例 グリア細胞壊死; 7 例中 1 例

^a 本表中に回復試験用の動物は含まれていない

^b () 内は病理組織学的所見の程度 (slight=極微、minimal=軽微、mild=軽度、moderate=中等度、severe=重度) を示す (定義は M4.2.3.2-1_Appendix J_Appendix 3 [p.1157] に示されている)

Data source: M4.2.3.2-1_Appendix J_Pathology Report

海馬ニューロンに出現した空胞は、比較的高頻度の IT 投与後に、細胞のエンドソーム又はリソソームに取り込まれた ISIS 396443 に起因している。試験 106 日の空胞の出現は試験 36 日に比べて組織内薬物濃度が高かったことを反映している。これらの細胞における空胞の出現は SC 投与後に全身組織 (腎臓等) に空胞の出現がみられることと一致している (Henry 2012)。エンドソーム又はリソソームへの ASO の細胞取込みと濃縮自体は、有害な毒性変化を表すものとは考えられない。この仮説は探究試験によって裏付けられた (8.2 項)。

高用量群の動物の 7 例中 1 例に 1 個のニューロン壊死が、また、高用量群のほかの動物 1 例には数個のグリア細胞壊死が認められたが、これらの変化の程度は、機能又は一般状態と関連しなかった。

回復試験の剖検 (12 週間後) では、高用量群の 4 例の動物 (3 mg/回) に依然として海馬の空胞が認められ、これは CNS 組織からのオリゴヌクレオチドの緩徐なクリアランスと一致した。ニューロン壊死は高用量の回復試験動物には観察されなかったが、グリア細胞壊死が 1 例の動物に認められた。海馬における空胞の出現と、ニューロン又はグリア細胞壊死の低頻度の出現との関連は明らかでない。

詳細な神経学的及び身体検査により観察した結果、海馬ニューロンにおける空胞と関連した動物行動に対する明らかな影響はなかった。これは病理学者の解釈と一致しており、海馬に局限した空胞が症状を誘発するとは考えられない (Dorato and Engelhart 2005)。中間用量 (1 mg/回、累積投与量 10 mg) では海馬の空胞は 7 例中 1 例のみに極微の程度で認められ、ニューロン壊死やグリア細胞壊死は認められなかった。高用量 (3 mg/回、累積投与量 45 mg) で細胞壊死が出現することに基づき、NOAEL はこの投与レジメンでは 1 mg/回 (中間用量、14 週で累積投与量は 10 mg) と判断された。

3.3 幼若カニクイザルを用いた ISIS 396443 の 1 年間（53 週間）反復投与毒性試験及び 26 週間回復期間の試験（396443-AS06 試験）

評価資料 [4.2.3.2-2] 396443-AS06

本試験は幼若カニクイザルを用いて ISIS 396443 を 53 週間腰部 IT 反復投与した後の本薬の局所及び全身性の毒性を評価する目的で実施した。本試験には 48 例のサルを使用した（表 9）。投与開始時の動物は約 9～11 ヶ月齢、体重は 1.0～2.0 kg（雌雄）であった。

14 週間試験における CNS 組織からの ISIS 396443 の緩徐な消失に基づき、53 週間試験では回復試験の期間を 12 週間から 26 週間に延長した。投与量は 0.3、1.0、及び 4.0 mg/回とした（表 9）。最低投与量 0.3 mg では、脊髄中薬物濃度はマウスモデルでの薬理活性濃度（2～10 µg/g）と類似すると予想された。最高投与量 4.0 mg は、14 週間試験で使用した最高投与量（3.0 mg）よりわずかに増量した。6 週間ごとの維持投与頻度に基づき、4 mg 投与量による脊髄及び脳組織中濃度は、14 週間試験で観察された海馬下部での空胞と関連した薬物濃度範囲に達すると予想された。

試験デザインには、臨床試験をサポートするため 2 種類の安全域の評価、すなわち、高用量（CSF 容積で補正した mg/回単位の用量）及び累積投与量に基づく評価を含めた。本試験では用法・用量を臨床用法・用量に類似させて、負荷投与期（週 1 回、5 回投与）とその後の維持投与期（6 週間ごとに 8 回投与）から構成し、これにより、より早期に定常状態の組織濃度を確立し、その後、その曝露レベルを維持するよう計画した。動物の場合には負荷投与期及び維持投与期とも臨床用法・用量（負荷投与期での投与は Day 1、15、85、及び維持投与期での投与はほぼ 18 週間ごと）より高頻度で投与した。毒性試験の投与頻度を臨床試験より多くした理由は、サルでの最高用量は、急性の脊髄下部反射の低下で制限されるためであった。

毒性評価項目は、生存期間中の観察（一般状態、体重、推定摂餌量、身体検査）、眼科学的検査、臨床病理学的検査（血液学的検査、血液生化学的検査、凝固検査、尿検査、CSF 中の細胞数及び生化学検査、CSF 中の補体検査）、心血管系の検査、骨格系の成熟度（骨密度の評価、骨塩量、X 線による大腿骨長）、T 細胞依存性抗体反応（TDAR）であった。CNS の評価は特に注意し、神経学的検査（一般感覚運動、脳反射、脊髄反射、膝蓋腱反射、足の把握反射）、及び学習能力の試験を含めた。剖検時の評価として肉眼的観察、臓器重量測定、病理組織学的検査を行った。

表 9 カニクイザルを用いた 53 週間 IT 投与試験の試験デザイン

投与量 (mg) ^a	累積投与量 ^b	動物数	剖検スケジュール ^c	
			主試験（試験 372 日）	回復試験（試験 554 日）
0（溶媒）	0	7M / 7F	5M / 5F	2M / 2F
0.3	3.9	5M / 5F	5M / 5F	なし
1.0	13	5M / 5F	5M / 5F	なし
4.0	52	7M / 7F	5M / 5F	2M / 2F

^a IT 投与の投与液量は 0.75 mL とした

^b 動物への投与は週 1 回投与を 5 回（試験 1、8、15、及び 29 日）、その後 6 週間ごとの投与（試験 71、113、155、197、239、281、323 及び 365 日）とした

^c 末期剖検は最終 IT 投与の 1 週間後に行った

Data source: M4.2.3.2-2_Table in text (p.16)

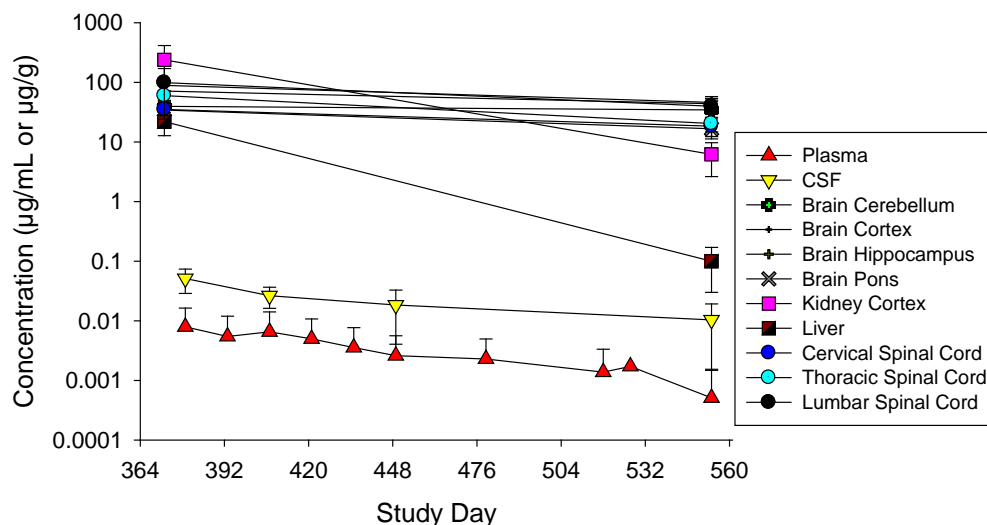
CSF（腰部）、血漿、及び CNS 組織について、ISIS 396443 の曝露を確認した（M 2.6.4）。投与期間中、投与前に CSF 中の ISIS 396443 のトラフ値を測定した。最初の 4 回の週 1 回負荷投与の 7 日後、及び各維持投与（6 週間ごとの投与）の 42 日後に濃度を測定した。6 ヶ月間の回復期間中にも、腰椎穿刺により CSF 中濃度を 4 回測定した。

CSF 中薬物濃度は投与後 7 日又は 42 日に測定したため、CSF 中濃度は予想されるピーク値を十分に下回っていた。負荷投与中に測定された CSF 中濃度推移は、CSF における多相性の分布パターンの終末（図 1 参照）を表している可能性が最も高かった。いずれの投与群でも、投与後 42 日に測定した CSF 中濃度は投与後 7 日の測定値より低かった。投与された ASO は分布相を完了していると考えられることから、このような CSF 中濃度の推移は、CSF 中に残存する ASO が CNS 組織との間で平衡状態に達している可能性が最も高いことを表している。投与終了後（試験 372 日）、CSF 中平均終末相半減期（111 日）は CNS 組織中の平均半減期（117～195 日）と同等であり、このことは投与後の CSF 中濃度と CNS 組織中濃度とが平衡状態に到達していることを示唆している。

初回及び最終 IT 投与後に血漿中濃度を測定した。血漿中の平均 T_{max} は、先行試験でもみられたように IT 投与の 1～2 時間後であった。投与後 7 日目の時点で、血漿中濃度は CSF 中濃度より低値であり、このこともまた先行試験の結果と一致していた。初回及び最終 IT 投与後の血漿中曝露量は、投与量に対してほぼ線形であった。

回復期間中、ISIS 396443 は CNS 組織、CSF、及び血漿中からそれぞれ、約 174、111、及び 56 日の半減期で消失した（図 2）。回復期間中の全測定時点で、CNS 組織中濃度（試験 364 日、約 40～100 $\mu\text{g/g}$ ）は CSF 中濃度（ $\leq 0.1 \mu\text{g/mL}$ ）に比べて大幅に高値を示し、また血漿中濃度（ $\leq 0.01 \mu\text{g/mL}$ ）よりも高かった。全身組織（肝臓及び腎臓）における消失半減期は CNS 組織に比べてより急速であった。

図 2 サルに ISIS 396443 を反復 IT 投与した後の回復期間中における平均 CSF、血漿、及び組織中 ISIS 396443 濃度（試験 364～554 日）



Data source: M4.2.3.2-2_Nonclinical PK Report 396443-AS06PK_Figure 13

幼若カニクイザルに ISIS 396443 を 53 週間 IT 投与したところ、忍容性は良好であった。死亡例はみとめられず、体重、摂餌量、又は一般状態に影響は認められなかった。身体検査、臨床病理学的評価、眼科学的検査、心血管系の評価、骨格系の成熟度、免疫系パラメータ (TDAR) について、対照群及び投薬群の動物ともにこれらの検査項目は同年齢の動物の正常範囲内の値であった。剖検時の肉眼的観察、臓器重量の変化又は全身組織における病理組織学的変化について ISIS 396443 に起因する影響は認められなかった。免疫原性評価では、中用量群の 1 例及び高用量群の 2 例で低い血漿中の抗 ISIS 396443 抗体価 (最大抗体価が 8 倍) が検出されたが、CSF 中、投与部位又は薬理作用標的部位である CNS 組織中の ISIS 396443 濃度に影響は認められなかった。

脊髄下部の反射 (膝蓋腱、把握、及び肛門) において一過性の障害が高用量群 (4 mg 群) の動物にのみ認められた。最も顕著な所見は初回 IT 投与 (試験 1 日) の後に観察され、4 mg 群の雌 7 例中 4 例、雄 7 例中 1 例に反射の減弱又は消失が認められた。これら所見はほとんどの場合投与後 48 時間以内に回復した。

神経行動学的又は学習パラメータに被験物質の影響は認められなかった。

病理組織学的変化は、脳、特に海馬下部に、14 週間の試験で観察された所見と同様の所見が認められた。被験物質に起因するニューロンの空胞化は 1 mg 投与群の雄 2 例に、4 mg 群の雄 3 例及び雌 2 例に認められた (表 10)。細胞残屑を伴うまれな細胞壊死が雄にのみ認められた (1 mg 群の雄 1 例、4 mg 群の雄 3 例)。Fluoro-Jade B 染色で陰性だったことから、壊死した細胞はニューロンではないと判断した。

表 10 53 週間 IT 投与後のカニクイザルの海馬における病理組織学的所見の発現頻度—主試験剖検—

海馬下部 顕微鏡所見 ^a	投与量 ^b			
	溶媒	0.3 mg/回	1 mg/回	4 mg/回
WNL ^c	雄：5 例中 5 例 雌：5 例中 5 例	雄：5 例中 5 例 雌：5 例中 5 例	雄：5 例中 3 例 雌：5 例中 5 例	雄：5 例中 2 例 雌：5 例中 3 例
ニューロンの空胞化	0	0	雄 2 例 (極微)	雄 3 例 (極微～軽微) 雌 2 例 (軽微～軽度)
まれな細胞壊死及び細胞残屑 ^d	0	0	雄 1 例 (極微)	雄 3 例 (極微)

^a () 内は病理組織学的所見の程度 (slight=極微、minimal=軽微、mild=軽度、moderate=中等度、severe=重度) を示す

^b 各投与群とも雄 5 例、雌 5 例を主試験剖検に供した

^c WNL : within normal limits (正常値の範囲内)

^d 壊死した細胞はニューロンではなかった

Data source: M4.2.3.2-2_Text Table 6

回復試験動物 (4 mg/回 群) 4 例中 3 例には海馬にニューロンの空胞化が認められ、病理組織学的所見の程度は主試験剖検時に認められた所見の程度と類似していた。回復試験の結果は、この所見が残存するものか、又は消失には回復期間が不十分であったか (空胞が出現した細胞中に

ISIS 396443 が存在する可能性がある) のいずれかを示唆している。

海馬の病理組織学的所見は脳及び脊髄組織中の濃度で評価した被験物質曝露量と関連した。これらの測定は維持投与期間の終了時（主試験剖検日）に実施し、定常状態の組織中濃度を表していた（表 11）。表中には比較として、肝臓における ISIS 396443 の組織中濃度を示した。これらの3つの組織において、オリゴヌクレオチド濃度は投与量に依存していた。これらの結果は閾値濃度を示し、閾値以下では海馬における空胞化は認められていない。

表 11 ISIS 396443 をカニクイザルに 53 週間投与した後の病理組織学的所見と曝露との相関性

投与群	海馬の顕微鏡所見 ^a		平均 (SD) 組織濃度 (µg/g) ^b		
	ニューロンの空胞化	細胞壊死 ^c	大脳 (皮質)	脊髄 (腰部)	肝臓
0.3 mg/回 (累積 3.9 mg) ^d	なし	なし	4.2 (1.9)	21.4 (9.3)	0.9 (0.4)
1 mg/回 (累積 13 mg) ^d	10 例中 2 例	10 例中 1 例	16.6 (6.0)	53.5 (33.6)	2.8 (1.6)
4 mg/回 (累積 52 mg) ^d	10 例中 5 例	10 例中 3 例	71.3 (29.2)	99.0 (71.5)	21.9 (9.2)

^a 頻度は雌雄を併合した結果を示す

^b 組織濃度は試験 372 日に測定した（主試験剖検）

^c 細胞壊死はニューロンではなかった

^d 53 週間の累積投与量を示す

Data source: M4.2.3.2-2_Text Table 4 and 6

本試験における病理評価者の見解では、海馬に認められた空胞化及びまれな細胞壊死が一般状態又は動物の身体機能に有害な影響を与えるとは考えられない。この見解はこれらの幼若サルにおいて神経行動学的な作用、又は学習能力の障害を示唆する所見が認められていないことから裏付けられた。しかしながら、他の 2'-MOE ASO では、腎臓の空胞化、尿細管変性、及び腎機能への影響が認められていることから（Henry 2012）、海馬の空胞化における毒性学的意義は否定できない。したがって、53 週間の毒性試験における NOAEL（無毒性量）は 0.3 mg/回と判断された。

4 遺伝毒性試験

ISIS 396443 の遺伝毒性を、*in vitro* の細菌を用いた復帰突然変異試験（エームス試験）、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞の染色体異常試験、及び *in vivo* ではマウスを用いた小核試験で検討した。これらの試験結果は陰性であり、ISIS 396443 には変異原性及び染色体異常誘発能はないと判断した。

4.1 細菌を用いた復帰突然変異試験（396443-IS02 試験）

評価資料 [4.2.3.3.1-1] 369443-IS02

細菌を用いた突然変異誘発試験には 5 菌株を使用した。初期毒性/変異原性試験は 5 菌株を用い S9 代謝活性化の非存在下及び存在下（±S9）で復帰突然変異作用を検討し、その用量範囲は 1.5～5000 µg/plate であった。最高用量において、毒性又は被験物質の沈殿を示すエビデンスは認められなかった。代謝活性化 S9 の非存在下及び存在下ともに変異原反応は認められなかった。

確認試験は 50～5000 µg/plate の用量範囲で行った（各条件すべて 3 回のアッセイで評価した）（表 12）。最高用量において、被験物質の沈殿及び細菌に対する毒性は認められなかった（各プレート上の細菌叢の検査に基づく）。

表 12 ISIS 396443 の細菌を用いた確認復帰突然変異試験の結果

菌株 ^a	代謝活性化法	用量範囲 ^b	結果
TA98	-S9	50～5000 µg/plate	変異原性なし
TA100			変異原性なし
TA1535			変異原性なし
TA1537			変異原性なし
WP2 ^{uvrA}			変異原性なし
TA98	+S9	50～5000 µg/plate	変異原性なし
TA100			変異原性なし
TA1535			変異原性なし
TA1537			変異原性なし
WP2 ^{uvrA}			変異原性なし

^a 菌株はすべて *Salmonella typhimurium*、ただし、WP2^{uvrA} (*E. coli*) を除く

^b 試験条件として、すべては 3 回繰り返した

Data source: M4.2.3.3.1-1_in Text

要約すると、ISIS 396443 は、Aroclor 誘発ラット肝臓 S9 の非存在下及び存在下での plate incorporation assays において、5 菌株で変異原性を示さなかった。

4.2 哺乳類培養細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験 (396443-IS03 試験)

評価資料 [4.2.3.3.1-2] 396443-IS03

ISIS 396443 についてチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞を用いて Aroclor 誘発ラット肝臓 S9 代謝活性化系の非存在下 (-S9) 及び存在下 (+S9) で染色体異常試験を行った。染色体異常試験の用量範囲を設定するため、予備的な毒性試験を行った。

被験物質の染色体異常誘発の可能性を評価するため、3 セットの試験条件を用いた (表 13)。予備的な毒性試験として、0.5~5000 µg/mL の濃度範囲で S9 非存在下及び存在下で評価した。被験物質はリン酸緩衝液・生理食塩水に溶解したが、最高用量においても被験物質の沈殿は観察されなかった。細胞毒性を示すエビデンスは認められなかった (細胞増殖に基づく)。

