



サノフィ・アベンティス株式会社
東京都新宿区西新宿三丁目 20 番 2 号

アピドラ注

CTD 第二部 一非臨床概要

2.6.6 毒性試験概要文

略号一覧表

略称、略号	内容
Asp(B10)	B 鎖 10 位のアミノ酸をアスパラギン酸に置換したインスリンアナログ
AUC	濃度時間曲線下面積
Cmax	最高血清（漿）中濃度
F ₀	親世代
F ₁	第一世代
GLP	医薬品の安全性試験の実施に関する基準
ICH	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
NOAEL	無毒性量
TK	トキシコキネティクス
t _{max}	最高血清(漿)濃度到達時間
アスパルト	インスリン アスパルト

目次

略号一覧表	2
2.6.6.1 まとめ	7
2.6.6.2 単回投与毒性試験	13
2.6.6.3 反復投与毒性試験（TK 評価を含む）	14
2.6.6.3.1 ラット 1 ヶ月間反復投与毒性試験（TK 含む）	14
2.6.6.3.2 ラット 6 ヶ月間反復投与毒性試験（TK を含む）	16
2.6.6.3.3 イヌ 1 ヶ月間反復投与毒性試験（TK を含む）	19
2.6.6.3.4 イヌ 6 ヶ月間反復投与毒性試験（TK を含む）	21
2.6.6.4 遺伝毒性試験	25
2.6.6.4.1 細菌を用いた復帰突然変異試験ーAmes 試験	25
2.6.6.4.2 ほ乳動物培養細胞を用いた <i>In vitro</i> 染色体異常試験	25
2.6.6.4.3 げっ歯を用いた <i>In vivo</i> 小核試験	26
2.6.6.5 がん原性試験（TK 評価を含む）	27
2.6.6.5.1 ラットにおける 12 ヶ月間反復投与毒性試験	27
2.6.6.5.2 ラット 14 日間投与試験における TK	31
2.6.6.5.3 ラット 6 ヶ月間及び 12 ヶ月間試験における細胞分裂活性の評価	33
2.6.6.5.3.1 ラット 6 ヶ月間投与毒性試験における細胞分裂マーカーKi-67 の免疫組織化学的 検出法を用いた乳腺の細胞分裂活性の評価	34
2.6.6.5.3.2 ラット 12 ヶ月間投与毒性試験における細胞分裂マーカーKi-67 の免疫組織化学的 検出法を用いた乳腺の細胞分裂活性の評価	35
2.6.6.6 生殖発生毒性試験（用量設定試験及び TK 評価を含む）	37

CTD 第二部 ー非臨床概要ー2.6.6毒性試験概要文
アビドラ注

2.6.6.6.1 ラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に及ぼす試験ー生殖毒性 Seg I 試験 ...	37
2.6.6.6.2 ラットにおける胚-胎児発生に関する試験ー生殖毒性 SegII 試験	38
2.6.6.6.3 ウサギにおける胚-胎児発生試験ー生殖毒性 SegII 試験.....	41
2.6.6.6.4 ラットにおける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ー生殖毒性 SegIII 試験.....	45
2.6.6.7 局所刺激性試験.....	47
2.6.6.7.1 ウサギにおける局所刺激性試験（皮下/ 静脈内/ 静脈周囲/ 筋肉内）	47
2.6.6.8 その他の毒性試験（実施している場合）	48
2.6.6.8.1 ラット 6 ヶ月間投与毒性試験におけるインスリン抗体の検出	48
2.6.6.8.2 ラット 12 ヶ月間投与毒性試験におけるインスリン抗体の検出	49
2.6.6.8.3 イヌ 6 ヶ月間投与毒性試験におけるインスリン抗体の検出	50
2.6.6.8.4 ウサギを用いた免疫原性試験	51
2.6.6.8.5 添加物トロメタモールの毒性試験.....	54
2.6.6.9 考察及び結論	56
2.6.6.10 図表	63
参考文献	64