したがって、細胞毒性の不在下で、一組 3 セットの試験条件で 750、1500、2000、3500、及び 5000 µg/mL の濃度を使用し染色体異常試験を行った。すべての濃度群について、各 2 回実施し、3 つ高濃度群 (2000、3500、5000 µg/mL) から、フラスコ当たり 100 個 (各濃度当たり 200 細胞) の分裂中期細胞について評価した。

表 13 CHO 細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験の試験デザイン

処理時間	回復時間	回収時期	S9	濃度範囲 (µg/mL)	細胞毒性 ^a	結果
4 hr	16 hr	20 hr	-	750 1500	なし	染色体異常なし
20 hr	0 hr	20 hr	-	2000 3500	なし ^b	染色体異常なし
4 hr	16 hr	20 hr	+	5000	なし	染色体異常なし

^a 細胞毒性は分裂指数の減少に基づく

^b 5000 µg/mL の分裂指数は溶媒対照群の 61%であった

Data source: M4.2.3.3.1-2_Table in text (p.7)

4 時間の処理時間 (±S9) で本被験物質は細胞毒性 (分裂指数の減少) を生起させなかった。20 時間の処理時間 (-S9) で分裂指数はわずかに減少したが、5000 µg/mL での分裂指数は対照の 61% であり、これは無毒性の判断基準より十分高いレベルにあると考えられる (対照の分裂指数が 50% 未満の場合は細胞毒性のエビデンスありと考えられる)。このように、試験で使用した全濃度において活発な細胞増殖が行われており、分裂中期の解析として適切であった。

細胞当たりの構造異常の平均数は全試験条件 (溶媒対照及び被験物質で処理した細胞) において 0.0%~1.0% (分裂中期細胞 200 当たり) であった。このように、*in vitro* の本試験条件下では ISIS 396443 は染色体傷害を生起しないと判断された。

4.3 *In Vivo* マウス小核試験 (396443-AS10 試験)

評価資料 [4.2.3.3.2-1] 396443-AS10

ISIS 396443 の CD-1 マウスを用いた *in vivo* の小核試験を行った。各群雌雄それぞれ 12 例のマウス (約 7 週齢) に被験物質を 1 回 SC 投与した。24 又は 48 時間後に骨髄を採取するため動物を剖検した (表 14)。多染性赤血球 (PCE) について、各時点に雌雄それぞれ 6 例のマウス (マウス当たり 4000 PCE) を用い評価した。

表 14 CD-1 マウスを用いた小核試験の試験デザイン

投与量 (mg/kg)	動物数	剖検日	
		第 2 日 (投与後 24 時間)	第 3 日 (投与後 48 時間)
0 (対照、生理食塩水)	12M / 12F	6M / 6F	6M / 6F
188	12M / 12F	6M / 6F	6M / 6F
375	12M / 12F	6M / 6F	6M / 6F
750	12M / 12F	6M / 6F	6M / 6F
シクロホスファミド ^a (陽性対照) 70 mg/kg	6M / 6F	6M / 6F	なし

^a シクロホスファミドは腹腔内投与した

Data source: M4.2.3.3.2-1_Table in text (pp.17-18)

被験物質の曝露を確認するため生理食塩水投与対照群及び被験物質投与 3 群の各群雌雄それぞれ 3 例から肝臓を採取した。雌雄動物の間に差異は認められず、平均組織中濃度は用量依存的に増加した。試験 2 日での平均組織中濃度は、188、375、及び 750 mg/kg 群について、それぞれ 68.6、104.3、及び 185.5 µg/g であった。試験 3 日では 73.3、102.0、及び 167.3 µg/g であり、試験 3 日の平均濃度は試験 2 日の値と同様であった。

小核 PCE の出現頻度には、いずれの被験物質投与群においても統計学的に有意な増加は認められなかった。陰性対照群のマウスの PCE 4000 細胞当たりの MN-PCE 出現頻度は 5.83~6.83 の範囲であった。比較すると、被験物質投与群のマウスの PCE 4000 細胞当たりの MN-PCE 出現頻度は 4.67~8.00 の範囲であった。陽性対照群の MN-PCE は顕著に増加した (PCE 4000 細胞当たり、雄 ; 183、雌 ; 142 であった)。

このように本試験条件下で、ISIS 396443 はマウスにおいて試験した 750 mg/kg までは小核を誘発しないと判断された。

5 がん原性試験

ISIS 396443 の対象疾患（主に I 型 SMA）は致死性の高い重篤な疾患であることから、「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンスについて」（平成 22 年 2 月 19 日付薬食審査発 1127001 号）及び「医薬品のがん原性試験に関するガイドラインの改正について」（平成 20 年 11 月 27 日付薬食審査発 1127001 号）を踏まえて、承認申請時にごん原性試験成績は提出しなかった。げっ歯類（CD-1 マウス）を用いた ISIS 396443 の皮下投与による 2 年間のごん原性試験を計画している。

6 生殖発生毒性試験

ISIS 396443 については、3 つの生殖発生毒性試験、すなわち、CD-1 マウスを用いた受胎能及び発生毒性の併合試験、出生前・出生後発生試験、及びニュージーランド白色ウサギを用いた胚・胎児発生毒性試験が実施された。成熟組織（特に生殖器官）及び胎児が最大限の曝露を受けるようにするため、投与経路は SC を用いた

6.1 CD-1 マウスを用いた皮下投与による受胎能及び発生毒性の併合試験 (396443-AS08 試験)

評価資料 [4.2.3.5.1-1] 396443-AS08

本試験はマウスにおける受胎能及び胚・胎児発生に対する ISIS 396443 の影響を評価する目的で実施した。雌雄マウスを 4 投与群に配分した (表 15)。

表 15 CD-1 マウスを用いた SC 投与による受胎能及び胚・胎児発生毒性試験の試験デザイン

投与群	投与量 (mg/kg)	週当たりの投与量 (mg/kg/週) ^a	雄の動物数 ^b	雌の動物数 ^b
1	0 (溶媒)	0	25 + 6	25 + 6
2	3	10.5	25 + 6	25 + 6
3	10	35	25 + 6	25 + 6
4	25	87.5	25 + 6	25 + 6

^a 投与は隔日とし、週当たり 3 又は 4 回投与した。週当たりの投与量は単回投与量の 3.5 倍だった。

^b 各群雌雄それぞれ 6 例について、TK 解析用の採血を行った。

Data source: M4.2.3.5.1-1_In-text Table 4

雄マウスには隔日で合計 10 週間 SC 投与し、本試験の交配期間の 4 週間前、交配中、及び交配後剖検までとした。雌マウスには交配の 2 週間前に隔日で SC 投与し、交配期間中、妊娠日齢 (GD) 15 日 (GD 15) まで継続した。当該投与期間はマウスの器官形成期を包含している。

主試験群の雌マウスについては、発情周期を毎日調べた。試験期間は、交配前 2 週間前から開始し、交配が確認されるまで継続、又は 14 日間の交配期間終了までとした。試験 15 日 (雌) 及び 29 日 (雄) に雌マウスと雄マウスを 1 : 1 で同居させた。各ペアは交尾が確認されるまで、又は 14 日間の交配期間が終了するまで同居させた。

雄の最終剖検は試験 71 日 (最終投与の約 2 日後) に実施した。妊娠母動物の最終剖検は GD18 に行った。雄では剖検時、左側の精巣上体尾部から精子を採取し、総精子数、運動性、濃度、及び精子の形態を調べた。雌では妊娠子宮重量、黄体数、及び着床痕 (生存胎児、早期吸収胚、後期吸収胚、死亡胎児) について調べた。生存胎児及び胎盤はすべて重量を測定し、生存胎児については外表の肉眼的な発生異常を調べた。

各同腹児の半数は骨格観察用、残りの半数は内臓観察用に供した。骨格及び内臓についての胎児所見は変異又は奇形に分類した。

ISIS 396443 は全投与量で、雌雄マウスともそれぞれの投与期間に対して忍容性が良好であった。

成熟雌動物では、一般状態、摂餌量、体重、体重増加、又は臨床病理パラメータに対する影響は認められなかった。母性能力、胚・胎児発生全般には薬物投与と関連した影響は認められなかった。ISIS 396443 の肝臓組織中濃度に基づくと曝露量は用量依存的に増加した（表 16）。雄マウスでは雌に比べて高い肝臓組織中濃度が認められ、このことは雄での投与期間が雌より長期であったことによると考えられた。

表 16 雌雄マウスの肝臓中 ISIS 396443 濃度

投与量 (mg/kg)	週当たり投与量 (mg/kg/週)	試験日	性別	肝臓濃度 (µg/g)
3	10.5	71	Male	185 (23.6)
		GD18	Female	69.2 (10.9)
10	35	71	Male	478 (131)
		GD18	Female	164 (32.7)
25	87.5	71	Male	989 (255)
		GD18	Female	417 (57.0)

Data source: M4.2.3.5.1-1_Appendix 7_Table A

成熟雄マウスでは、受胎能、精子濃度、又は精子の運動性について影響を認めなかった。生殖系器官について、被験物質と関連した病理組織学的変化が精巣、精巣上体、前立腺、精嚢に認められた。これらの変化は主としてこれら組織にオリゴヌクレオチドが蓄積した結果であった。病理組織学所見には精巣のライディヒ細胞の軽度から中等度の空胞化、精巣上体、前立腺及び精嚢における顆粒/空胞化マクロファージの軽微から軽度の浸潤を認めた。

成熟雌動物では、各群における受胎率に変化は認められなかった。母動物評価に関する項目（子宮重量、黄体数、着床数、着床率、胎児の生存率、性比、及び胎児体重）に被験物質投与と関連した変化は認められなかった。個々の胎児観察（外表、骨格及び内臓観察等）に被験物質投与と関連した変化は認められなかった。

要約すると、雌雄マウスに ISIS 396443 を隔日 SC 投与したところ、最高用量 87.5 mg/週まで良好な忍容性が示された。受胎能、精子形成、妊娠又は胚・胎児発生に対し被験物質の影響は認められなかった。本試験条件下において、親動物の毒性、生殖能及び初期胚発生に対する無毒性量（NOAEL）は 87.5 mg/kg/週と判断された。

6.2 胚・胎児発生毒性

6.2.1 ニュージーランド白色ウサギを用いた ISIS 396443 の用量設定毒性試験 (396443-AS09P 試験)

参考資料 [4.2.3.5.2-1] 396443-AS09P

本試験の投与量は、ニュージーランド白色ウサギへの類似したアンチセンスオリゴヌクレオチドの投与経験に基づき設定した。本試験結果は、最終的な胚・胎児発生毒性試験の投与量の設定に用いられた。妊娠したウサギを4群に配分し（表 17）、被験物質を妊娠日齢（GD）6、8、10、12、14、16 及び GD 18 に SC 投与した。

表 17 妊娠ウサギを用いた用量設定試験の試験デザイン

投与量 (mg/kg/回)	週当たりの投与量 (mg/kg/週)	妊娠ウサギの 動物数	解剖時の状況（GD 28）	
			妊娠	非妊娠
溶媒 (0)	0	7	7	0
5	17.5	7	7	0
15	52.5	7	6	1 ^a
30	105	7	4	1 ^a + 2 ^b

^a 1 例の動物は交尾を確認したが妊娠していなかった

^b 2 例の動物には死亡した胎児を認めた（1 胎児及び 3 胎児）

Data source: M4.2.3.5.2-1_In-text Table 3

最高用量（105 mg/kg/週）の投与により、投与中及び投与後の期間に母動物毒性の症状として軽度の摂餌量低下及び早産が認められた。これらの結果から、最終試験の最高用量は 87.5 mg/kg/週（25 mg/回）に設定した。

6.2.2 ニュージーランド白色ウサギを用いた ISIS 396443 の皮下投与による胚・胎児発生毒性試験 (396443-AS09 試験)

評価資料 [4.2.3.5.2-2] 396443-AS09

本試験はニュージーランド白色ウサギを用いて胚・胎児発生に対する ISIS 396443 の影響を評価する目的で行った。妊娠したウサギを4投与群に配分し（表 18）、被験物質を GD 6、8、10、12、14、16 及び 18 に SC 投与した。

表 18 ウサギを用いた胚・胎児発生毒性試験における試験デザイン

投与群	投与量 (mg/kg)	週当たり投与量 (mg/kg/週) ^a	妊娠ウサギの動物数
1	0 (溶媒)	0	22
2	6	21	22 + 3 ^b
3	12.6	44.1	22 + 3 ^b
4	25	87.5	22 + 3 ^b

^a ウサギに対して隔日に投与し、週当たり 3 又は 4 回投与した。週当たりの投与量は mg/kg 単回投与量の 3.5 倍に相当する

^b 被験物質投与群の妊娠ウサギ 3 例については、TK 解析用に採血を行った
Data source: M4.2.3.5.2-2_In-text Table 2

一般状態の観察は 1 日 2 回行った。摂餌量は GD 4~27 の間毎日測定し、体重は GD 0、3、6、9、12、15、18、21、24、27 及び 28 に測定した。計画剖検日の GD 28 に、妊娠子宮重量を測定し、子宮内容物（胎児及び吸収胚）を調べた。生存胎児及び胎盤の重量を測定し、発生異常を調べるため胎児の外表、内臓、及び骨格検査を行った。骨格及び内臓検査をした胎児の所見については、変異又は奇形に分類した。

オリゴヌクレオチドを取込む標的器官はすでに知られていることから、母動物及び胎児の肝臓組織中 ISIS 396443 濃度、及び胎盤（GD 20 の TK 解析用ウサギ及び GD 28 の主試験のウサギ）組織中の ISIS 396443 濃度を測定した。母動物の組織中薬物濃度分析によると、GD 20（最終投与日の 2 日後）及び GD 28（最終投与日の 10 日後）での ISIS 396443 曝露は用量依存的に増加した。GD 20 では、各投与群での肝臓中平均薬物濃度は 90.5~374 µg/g tissue の範囲にあり（6~25 mg/kg 投与群）、GD 28 では、各投与群での平均値は 40.1~281 µg/g tissue の範囲にあった。胎盤組織中では非常に低い曝露量（母動物の肝臓中濃度値の 9%以下）が観察されたが、各投与群の胎児肝臓には薬物を検出できなかった（すべて検出限界以下 [LLOQ、10 µg/g]）。胎児肝臓組織中に曝露は認められず、ISIS 396443 は器官形成期中の胎児に容易には移行しなかった。

妊娠したニュージーランド白色ウサギに ISIS 396443 を SC 投与したところ、投薬期間中すべての投薬群において良好な忍容性が認められた。体重及び体重増加について薬物投与と関連した変化は認められなかった。母動物の健康状態、繁殖成績、胚・胎児発生に関して有害な作用は認められなかった。妊娠が確認できた動物（主試験及び TK 用動物）の頻度は、溶媒対照、6、12.6、及び 25 mg/kg 群で、それぞれ 20/22 例、21/25 例、22/25 例、及び 21/25 例であった。

黄体数、着床率、胎児生存率、性比、又は胎児体重に薬物投与と関連した変化は認められなかった。ISIS 396443 投与に関連した胚・胎児の死亡は認められなかった。

胚・胎児発生に特に影響は認められなかった。少数例の胎児に奇形を認めたが、対照群にも同様に認められた。最も多く認められた胎児所見は骨格変異であり、例えば過剰肋骨、舌骨の化骨不全であった。これらは全投与群に認められ被験物質投与群で顕著に増加することはなかった。

要約すると、妊娠したウサギに ISIS 396443 を SC 投与したが良好な忍容性が認められ、母動物の健康状態、繁殖成績、又は胚・胎児発生に有害な影響は認められなかった。組織中薬物濃度分析の結果によると、母動物では用量依存的な曝露量の増加を認めたが、いずれの投薬群の胎児には被験物質は検出されなかった。本試験条件下において、最高用量（25 mg/kg 隔日投与、87.5 mg/kg/週）が母動物及び胎児に対する NOAEL（無毒性量）であると考えられた。

6.2.3 CD-1 マウスを用いた ISIS 396443 の皮下投与による出生前及び出生後発生試験（396443-AS12 試験）

評価資料 [4.2.3.5.3-1] 396443-AS12

本試験は、妊娠及び授乳 CD-1 マウスに被験物質、ISIS 396443 を SC 投与したときの潜在的副作用を評価する目的で実施した。妊娠マウスは 4 群（表 19）に割付け、被験物質を妊娠 6 日目（GD

6)、8、10、12、14、16の隔日及び授乳0日目(LD 0)、6、12、18の週1回皮下投与した。

表 19 CD-1 マウスを用いた ISIS 396443 の SC 投与による出生前及び出生後発生試験

濃度 (mg/mL)	投与量 (mg/kg/週) ^a	母動物	F ₁ 選択動物	
			雄	雌
0	0	46	46	46
0.29	5	30	26	26
1.14	20	30	26	26
3.43	60	30	26	26

^a 妊娠期間中、母動物には 5 mL/kg (平均週 3.5 回) を隔日投与した。哺乳期間中、母動物には 17.5 mL/kg を週 1 回投与した。

Data source: M4.2.3.5.3-1_Table A

母動物の生存期間中の観察項目は、妊娠及び授乳期間を通じて一般状態の観察、体重及び摂餌量を測定した。生殖パラメータとして、分娩、同腹児のデータ、出生児の離乳率を観察した。F1 出生児については、生存率、性比、体重、肉眼的異常、身体的発達を評価した。離乳後、選択した F1 動物 (同腹児から雌雄各 1 例) について、生存率、一般状態、体重、性成熟、行動評価 (自発運動量、受動回避)、交配率/出産率、GD 13 の妊娠黄体、器官重量、及び肉眼所見を観察した。

乳汁中の被験物質濃度を測定するため LD 13 に各群 4 例の動物から乳汁を採取した。腎臓及び肝臓中の被験物質濃度を測定するため各群とも母動物 10 例、及び F1 出生児の雌雄それぞれ 10 例から組織を採取した。ISIS 396443 は授乳中の母動物の乳汁に検出され、用量依存的な増加が認められた。乳汁中濃度は 5、20 及び 60 mg/kg/週の用量で 0.00847、0.0252 及び 0.0552 µg/mL であった。母動物の肝臓中濃度と比較して乳汁中濃度は極めて低かった。全身曝露の指標として、母動物の肝臓中 ISIS 396443 濃度が評価された。組織肝臓中濃度に対する乳汁中濃度の比 (0.000220 ~ 0.000227) が 3 用量群間で類似して低かったことは、皮下投与後に乳汁中に容易には移行しないことを示している。

母動物では妊娠期間及び授乳期間を通じて一般状態、体重、摂餌量及び肉眼的検査に対して被験物質の影響は認められなかった。母動物の腎臓、肝臓及び脾臓重量 (絶対及び体重比相対重量) は増加した。この増加は被験物質と関連しており、高用量群では腎臓、肝臓、脾臓の絶対重量の増加はそれぞれ 10%、10%、19%であった。これらの器官重量の増加の原因は ASOs の炎症誘発作用によるものであり、有害な作用とは考えられなかった。

妊娠率は全投与群間で類似しており、83.3%から 90%の範囲であった。平均妊娠期間についても全投与群で類似しており 18.9 から 19.0 の範囲であった。一腹当たりの平均出生児数は類似しており、溶媒対照群の 12.9 例から中用量群の 13.8 例の範囲であった。各用量群間の F1 出生児性比には統計学的有意差は認められず、LD 0 における雄新生児の比率は 45% (高用量) から 53% (中用量) であった。F1 出生児の平均体重は、出生時から出生後 28 日、及び淘汰した出生児では出生後 13 週まで全投与群間で類似していた。

F1 出生児の行動、感覚、又は発達指標について、被験物質の影響は認められなかった。身体的発達 (眼瞼開裂、反射等)、自発運動量、学習/記憶の評価及び性成熟の時期についての評価を行った。F1 出生児の生殖能力は全投与群間で類似しており、F1 雌出生児の GD 13 の子宮及び卵巣

のパラメータに被験物質の影響は認められなかった。

要約すると、母動物の妊娠期間及び授乳期間を通じて ISIS 396443 を SC 投与したが、出生前及び出生後の発生に影響は認められなかった。本試験における母動物の一般状態及び生殖毒性に対する無毒性量 (NOAEL)、並びに出生児毒性に対する無毒性量とも、最高用量の 60 mg/kg/週であった。

7 局所刺激性試験

ISIS 396443 の独立した局所刺激性試験は実施していない。局所刺激性はカニクイザルを用いた単回投与及び反復投与毒性試験で評価した。腰部 IT 投与後、被験物質投与と関連した有害な肉眼的及び病理組織学的変化は認められなかった。

8 その他の毒性試験

8.1 CD-1 マウスを用いた ISIS 396443 の 13 週間反復投与試験及び不純物適格性評価試験 (396443-AS13 試験)

評価資料 [4.2.3.7.6-1] 396443-AS13

種々の不純物を増量した ISIS 396443 の全身毒性を評価する目的で成熟 CD-1 マウスを用いて 13 週間 SC 投与毒性試験を行った。SC 投与開始時のマウスは 7 から 8 週齢であった。12 種類のカテゴリーの不純物を含有する 3 つの不純物増量被験物質ロット (Mixture #1、Mixture #2、Mixture #3) を調製し、5 及び 25 mg/kg/週を投与した (表 20)。これらの不純物増量 Mixture の結果を ISIS 396443 投与群 (5 及び 25 mg/kg/週)、及び生理食塩水の対照群と比較した。各群雌雄それぞれ 6 例のマウスを使用した。本試験に用いた ISIS 396443 のロット (002*) の純度 (Full-length n) は ■■■%であった。これに比較し、不純物増量 Mixture の純度は ■■■%~■■■%の範囲にあり、一方、各不純物単独の含有率は 4.1%~6.7%の範囲にあった。

表 20 CD-1 マウスを用いた 13 週間の不純物適格性評価試験の試験デザイン

投与量 (mg/kg/週)	処置	親 ASO		増量した不純物の組成 ^a	
		純度	%	不純物	%
0	生理食塩水対照	N/A		N/A	N/A
5 及び 25	ISIS 396443	Full-length n	■■■	N/A	N/A
		Full-length (P=O) ₁	■■■		
5 及び 25	Mixture #1	Full-length n	■■■	2' -O-■■■	6.7
		Full-length (P=O) ₁	■■■	a*	4.9
				Total Abasic	5.1
5 及び 25	Mixture #2	Full-length n	■■■	2' -O-CH ₃	4.6
				Dithioate	4.8
				ADP	4.5
				CNET	6.3
				IDP	5.6
5 及び 25	Mixture #3	Full-length n	■■■	Intverted Isomer	6.3
				3' -MOE	5.0
				Early Eluting Impurites	4.1
				Late Eluting Impurites	5.9

^a 不純物の略語：ADP (N² acetyl-2, 6-Diaminopurine), CNET (N³ -(2-cyaoethyl) thymine), IDP (N² isobutyryl-2, 6-diaminopurine), MOE (methoxyethyl)

Data source: M4.2.3.7.6-1_Appendix B, Certificate of Analysis (p.94)

毒性学的評価として、生存期間中の観察 (体重、摂餌量、一般状態、眼科学的検査)、臨床病理

学的検査（血液学的及び血液生化学的検査）、及び剖検後の評価（肉眼的観察、臓器重量、病理組織学的評価）を行った。各群雌雄それぞれ 6 例から肝臓を採取し ISIS 396443 の組織中濃度を測定した。

すべての被験物質ロットにおいて肝臓での曝露量は用量依存的に増加した。これらのデータは、ISIS 396443 を含む全オリゴヌクレオチド成分の肝臓における組織中曝露量は全投与群間で同様であることを示している。

ISIS 396443 及び 3 種の不純物混合物を 5 及び 25 mg/kg/週投与したが、いずれも良好な忍容性が認められた。瀕死率、死亡率、一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査、剖検時の肉眼的観察、又は臓器重量について、被験物質の影響は認められなかった。いずれの投与量でも血液生化学パラメータに投与群間で意味のある差異は認められなかった。発現頻度は低いが、AST 及び ALT が軽度増加する動物が散見された。これら所見は肝臓の病理組織学的所見（マクロファージ空胞化/顆粒化等）と関連しており、被験物質と関連していると考えられた。

全被験物質群のマウスの全身組織にマクロファージ空胞化/顆粒化、及び腎臓の尿細管上皮内の好塩基性顆粒の蓄積が病理組織学的所見として認められた。これら所見はオリゴヌクレオチドの細胞取込み又はオリゴヌクレオチドの炎症誘発作用による細胞活性化及びサイトカイン産生と一致しており、これらが有害であるとは判断されなかった。不純物増量 Mixture を投与された動物に他の病理組織学的所見は認められなかった。

要約すると、本試験に認められた変化はオリゴヌクレオチドをげっ歯類に SC 投与した場合の細胞取込み又は炎症誘発作用として既知の所見である。被験物質投与群間に差異は認められず、したがって、不純物増量 Mixture の投与に関連した新たな毒性は認められなかった。

8.2 各種組織固定法を用いたカニクイザル腰部 IT ポーラス投与後のオリゴヌクレオチド関連海馬空胞化の評価（396443-AS11 試験）

参考資料 [4.2.3.7.7-1] 396443-AS11

当該非 GLP 試験はカニクイザルの毒性試験で観察された海馬の空胞化の顕微鏡による外観所見に対する数種の異なる組織固定技術の影響を評価する目的で行った。加えて、ISIS 396443 に伴い発現する脊髄下部反射の低下の発現時期及び回復期も評価した。

腰部髄腔内にカテーテルを設置し、5 mg/回の用量で週 1 回、計 6 回 IT ポーラス投与した(表 21)。

表 21 カニクイザルを用いた探索研究の試験デザイン

群	投与量	累積投与量 ^a	動物数	剖検 ^b	脳の固定方法
1	5 mg	30 mg	3M / 3F	第 50 日	浸漬固定 ^c 凍結 ^d
2	5 mg	30 mg	3M / 3F	第 50 日	灌流固定 ^e

^a 動物には週 1 回の IT 投与を 6 回投与した（試験 1、8、15、22、29 及び 36 日）

^b 剖検は最終投与の 14 日後に行った

^c 脳左半球より代替脳切片を採取し 10% 中性緩衝ホルマリン（NBF）又はカルノア液に浸漬した

^d 凍結用切片用試料は脳右半球より採取した

^e 灌流固定はカルノフスキー固定の変法（2% パラホルムアルデヒド/2.5% グルタルアルデヒド）

Data source: M4.2.3.7.7-1_Table in text (p.16)

生存期間中の観察及び測定は、体重、摂餌量、一般状態、神経学的及び身体検査であった。

ISIS 396443 の投与により持続性の一般状態、体重、摂餌量、身体検査の変化は認められなかった。急性の一般状態として、脊髄下部反射の一過性の低下のみを認めたが、本所見はすでに単回投与毒性/PK 試験 (396443-AS01) 及びサルを用いた反復投与試験 (396443-AS03、396443-AS06) で報告されている所見と同じ性質のものであった。具体的には、これらは膝蓋腱反射、皮膚反射、足の感覚反射及び尾の反射検査における反応の消失であった。これらの反射障害は 1 回以上の IT 投与後の 12 例中 8 例に観察された。脊髄下部反射の低下は、投与後 4 時間以内に認められ、投与後 24～48 時間以内に消失した。

病理組織学的解析は脳及び脊髄に限定された。第 1 群の動物の脳は 10% 中性緩衝液ホルマリン (NBF) に浸漬固定され、空胞化を 6 例中 3 例のサル海馬に認めた (病理組織学的スコアは軽微であった)。その他に組織学的変化は認められなかった。免疫組織化学 (IHC) 染色では、海馬に空胞が認められた 3 例のサルに ISIS 396443 陽性の染色反応が認められた。陽性染色は、空胞の位置と一致する海馬領域に観察され、一部の染色では空胞と共存した。海馬に空胞が認められなかった第 1 群の 3 例のサルでは、ISIS 396443 陽性の染色も観察されなかった。初期の組織中薬物濃度分析試験では、腰部 IT 投与後のサルの海馬に ISIS 396443 の再現性のある分布を確認していることから、これら 3 例の動物に被験物質陽性の染色反応が認められなかったことには、IHC 染色の感度が関連している可能性がある。

他の方法で固定した脳切片 (カルノア液に浸漬し固定、カルノフスキー固定の変法で灌流固定、凍結による固定) では、薬物が免疫組織化学的に陽性であることが確認されているにもかかわらず、海馬での空胞化は観察されなかった。

用いた固定方法にかかわらず脊髄に組織学的変化は認められなかった。

要約すると、ISIS 396443 の 5 mg/回を週 1 回で 6 回投与したところ、サルの GLP 反復投与毒性試験で認められた脊髄下部反射における一過性の障害が再現された。通常的手法 (NBF で浸漬固定して HE 染色) で作製した脳切片で、海馬の空胞を 6 例中 3 例に認めた。ISIS 396443 は海馬に分布しており、ホルマリン固定した脳切片の海馬神経細胞の空胞化と共存した。他の固定方法で作成した脳切片では海馬の空胞化は認められなかった。

この探究試験から、ISIS 396443 IT 投与後の海馬に認められた空胞は、有害な病理組織学的所見を示すものではなく、薬物の蓄積がある組織の保存方法と関連している可能性が最も高いと考えられる。

8.3 免疫毒性試験

ISIS 396443 の独立した免疫毒性試験は実施していない。カニクイザルを用いた 53 週間 IT 投与毒性試験で ISIS396443 に対する抗体産生が検出されたが、T 細胞依存性抗体産生 (TDAR) 試験では陰性の結果が得られた。また、免疫系の組織にも異常は認められなかった。以上の結果から ISIS 396443 は免疫能に影響しないと考えられる。

8.4 光毒性試験

ISIS396443 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、約 260 nm の波長にピークを有する UV 吸収性を示す。髄腔内投与によるドラッグデリバリー及び低用量の投与では、皮膚濃度は低いと考えられる。ISIS 396443 の臨床試験の患者に皮膚の光毒性関連有害事象は認められなかった。よって、ISIS396443 は光毒性の懸念がないことが確認された。

9 考察及び結論

ISIS 396443 毒性プログラムは、脊髄性筋萎縮症 (SMA) 患者における長期 IT 投与の裏付けとするために計画した。ヒトで意図している薬理標的は *SMN2* 遺伝子のスプライシングの修正である。一般的な毒性試験動物種は *SMN1* 遺伝子のみを有しており、ISIS 396443 の薬理活性動物種で潜在的な毒性を評価することは不可能である。また、*SMN2* 遺伝子のスプライシングの修正による薬理作用は正常タンパク質の産生であり、薬理作用に起因する安全性について評価する必要性はないと考えられた。単回投与毒性/PK 試験及び主要な反復投与 (14 週間及び 53 週間) 試験は、カニクイザルの単一動物種で実施した。これはげっ歯類における反復 IT 投与が技術的に可能ではないためである。サルは、ASO の組織内分布、細胞取込み、代謝、及びクラス毒性に対する感受性の観点から、ヒトに外挿する動物として適切である。さらに、サルでは IT ボーラス投与が実施可能であり、用量-曝露量-反応の関係性が確立していることから、ヒトに外挿可能な完全な安全性評価が得られると考えられる。14 週間及び 53 週間試験では、SMA 適応患者が小児であることから、幼若サルを用いた。

CD-1 マウスの 13 週間試験は、げっ歯類での全身毒性プロファイルを把握するため、及び小児患者の治療に関連する安全性データを補足する目的で実施した。生殖試験にはマウス及びウサギを用い、安全性薬理試験にはラットを使用した。ISIS 396443 の一連の遺伝毒性試験も実施した (細菌を用いた復帰突然変異試験、*in vitro* の染色体異常試験、*in vivo* マウス小核試験)。

主要な反復投与試験での投与経路は腰部髄腔内へのスローボーラス投与であり、臨床投与経路を用いた。生殖試験はマウス及びウサギを用いて SC 投与し、成熟動物及び胎児に対して ISIS 396443 の最大曝露量を確保した。安全性薬理試験ではラットを使用し、ISIS 396443 は持続注入装置 (Alzet osmotic mini-pump) を用いて持続 IT 投与した。

サルの単回及び反復投与試験では、良好な忍容性が認められたが、最高用量群の脊髄下部反射に急性で一過性の低下が認められた。死亡例は認められず、体重、摂餌量に影響は認められなかった。また、一般状態の観察では持続性の症状は観察されなかった。急性で一過性の脊髄下部反射の低下は、最高用量にのみ発現した (単回投与試験の 7 mg、14 週間試験での 3 mg、53 週間試験の 4 mg、及び 6 週間探索的試験の 5 mg)。これらの作用は全般に、投与後数時間以内に観察され、投与後 48 時間以内に消失し、反復投与に伴って重症化することはなかった。

14 及び 53 週間試験では、身体検査、臨床病理検査、眼科学的検査、心血管系の評価、骨格系の成熟度、及び免疫系のパラメータはこの年齢の動物の正常範囲内の値であった。全身の器官に病理組織学的な影響は認められなかった。肝臓及び腎臓組織中に ISIS 396443 は検出されたが、薬物投与に関連した所見は認められなかった。肝臓中の濃度は相対的に低く (< 120 µg/g)、他の化合物で行った全身性投与の毒性試験でのサルの肝臓中濃度の閾値 (> 1000 µg/g) 以下であった (Henry 2008)。特に、神経行動学又は学習パラメータについては薬物投与に関連した影響は認められなかった。

病理組織学的変化は脳の海馬下部に限られ、主な所見は軽微から軽度の限局性の神経細胞の空胞化であった。この変化は薬物存在下での組織固定方法及び標本処理方法と関連すると考えられ、有害な所見を表すとは考えられない。この固定法に起因して観察された空胞化の頻度及び程度は、

14 週間サル IT 投与試験の最も集中した投与スケジュール（14 週間、累積投与量 45 mg）で最大となったが、この投与スケジュールでは脊椎腰部及び大脳皮質中の薬物濃度が最高値に達していた（それぞれ、169 及び 166 µg/g）。

14 週間の試験では、7 例中 1 例の動物にニューロン壊死、53 週間試験では神経細胞ではない細胞壊死及び細胞残屑を、中用量の雄で 1 例、高用量の雄で 7 例中 3 例に認めた。5 段階の病理組織所見の程度の基準によると、両試験での海馬細胞の空胞化は主に極微 (Grade 1) 及び軽微 (Grade 2) で軽度 (Grade 3) は 1 例のみであり、本試験における病理評価者の見解では、この海馬での変化が一般状態又は身体機能に有害な影響を与えるとは考えられない。この解釈は病理組織学的重症度に基づいており、これらの動物の神経行動学的観察で影響が認められていないことから裏付けられた。

53 週間サル IT 試験では、14 週間投与試験における中間用量での曝露量に到達するように計画され、慢性的な曝露により毒性の進展又は追加の毒性が認められるか検討した。この試験の最初の 3 ヶ月間の累積投与量は 24 mg で腰部脊椎及び大脳皮質中の薬物濃度はそれぞれ 106 及び 71 µg/g であった。海馬下部ニューロンの空胞化はこの曝露量で出現したが、14 週間投与試験に比べて組織学的変化の重症度の悪化は認められなかった。

カニクイザルを用い探究試験を実施したところ、海馬における空胞には ISIS 396443 が含まれおり、有害な病理組織学的所見を示すことはなかった。実際のところ、観察された空胞は、薬物存在下での組織の固定方法と関連しているため、固定法誘起性空胞化ということができる。海馬下部の空胞化はカルノア液に浸漬固定した組織、又はカルノフスキー固定で灌流した組織では認められなかった。

安全性薬理試験の項目は、14 週間及び 53 週間のサルの毒性試験の一部、及び 25 日間被験物質を持続 IT 投与したラットで検討した。これらの試験では、安全性薬理試験のパラメータに ISIS 396443 に起因した変化は認められなかった (M 2.6.2)。

3 つの発生及び生殖毒性試験の結果により、受胎能及び胚・胎児発生に関する ISIS 396443 投与と関連した作用は陰性であった。生体内分布の試験結果によると、ISIS 396443 は胎盤を通過しない。したがって、母動物での曝露が発生中の胎児に毒性学的に関連した曝露を生じることはない。

ISIS 396443 は細菌を用いた復帰突然変異試験、*in vitro* の CHO 細胞による染色体異常試験、*in vivo* マウス小核試験で試験した結果、遺伝毒性は認められなかった。ISIS 396443 は変異原性及び染色体異常誘発能を有しないと判断された。

ISIS 396443 のがん原性試験は実施しておらず、実施予定はない。ISIS 396443 は遺伝毒性を示さず、また腫瘍誘導をするような直接的な作用機序を有さない。SMN2 遺伝子を介して SMN タンパク質を産生する ISIS 396443 の薬理作用が、SMA 患者に対し発がんリスクを有する懸念はない。weight-of-evidenc に基づく評価より、ISIS 396443 が患者に対して重要な発がん性リスクを有することはないと考えられる。

累積投与量に基づいて、サル毒性試験の結果と患者の投与量とを比較し安全域を評価した。53 週間試験の累積投与量は 3.9、13、及び 52 mg であった (表 22)。サルの試験における累積投与量を脳重量の差異 (体重 3.4 kg のサルで約 70 g、体重 70 kg のヒトで約 1400 g [Dobbing and Sand

1973] の脳重量には約 20 倍の差異がある) に基づいて、ヒト等価用量 (HED) に換算した。

表 22 最初の 1 年間及び長期 (維持) 投与期間での安全域の算出

毒性試験期間	1 回用量 (mg)	毒性評価	累積用量	HED ^a	安全域： 成人用量に対する NOAEL の比	
					最初の 1 年間の総投与量 ^b (72 mg)	長期の年間維持投与量 ^c (36 mg)
53 週間	0.3	NOAEL	3.9 mg	78 mg	1.1 倍	2.2 倍
	1.0	—	13 mg	260 mg		
	4.0	—	52 mg	1040 mg		

^a ヒト等価用量 (HED) はサルにおける累積投与量の 20 倍 (脳重量が約 20 倍の差)

^b SMA 患者は 1、15、29 及び 64 日目に負荷投与を受け、その後 4 ヶ月ごとに維持投与を受ける (最初の 1 年間で 72 mg、成人と同等量)

^c 維持投与量は 1 年間で 36 mg (4 ヶ月ごとに 12 mg)

SMA と診断された患者は、可能な限り早期に CNS 組織中濃度が定常状態になるように最初の 1 年間に 4 回の負荷投与を行い、その後、維持期投与として 4 ヶ月に 1 回の投与を受ける。最初の 1 年間の治療の累積投与量は 72 mg であり、安全域は 1.1 倍 (78 mg / 72 mg) となる。その後の維持投与量に基づく安全域は 2.2 倍となる (78 mg / 36 mg)。

要約すると、毒性プログラムの結果に基づき、動物及び *in vitro* の試験により ISIS 396443 の安全性プロファイルの特徴が適切に明らかにされた。ヒトの IT 投与量とサルの IT 投与量を比較し得られた安全域は、2 つの動物種間での脳重量の差に基づく (2 歳以上のヒトにおける脳重量はサルの約 20 倍量である)。非臨床の安全性プログラムは臨床プログラムを裏付け、また承認申請及び ISIS 396443 の適切な添付文書の裏付けとなる安全性データと考えられた。

10 参考文献

Artru AA. Spinal cerebrospinal fluid chemistry and physiology. In: Spinal Drug Delivery, Tony I. Yaksh (ed). Elsevier Science B.V. 8: 177-237 (1999).