表のリスト

表 2.6.6- 1 毒性試験プログラム	8
表 2.6.6- 2 単回投与毒性試験成績	13
表 2.6.6- 3 反復投与毒性試験一覧	14
表 2.6.6- 4 ラット 1 ヶ月間投与試験における TK	16
表 2.6.6- 5 ラット 6 ヶ月間投与試験における TK	18
表 2.6.6- 6 イヌ 1 ヶ月間投与試験における平均血清グルコース濃度	19
表 2.6.6- 7 イヌ 1 ヶ月間投与試験における TK	21
表 2.6.6- 8 イヌ 6 ヶ月間投与試験における平均血清グルコース濃度	22
表 2.6.6- 9 イヌ 6 ヶ月間投与試験における TK	24
表 2.6.6- 10 ほ乳動物培養細胞を用いた染色体異常試験	25
表 2.6.6- 11 グルリジンのラット 12 ヶ月間毒性試験における死亡又は屠殺時別累積死亡数（各群 雌雄各 30 例）	28
表 2.6.6- 12 グルリジンのラット 12 ヶ月間投与毒性試験における乳腺腫瘍をもつ雌 SD ラットの 頻度（各群 30 例）	30
表 2.6.6- 13 ラット 14 日間投与試験におけるグルリジンの TK	32
表 2.6.6- 14 ラット 14 日間投与試験におけるヒトインスリンの TK	33
表 2.6.6- 15 グルリジンのラット 12 ヶ月間投与毒性試験における雌乳腺組織の Ki-67 ラベル指数	35
表 2.6.6- 16 グルリジンのラット 12 ヶ月間投与毒性試験における雌乳腺組織の Ki-67 ラベル指数	36
表 2.6.6- 17 ラットを用いた胚－胎児発生試験における 0.5, 1 及び 2 時間の時点で測定した平均血 中グルコース濃度	40
表 2.6.6- 18 グルリジン 7 回目投与後の TK 測定結果	41
表 2.6.6- 19 ウサギを用いた胚－胎児発生試験における投与後 0.5, 1 及び 2 時間の時点における平 均血中グルコース濃度	43
表 2.6.6- 20 グルリジン 7 回目投与後の TK 測定結果	45
表 2.6.6- 21 ラット 6 ヶ月間試験におけるインスリン抗体	48
表 2.6.6- 22 ラット 12 ヶ月間試験におけるインスリン抗体	50
表 2.6.6- 23 イヌ 6 ヶ月間試験におけるインスリン抗体	51
表 2.6.6- 24 ウサギにおける抗原性試験計画	52
表 2.6.6- 25 免疫原性パラメータ	53
表 2.6.6- 26 本剤 1 mL 中の成分・分量	54
表 2.6.6- 27 毒性試験で投与されたトロメタモール量	55
表 2.6.6- 28 イヌに 2 単位/kg 投与した 6 ヶ月間反復投与毒性試験での血糖値の変動（個別データ）	60

表 2.6.6- 29 イヌの 1 ヲ月間反復投与毒性試験におけるグルリジン投与群の血糖値の変化（個別データ）	61
表 2.6.6- 30 イヌの 6 ヲ月間反復投与毒性試験におけるグルリジン投与群の血糖値の変化（個別データ）	62

図のリスト

図 2.6.6- 1 イヌの 6 ヲ月間反復投与毒性試験における血糖値及び血中グルリジン濃度の変化	59
---	----

2.6.6.1 まとめ

グルリジンの毒性を評価するために、単回投与毒性、反復投与毒性、遺伝毒性、がん原性、生殖発生毒性、局所刺激性及び免疫原性の各試験を実施した。グルリジンの毒性試験で得られた所見は、ヒトインスリンを用いた毒性試験で認められている既知の所見と変わらず、予期した毒性所見以外には認められなかった。毒性所見は過度の血糖降下作用に関連したものであった。すべての毒性試験は GLP を遵守して行った。グルリジンを用いて実施した毒性試験を表 2.6.6- 1にまとめた。