Dorato MA, Engelhardt JA. The no-observed-adverse-effect-level (NOAEL) in drug safety evaluations: Use, issues and definition(s). Regul Toxicol Pharmacol. 2005;42(3):265-74.

Dobbing J and J Sand. Quantitative Growth and Development of Human Brain. Arch Dis Child. 1973;48: 757-67.

Henry SP, Johnson M, Zanardi TA, Fey R, Auyeung D, Lappin PB, Levin AA. Renal uptake and tolerability of a 2'-O-methoxyethyl modified antisense oligonucleotide (ISIS 113715) in monkey. Toxicology 2012;301:13-20.

Henry SP, Kim TW, Kramer-Stickland K, and Levin AA. Toxicologic Properties of 2'-O-Methoxyethyl Chimeric Antisense Inhibitors in Animals and Man, pp. 327-362. In: Antisense Drug Technology (Second Edition), Ed: Stanley T. Crooke, CRC Press, New York, New York (2008). pp.327-362.

スピンラザ髄注 12 mg

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.....	5
3 トキシコキネティクス試験成績の一覧：血漿トキシコキネティクス.....	6
4 毒性試験：被験物質（使用ロット）一覧.....	7
5 単回投与毒性試験（396443-AS01）.....	8
6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験.....	11
7 反復投与毒性試験：重要な試験.....	12
7.1 幼若 CD-1 マウスを用いた 13 週間皮下投与毒性試験（396443-AS07）.....	12
7.2 幼若カニクイザルを用いた 14 週間毒性試験（396443-AS03）.....	15
7.3 幼若カニクイザルを用いた 1 年間毒性試験（396443-AS06）.....	20
8 In Vitro 遺伝毒性試験.....	27
8.1 細菌を用いた復帰突然変異試験（396443-IS02）.....	27
8.2 哺乳類培養細胞を用いた染色体異常試験（396443-IS03）.....	30
9 In Vivo 遺伝毒性試験.....	32
9.1 マウス小核試験（396443-AS10）.....	32
10 がん原性試験.....	33
11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験.....	34
11.1 ウサギを用いた用量設定毒性試験.....	34
12 生殖・発生毒性試験：受胎能及び胚・胎児発生毒性試験（重要な試験）.....	35
12.1 マウスを用いた受胎能及び発生毒性の併合試験（396443-AS08）.....	35
13 生殖・発生毒性試験：胚・胎児の発生に対する影響（重要な試験）.....	46
13.1 ウサギを用いた胚・胎児発生毒性試験（396443-AS09）.....	46
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（重要な試験）.....	53
14.1 マウスを用いた出生前及び出生後発生試験（396443-AS12）.....	53
15 局所刺激性試験.....	59
16 その他の毒性試験.....	60
16.1 スクレオチド関連海馬空胞化の評価（396443-AS11）.....	60
16.2 13 週間の不純物適格性評価試験（396443-AS13）.....	63

1 毒性試験：一覧表

被験物質：ISIS 396443							
試験の種類/ 動物種/系統	投与方法	投与期間	用量 ^a	GLP 適用	試験施設	試験番号	CTD での記 載箇所
単回投与毒性試験							
カニクイザル（成熟）	腰椎髄腔内ボラス注射 ^b	単回投与	0, 1, 3, 7 mg	適	██████████	396443-AS01	4.2.3.1-1
反復投与毒性試験							
カニクイザル（幼若）	腰椎髄腔内ボラス注射 ^b	4/14 週間	0, 0.3, 1, 3 mg/回	適	██████████	396443-AS03	4.2.3.2-1
カニクイザル（幼若）	腰椎髄腔内ボラス注射 ^b	53 週間	0, 0.3, 1, 4 mg/回	適	██████████	396443-AS06	4.2.3.2-2
遺伝毒性試験							
細菌を用いた復帰突然変異試験 (<i>Salmonella typhimurium</i> / <i>Escherichia coli</i>) プレート法	<i>In Vitro</i>	プレート処理を 48～72 時間	50, 150, 500, 1500, <u>5000</u> μg/プレート	適	██████████	396443-IS02	4.2.3.3.1-1
チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞を用いた染色体異常試験	<i>In Vitro</i>	S9 添加及び未添加で 4 時間、 S9 未添加で 20 時間	0, 750, 1500, 2000, 3500, <u>5000</u> μg/mL	適	██████████	396443-IS03	4.2.3.3.1-2
マウス小核試験	<i>In Vivo</i>	単回投与	188, 375, <u>750</u> mg/kg	適	██████████	396443-AS10	4.2.3.3.2-1
生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生（重要な試験）							
CD-1 マウスを用いた受胎能及び発生の併合毒性試験	皮下注射	10 週間（雄） 4～6 週間（雌）	0, 3, 10, <u>25</u> mg/kg	適	██████████	396443-AS08	4.2.3.5.1-1

1 毒性試験：一覧表（続き）

							被験物質 ISIS 396443
試験の種類/ 動物種/系統	投与方法	投与期間	用量 ^a	GLP 適用	試験施設	試験番号	CTD での記 載箇所
生殖発生毒性試験：胚・胎児発生への影響（重要な試験）							
NZW ウサギを用いた胚・胎児発生毒性試験	皮下注射	2 週間	6, 12.6, <u>25</u> mg/kg	適	██████████	396443-AS09	4.2.3.5.2-2
出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能							
CD-1 マウスを用いた出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験	皮下注射	妊娠中(妊娠 6～17 日目) 隔日 授乳中(授乳 0～18 日目) 週 1 回	0, 1.4, 3.8, 7.2 mg/kg	適	██████████	396443-AS12	4.2.3.5.3-1
幼若動物を用いた毒性試験							
CD-1 マウス (幼若)	皮下注射	13 週間	0, 1, 10, <u>50</u> mg/kg	適	██████████	396443-AS07	4.2.3.2.-3
その他の毒性試験							
CD-1 マウスを用いた 13 週間の反復投与毒性及び不純物適格性評価試験	皮下注射	13 週間	5, 25 mg/kg	適	██████████	396443-AS13	4.2.3.7.6-1
カニクイザルを用いた組織固定法の評価	腰椎髄腔内ボラス注射 ^b	6 週間	5 mg/回	非適用	██████████	396443-AS11	4.2.3.7.7-1

^a 特に規定しない限り、最大無毒性量 (NOAEL) を下線で示す。

^b 腰椎髄腔内に緩徐 (3 分間かけて) ボラス注射

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

被験物質：ISIS 396443						
試験の種類	動物種	投与方法	用量	GLP 適用	試験番号	CTD での記載箇所
単回投与毒性／ 薬物動態試験	カニクイザル	腰椎髄腔内ボース 注射 ^a	0, 1, 3, 7 mg	適	396443-AS01PK	4.2.3.1-1
4／14 週間毒性／ 薬物動態試験	カニクイザル	腰椎髄腔内ボース 注射 ^a	0, 0.3, 1, 3 mg/回	適	396443-AS03PK	4.2.3.2-1
53 週間毒性／ 薬物動態試験	カニクイザル	腰椎髄腔内ボース 注射 ^a	0, 0.3, 1, 4 mg/回	適	396443-AS06PK	4.2.3.2-2

^a 腰椎髄腔内に緩徐ボース注入（3分間）

3 トキシコキネティクス試験成績の一覧：血漿トキシコキネティクス

被験物質：ISIS 396443		
Day 1 の定常状態における AUC ₀₋₂₄ (時間*μg/mL)		
動物種	カニクイザル	
年齢	成熟	幼若
投与方法	腰椎髄腔内ボラス注射 ^a	
動物数 (雄/雌)	3/3 ^b	6/7 ^c
用量 (mg/回)		
0.3	-	1.06 ± 0.423
1	2.03 ± 0.408	3.64 ± 1.09
3	4.50 ± 1.83	12.0 ± 2.42
7	14.6 ± 4.32	-
試験番号	396443-AS01	396443-AS03

^a 腰椎髄腔内に緩徐ボラス注入 (3 分間)

^b 3 mg の結果には TK 評価動物 (別の雌雄各 5 匹) のデータを含めた。性別のトキシコキネティクスのデータは M2.6.5 を参照。

^c 3 mg の結果には回復評価動物 (別の雌雄各 4 匹) のデータ及び代替として入れた雄 1 匹のデータが含まれる

4 毒性試験：被験物質（使用ロット）一覧

被験物質：ISIS 396443

ロット番号	純度 (%) ^a	不純物含量 (%) ^b									試験番号	試験の種類										
		(P=O) ₁	CNET	MAM	2'-OCH ₃	2'-O-ethy 1	n+14 ~n+16	n+70	n+98	n-1												
001*	■	1.4	0.33	0.30	0.31	0.24	1.4	0.43	0.42	0.74	396443-AS01	単回投与試験										
											396443-AS03	反復投与試験										
											396443-AS04	安全性薬理試験										
											396443-AS06	反復投与試験										
											396443-IS02	遺伝毒性試験										
											396443-IS03	遺伝毒性試験										
											396443-AS07	反復投与試験										
											396443-AS08	生殖毒性試験										
											396443-AS11	その他の毒性試験										
											002*	■	1.1	0.35		0.4	0.33			0.36	396443-AS09	生殖発生毒性試験
																					396443-AS12	遺伝毒性試験
396443-AS10	遺伝毒性試験																					
396443-AS13	不純物適格性評価試験																					

^a ISIS 396443、(P=O)₁を含む

^b 001* は、1不純物* を0.73%、m不純物* を1.6%含有する。002* は、1不純物* を0.47%、n不純物* を0.7%含有する。

5 単回投与毒性試験 (396443-AS01)

被験物質：ISIS 396443								
報告書題名：カニクイザルを用いた腰椎髄腔内緩徐ボラス投与による ISIS 396443 の単回投与毒性及び薬物動態試験						試験番号：ISIS 396443-AS01		
動物種／系統：カニクイザル			投与期間：単回投与			CTD での記載箇所：4.2.3.1-1		
開始齢：2～4 歳（成熟）			投与後期間：10 週間			GLP 適用：適		
初回投与日：20██年██月██日			投与方法：腰椎髄腔内ボラス注射					
溶媒／投与形態：水溶液（人工 CSF）；液量 1 mL								
特記事項：3 mg の用量でトキシコキネティクス評価（雌雄各 5 匹）								
無毒性量：NA								
用量 (mg/回)：								
0 (対照)		1		3		7		
動物数：								
雄：2		雌：2		雄：3		雌：3		雄：3 雌：3
トキシコキネティクス：AUC ₀₋₂₄ (hr·μg/mL)								
Day 1 - 血漿		NA		2.03 ± 0.408		4.50 ± 1.83		14.6 ± 4.32
組織中オリゴヌクレオチド濃度 (μg/g) - Day 8								
脊髄								
腰部		NA		8.33 ± 4.89		19.2 ± 7.55		19.6 ± 14.3
胸部		NA		6.07 ± 4.26		10.3 ± 5.04		18.4 ± 19
頸部		NA		2.72 ± 0.676		5.6 ± 2.91		10.7 ± 5.43
大脳皮質		NA		2.42 ± 1.37		6.98 ± 3.63		12.8 ± 12.4
肝臓		NA		1.89 ± 0.401		9.95 ± 8.48		36.0 ± 26.5
特記すべき所見								
死亡又は切迫屠殺		0		0		0		0
体重 (%) ^a		-		-		-		-
摂餌量 (%)		-		-		-		-

5 単回投与毒性試験 (396443-AS01) (続き)

試験番号：ISIS 396443-AS01		被験物質：ISIS 396443							
用量 (mg/回)：	0 (対照)		1		3		7		
動物数：	雄：2	雌：2	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3	
飲水量	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
一般状態 ^d ：									
ケージ床に横臥	0	0	0	0	0	0	1	0	
身体検査 ^d ：									
傾眠	0	0	0	0	0	0	1	0	
後肢筋力低下	0	0	0	0	0	0	1	0	
体温低下	0	0	0	0	0	0	1	0	
呼吸数低下	0	0	0	0	0	0	1	0	
神経学的検査 ^e ：									
皮膚反射陰性	0	0	0	0	0	0	1	0	
尾部反射陰性	0	0	0	0	0	0	1	0	
固有反射 (右後肢) 陰性	0	0	0	0	0	0	1	0	
血液学的検査：	-	-	-	-	-	-	-	-	
血液生化学的検査：	-	-	-	-	-	-	-	-	
凝固検査：	-	-	-	-	-	-	-	-	
CSF 生化学的検査：	-	-	-	-	-	-	-	-	
CSF 細胞数：	-	-	-	-	-	-	-	-	
補体：									
血中 Bb (µg/mL)	2.0		1.7		2.8 ^a		2.5		

5 単回投与毒性試験 (396443-AS01) (続き)

試験番号 : ISIS 396443-AS01		被験物質 : ISIS 396443							
用量 (mg/回) :	0 (対照)		1		3		7		
動物数 :	雄 : 2	雌 : 2	雄 : 3	雌 : 3	雄 : 3	雌 : 3	雄 : 3	雌 : 3	
臓器重量 ^b :	-	-	-	-	-	-	-	-	
肉眼的観察 ^c :	-	-	-	-	-	-	-	-	
病理組織学的検査 ^c :									
評価数 :	2	2	3	3	3	3	3	3	
脳を被う髄膜における細胞浸潤 - 極微	0	0	1	0	0	1	0	2	
投与後評価 ^d :									
評価動物数 :	0	0	0	0	5	5	0	0	
病理組織学的検査 ^c :									
脳髄膜における細胞浸潤 - 極微/軽微	NA	NA	NA	NA	4	0	NA	NA	

- : 特記すべき所見なし、NA : 該当なし

^a 16 匹

^b Day 8 の剖検時。対照群は群平均値を示す。投与群は、対照群との相対的な差 (%) を示す。統計的有意性は相対的な差 (%) ではなく実測値に基づいて検定した

^c 偶発的变化及び投与用カテーテル留置に関連した変化は記載していない

^d 投与後 2、20、56 及び 70 日目にトキシコキネティクス評価動物を雌雄各 1 又は 2 匹屠殺して評価を行った (2 日目は雄 2 匹/雌 1 匹、20 及び 56 日目は雌雄各 1 匹、70 日目は雄 1 匹/雌 2 匹)。性別のトキシコキネティクスのデータは M2.6.5 を参照。

^e 投与後 2~4 時間に単一動物で身体検査/神経学的検査における臨床徴候及び変化が認められたが、6 時間後までに完全に回復した。

6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

該当する試験はない。

7 反復投与毒性試験：重要な試験

7.1 幼若 CD-1 マウスを用いた 13 週間皮下投与毒性試験 (396443-AS07)

								被験物質：ISIS 396443	
報告書題名：幼若 CD-1 マウスを用いた ISIS 396443 の 13 週間皮下投与毒性試験						試験番号：ISIS 396443-AS07			
動物種／系統：CD-1 マウス			投与期間：13 週間。週 1 回を 4 週間、その後は隔週 1 回投与（計 9 回）。			CTD での記載箇所：4.2.3.2-3			
開始齢：生後 4 日目			投与後期間：なし			GLP 適用：適			
初回投与日：20■■年■■月■■日			投与方法：皮下注射						
溶媒／投与形態：滅菌生理食塩水／ISIS 396443 の滅菌生理食塩水溶液									
特記事項：新生仔マウスを用いた試験									
無毒性量：50 mg/kg									
用量 (mg/kg)：	0 (対照)		1		10		50		
動物数：	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	
	10	10	10	10	10	10	10	10	10
曝露 (肝組織中濃度、μg/g)	未測定	未測定	BLQ	BLQ	45.1 (4.9)	44.0 (10.4)	214 (35.8)	220 (13.1)	
被験物質の影響による特記すべき所見									
早期死亡又は切迫殺	0	0	0	1 PND84	0	0	0	0	
体重 (g) - 生後 97 日目	37.5	31.0	37.9	29.8	38.4	29.9	39.6	31.7	
摂餌量	-	-	-	-	-	-	-	-	
眼科学的検査 (生後 91 又は 92 日目)	-	-	-	-	-	-	-	-	
一般状態	-	-	-	-	-	-	-	-	
血液学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-	

7.1 幼若 CD-1 マウスを用いた 13 週間皮下投与毒性試験 (396443-AS07) (続き)

用量 (mg/kg) :	0 (対照)		1		10		50		
動物数 :	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	
血液生化学的検査： 蛋白 (g/dL)	-	5.2	-	5.1	-	5.1	-	4.8*	
アルブミン (g/dL)	-	3.2	-	3.1	-	3.2	-	3.0	
グロブリン (g/dL)	-	2.0	-	2.0	-	1.9	-	1.8*	
肉眼的観察 :	-	-	-	-	-	-	-	-	
臓器重量 :	肝臓 (g)	1.63	1.39	1.68	-	1.79	-	1.87	-
	肝臓 (体重に対する%)	4.33	4.49	4.44	-	4.68	-	4.71*	-
	肝臓 (脳に対する%)	328	277	326	-	356	-	389**	-
	腸間膜リンパ節 (g)	0.017	0.020	0.025	0.019	0.019	0.019	0.023	0.024
	脾臓 (g)	0.093	0.106	0.085	0.103	0.104	0.105	0.111	0.120
病理組織学的検査									
評価動物数 :	10	10	10	10	10	10	10	10	
肝臓 (肥大) クッパー細胞	0	0	0	0	1	1	10	10	
軽微					1	1	8	9	
軽度					0	0	2	1	
腎臓 (好塩基性顆粒)	0	0	0	0	5	9	10	10	
軽微					5	9	8	6	
軽度					0	0	2	4	
下顎リンパ節 (空胞化マクロファージ)	0	0	0	0	2	5	9	9	
軽微					2	5	5	6	
軽度					0	0	4	3	

7.1 幼若 CD-1 マウスを用いた 13 週間皮下投与毒性試験 (396443-AS07) (続き)

用量 (mg/kg) :	0 (対照)		1		10		50	
動物数 :	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
腸間膜リンパ節 (空胞化マクロファージ)	10	10	10	10	10	10	10	10
軽微	0	0	0	0	1	3	10	9
軽度					1	3	7	8
鼠径リンパ節 (空胞化マクロファージ)	0	0	0	0	3	6	9	10
軽微					3	6	8	10
軽度					0	0	1	0
顎下腺、唾液腺 (分泌低下、顆粒管)	0	0	1	0	4	0	3	0
軽微 ^a			1		1		1	
軽度			0		3		2	
胸骨骨髓 (骨髓細胞優勢)	0	0	1	0	1	1	3	1
注射部位 (空胞化マクロファージ)	0	0	1	7	10	10	10	10
軽微			1	7	10	7	5	1
軽度			0	0	0	3	5	6
中等度			0	0	0	0	0	3

*p < 0.05

^a これらの所見の程度は、軽微、軽度、中等度、及び重度のグレーディングスケールに基づいて判定されたが、正常な生理的変動であった。

7.2 幼若カニクイザルを用いた 14 週間毒性試験 (396443-AS03)

被験物質：ISIS 396443

報告書題名：幼若カニクイザルを用いた腰椎髄腔内ボーラス注射による ISIS 396443 の 14 週間反復投与毒性試験、4 週間 試験番号：ISIS 396443-AS03
目の中間剖検及び 12 週間回復試験

動物種／系統：カニクイザル 投与期間：4 又は 14 週間。3 mg/回では週 1 回投与（計 15 回）。0、0.3 又は 1 mg/回では週 1 回を 5 週間、その後は隔週 1 回投与（計 10 回）。 CTD での記載箇所：4.2.3.2-1

開始齢：7～8 ヲ月齢（幼若） 投与後期間：12 週間 GLP 適用：適

初回投与日：20 年 月 日 投与方法：腰椎髄腔内ボーラス注射

溶媒／投与形態：水溶液（人工 CSF）；液量 0.75 mL

特記事項：幼若サルを用いた毒性評価

無毒性量：1 mg の用量で週 1 回を 5 週間、その後は隔週 1 回（総用量 10 mg）

用量 (mg/回)：	0 (対照) °		0.3		1		3°	
動物総数：	雄：8	雌：9	雄：6	雌：7	雄：6	雌：7	雄：9	雌：9

トキシコキネティクス：AUC₀₋₂₄ (hr·µg/mL)

Day 1 - 血漿	NA	1.06 ± 0.42	3.64 ± 1.09	12.0 ± 2.42
Day 29 - 血漿	NA	1.14 ± 0.27	3.93 ± 1.38	12.7 ± 4.21
Day 99 - 血漿	NA	1.05 ± 0.40	3.51 ± 0.67	11.1 ± 2.26
Day 36 - 腰部 CSF (µg/mL)	NA	0.0104 ± 0.0127	0.0233 ± 0.0268	0.0572 ± 0.0655
Day 106 - 腰部 CSF (µg/mL)	NA	0.0152 ± 0.0098	0.0108 ± 0.0085	0.0778 ± 0.0727

7.2 幼若カニクイザルを用いた 14 週間毒性試験 (396443-AS03) (続き)

試験番号 : ISIS 396443-AS03		被験物質 : ISIS 396443							
用量 (mg/回) :	0 (対照) ^e		0.3		1		3 ^e		
動物総数 :	雄 : 8	雌 : 9	雄 : 6	雌 : 7	雄 : 6	雌 : 7	雄 : 9	雌 : 9	
組織中オリゴヌクレオチド濃度 (µg/g)									
脊髄									
腰部 - Day 36	NA		12.9 ± 4.22		33.8 ± 7.77		62.9 ± 32.4		
腰部 - Day 106	NA		31.9 ± 15.5		78.6 ± 53.3		169 ± 54.2		
胸部 - Day 36	NA		8.43 ± 3.65		12.2 ± 4.07		23.3 ± 13.2		
胸部 - Day 106	NA		20.2 ± 4.59		38.4 ± 7.06		101 ± 46.5		
頸部 - Day 36	NA		7.15 ± 4.43		16.3 ± 7.83		26.7 ± 13.0		
頸部 - Day 106	NA		10.6 ± 6.21		26.8 ± 6.4		82.8 ± 27.8		
大脳皮質 - Day 36	NA		9.98 ± 1.56		26.3 ± 3.68		68.0 ± 39.3		
大脳皮質 - Day 106	NA		15.2 ± 3.9		35.4 ± 13.7		166 ± 45.8		
肝臓 - Day 36	NA		1.59 ± 0.41		16.4 ± 21.9		45.2 ± 23.8		
肝臓 - Day 106	NA		1.88 ± 0.38		42.5 ± 40.9		115 ± 65.1		
特記すべき所見									
死亡又は切迫屠殺 ^a	0	0	0	0	0	0	0	0	
体重 (%) ^b	-	-	-	-	-	-	-	-	
摂餌量 (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	
一般状態 :	-	-	-	-	-	-	-	-	
身体検査 :	-	-	-	-	-	-	-	-	
神経学的検査 :									
Day 1									
皮膚反射陰性	0	0	0	0	0	0	1	1	
尾部反射陰性	0	0	0	0	0	0	1	0	
足の感覚反射陰性	0	0	0	0	0	0	1	0	

7.2 幼若カニクイザルを用いた 14 週間毒性試験 (396443-AS03) (続き)

試験番号 : ISIS 396443-AS03		被験物質 : ISIS 396443							
用量 (mg/回) :	0 (対照) ^e		0.3		1		3 ^e		
動物総数 :	雄 : 8	雌 : 9	雄 : 6	雌 : 7	雄 : 6	雌 : 7	雄 : 9	雌 : 9	
Day 29 ^d									
皮膚反射陰性	0	0	0	0	0	0	3	2	
尾部反射陰性	0	0	0	0	0	0	4	1	
足の感覚反射陰性	0	0	0	0	0	0	1	0	
Day 99 ^f									
尾部反射陰性	0	0	0	0	0	0	0	1	
足の感覚反射陰性	0	0	0	0	0	0	0	1	
心電図 :	-	-	-	-	-	-	-	-	
眼科学的検査 :	-	-	-	-	-	-	-	-	
血液学的検査 :	-	-	-	-	-	-	-	-	
血液生化学的検査 :	-	-	-	-	-	-	-	-	
尿検査 :	-	-	-	-	-	-	-	-	
CSF 生化学的検査 :	-	-	-	-	-	-	-	-	
CSF 細胞数 :	-	-	-	-	-	-	-	-	
補体 :	-	-	-	-	-	-	-	-	
血中 Bb (µg/mL) - Day 99	2.20		2.49		1.83		2.12		
CSF 中 Bb (µg/mL) - Day 106	0.27		0.05		0.17		0.21		
臓器重量 :	-	-	-	-	-	-	-	-	
肉眼的観察 :	-	-	-	-	-	-	-	-	
評価動物数 :	8	9	6	7	6	7	8	9	

7.2 幼若カニクイザルを用いた 14 週間毒性試験 (396443-AS03) (続き)

試験番号 : ISIS 396443-AS03		被験物質 : ISIS 396443							
用量 (mg/回) :	0 (対照) ^e		0.3		1		3 ^e		
動物総数 :	雄 : 8	雌 : 9	雄 : 6	雌 : 7	雄 : 6	雌 : 7	雄 : 9	雌 : 9	
病理組織学的検査 ^c :									
評価動物数 (Day 36) :	3	3	3	3	3	3	3	3	
ミクログリア細胞増殖 - 極微	0	0	0	0	1	0	0	0	
脳及び脊髄の血管周囲細胞浸潤 - 極微	0	0	0	0	1	0	0	0	
評価動物数 (Day 106) :	3	4	3	4	3	4 ^h	3	4	
脳									
海馬空胞化 - 極微～軽微	0	0	0	0	1	0	3	4	
海馬神経細胞壊死、 単一細胞	0	0	0	0	0	0	0	1	
海馬グリア細胞壊死、 1 又は 2 細胞	0	0	0	0	0	0	1	0	
髄膜における細胞浸潤増加 ^g	3	3	2	2	3	2	3	0	
腰髄									
血管周囲マクロファージ灰白質 - 軽微	0	0	0	0	0	0	0	1	

7.2 幼若カニクイザルを用いた 14 週間毒性試験 (396443-AS03) (続き)

試験番号 : ISIS 396443-AS03	被験物質 : ISIS 396443							
用量 (mg/回) :	0 (対照) ^e		0.3		1		3 ^e	
動物総数 :	雄 : 8	雌 : 9	雄 : 6	雌 : 7	雄 : 6	雌 : 7	雄 : 9	雌 : 9
病理組織学的検査 ^c :								
回復試験 :								
評価数 (Day 183) :	2	2	0	0	0	0	2	2
脳								
海馬空胞化 - 極微～軽微	0	0	NA	NA	NA	NA	2	2
海馬グリア細胞壊死、 1 又は 2 細胞	0	0	NA	NA	NA	NA	0	1
腰髄								
血管周囲マクロファージ、 中心管 - 極微	0	0	NA	NA	NA	NA	0	1

- : 特記すべき所見なし、NA : 該当なし、性別のトキシコキネティクスデータは M2.6.5 を参照。

^a 3 mg/週の用量で 14 週間評価群に割付けた雄 1 匹が死亡したが、ISIS 396443 の投与に関連しないと判断され、この個体の代替として Day 8 に新たな雄を入れた。

^b Day 106 の剖検時。対照群は群平均値を示す。投与群は、対照群との相対的な差 (%) を示す。統計的有意性は相対的な差 (%) ではなく実測値に基づいて検定した

^c 偶発的変化及び投与用カテーテル留置に関連した変化は記載しない

^d Day 1 に単一個体で認められた神経学的検査における変化は、Day 29 にも単一個体で認められた。これらの変化は投与 4 時間後に認められ、完全に回復した

^e この用量でのみ回復評価を行った (雌雄各 2 匹)

^f Day 1 に単一個体で認められた神経学的検査における変化は、Day 29 及び 99 にも単一個体で認められた。これらの変化は投与 4 時間後に認められ、完全に回復した

^g 平均重症度スコア

^h Day 64 (7 回目の投与から 7 日後) に、投与カテーテルが機能しなかったため雌 1 匹を屠殺した

7.3 幼若カニクイザルを用いた 1 年間毒性試験 (396443-AS06)

		被験物質：ISIS 396443							
報告書題名：幼若カニクイザルを用いた 1 年間 (53 週間) 反復投与毒性試験及び 26 週間回復期		試験番号：ISIS 396443-AS06							
動物種/系統：カニクイザル		投与期間：53 週間。週 1 回を 5 週間、その後は 6 週に 1 回投与 (計 13 回)。						CTD での記載箇所：4.2.3.2-2	
開始齢：9~11 ヲ月齢		回復期間：26 週間						GLP 適用：適	
初回投与日：20■■年■■月■■日		投与方法：腰椎髄腔内ボラス注射							
溶媒/投与形態：水溶液 (人工 CSF) ; 液量 0.75 mL									
特記事項：学習能力検査、骨格成長及び免疫系パラメータの測定									
無毒性量：0.3 mg の用量で 6 週に 1 回 (総用量 3.9 mg)									
用量 (mg/回) :		0 (対照) ^a		0.3		1.0		4.0 ^a	
		雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
主試験動物数 :		5	5	5	5	5	5	5	5
回復試験動物数 :		2	2	0	0	0	0	2	2
血漿中トキシコキネティクス :									
Day 1 : AUC _{0-24hr} (hr·µg/mL)		NA		0.983 ± 0.186		4.02 ± 0.915		22.8 ± 8.18	
C _{max} (µg/mL)		NA		0.122 ± 0.036		0.569 ± 0.2		3.74 ± 1.72	
T _{max} (hr)		NA		2 (1 - 4)		2 (1 - 4)		4 (2 - 8)	
Day 365 : AUC _{0-24hr} (hr·µg/mL)		NA		0.626 ± 0.197		2.79 ± 1.59		9.59 ± 1.90	
C _{max} (µg/mL)		NA		0.0859 ± 0.0514		0.454 ± 0.258		1.52 ± 0.535	
T _{max} (hr)		NA		2 (1 - 6)		3 (0.5 - 6)		2 (1 - 6)	

7.3 幼若カニクイザルを用いた1年間毒性試験 (396443-AS06) (続き)

試験番号 : ISIS 396443-AS06		被験物質 : ISIS 396443							
用量 (mg/回) :	0 (対照) ^a		0.3		1.0		4.0 ^a		
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	
主試験動物数 :	5	5	5	5	5	5	5	5	
回復試験動物数 :	2	2	0	0	0	0	2	2	
組織中濃度 (μg/g) – Day 372									
主試験動物 (雌雄各 5 匹)									
小脳	NA		4.27 ± 1.39		20.8 ± 16.0		39.6 ± 19.7		
大脳皮質	NA		4.23 ± 1.89		16.6 ± 5.97		71.3 ± 29.3		
海馬	NA		10.1 ± 2.81		28.9 ± 10.3		88.9 ± 18.0		
脳橋	NA		4.14 ± 3.06		8.84 ± 3.97		34.2 ± 15.5		
頸髄	NA		6.68 ± 2.78		15.9 ± 5.14		35.1 ± 11.0		
胸髄	NA		14.0 ± 9.34		23.0 ± 10.6		59.8 ± 11.7		
腰髄	NA		21.4 ± 9.28		53.5 ± 33.6		99.0 ± 71.5		
腎皮質	NA		23.7 ± 17.6		42.8 ± 19.0		239 ± 176		
肝臓	NA		0.850 ± 0.430		2.79 ± 1.64		21.9 ± 9.16		
組織中濃度 (μg/g) – Day 554									
回復試験動物 (雌雄各 2 匹)									
小脳	NA		NA		NA		34.5 ± 23.2		
大脳皮質	NA		NA		NA		43.8 ± 4.41		
海馬	NA		NA		NA		46.0 ± 7.75		
脳橋	NA		NA		NA		16.6 ± 4.27		
頸髄	NA		NA		NA		18.4 ± 6.05		
胸髄	NA		NA		NA		20.3 ± 5.60		
腰髄	NA		NA		NA		39.7 ± 10.8		
腎皮質	NA		NA		NA		6.17 ± 3.54		
肝臓	NA		NA		NA		0.101 ± 0.0675		

7.3 幼若カニクイザルを用いた1年間毒性試験 (396443-AS06) (続き)

試験番号 : ISIS 396443-AS06		被験物質 : ISIS 396443							
用量 (mg/回) :	0 (対照) ^a		0.3		1.0		4.0 ^a		
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	
主試験動物数 :	5	5	5	5	5	5	5	5	
回復試験動物数 :	2	2	0	0	0	0	2	2	
CSF 中濃度 (ng/mL) :									
Day 8	NA		14.1 ± 16.9		13.4 ± 6.54		18.5 ± 11.3		
Day 29	NA		33.6 ± 36.3		32.1 ± 16.0		53.6 ± 32.5		
Day 71	NA		14.3 ± 10.4		18.8 ± 7.39		30.8 ± 10.8		
Day 281	NA		15.0 ± 15.8		28.0 ± 26.2		42.1 ± 27.5		
Day 372	NA		12.0 ± 10.6		23.3 ± 16.7		51.8 ± 37.8		
Day 554	NA		NA		NA		10.3 ± 8.86		
特記すべき所見 :									
死亡又は切迫屠殺	-	-	-	-	-	-	-	-	
体重 (%) ^b	-	-	-	-	-	-	-	-	
摂餌量 (%) ^b	-	-	-	-	-	-	-	-	
一般状態	-	-	-	-	-	-	-	-	
身体検査	-	-	-	-	-	-	-	-	

7.3 幼若カニクイザルを用いた1年間毒性試験 (396443-AS06) (続き)

試験番号 : ISIS 396443-AS06		被験物質 : ISIS 396443							
用量 (mg/回) :	0 (対照) ^a		0.3		1.0		4.0 ^a		
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	
主試験動物数 :	5	5	5	5	5	5	5	5	
回復試験動物数 :	2	2	0	0	0	0	2	2	
神経学的検査 :									
脊髄下部反射低下/消失 - Day 1 ^b									
足の把握反射	-	-	-	-	-	-	1	4	
膝蓋腱反射	-	-	-	-	-	-	1	4	
脊髄下部反射低下/消失 - Day 29 ^b									
肛門反射	-	-	-	-	-	-	-	1	
膝蓋腱反射	-	-	-	-	-	-	-	2	
脊髄下部反射低下/消失 - Day 71 ^b									
足の把握反射	-	-	-	-	-	-	1	-	
膝蓋腱反射	-	-	-	-	-	-	1	-	
脊髄下部反射低下/消失 - Day 197 ^b									
膝蓋腱反射	-	-	-	-	-	-	-	1	
脊髄下部反射低下/消失 - Day 365 ^b									
足の把握反射	-	-	-	-	-	-	1	-	
膝蓋腱反射	-	-	-	-	-	-	1	-	
学習能力 (学習検査完了に要した日数 ±SD) :									
投与前	9.7 ± 6.4	12.0 ± 4.7	9.8 ± 3.7	16.8 ± 6.0	10.6 ± 4.8	16.0 ± 4.4	7.6 ± 3.3	11.0 ± 4.2	
25~28 週目	10.4 ± 5.6	12.1 ± 3.3	12.2 ± 6.8	11.0 ± 1.4	16.3 ± 6.8	16.8 ± 3.2	7.3 ± 2.7	12.5 ± 5.6	
49~52 週目	6.0 ± 2.8	5.3 ± 2.6	7.4 ± 3.0	5.0 ± 1.0	7.0 ± 1.9	4.6 ± 1.5	9.1 ± 4.6	7.2 ± 3.4	
回復評価 22~26 週目 (2 匹)	5.0	3.5	NA	NA	NA	NA	10.0	6.0	