表 2.6.6- 1 毒性試験プログラム

試験の種類と期間	投与経路	動物種/細菌・細胞	条件
単回投与毒性試験	皮下	マウス	GLP
	皮下及び静脈内	ラット	GLP
	皮下	イヌ	GLP
反復投与毒性試験			
1 ヶ月間	皮下	ラット	GLP
6 ヶ月間	皮下	ラット	GLP
12 ヶ月間	皮下	ラット	GLP
1 ヶ月間	皮下	イヌ	GLP
6 ヶ月間	皮下	イヌ	GLP
遺伝毒性試験			
細菌を用いた復帰突然変異試験 - Ames 試験	—	<i>Salmonella typhimurium</i> <i>Eschericia coli</i>	GLP
<i>In vitro</i> 染色体異常試験	—	チャイニーズハムスター肺 V79 細胞	GLP
<i>In vivo</i> 小核試験	皮下	ラット	GLP
がん原性試験 (ラット 12 ヶ月間試験にて評価)	皮下	ラット	GLP
生殖発生毒性試験			
Seg. I	皮下	ラット	GLP
Seg. II	皮下	ラット	GLP
Seg. II	皮下	ウサギ	GLP
Seg. III	皮下	ラット	GLP
局所刺激性試験	皮下、静脈内、静脈周囲、筋肉内	ウサギ	GLP
免疫原性試験	皮下	ウサギ	GLP

単回投与毒性試験

マウス（皮下投与）及びラット（皮下投与及び静脈内投与）を用いてグルリジンの単回投与毒性試験を行った結果、概略の致死量は両投与経路とも 1000 単位/kg より大であった。イヌを用いたグルリジンの単回皮下投与試験では概略の致死量は 40 単位/kg であった。

反復投与毒性試験

ヒトで予想される臨床適用（長期投与及び投与経路）を考慮して、グルリジンの反復投与毒性試験を実施した。被験物質をラットでは最長 12 ヶ月間、イヌでは 6 ヶ月間皮下に投与した。非げっ歯類の 9 ヶ月間反復投与毒性試験の必要性については、ICH ガイドライン『バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価』（医薬審第 326 号、2000 年 2 月 22 日付）の記載も勘案し、科学的に検討した結果、6 ヶ月で十分と判断し、それ以上長期投与期間の試験を行わなかった（詳細は 2.6.6.9 に記載）。

ラット 1 ヶ月間皮下投与毒性試験：ラット 1 ヶ月間皮下投与毒性試験において途中死亡例が認められた（500 単位/kg/日及び 150 単位/kg/日投与群）。病理組織学的検査において死亡例の臓器にうっ血がみられた。死因は循環器-呼吸器不全を示唆するもので、被験物質の過度の血糖降下作用により引き起こされたものと考えられた。グルリジンの本試験における無毒性量（NOAEL）は 50 単位/kg/日であった。トキシコキネティクス（以下：TK と略）データにより動物はグルリジン投与後 3 時間以上にわたって全身性に大量の被験物質に曝露されたことが示された。

ラット 6 ヶ月間皮下投与毒性試験：ラット 6 ヶ月間皮下投与毒性試験において、80 及び 20 単位/kg/日投与群で一般状態の変化及び途中死亡が認められ、これは被験物質の過度の血糖降下作用によるものと考えられた。無毒性量は 5 単位/kg/日であった。1 ヶ月間皮下投与毒性試験と同様、すべてのラットは全身性に大量のグルリジンに曝露され、AUC（濃度曲線下面積）及び C_{max}（最高血中濃度）は投与量の増加に伴って増加した。

ラット 12 ヶ月間皮下投与毒性試験：長期反復投与試験としてラット 12 ヶ月間皮下投与毒性試験を実施した。本試験においては、グルリジンのがん原性の有無についても検討した。比較対照薬としてヒトインスリン投与群を設定した。低血糖状態で典型的にみられる一般状態の変化が、グルリジン投与群の死亡例（62 例中 10 例）及びヒトインスリン投与群の死亡例（95 例中 15 例）に認められた。過度の低血糖により病理組織学的検査で、海馬中に好酸性神経細胞壊死が認められることが報告されており^{Ref. 2.6-17、Ref. 2.6-18}、本試験においてもグルリジン投与群の死亡例（62 例中 8 例）及びヒトインスリン投与群の死亡例（95 例中 14 例）にも同様の所見が認められた。数例のラット投与部位に悪性線維性組織球腫が認められた。しかし、その発生は対照群を含む全投与群に分布しており、グルリジン投与群とヒトインスリン投与群との間に明確な差異は認められず、またすべての投与群と対照群との間にも明らかな差はみられなかった。