7.3 幼若カニクイザルを用いた1年間毒性試験 (396443-AS06) (続き)

試験番号 : ISIS 396443-AS06		被験物質 : ISIS 396443							
用量 (mg/回) :	0 (対照) ^a		0.3		1.0		4.0 ^a		
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	
主試験動物数 :	5	5	5	5	5	5	5	5	
回復試験動物数 :	2	2	0	0	0	0	2	2	
神経行動学的観察	-	-	-	-	-	-	-	-	
眼科学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-	
動脈血圧	-	-	-	-	-	-	-	-	
心電図	-	-	-	-	-	-	-	-	
骨密度 (BMD)	-	-	-	-	-	-	-	-	
骨塩量 (BMC)	-	-	-	-	-	-	-	-	
大腿骨長	-	-	-	-	-	-	-	-	
血液学的検査/凝固検査	-	-	-	-	-	-	-	-	
血液生化学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-	
尿検査	-	-	-	-	-	-	-	-	
T細胞依存性抗体反応 (TDAR) ^c	-	-	NA	NA	NA	NA	-	-	
CSF 生化学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-	
CSF 細胞数	-	-	-	-	-	-	-	-	
CSF 補体 Bb (µg/mL)	-	-	-	-	-	-	-	-	
抗薬物抗体	-	-	-	-	1 ¹	-	1 ²	1 ²	
主試験剖検 (Day 372)									
評価動物数 :	5	5	5	5	5	5	5	5	
臓器重量	-	-	-	-	-	-	-	-	
肉眼的観察	-	-	-	-	-	-	-	-	

7.3 幼若カニクイザルを用いた1年間毒性試験 (396443-AS06) (続き)

試験番号 : ISIS 396443-AS06		被験物質 : ISIS 396443							
用量 (mg/回) :	0 (対照) ^a		0.3		1.0		4.0 ^a		
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	
主試験動物数 :	5	5	5	5	5	5	5	5	
回復試験動物数 :	2	2	0	0	0	0	2	2	
病理組織学的検査 :									
脳									
海馬下部ニューロンの空胞化、大 - 極微～軽度	0	0	0	0	2	0	3	2	
海馬下部 CA3 内側領域ニューロンの空胞化	0	0	0	0	0	0	0	1	
海馬下部の空胞／綿状物質 - 極微～軽微	0	0	0	0	0	0	2	1	
海馬下部の細胞壊死／細胞残屑 - 軽微	0	0	0	0	1	0	3	0	
海馬下部の細胞壊死／細胞残屑 - 極微	0	0	NA	NA	NA	NA	1	0	

7.3 幼若カニクイザルを用いた1年間毒性試験(396443-AS06)(続き)

試験番号：ISIS 396443-AS06		被験物質：ISIS 396443							
用量 (mg/回)：	0 (対照) ^a		0.3		1.0		4.0 ^a		
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	
主試験動物数：	5	5	5	5	5	5	5	5	
回復試験動物数：	2	2	0	0	0	0	2	2	
回復試験剖検 (Day 554)									
評価動物数：	2	2	0	0	0	0	2	2	
臓器重量	-	-	NA	NA	NA	NA	-	-	
肉眼的観察	-	-	NA	NA	NA	NA	-	-	
病理組織学的検査：									
脳									
海馬下部ニューロンの空胞化、大型 - 極微～軽度	0	0	NA	NA	NA	NA	2	1	
海馬下部 CA3 内側領域ニューロンの空胞化、大型空胞	0	0	NA	NA	NA	NA	0	0	
海馬下部の空胞／綿状物質 - 極微～軽微	0	0	NA	NA	NA	NA	1	0	
海馬下部の細胞壊死／細胞残屑 - 極微	0	0	NA	NA	NA	NA	1	0	

-：特記すべき所見なし、NA：該当なし、性別のトキシコキネティクスのデータは M2.6.5 を参照。

^a この用量でのみ回復評価を行った（雌雄各2匹）

^b これらの変化は当初投与後4～8時間に認められ、一般に24～48時間以内に回復した。

^c TDAR：T細胞依存性抗体反応

1 Day 197

2 Day 113、197、323

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 (396443-IS02)

報告書題名：細菌を用いた復帰突然変異試験		被験物質：ISIS 396443
評価内容：細菌細胞における復帰突然変異誘発性		試験番号：ISIS 396443-IS02
細菌種：Salmonella typhimurium / Escherichia coli	独立試験回数：2	CTD での記載箇所：4.2.3.3.1-1
代謝系：アロクロール誘導ラット肝 S9	培養繰り返し数：2回 (試験#1)、3回 (試験#2)	GLP 適用：適
被験物質の溶媒：リン酸緩衝 0.9%生理食塩水 (PBS)	分析/培養細胞数：N/A	
処理：プレート法で最初の試験 (#1) 及び確認試験 (#2) を実施	陽性対照の溶媒：ジメチルスルホキシド、ただしアジ化ナトリウムには水	処理日：20 年 月 日 (#1) 20 年 月 日 (#2)
細胞毒性作用：なし		
遺伝毒性作用：なし		

		試験#1 - 復帰突然変異コロニー数 (平均 ± SD)					
代謝活性化	被験物質	用量 (μg/プレート)	TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2 <i>uvrA</i>
代謝活性化なし	溶媒	50 μL	14 ± 7	112 ± 12	14 ± 1	7 ± 4	46 ± 13
		1.5	17 ± 4	108 ± 1	7 ± 3	9 ± 6	41 ± 1
		5	21 ± 10	98 ± 19	7 ± 3	7 ± 1	43 ± 8
		15	21 ± 4	85 ± 0	14 ± 1	6 ± 4	53 ± 2
		50	17 ± 8	101 ± 18	13 ± 4	9 ± 1	41 ± 1
		150	20 ± 3	93 ± 5	11 ± 4	5 ± 1	38 ± 8
		500	20 ± 4	95 ± 3	12 ± 8	6 ± 3	44 ± 9
		1500	22 ± 2	80 ± 0	9 ± 4	4 ± 1	30 ± 5
		5000	24 ± 3	99 ± 23	11 ± 3	4 ± 1	45 ± 7
		2-ニトロフルオレン ^a	1	185 ± 14			
	アジ化ナトリウム ^a	1		636 ± 49	514 ± 0		
	9-アミノアクリジン ^a	75				690 ± 136	

8.1 細菌を用いた復帰突然変異試験 (396443-IS02) (続き)

試験番号 : ISIS 396443-IS02			被験物質 : ISIS 396443				
代謝活性化	被験物質	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	試験#1 - 復帰突然変異コロニー数 (平均 \pm SD)				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2 <i>uvrA</i>
代謝活性化なし	メタンサルホン酸メチル ^a	1000					380 \pm 18
代謝活性化あり	溶媒	50 μL	34 \pm 4	113 \pm 11	10 \pm 1	5 \pm 1	57 \pm 4
		1.5	28 \pm 1	114 \pm 1	9 \pm 1	5 \pm 2	42 \pm 6
		5	33 \pm 7	103 \pm 13	12 \pm 3	7 \pm 1	50 \pm 13
		15	28 \pm 13	105 \pm 2	12 \pm 1	9 \pm 0	40 \pm 17
	ISIS 396443	50	25 \pm 4	122 \pm 3	16 \pm 6	8 \pm 2	51 \pm 11
		150	25 \pm 3	115 \pm 2	12 \pm 1	10 \pm 6	44 \pm 5
		500	32 \pm 0	112 \pm 1	15 \pm 6	6 \pm 3	44 \pm 2
		1500	34 \pm 13	121 \pm 2	12 \pm 5	6 \pm 3	46 \pm 13
		5000	30 \pm 2	126 \pm 0	8 \pm 2	8 \pm 3	55 \pm 4
		1	335 \pm 24		108 \pm 16	86 \pm 5	
	2-アミノアントラセン ^a	2		561 \pm 31			
		15					215 \pm 4

8.1 細菌を用いた復帰突然変異試験 (396443-IS02) (続き)

試験番号 : ISIS 396443-IS02			被験物質 : ISIS 396443				
代謝活性化	被験物質	用量 (μg /プレート)	試験#2 - 復帰突然変異体数/プレート (平均 \pm SD)				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2 <i>uvrA</i>
代謝活性化なし	溶媒	50 μL	11 \pm 3	97 \pm 12	14 \pm 6	7 \pm 2	38 \pm 2
		50 μg	21 \pm 5	91 \pm 6	20 \pm 8	6 \pm 4	33 \pm 6
	ISIS 396443	150 μg	16 \pm 6	101 \pm 9	16 \pm 7	6 \pm 2	37 \pm 9
		500 μg	12 \pm 3	91 \pm 5	8 \pm 1	4 \pm 1	40 \pm 1
		1500 μg	16 \pm 3	107 \pm 17	14 \pm 6	5 \pm 1	46 \pm 1
		5000 μg	14 \pm 4	90 \pm 8	14 \pm 7	3 \pm 1	44 \pm 5
		2-ニトロフルオレン ^a	1.0 μg	318 \pm 63			
	アジ化ナトリウム ^a	1.0 μg	707 \pm 52		188 \pm 62		
	9-アミノアクリジン ^a	75 μg	812 \pm 79				
メタンサルホン酸メチル ^a	1000 μg	384 \pm 9					
代謝活性化あり	溶媒	50 μL	21 \pm 6	120 \pm 12	14 \pm 3	4 \pm 1	49 \pm 3
		50 μg	31 \pm 4	129 \pm 12	14 \pm 4	6 \pm 3	54 \pm 6
		150 μg	29 \pm 5	132 \pm 6	20 \pm 7	6 \pm 3	49 \pm 7
	ISIS 396443	500 μg	26 \pm 10	129 \pm 1	17 \pm 4	5 \pm 3	42 \pm 10
		1500 μg	28 \pm 9	130 \pm 7	15 \pm 2	7 \pm 5	50 \pm 8
		5000 μg	28 \pm 6	123 \pm 8	14 \pm 4	3 \pm 1	52 \pm 9
		1.0 μg	309 \pm 23	107 \pm 15		140 \pm 36	
	2-アミノアントラセン ^a	2.0 μg	612 \pm 31				
		15 μg	196 \pm 45				

^a 陽性対照

8.2 哺乳類培養細胞を用いた染色体異常試験 (396443-IS03)

報告書題名：哺乳類培養細胞を用いた <i>In Vitro</i> 染色体異常試験		被験物質：ISIS 396443
評価内容：染色体異常誘発性		試験番号：ISIS 396443-IS03
細胞株：チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞	独立試験回数：1	CTD での記載箇所：4.2.3.3.1-2
代謝系：アロクロールで酵素誘導したラット肝の S9	培養繰り返し数：2	GLP 適用：適
分析/培養細胞数：100 個で構造的異常、100 個で数的異常；陽性対照は 50 個で構造的異常、100 個で数的異常		
被験物質の溶媒：リン酸緩衝 0.9%生理食塩水 (PBS) 陽性対照の溶媒：水		
処理：S9 未添加で 20 時間、S9 添加で 4 時間；S9 添加及び未添加で 16 時間の回復期間		処理日：20 年 月 日
細胞毒性作用：5000 µg/mL の濃度まで陰性		
遺伝毒性作用：アロクロール誘導ラット肝 S9 添加でも未添加でも陰性		

代謝活性化	被験物質	濃度 (µg/mL)	細胞毒性 ^a (対照と比較した%)	異常細胞		細胞当たりの異常数 ^{b,d}	総倍数体細胞数 (平均%) ^e
				構造的 ^b	数的 ^c		
20 時間連続処理、 代謝活性化なし	溶媒	0	NA	0.5	1.5	0.005 ± 0.071	1.5
	ISIS 396443	2000	-4	0.0	2.0	0.000 ± 0.000	2.0
		3500	-3	0.5	0.5	0.005 ± 0.071	0.5
		5000	-2	1.0	1.0	0.010 ± 0.100	1.0
		マイトマイシン C ^a	0.1	28	18.0 **	1.0	0.190 ± 0.419
4 時間処理後に 16 時間回復、代 謝活性化なし	溶媒	0	NA	0.0	1.5	0.000 ± 0.000	1.5
	ISIS 396443	2000	1	0.0	3.0	0.000 ± 0.000	3.0
		3500	7	0.0	1.5	0.000 ± 0.000	1.5
		5000	-5	0.0	2.0	0.000 ± 0.000	2.0
		マイトマイシン C ^a	0.2	13	14.0**	1.0	0.150 ± 0.386

8.2 哺乳類培養細胞を用いた染色体異常試験 (396443-ISIS) (続き)

試験番号 : ISIS 396443-ISIS			被験物質 : ISIS 396443				
代謝活性化	被験物質	濃度 (µg/mL)	細胞毒性 ^a (対照と比較した%)	異常細胞		細胞当たりの異常数 ^{b,d}	総倍数体細胞数 (平均%) ^e
				構造的 ^b	数的 ^c		
4 時間処理後に 16 時間回復、代 謝活性化あり	溶媒	0	NA	0.0	3.0	0.000 ± 0.000	2.0
	ISIS 396443	2000	-19	0.0	1.0	0.000 ± 0.000	1.0
		3500	-17	0.0	1.0	0.000 ± 0.000	1.0
		5000	-16	0.0	1.0	0.000 ± 0.000	1.0
	シクロホスファミド ^a	10	59	15.0**	2.5	0.210 ± 0.537	2.5

NA : 該当なし。フィッシャーの正確確率検定 : * p ≤ 0.5、** p ≤ 0.01

^a 細胞増殖阻害に基づく

^b ギャップのみの細胞は含まない

^c 倍数体細胞及び核内倍加細胞が含まれる

^d 高度損傷細胞を異常数 10 とした

^e 核内倍加細胞は含まない

9 In Vivo 遺伝毒性試験

9.1 マウス小核試験 (396443-AS10)

報告書題名：ICR マウスの皮下注射後の骨髓赤血球を用いた哺乳類小核試験				被験物質：ISIS 396443			
評価内容：染色体異常誘発性及び分裂阻害			処理予定：単回投与		試験番号：ISIS 396443-AS10		
動物種／系統：ICR マウス			試料採取時点：24 及び 48 時間		CTD での記載箇所： 4.2.3.3.2-1		
年齢：投与時に約 7 週齢			投与方法：皮下注射				
被験細胞：骨髓細胞			溶媒／投与形態：0.9% NaCl		GLP 適用：適		
個体当たりの評価 PCE 数：4000 個					動物受領日：20 年 月 日 投与日：1 週間後		
毒性／細胞毒性作用：高用量 (750 mg/kg) で PCE : NCE 比に対する影響なし							
遺伝毒性作用：なし							
被験物質	用量 (mg/kg)	動物数	採取時点	PCE4000 個当たりの小核 PCE 数平均 (SD)		PCE : NCE 比 平均 (SD)	
				雄	雌	雄	雌
溶媒対照 (生理食塩水)	0	雌雄各 6	24 時間	5.83 (2.23)	5.83 (1.83)	0.52 (0.05)	0.62 (0.07)
		雌雄各 6	48 時間	6.83 (1.94)	5.00 (1.55)	0.53 (0.03)	0.52 (0.07)
陽性対照 (シクロホスファミド)	70 (IP)	雌雄各 6	24 時間	183 (31.7)	142 (26.7)	0.51 (0.06)	0.53 (0.04) *
ISIS 396443	188	雌雄各 6	24 時間	7.67 (2.42)	5.50 (2.51)	0.52 (0.06)	0.60 (0.06)
		雌雄各 6	48 時間	6.67 (1.03)	4.67 (2.07)	0.55 (0.02)	0.58 (0.05)
	375	雌雄各 6	24 時間	6.00 (2.10)	5.67 (2.07)	0.55 (0.08)	0.64 (0.04)
		雌雄各 6	48 時間	6.83 (2.79)	6.50 (2.66)	0.57 (0.04)	0.61 (0.06)
	750	雌雄各 6	24 時間	8.00 (2.90)	5.00 (1.90)	0.54 (0.08)	0.61 (0.03)
		雌雄各 6	48 時間	8.00 (2.28)	5.33 (1.21)	0.54 (0.04)	0.57 (0.09)

PCE：多染性赤血球、NCE：正染性赤血球、SD：標準偏差、*：P≤0.05 で統計的に有意

10 がん原性試験

現時点ではがん原性試験は実施されていない。

11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

11.1 ウサギを用いた用量設定毒性試験

動物種／系統	投与方法 (溶媒／投与形態)	投与期間	用量 (mg/kg)	各群の動物数	特記すべき所見	試験番号
<i>Oryctolagus cuniculus</i> ／ニュージーランド ホワイトウサギ	皮下 (SC) 注射を隔 日 1 回 (滅菌生理食 塩水)	妊娠 6～18 日目に 隔日 1 回	0 (対照) 5、15 及び 30	雌 7 匹	早産、 軽度の摂餌量減少	396443-AS09P

12 生殖・発生毒性試験：受胎能及び胚・胎児発生毒性試験（重要な試験）

12.1 マウスを用いた受胎能及び発生毒性の併合試験（396443-AS08）

試験番号：ISIS 396443-AS08		被験物質：ISIS 396443
報告書題名：CD-1 マウスを用いた皮下注射による ISIS 396443 の受胎能及び発生併合毒性試験		試験番号：ISIS 396443-AS08
動物種／系統：CD-1 マウス (<i>Mus musculus</i>)	投与期間： 雄：計 10 週間（4 週間の交配前期間、交配期間中及び交配後を含む）、 隔日 1 回 雌：2 週間の交配前期間、交配期間中、及び妊娠 15 日目（GD 15）ま で、隔日 1 回	CTD での記載箇所：4.2.3.5.1-1
開始齢：受領時に 50～66 日齢	交配日：妊娠 0 日目	GLP 適用：適
初回投与日： 20 年 月 日～20 年 月 日（雄） 20 年 月 日～20 年 月 日（雌）	帝王切開日：妊娠 18 日目	試験デザイン：ICH 4.1.1 に準拠
投与方法：皮下（SC）注射を隔日 1 回		溶媒／投与形態：滅菌生理食塩水
高用量の設定根拠：類似の 2'-MOE 修飾オリゴヌクレオチドで実施済みの CD-1 マウスを用いた受胎能及び発生の併合毒性試験で得られた結果に基づく。高用量（87.5 mg/kg/週）では、肝アミノトランスフェラーゼの増加や臓器重量の変化などの影響が認められると予想される。		
無毒性量：		
F ₀ 雄：	25 mg/kg ISIS 396443（87.5 mg/kg/週）	
F ₀ 雌：	25 mg/kg ISIS 396443（87.5 mg/kg/週）	
胚・胎児発生及び 受胎（精）能	25 mg/kg ISIS 396443（87.5 mg/kg/週）	