グルリジン及びヒトインスリンの両方について行った TK 測定の結果、性差はなく、被験物質に対する全身性曝露時間は 1 時間を超えることが確認された。

イヌ 1 ヶ月間皮下投与毒性試験：イヌ 1 ヶ月間皮下投与毒性試験で 10 単位/kg/日投与群の雄 1 例及び 3 単位/kg/日投与群の雌 1 例が、強直性間代性痙攣を伴った重篤な低血糖症状を呈したため試験途中で安楽致死させた。また、両投与群の他の動物は一過性の低血糖症状を示した。これは血中グルコース値に一致した用量依存性のあるものであった。試験終了時に安楽致死させた 10 単位/kg/日投与群雄 2 例及び 3 単位/kg/日投与群の雄 1 例の精巣上体に、脱落した生殖細胞の増加が認められたが、これは低血糖によるものと考えられた。軽度の精巣の変化が 10 単位/kg/日投与群

の1例においてのみ観察された。精巣上体及び精巣に認められた所見は、イヌ1ヵ月間皮下投与毒性試験においてのみ観察された。グルリジンの無毒性量は1単位/kg/日であった。TK測定の結果、グルリジンのすべての投与群は、全身性に2～3時間にわたって大量の被験物質に曝露された。AUC及びCmaxは投与量の増加に伴って増加し、その増加は比例的増加を超えるものであった。

イヌ6ヵ月間投与毒性試験：イヌ6ヵ月間皮下投与毒性試験において2単位/kg/日投与群の雌雄各1例が強直性間代性痙攣を伴った低血糖症状を示したため試験途中で安楽致死させた。このうちの雄は病理組織学的に低血糖でみられる明らかな海馬の神経細胞壊死とショックを示す腎臓の病変を呈した。無毒性量は1単位/kg/日であった。TK測定の結果、動物は投与後、2～3時間にわたって大量のグルリジンに曝露されていたことが示された。

遺伝毒性試験

グルリジンの遺伝毒性を調べるため、Ames試験（細菌を用いた復帰変異原性試験）及び*in vitro*の染色体異常試験並びに*in vivo*の染色体異常試験（小核試験）を実施した。Ames試験においては、いずれの試験系菌株においても、いずれの用量（最高5000 µg/平板）においても変異原性を示さなかった。グルリジンは*in vitro*の哺乳動物細胞（V79チャイニーズハムスター細胞）でいずれの用量（最高5000 µg/mL）においても染色体異常を誘発しなかった。また、グルリジンをラットに皮下投与した結果、いずれの投与量（最高1000単位/kg/日）においても小核試験で染色体異常は観察されなかった。

がん原性試験

ラット12ヵ月間皮下投与毒性試験においてがん原性の有無を調べた。比較対照薬として、ヒトインスリンを試験系に加えた。乳腺腫瘍がグルリジン（5、10、40及び100単位/kg/日）及びヒトインスリン（40及び100単位/kg/日）のすべての投与群に観察された。対照群（0単位/kg/日）には乳腺腫瘍は観察されなかった。統計学的に有意な乳腺腫瘍発生頻度の増加がグルリジンの5単位/kg/日投与群又は40単位/kg/日投与群及びヒトインスリンの40単位/kg/日投与群にみられたが（Fisherの直接確率法、 $p < 0.05$ ）、高用量群であるグルリジンの100単位/kg/日投与群又はヒトインスリンの100単位/kg/日投与群では有意な増加はみられなかった。さらに、PETO-Trend解析によりグルリジンのすべての投与群に一定の傾向はみられず、また、乳腺腫瘍の発生頻度について用量依存性がないことが示された。投与期間中の動物の死亡については被験物質投与との関連がみられ、死亡例はグルリジン又はヒトインスリンの40単位/kg/日以上投与群で用量依存性に増加した。

一般的に雄は雌よりも被験物質の影響を強く受けた。同じ投与量ではヒトインスリンの投与群で死亡率が高かった。

がん原性に関してグルリジンの細胞分裂誘発作用（これは病理組織学的検査では観察不能である）の有無を検討するため、Ki-67免疫組織化学的手法を用いて細胞分裂活性を調べた。ラット6

ヵ月間投与毒性試験においては、グルリジンの最高投与量である 80 単位/kg/日で、対照群に比較して乳腺における *in vivo* の細胞分裂に及ぼす影響は認められなかった。また、ラット 12 ヶ月間投与毒性試験においてもグルリジン 100 及び 40 単位/kg/日投与群、ヒトインスリン 40 単位/kg/日投与群及び対照群のすべての雌の乳腺について同様の検査を実施したが、両被験物質とも、対照群と比較して有意な乳腺の細胞分裂増加はみられなかった。