12.1 マウスを用いた受胎能及び発生毒性の併合試験 (396443-AS08) (続き)

試験番号 : ISIS 396443-AS08		被験物質 : ISIS 396443							
1 日用量 (mg/kg) :	0 (対照)		3		10		25		
1 週間用量 (mg/kg/週)	0 (対照)		10.5		35		87.5		
性別	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	
主試験動物数	25	25	25	25	25	25	25	25	
TK 評価動物数	6	6	6	6	6	6	6	6	
雄 ^a									
組織中トキシコキネティクス* : 肝 (µg/g ± SD) 各群 6 匹	BLQ		185 ± 23.6		478 ± 131		989 ± 255		
死亡又は切迫屠殺数	-		1b		1c		-		
一般状態	-		-		-		-		
体重 (g) - Day 15~71	38.3-43.4		-		40.3-47.0*		40.0-45.3*		
摂餌量 (%)	-		-		-		-		
血液学的検査 - Day 71 ^d (7~12 匹) :									
ヘモグロビン (g/dL)	13		-		-		-5.4% *		
平均赤血球ヘモグロビン量 (pg)	15		-		-		-7.6% ***		
平均赤血球容量 (fL)	49.5		-		-		-6.7% ***		
赤血球粒度分布幅 (%)	12.4		-		-		7.4% ***		
白血球数 (×10 ³ /µL)	2.8		-		-		63.4% **		
好中球数 (×10 ³ /µL)	0.55		-		69.9% *		144.6% ***		
単球数 (×10 ³ /µL)	0.09		-		132.0% **		216.5% ***		

12.1 マウスを用いた受胎能及び発生毒性の併合試験 (396443-AS08) (続き)

試験番号：ISIS 396443-AS08				被験物質：ISIS 396443				
1 日用量 (mg/kg) :	0 (対照)		3		10		25	
1 週間用量 (mg/kg/週)	0 (対照)		10.5		35		87.5	
性別	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
血液生化学的検査 - Day 71 ^d (13 匹) :								
アルブミン (g/dL)	2.7		-		-7.4% ***		-14.8% ***	
総蛋白 (g/dL)	5.0		-		-8.0% **		-8.0% ***	
アルブミン/グロブリン	1.2		-		-		-13.0% **	
アラニンアミノトランスフェラーゼ (U/L)	36		-		-		138% *	
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (U/L)	49		-		-		115% *	
トリグリセリド (mg/dL)	122		-		-		-34.0% *	
肉眼的観察 :								
腎臓の褪色	-		-		-		1	
脾臓腫大	-		-		-		2	
臓器重量、絶対値								
肝臓 (胆嚢を含む)	2.0396 g		-		14% **		20% ***	
脾臓	0.1153 g		-		19% *		66% ***	

12.1 マウスを用いた受胎能及び発生毒性の併合試験（396443-AS08）（続き）

試験番号：ISIS 396443-AS08				被験物質：ISIS 396443				
1 日用量 (mg/kg) :	0 (対照)		3		10		25	
1 週間用量 (mg/kg/週)	0 (対照)		10.5		35		87.5	
性別	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
病理組織学的検査 (12 匹)								
腎臓								
軽微～軽度の皮質尿細管細胞質内顆粒	-		-		4		9	
軽微～軽度の尿細管変性／再生	3		1		3		9	
肝臓								
軽微～軽度のクッパー細胞肥大	-		4		12		12	
軽微の肉芽腫	-		2		4		6	
中等度～重度の肉芽腫	-		-		-		5	
精巣								
間質細胞空胞化、多巢性、軽度～中等度	-		NA		NA		12	
各種組織 ^o								
マクロファージ／単核細胞浸潤	-		p		p		p	

12.1 マウスを用いた受胎能及び発生毒性の併合試験 (396443-AS08) (続き)

試験番号：ISIS 396443-AS08		被験物質：ISIS 396443							
1 日用量 (mg/kg) :	0 (対照)	3		10		25			
1 週間用量 (mg/kg/週)	0 (対照)	10.5		35		87.5			
性別	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	
雌 ^a									
組織中トキシコキネティクス* :									
肝 (µg/g ± SD) 各群 5~6 匹	BLQ	69.2 ± 10.9		164 ± 32.7		417 ± 57.0			
プール胎盤組織 (µg/g ± SD) 各群 5~6 腹	NA	BLQ		BLQ		9.60 ± 4.82			
胎児肝臓 (µg/g)	NA	BLQ		BLQ		BLQ			
死亡又は切迫屠殺数	-	-		-		-			
一般状態	-	-		-		-			
体重 (g)	-	-		-		-			
摂餌量 (%)	-	-		-		-			
血液学的検査 - Day 71 (7~12 匹)	-	-		-		-			
血液生化学的検査 - Day 71 (13 匹)	-	-		-		-			
トリグリセリド (mg/dL)	301	-		44.0% *		-			
肉眼的観察 :									
腎臓の褪色	-	-		2		1			
臓器重量、絶対値	-	-		-		-			

12.1 マウスを用いた受胎能及び発生毒性の併合試験 (396443-AS08) (続き)

試験番号 : ISIS 396443-AS08		被験物質 : ISIS 396443							
1 日用量 (mg/kg) :	0 (対照)	3		10		25			
1 週間用量 (mg/kg/週)	0 (対照)	10.5		35		87.5			
性別	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	
病理組織学的検査 (12 匹)	--		--		--		--		
腎臓									
軽微～軽度の好塩基性 - 皮質尿細管細胞質	0		6		11		12		
軽微～軽度の尿細管変性/再生	0		1		0		1		
肝臓									
軽微～軽度のクッパー細胞肥大	--		--		--		1		
各種組織 ^o									
マクロファージ/単核細胞浸潤	-		p		p		p		
同居動物数	31		31		31		31		
交尾動物数	30		28		29		31		
妊娠動物数	22		29		27		26		
流産又は全胚吸収動物数									
投与前の平均性周期 (Day -14~-1、日数)	5.0		4.5		5.1		5.1		
Day 1~14 の平均性周期 (投与期間中、日数)	4.5		4.4		4.7		4.5		
平均妊娠子宮重量 (±SD、g)	22.4 ± 5.93		23.7 ± 4.53		23.8 ± 4.57		23.3 ± 3.94		
平均黄体数 (±SD)	15 ± 4		16 ± 2		15 ± 2		17 ± 3		
平均着床数 (±SD)	14 ± 3		14 ± 3		14 ± 2		15 ± 2		
平均着床率 (%)	109		90		94		90		

12.1 マウスを用いた受胎能及び発生毒性の併合試験（396443-AS08）（続き）

試験番号：ISIS 396443-AS08		被験物質：ISIS 396443								
1日用量（mg/kg）：		0（対照）		3		10		25		
1週間用量（mg/kg/週）		0（対照）		10.5		35		87.5		
性別		雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	
生殖能										
受胎率（妊娠動物数/同居した雌の数）（各群 31 対）		71%		93.5%		87.1%		83.9%		
受精率（妊娠動物数/交尾が確認された雌の数）（各群雌 31 匹）		70%		92.9%		86.2%		83.9%		
精液分析（各群 24～25 匹）										
精子濃度		-		-		-		-		
精子運動能		-		-		-		f		
精子形態		-		-		-		-		
同腹児：										
評価母動物数		15		21		18		20		
生存胎児数		93		136		114		132		
同腹児当たりの平均生存胎児数（±SD）		13 ± 4		13 ± 3		13 ± 3		13 ± 3		
平均早期吸収胚数（±SD）		2 ± 2		1 ± 1		1 ± 2		1 ± 1		
平均後期吸収胚数（±SD）		0 ± 0		0 ± 0		0 ± 0		0 ± 0		
同腹児当たりの平均死亡胎児数（±SD）		0 ± 0		0 ± 0		0 ± 0		0 ± 0		
平均着床後胚損失率（±SD、%）		0 ± 0		0 ± 0		0.4 ± 1.8		1.0 ± 2.5		
平均胎児体重（±SD、g）		1.49 ± 0.08		1.50 ± 0.11		1.51 ± 0.13		1.43 ± 0.11		
平均胎児性比（±SD）		55.1 ± 18		55.3 ± 13.2		51.1 ± 13.8		50.6 ± 11.9		

12.1 マウスを用いた受胎能及び発生毒性の併合試験 (396443-AS08) (続き)

試験番号 : ISIS 396443-AS08		被験物質 : ISIS 396443			
1 日用量 (mg/kg) :		0 (対照)	3	10	25
1 週間用量 (mg/kg/週)		0 (対照)	10.5	35	87.5
胎児異常 (変異及び奇形) :					
肉眼的外表異常					
評価胎児数		189	283	238	272
評価母動物数		15	21	18	20
奇形					
	胎児数	0	2	1	2
	(%)	0.0	0.7	0.3	0.8
	母動物数	0	2	1	2
	(%)	0.0	9.5	5.6	10.0
合計					
	胎児数	0	2	1	2
	(%)	0.0	0.7	0.4	0.7
	母動物数	0	2	1	2
	(%)	0.0	9.5	5.6	10.0

12.1 マウスを用いた受胎能及び発生毒性の併合試験 (396443-AS08) (続き)

試験番号 : ISIS 396443-AS08		被験物質 : ISIS 396443			
1 日用量 (mg/kg) :		0 (対照)	3	10	25
1 週間用量 (mg/kg/週)		0 (対照)	10.5	35	87.5
内臓異常 (ブアン固定)					
評価胎児数		93	136	114	132
評価母動物数		15	21	18	20
変異					
	胎児数	15	11	12	13
	(%)	15.2	7.9	11.3	10.0
	母動物数	8	9	9	9
	(%)	53.3	42.9	50.0	45.0
奇形					
	胎児数	4	1	1	0
	(%)	4.5	0.8	0.7	0.0
	母動物数	3	1	1	0
	(%)	20.0	4.8	5.6	0.0
合計					
	胎児数	17	12	13	13
	(%)	18.3	8.8	11.4	9.8
	母動物数	9	10	10	9
	(%)	60.0	47.6	55.6	45.0

12.1 マウスを用いた受胎能及び発生毒性の併合試験 (396443-AS08) (続き)

試験番号 : ISIS 396443-AS08		被験物質 : ISIS 396443			
1 日用量 (mg/kg) :	0 (対照)	3	10	25	
1 週間用量 (mg/kg/週)	0 (対照)	10.5	35	87.5	
骨格異常^g					
評価胎児数	97	143	123	137	
評価母動物数	15	21	18	20	
変異					
	胎児数	48	76	70	77
	(%)	46.9	54.4	56.1	57.4
	母動物数	14	21	17	18
	(%)	93.3	100	94.4	90.0
奇形					
	胎児数	0	4	1	1
	(%)	0.0	2.6	0.6	0.5
	母動物数	0	3	1	1
	(%)	0.0	14.3	5.6	5.0
合計					
	胎児数	48	76	70	77
	(%)	49.5	53.1	56.9	56.2
	腹数	14	21	17	18
	腹率 (%)	93.3	100	94.4	90.0

* p < 0.05、** p < 0.01、*** p < 0.001

- : 特記すべき所見なし、NA : 該当なし、Day # : 試験#日目、BLQ : 定量限界未満、p : あり

* トキシコキネティクス評価動物から採取

^a 特に記載がない限り、主試験動物 (雄、及び剖検時に妊娠していた雌) で得られたデータを示し、TK 評価動物又は剖検時に妊娠していなかった雌のデータを含まない。相対値 (%) 及び変化倍率の平均は、群平均値との比較により算出。

^b 動物#14 は、Day 17 の投与後に死亡しているのが発見された (ハンドリングに関連した影響である可能性が示唆される)。剖検で顕著な所見はなく、死亡前に一般状態の異常はなかった。

^c 動物#33 は、交配期間中の Day 30 に死亡しているのが発見された。この個体は、Day 15 に眼がやや細く充血し斜視が見られたため獣医の検査を受けている。Day 29 の一般状態観察でも充血と斜視が報告された。しかし、これらの眼所見は死亡と関連しないと判断した。Day 30 に、この雄個体と同じケージに入れた雌がけんかをし、その直後に雄の死亡が確認されたが、関連した外傷はみられなかった。剖検でも肉眼的な病変は認められなかった。

^d 血液学的検査及び血液生化学的検査で、投与に関連した変化が雄のみにみられ、長期投与に起因すると考えられた。

^e 精巣上部、脾臓、前立腺、精嚢（雄）、腎臓、肝臓、脾臓（雌雄）

^f 87.5 mg/kg/週投与群で、異常精子の総数及び割合が対照群と比べて統計的に有意に増加した ($p < 0.01$)。異常精子率の平均は対照群が 6.2%、高用量群が 13.0%であった。しかし、4 群の 1 匹（動物#104）のみが異常精子率が 99%と非常に高く、これが高用量群平均値に影響した。また、用量に比例した精子異常の増加傾向は認められなかった。よって、この所見が ISIS 396443 の投与に関連する可能性は低いと考えられた。

^g すべての群で、被験物質と関連しない肋骨及び胸骨分節の骨格変異が複数認められた。

13 生殖・発生毒性試験：胚・胎児の発生に対する影響（重要な試験）

13.1 ウサギを用いた胚・胎児発生毒性試験（396443-AS09）

		被験物質：ISIS 396443
報告書題名：ニュージーランドホワイトウサギを用いた皮下注射による ISIS 396443 の胚・胎児発生毒性試験		試験番号：ISIS 396443-AS09
動物種／系統：Oryctolagus cuniculus／ニュージーランド ホワイトウサギ	投与期間：妊娠 6～18 日目に隔日 1 回	CTD での記載箇所：4.2.3.5.2-2
開始齢：6～8.5 カ月齢	交配日：妊娠 0 日目	
初回投与日：20■■年■■月■■日～20■■年■■月■■日	帝王切開日：妊娠 28 日目（主試験動物）、妊娠 20 日目（TK 評価動物）	GLP 適用：適
特記事項：サテライト TK 評価動物（各群に交配母動物 3 匹）をそれぞれの被験物質投与群に割付け、妊娠 20 日目に剖検		
投与方法：皮下注射		
溶媒／投与形態：生理食塩水		試験デザイン：ICH 4.1.3 に準拠
高用量の設定根拠：高用量（87.5 mg/kg/週）は、同一被験物質で実施した用量範囲設定試験に基づいて設定した。この用量では、母動物の体重増加及び摂餌量の減少並びに流産増加が認められるが観察可能な同腹児数の減少は問題にならない程度と予想される。		
無毒性量		
F ₀ 雌：	25 mg/kg/回（87.5 mg/kg/週）	
F ₁ 仔：	25 mg/kg/回（87.5 mg/kg/週）	

13.1 ウサギを用いた胚・胎児発生毒性試験 (396443-AS09) (続き)

試験番号：ISIS 396443-AS09		被験物質：ISIS 396443		
1日用量 (mg/kg)	0 (対照)	6	12.6	25
1週間用量 (mg/kg/週)	0 (対照)	21	44.1	87.5
母動物/雌親： トキシコキネティクス：組織 (μg/g ± SD)	5 匹	3~5 匹	3~5 匹	3~5 匹
母動物肝臓：妊娠 20 日目	NA	90.5 ± 38.3	224 ± 40.9	374 ± 128
母動物肝臓：妊娠 28 日目	0 ± 0	40.1 ± 11.4	120 ± 57.1	281 ± 60.1
胎児肝臓：妊娠 20 日目	NA	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
胎児肝臓：妊娠 28 日目	NA	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
胎盤：妊娠 20 日目	NA	0 ± 0	18.4 ± 3.23	28.3 ± 9.61
胎盤：妊娠 28 日目	NA	0 ± 0	0 ± 0	17.7 ± 5.17

13.1 ウサギを用いた胚・胎児発生毒性試験 (396443-AS09) (続き)

試験番号：ISIS 396443-AS09		被験物質：ISIS 396443		
1日用量 (mg/kg)	0 (対照)	6	12.6	25
1週間用量 (mg/kg/週)	0 (対照)	21	44.1	87.5
母動物/雌親： 妊娠母体数 (毒性評価のみ)	18	17	18	18
死亡又は切迫屠殺数	0	0	0	0
流産又は全胚吸収母体数	4 ²	5 ²	4 ²	4
一般状態	-	-	-	-
肉眼的観察	-	-	-	-
妊娠 6～28 日目の体重増加 (kg) ¹	-	-	-	-
摂餌量 (対照群との相対的な差、%)				
妊娠 6～27 日目 (g/日) ¹	132.4	0.2%	-6.0%	-14.4% *
臨床病理所見 (対照群との相対的な差、%)				
赤血球数 (×10 ⁶ /μL)	6.06	-9.90% **	-13.37% ***	-14.85% ***
ヘモグロビン (g/dL)	12.4	-9.7% **	-13.5% ***	-15.3% ***
ヘマトクリット (%)	38.4	-9.6% ***	-12.8% ***	-15.6% ***
血小板数 (×10 ³ /μL)	319	44% **	49% ***	29% *
白血球数 (×10 ³ /μL)	6.18	29.45% **	27.67% **	20.23% *
好中球数 (×10 ³ /μL)	1.55	60% **	46% **	81% ***
リンパ球数 (×10 ³ /μL)	4.19	24.82% *	26.25% *	3.34%
アルブミン (g/dL)	3.1	-5.5%	-8.7% **	-9.9% **
グロブリン (g/dL)	1.0	18.4% ***	16.6% **	9.0%
A/G	3.2	-20.1% ***	-21.4% ***	-17.0% ***
平均妊娠子宮重量 (g)	424.7	405.2	405.9	358.5
平均黄体数 (±SD) ¹	10 ± 2	9 ± 2	10 ± 2	9 ± 1
平均着床数 (±SD) ¹	9 ± 2	8 ± 2	9 ± 3	7 ± 1
平均着床率 ¹ (±SD)	93 ± 12	90 ± 9	88 ± 20	85 ± 13

13.1 ウサギを用いた胚・胎児発生毒性試験 (396443-AS09) (続き)

試験番号：ISIS 396443-AS09		被験物質：ISIS 396443			
1日用量 (mg/kg)	0 (対照)	6	12.6	25	
1週間用量 (mg/kg/週)	0 (対照)	21	44.1	87.5	
同腹児：					
評価母体数	18	17	18	18	
生存胎児数	153	128	160	131	
平均生存胎児数 (±SD)	8 ± 2	7 ± 2	9 ± 3	7 ± 2	
平均早期吸収胚数 (±SD)	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	
平均後期吸収胚数 (±SD)	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	
平均死亡胎児数 (±SD)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	
平均着床後胚損失率 (±SD、%)	5.3 ± 6.2	8.8 ± 13.7	3.8 ± 7.5	2.9 ± 7.2	
平均胎児体重 (±SD、g)	34.22 ± 4.30	35.92 ± 4.48	31.94 ± 5.48	32.43 ± 4.21	
平均胎児性比 (±SD)	49.4 ± 17.9	55.8 ± 21.4	53.7 ± 16.4	44.2 ± 19.3	