生殖発生毒性試験

生殖能、繁殖行動、胚-胎児発生及び生後発育に及ぼす影響を評価するため、グルリジン及び比較対照薬としてヒトインスリンを用いて生殖発生毒性試験を実施した。概ね、グルリジンの影響はヒトインスリンで認められた影響と変わらず母動物の毒性量でのみ観察された。

グルリジンとヒトインスリンは雌ラットの交配前、交配期間中、妊娠期間中及び授乳期間中、並びに雄ラットの交配前及び交配期間中に皮下投与した。グルリジンは試験したすべての投与量（最高 10 単位/kg/日投与群）において生殖能に影響を及ぼさず、また胚-胎児に対する影響も示さなかった。グルリジン及びヒトインスリンの 8 単位/kg/日までの投与量では、ラットの生後発育、生殖あるいは次世代の妊娠に何ら有害作用も及ぼさなかった。

グルリジン及びヒトインスリンを胚発生及び胎児形成期にある雌ウサギに皮下投与した。グルリジンの 0.5 及び 1.5 単位/kg/日投与で着床後死亡の軽度増加がみられたが、ヒトインスリンの 1.5 単位 kg/日投与では着床後死亡は著しく増加した。妊娠ウサギにグルリジンを投与すると、1.5 単位/kg/日投与群で 2 例が流産を起こし、2 例が死亡した。ヒトインスリンの 1.5 単位 kg/日投与では、1 例が流産し、4 例が死亡した。また、グルリジン及びヒトインスリンのいずれにおいても 1.5 単位/kg/日投与群で骨格異常の軽度増加が観察された。

上記有害作用はすべてグルリジン投与による低血糖に関連したものであると考えられた。

局所刺激性試験

ウサギにグルリジンを皮下投与又は静脈内投与した結果、良好な忍容性が認められた。また、静脈周囲投与又は筋肉内投与では、中等度の忍容性が認められた。

免疫原性試験

ラット 6 ヶ月間及び 12 ヶ月間皮下投与毒性試験並びにイヌ 6 ヶ月間皮下投与毒性試験の期間中、¹²⁵I-トレーサー結合アッセイ法を用いたインスリン抗体測定により免疫原性を調べた。ラットにおいてはインスリンの抗体産生は認められなかった。少数のイヌにおいてインスリン抗体が検出されたが、用量－反応関係は明確ではなかった。

能動免疫試験においては、グルリジン、比較対照薬としてヒトインスリン及びウシインスリン並びにプラセボを投与量を変えてウサギに皮下投与した。インスリン抗体はすべての投与群において、グルリジン、ヒトインスリン及びウシインスリンのトレーサーを用いて放射性免疫沈降法により測定した。その結果、グルリジンはウサギにおいてグルリジン抗体の産生を誘導した。そ

の免疫原性はウシインスリンよりも低く、ヒトインスリンよりも高かった。さらに、グルリジン抗体はヒトインスリンに対し交差反応性が低いことが示された。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

グルリジン 1000 単位/kg をマウスの皮下並びにラットの皮下及び静脈内に、また、グルリジン 10、20 及び 40 単位/kg をイヌの皮下に投与し急性毒性について検討した。

概略の致死量を表 2.6.6-2 に要約した。

マウス及びラットを用いた試験では、死亡は発現せず一般状態に異常も認められず、概略の致死量は 1000 単位/kg より大であった。イヌを用いた試験では 40 単位/kg 投与群の 2 例中 1 例が死亡し、概略の致死量は 40 単位/kg と推定された。

表 2.6.6-2 単回投与毒性試験成績

動物種	投与経路	被験物質	概略の致死量	評価資料
マウス	皮下	グルリジン	>1000 単位/kg	概要表 2.6.7.5 添付資料 4.2.3.1-1
ラット	皮下	グルリジン	>1000 単位/kg	概要表 2.6.7.5 添付資料 4.2.3.1-2
ラット	静脈内	グルリジン	>1000 単位/kg	概要表 2.6.7.5 添付資料 4.2.3.1-3
イヌ*	皮下	グルリジン	10 単位/kg (給餌前投与) >10 単位/kg (給餌後投与)	概要表 2.6.7.5 添付資料 4.2.3.1-4
イヌ	皮下	グルリジン	40 単位/kg (給餌後投与)	概要表 2.6.7.5 添付資料 4.2.3.1-5

*：予備試験（GLP 非適用）

2.6.6.3 反復投与毒性試験（TK 評価を含む）

表 2.6.6- 3に反復投与毒性試験におけるグルリジンの無毒性量（NOAEL）を要約した。

表 2.6.6- 3 反復投与毒性試験一覧

動物種	投与経路	投与期間	投与量	無毒性量	評価資料
ラット	皮下	1 ヶ月間	0, 50, 150, 500 単位/kg/日	50 単位/kg/日	概要表 2.6.7.7A 添付資料 4.2.3.2-1
	皮下	6 ヶ月間	0, 5, 20, 80 単位/kg/日	5 単位/kg/日	概要表 2.6.7.7C 添付資料 4.2.3.2-3
イヌ	皮下	1 ヶ月間	0, 1, 3, 10 単位/kg/日	1 単位/kg/日	概要表 2.6.7.7B 添付資料 4.2.3.2-6
	皮下	6 ヶ月間	0, 0.5, 1, 2 単位/kg/日	1 単位/kg/日	概要表 2.6.7.7D 添付資料 4.2.3.2-8

2.6.6.3.1 ラット 1 ヶ月間反復投与毒性試験（TK 含む）

（添付資料 4.2.3.2-1, 4.2.3.2-2）

グルリジン（バッチ 1120）の 0、50、150 及び 500 単位/kg/日 を各群雌雄各 10 例のラット（Sprague-Dawley 系、XXXXXXXXXXより入手）に 1 日 1 回、1 ヶ月間にわたり皮下投与した。対照群には、投与群と同数の雌雄にプラセボ（組成は p54、表 2.6.6-26 に記載、バッチ 1085）のみを投与した。試験開始時、動物は約 5 ～ 6 週齢、平均体重は雄 133 g、雌 123 g であった。TK 測定のために、対照群では雌雄各 5 例、被験物質投与群では雌雄各 10 例を追加した。

50、150 及び 500 単位/kg/日投与群には 100 単位/mL のグルリジンを含む注射液をそれぞれ 0.5 mL/kg、1.5 mL/kg 及び 5.0 mL/kg を投与し、対照群にはプラセボ 5.0 mL/kg を投与した。各群の動物を最終投与日（Day29）の翌日に安楽致死させ TK 測定を実施した。

観察及び検査項目は、一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査（雄のみ）、剖検、臓器重量、病理組織学的検査及び TK について行った。

150 単位/kg/日投与群の雄 2 例及び 500 単位/kg/日投与群の雄 9 例と雌 3 例が投与期間中に死亡した。死亡例の雄のほとんどは、絶食下で尿サンプル採取中に、絶食による低血糖に加えて被験物質の過度の血糖降下作用により死亡した。血中グルコース濃度の低下によるものと考えられた。

自発運動低下が投与 1 ～ 3 日目まで 500 単位/kg/日投与群の 3 例の雄に観察された。50 単位/kg/日投与群では被験物質投与による影響は観察されなかった。

死亡例の肉眼所見では、胃に内容物は認められず、注射部位は肥厚あるいは赤色化していた。赤色化した注射部位は対照群も含め 5 例の生存例にも観察された。

病理組織学的検査において、死亡例の臓器にうっ血がみられ、循環器呼吸器不全が示唆された。死因は被験物質に起因した低血糖によるものと考えられた。

注射部位には異物性肉芽、線維化、肉芽組織、出血、浮腫、フィブリン沈着、炎症性反応及び筋炎が観察された。これら病変の数、程度及び重篤度は対照群と 500 単位/kg/日投与群で顕著であり、用いられた溶媒量が多かったため皮下投与における忍容性が良好でなかったことを示している。他の検査項目については、被験物質投与に関連した影響は観察されなかった。

グルリジンの無毒性量は、雌雄とも 50 単位/kg/日であった。

血清中のグルリジン濃度を初回及び 23 回目投与後に測定した。血清サンプルは投与後 0.25、0.5、1、3 及び 6 時間に、各時点最大 2 例の動物より採取した。さらに、各投与群雌雄各 10 例の動物より 28 回目投与後のみ投与 24 時間後の放血時にサンプルを採取した。血清中のグルリジン濃度をラジオイムノアッセイにより測定した。次表に示す結果は 1 mL 中のグルリジン濃度を ng 単位で示した。変換係数は、1 ng が純物質の 28.6 µ単位に相当する。定量限界は 0.2 ng/mL であった。