13.1 ウサギを用いた胚・胎児発生毒性試験 (396443-AS09) (続き)

試験番号 : ISIS 396443-AS09		被験物質 : ISIS 396443			
1 日用量 (mg/kg) :	0 (対照)	6	12.6	25	
1 週間用量 (mg/kg/週)	0 (対照)	21	44.1	87.5	
胎児異常 (変異及び奇形) :					
肉眼的的外表異常					
評価胎児数	153	128	160	131	
評価母体数	18	17	18	18	
奇形					
	胎児数	0	1	0	0
	(%)	0.0	0.8	0.0	0.0
	母体数	0	1	0	0
	(%)	0.0	5.9	0.0	0.0
合計					
	胎児数	0	1	0	0
	(%)	0.0	0.8	0.0	0.0
	母体数	0	1	0	0
	(%)	0.0	5.9	0.0	0.0

13.1 ウサギを用いた胚・胎児発生毒性試験 (396443-AS09) (続き)

試験番号 : ISIS 396443-AS09		被験物質 : ISIS 396443			
1 日用量 (mg/kg) :		0 (対照)	6	12.6	25
1 週間用量 (mg/kg/週)		0 (対照)	21	44.1	87.5
内臓異常 (新鮮)					
評価胎児数		152	127	158	130
評価母体数		18	17	18	18
変異					
	胎児数	0	2	0	3
	(%)	0.0	1.5	0.0	2.1
	母体数	0	2	0	3
	(%)	0.0	11.8	0.0	16.7
奇形					
	胎児数	0	0	1	3
	(%)	0.0	0.0	0.7	2.3
	母体数	0	0	1	2
	(%)	0.0	0.0	5.6	11.1
合計					
	胎児数	0	2	1	5
	(%)	0.0	1.6	0.6	3.8
	母体数	0	2	1	4
	(%)	0.0	11.8	5.6	22.2

13.1 ウサギを用いた胚・胎児発生毒性試験 (396443-AS09) (続き)

試験番号 : ISIS 396443-AS09		被験物質 : ISIS 396443			
1 日用量 (mg/kg) :	0 (対照)	6	12.6	25	
1 週間用量 (mg/kg/週)	0 (対照)	21	44.1	87.5	
骨格異常³					
評価胎児数	152	118	130	130	
評価母体数	18	16	16	18	
変異					
	胎児数	133	107	121	116
	(%)	88.9	91.4	93.5	88.8
	母体数	18	16	16	18
	(%)	100	100	100	100
奇形					
	胎児数	4	4	2	2
	(%)	2.4	3.2	1.4	1.5
	母体数	4	3	2	2
	(%)	22.2	18.8	12.5	11.1
合計					
	胎児数	135	107	121	117
	(%)	88.8	90.7	93.1	90.0
	母体数	18	16	16	18
	(%)	100	100	100	100

¹ 剖検時に生存胎児 1 匹以上を妊娠していた主試験動物で得られたデータを示す。

² 剖検時に妊娠していなかった動物のうち、0 mg/kg/週群の主試験動物#5312 が妊娠 26 日目、21 mg/kg/週群の主試験動物#5335 が妊娠 17 日目、44.1 mg/kg/週群の主試験動物#5394 が妊娠 28 日目の朝（予定していた剖検の前）にそれぞれ出産又は流産した。動物#5328 (0 mg/kg/週) は妊娠 28 日目の剖検で非妊娠子宮を有するとみられたが、検査で着床部位が 1 箇所認められた。

³ すべての群で、被験物質との関連が認められない過剰肋や舌骨の不完全骨化を含む骨格変異が多数認められた。

- : 被験物質と関連する特記すべき所見なし

* p < 0.05、** p < 0.01、*** p < 0.001

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（重要な試験）

14.1 マウスを用いた出生前及び出生後発生試験（396443-AS12）

報告書題名：CD-1 マウスを用いた皮下投与による ISIS 396443 の出産前及び出産後の発生並びに母動物の機能に関する試験 試験番号：ISIS 396443-AS12

動物種／系統：Crl:CD1[®] (ICR) マウス 投与期間：妊娠 6～17 日目及び授乳 0～18 日目¹ CTD での記載箇所：4.2.3.5.3-1

開始年齢：9 週齢 交配日：妊娠 0 日目

初回投与日：20■■年■■月■■日 投与方法：皮下注射 GLP 適用：適

特記事項：乳汁の評価 溶媒／投与形態：注射用 0.9%塩化ナトリウム、USP

高用量の設定根拠：幼若マウスを用いた皮下投与毒性試験における高用量（50 mg/kg/週）と同程度。 仔の殺処分：実施 試験デザイン：ICH 4.1.2 に準拠

無毒性量

F₀雌、F₁雌雄：

17.2 mg/kg/回（60 mg/kg/週）

¹ 5 mL/kg の投与量で妊娠 6 日目から投与を開始し、妊娠 17 日目まで隔日 1 回の投与を継続した。授乳中は、17.5 mL/kg の投与量で授乳 0 日目から投与を開始し、授乳 18 日目まで約週 1 回（授乳 0、6、12 及び 18 日目）の投与を継続し、妊娠中と同じ 1 週間用量とした。

14.1 マウスを用いた出生前及び出生後発生試験 (396443-AS12) (続き)

試験番号 : ISIS 396443-AS12		被験物質 : ISIS 396443			
1 日用量 (mg/kg)	0 (対照)	1.4	5.8	17.2	
1 週間用量 (mg/kg/週) :	0 (対照)	5.0	20.0	60.0	
F ₀ 雌 :	TK : 組織 (µg/g ± SD)	10 匹	10 匹	10 匹	10 匹
	肝臓 : 出産後 22 日目	BLQ	37.6 ± 3.60	111 ± 18.7	251 ± 49.9
	TK : 乳汁 (µg/mL)	4 匹からのプール試料	4 匹からのプール試料	4 匹からのプール試料	4 匹からのプール試料
	乳汁 : 授乳 13 日目	BLQ	0.00847	0.0252	0.0552
	肝臓に対する乳汁の比	NC	0.000225	0.000227	0.000220
	試験動物数	46	30	30	30
	妊娠母体数 (%)	40 (87%)	25 (83%)	25 (83%)	27 (90%)
	死亡又は切迫屠殺数 ³	2	1	1	0
	一般状態	-	-	-	-
	肉眼的観察	-	-	-	-
	臓器重量 ⁴				
	腎臓 (g)	0.47	+3%	+8% **	+10% **
	腎臓/体重 (%)	1.3044	+3%	+6% **	+7% **
	肝臓 (g)	2.473	+5%	+8%	+10% *
	肝臓/体重 (%)	6.868	+5%	+5%	+7% *
	脾臓 (g)	0.111	+5%	+1%	+19% *
	脾臓/体重 (%)	0.306	+5%	0	+16% *
	妊娠時体重 (%)	-	-	-	-
	授乳時体重 (%)	-	-	-	-
	妊娠時摂餌量 (%)	-	-	-	-
	授乳餌摂餌量 (%)	-	-	-	-
	平均妊娠期間 (日数)	18.9	19.0	18.8	18.9
	異常分娩	-	-	-	-

14.1 マウスを用いた出生前及び出生後発生試験 (396443-AS12) (続き)

試験番号 : ISIS 396443-AS12		被験物質 : ISIS 396443			
1 日用量 (mg/kg)		0 (対照)	1.4	5.8	17.2
1 週間用量 (mg/kg/週) :		0 (対照)	5.0	20.0	60.0
F ₁ 出生児 :	評価母体数	39	25	23	27
(離乳前)	同腹児当たりの平均出生児数	12.9	13.4	13.8	13.0
	同腹児当たりの平均生存児数	12.8	13.4	13.8	13.0
	同腹児当たりの平均死産児数	0.1	0.0	0.0	0.0
	4 日目までの生後生存率	97.5%	97.8%	98.4%	99.2%
	離乳までの生後生存率	89.7%	80.0%	82.6%	85.2%
	出生児の性比 (0 日目の雄率、%)	52.3%	51.3%	53.0%	45.5%
	出生児の体重 (g)	-	-	-	-
	出生児の一般状態	-	-	-	-
	出生児肉眼的観察	-	-	-	-

14.1 マウスを用いた出生前及び出生後発生試験 (396443-AS12) (続き)

試験番号 : ISIS 396443-AS12		被験物質 : ISIS 396443			
1 日用量 (mg/kg)		0 (対照)	1.4	5.8	17.2
1 週間用量 (mg/kg/週) :		0 (対照)	5.0	20.0	60.0
F ₁ 雄	離乳後評価動物数	46	26	26	26
(離乳後)	死亡又は切迫屠殺数	0	0	0	0
	一般状態	-	-	-	-
	肉眼的観察	-	-	-	-
	臓器重量	-	-	-	-
	体重変化 (g)	-	-	-	-
	摂餌量 (%)	-	-	-	-
	包皮分離 (日)	29.1	29.3	28.8	28.8
	運動活性	-	-	-	-
	学習及び記憶	-	-	-	-
	交配前の平均日数	2.8	2.3	3.0	3.3
	交配した雄の数	45	24	26	25
	授胎した雄の数	44	24	26	22

14.1 マウスを用いた出生前及び出生後発生試験 (396443-AS12) (続き)

試験番号 : ISIS 396443-AS12		被験物質 : ISIS 396443			
1 日用量 (mg/kg)		0 (対照)	1.4	5.8	17.2
1 週間用量 (mg/kg/週) :		0 (対照)	5.0	20.0	60.0
F ₁ 雌	離乳後評価数	46	26	26	26
(離乳後)	死亡又は切迫屠殺数 ⁵	0	2	0	0
	一般状態	-	-	-	-
	剖検観察	-	-	-	-
	臓器重量	-	-	-	-
	交配前体重変化 (g)	-	-	-	-
	妊娠時体重変化 (g)	-	-	-	-
	交配前摂餌量 (%)	-	-	-	-
	妊娠時摂餌量 (%)	-	-	-	-
	膣開口齢平均 (日)	28.6	27.2	27.0	27.3
	運動活性	-	-	-	-
	学習及び記憶	-	-	-	-
	交配前の平均日数	2.8	2.3	3.0	3.3
	精子陽性の雌の数	46	24	26	26
	妊娠動物数 (%)	45 (97.8%)	24 (100%)	26 (100%)	23 (88.5%)
	平均黄体数	16.7	17.0	16.9	16.7
	平均着床数	15.3	15.8	16.3	15.8
	平均着床前胚損失率 (%)	6.92%	6.88%	3.71%	5.18%

14.1 マウスを用いた出生前及び出生後発生試験 (396443-AS12) (続き)

試験番号 : ISIS 396443-AS12		被験物質 : ISIS 396443			
1 日用量 (mg/kg)		0 (対照)	1.4	5.8	17.2
1 週間用量 (mg/kg/週) :		0 (対照)	5.0	20.0	60.0
F ₂ 出生児	同腹児当たりの平均生存胚数	13.8	14.5	15.0	14.7
	平均吸収胚数	1.5	1.2	1.3	1.1
	平均死亡胚数	0	0	0	0
	平均着床後胚損失率 (%)	11.22%	8.06%	7.88%	6.82%

³ 対照群の雌 2 匹が乳汁採取中に死亡した。いずれも乳汁採取中の処置によるストレスに関連した死亡と考えられた。1.4 mg/kg/回投与群の雌 1 匹が授乳 14 日目に死亡しているのが発見された。剖検時の一般状態所見は正常であり、体脂肪枯渇のみを認めた。この個体の死因は不明である。5.8 mg/kg/回投与群の雌 1 匹が妊娠 12 日目に瀕死状態に陥ったため安楽死させた。この個体は複数の症状を示し、摂餌量の減少及び体重低下がみられた。剖検時に唯一の所見として膈内に粘液状の赤色液体を認め、妊娠に関連した合併症が示唆された。5.8 mg/kg/回投与群の他の個体では同様の所見を認めず、よってこの瀕死状態は投与に関連しないと考えられた。

⁴ 対照群は群平均値を示す。投与群は、対照群との相対的な差 (%) を示す。統計的有意性は相対的な差 (%) ではなく実測値に基づいて検定した。相対的な差 (%) はすべて四捨五入して整数で表す。

⁵ 1.4 mg/kg/回投与群の F₁ 雌 2 匹がそれぞれ Day 11 及び Day 35 に死亡した。これらの個体の一般状態は正常であり、剖検で肉眼的所見を認めなかった。この他に 1.4 mg/kg/回以上で死亡した個体はなく、よって上の 2 匹の死亡は ISIS 396443 と関連しないと考えられた。

* 対照群と比較して有意差あり (p < 0.05)、** 対照群と比較して有意差あり (p < 0.01)

15 局所刺激性試験

独立した局所刺激試験は実施していない。

16 その他の毒性試験

16.1 ヌクレオチド関連海馬空胞化の評価 (396443-AS11)

被験物質：ISIS 396443

報告書題名：カニクイザルを用いた複数組織固定法による腰椎髄腔内ボラス投与後のオリゴヌクレオチド関連海馬空胞化の評価 試験番号：ISIS 396443-AS11

動物種／系統：カニクイザル 投与期間：6週間。週1回投与（計6回） CTDでの記載箇所：
4.2.3.7.7-1

開始齢：3～4歳 投与後期間：なし GLP適用：非適用

初回投与日：20 年 月 日 投与方法：腰椎髄腔内ボラス注射

溶媒／投与形態：水溶液（人工CSF）；液量 1.25 mL

特記事項：サル6例の脳を10%中性緩衝ホルマリン液又はカルノア液で浸漬固定及びサル6例の脳を変法カルノフスキー液（2%パラホルムアルデヒド／2.5%グルタルアルデヒド）で灌流固定し、海馬内の空胞化を評価

用量（mg/回）： 5

動物数 雄：6 雌：6

組織中オリゴヌクレオチド濃度（ $\mu\text{g/g}$ ）

脊髄

腰部 99.95 ± 78.4

胸部 84.86 ± 27.4

頸部 44.84 ± 26.5

脳

海馬 9.87 ± 7.7

前頭皮質 58.71 ± 46.3

後頭皮質 60.56 ± 50.7

16.1 ヌクレオチド関連海馬空胞化の評価（396443-AS11）（続き）

試験番号：ISIS 396443-AS11		被験物質：ISIS 396443	
用量（mg/kg）：		5	
動物数	雄：6	雌：6	
特記すべき所見			
死亡又は切迫都殺	-	-	
体重（%）	-	-	
摂餌量（%）	-	-	
一般状態	-	-	
身体検査		-	-
神経学的検査：			
Day 1 ^a			
膝蓋腱反射	1	1	
尾部反射陰性	3	1	
感覚性足反射陰性	1	-	
Day 36 ^a			
皮膚反射陰性	2	-	
尾部反射陰性	1	2	
足の感覚反射陰性	-	-	
臓器重量		-	-
肉眼的観察：			
褪色、脳表面、側頭葉（スライス 8）	1	-	

16.1 ヌクレオチド関連海馬空胞化の評価 (396443-AS11) (続き)

試験番号 : ISIS 396443-AS11		被験物質 : ISIS 396443			
用量 (mg/kg) :	5 (浸漬) ^b		5 (灌流) ^b		
評価数 (Day 50) :	雄 : 3	雌 : 3	雄 : 3	雌 : 3	
病理組織学的検査 :					
脳 - 10%中性緩衝ホルマリンで固定					
海馬空胞化 - 軽微	2	1	NA	NA	
空胞内に抗 ISIS 39644 免疫組織染色陽性	2	1	NA	NA	
脳 - カルノア液で固定					
海馬空胞化 - 軽微	0	0	NA	NA	
脳 - 凍結切片					
海馬空胞化 - 軽微	NA	NA	0	0	
脳 - 変法カルノフスキー液 (2%パラホルムアルデヒド/2.5%グルタルアルデヒド) で灌流固定					
海馬空胞化 - 軽微	NA	NA	0	0	

- : 特記すべき所見なし

NA : 該当なし

^a これらの変化は投与後 48 時間までに完全に消失した

^b 10%中性緩衝ホルマリン又はカルノア液で浸漬固定、又は変法カルノフスキー液 (2%パラホルムアルデヒド/2.5%グルタルアルデヒド) で灌流固定

16.2 13 週間の不純物適格性評価試験 (396443-AS13)

報告書題名：CD-1 マウスを用いた ISIS 396443 の 13 週間反復投与毒性及び不純物適格性評価試験		被験物質：ISIS 396443
動物種／系統：CD-1 マウス	投与期間：週 1 回を 13 週間	試験番号：ISIS 396443-AS13
初回投与時の年齢：7～8 週齢	回復期間：なし	CTD での記載箇所： 4.2.3.7.6-1
初回投与日：20██年██月██日		
溶媒／投与形態：0.9% NaCl	投与方法：皮下注射	GLP 適用：適
特記事項：不純物増量被験物質と親 ASO (ISIS 396443) の毒性プロファイルの比較		

結果：不純物増量 ASO ロットの投与と関連した新たな毒性は認められなかった

用量 (mg/kg)	溶媒対照 (生理食塩水)		ISIS 396443				TAM #1				TAM #2				TAM #3			
	0	0	5		25		5		25		5		25		5		25	
性別 ^a	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
特記すべき所見																		
早期死亡又は切迫屠殺	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
平均体重 (g) Day 91	39.3	31.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
摂餌量	WNL	WNL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
眼科学的検査	WNL	WNL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
一般状態	WNL	WNL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
血液学的検査	WNL	WNL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
血液生化学的検査	WNL	WNL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
肉眼的観察	WNL	WNL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
臓器重量	WNL	WNL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

16.2 13週間の不純物適格性評価試験（396443-AS13）（続き）

用量 (mg/kg)	溶媒対照 (生理食塩水)		ISIS 396443				TAM #1				TAM #2				TAM #3			
	0	0	5		25		5		25		5		25		5		25	
性別 ^a	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
特記すべき所見 (病理組織学的検査)																		
肝臓 (空胞化/顆粒化マクロファージ)	0	0	2	3	6	6	3	2	6	6	1	1	6	6	0	1	6	6
軽微			2	3	5	4	3	2	6	2	1	1	5	5		1	6	4
軽度			0	0	1	2	0	0	0	4	0	0	1	1		0	0	2

^a 各群に雌雄各6匹、TAM：被験物質不純物混合物、WNL：正常範囲内、-：溶媒対照と比べて特記すべき変化なし