TK 測定結果を表 2.6.6- 4 に示した。対照群ではアッセイの交差反応性により、内因性インスリンが検出された。ラットは最低用量である 50 単位/kg/日投与でも大量のグルリジンに 3 時間以上にわたり全身的に曝露された。蓄積性や性差は認められなかった。

表 2.6.6- 4 ラット 1 ヶ月間投与試験における TK

グルリジン 投与	性	投与量 (単位/kg/日)	t _{max} (時間)	C _{max} (ng/mL)	AUC _(0-6hr) (ng・h/mL)	AUC _(0-24hr) (ng・h/mL)
1 回目	雄	0	0.50	1.96	6.2	—
		50	0.25	1290	1303.7	—
		150	0.50	4077	4557.4	—
		500	0.25	7566	15696.9	—
	雌	0	0.50	3.94	7.8	—
		50	0.25	2114	1876.1	—
		150	0.50	3994	5558.6	—
		500	0.50	7294	14589.7	—
23 回目/ 28 回目	雄	0	0.25	3.77	10.3	27.8
		50	0.25	1257	1833.2	1861.0
		150	0.50	4289	7038.6	7111.9
		500	1.00	10843	20903.0	21934.7
	雌	0	0.50	2.59	8.8	27.1
		50	0.50	1597	1865.4	1899.1
		150	1.00	3629	7027.9	7105.8
		500	0.50	8351	15872.9	16240.6

サンプルは投与後 0.25, 0.5, 1, 3 及び 6 時間に採取した；24 時間サンプルは 28 回目投与の剖検時に採取した。
表中の値は平均値。対照群の値は内因性インスリンを示す。
—: 測定せず

2.6.6.3.2 ラット 6 ヶ月間反復投与毒性試験（TK を含む）

(添付資料 4.2.3.2-3, 4.2.3.2-4)

グルリジン（バッチ 1215）の 0、5、20 又は 80 単位/kg/日を各群雌雄各 20 例のラット（Sprague Dawley 系 SD, [REDACTED] より入手）に 1 日 1 回、6 ヶ月間（181 日間）皮下投与した。対照群には、投与群と同数の雌雄にプラセボ（バッチ番号 1214）のみを投与した。試験開始時、動物は約 6～7 週齢で、平均体重は雄 184g、雌 150g であった。6 ヶ月間の最終投与日翌日、各群の番号の若い雌雄各 10 例を安楽致死させ剖検した。各群の残り雌雄各 10 例は約 4 週間の回復試験に用いた。5、20 及び 80 単位/kg/日投与群にはそれぞれ 5、20 及び 80 単位/mL のグルリジンを含む注射液を、対照群にはプラセボをそれぞれ 1mL/kg 投与した。

観察及び検査項目は、一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、臓器重量、病理組織学的検査、血清中濃度及び抗体価測定であった。

80 単位/kg/日投与群の雄 11 例及び雌 2 例並びに 20 単位/kg/日投与群の雄 3 例及び雌 1 例が投与期間中に死亡した。死亡例の大部分は、投与期間の後半 3 ヶ月間に認められた。ほとんどの動物は一般状態の変化を呈することなく死亡した。これら動物の何例かは死亡前日、自発運動低下、うずくまり、腹臥又は横臥などの症状を呈した。死亡例に認められたこのような症状は被験物質の過度の血糖降下作用によるものと考えられた。

体重変化は試験全体を通してすべての投与群で同等であった。各投与群の平均摂餌量の対照群に対する割合（相対平均摂餌量）は 80 単位/kg/日投与群において投与期間中わずかに増加したが、他の投与群では同等であった。

20 及び 80 単位/kg/日投与群に一過性の自発運動低下が観察された。80 単位/kg/日投与群の雌雄に、横臥、腹臥又はうずくまりが各 1 回観察された。80 単位/kg/日投与群の雄 1 例が腹這前進又は強直性間代性痙攣を各 1 回呈した。毎週、歯、眼、可視粘膜及び神経学的検査について検査を行った結果、肉眼的に被験物質投与に起因した所見は認められなかった。

血液学的検査においては、80 単位/kg/日投与群雄に、統計学的に有意な軽度の赤血球数減少が認められた。6 ヶ月間投与後、20 及び 80 単位/kg/日投与群に軽微ではあるが統計学的に有意なプロトロンビン時間の延長がみられた。80 単位/kg/日投与群雄ではこの変化は回復期間後も観察された。中間及び最終検査時に、すべての被験物質投与群の雌に統計学的に有意な平均赤血球容積（MCV）の増加がみられた。しかし、この影響は軽微であり、また必ずしも他の関連する赤血球系変化を伴っていなかった。赤血球数に毒性学的に意義のある変化は認められず、中間検査時に軽微な変化がみられたのみであった。すなわち、20 及び 80 単位/kg/日投与群雌に軽度のヘマトクリット値の増加と、80 単位/kg/日投与群雌に軽度の網状赤血球の増加が認められた。中間検査時にみられた 80 単位/kg/日投与群雄の軽微な平均赤血球容積の増加を除くと、このような変化は雌においてのみ認められた。5 単位/kg/日投与群でみられた平均赤血球容積に及ぼす影響は軽微なものであり、特に毒性学的意義は低いと考えられた。

グルリジン投与群においては、用量依存性に軽度の血糖上昇がみられ、20 単位/kg/日投与群の雄（中間検査時のみ）及び 80 単位/kg/日投与群の雄（中間検査及び最終検査時）で統計学的有意差が認められた。80 単位/kg/日投与群の雌では、中間検査時の値のみが有意に高かった。これら軽度の血糖上昇は、インスリン投与後の血糖低下のリバウンド現象であり、毒性学的に意味のあるものではないと考えられた。20 及び 80 単位/kg/日投与群の雄において、最終検査時に総たん白及びグロブリンの統計学的に有意な低下がみられた。

尿検査においては投与に関連した所見は観察されなかった。

臓器重量においては、20 及び 80 単位/kg/日投与群の雄で肝臓の絶対及び相対重量の減少が認められた（相対重量では統計学的有意差あり）。回復期間後においても、80 単位/kg/日投与群の雄では軽微ではあるが肝の相対重量に対して統計学的に有意な減少が認められた。

投与初期に死亡した 6 例の剖検例では、胃内容物は認められなかった。病理組織学的にこれらの動物には特異的な所見は認められなかった。これは、インスリンの過量投与による低血糖に起

因していると考えられた。各投与群の生存例には被験物質に起因した病理組織学的変化は認められなかった。

結論として、ラット6ヵ月間投与毒性試験におけるグルリジンの無毒性量は5単位/kg/日であると考えられた。

ラット6ヵ月間投与試験では、血清中のグルリジン濃度を22回目及び176回目投与後にラジオイムノアッセイにより測定した。血清サンプルは投与0.25、0.5、1、3及び6時間後に、各時点最大2例より採取した。181回目投与後のみ24時間サンプルを各投与群雌雄それぞれ最大10例から放血時採取した。

対照群ではアッセイの交差反応性により、内因性インスリンが検出された。5単位/kg/日投与においても、動物は大量のグルリジンに3時間以上にわたって全身的に曝露されていた。蓄積性も性差も観察されなかった。

22回目及び176回目/181回目投与後のグルリジンのTK測定結果を表2.6.6-5に示した。

表 2.6.6- 5 ラット6ヵ月間投与試験における TK

グルリジン 投与	性	投与量 (単位/kg/日)	t _{max} (時間)	C _{max} (ng/mL)	AUC _(0-6hr) (ng・h/mL)	AUC _(0-24hr) (ng・h/mL)
22 回目	雄	0	0.50	2.00	10.8	—
		5	0.25	138	143.7	—
		20	0.50	414	622.0	—
		80	0.50	2517	3349.8	—
	雌	0	0.50	2.88	10.7	—
		5	0.25	142	106.8	—
		20	0.25	691	625.8	—
		80	0.25	2530	3210.2	—
176 回目/ 181 回目	雄	0	6.0	2.34	10.1	34.3
		5	0.25	111	140.6	169.8
		20	0.25	424	750.8	779.5
		80	0.50	2660	4589.7	4717.9
	雌	0	1.0	2.96	12.4	35.3
		5	0.25	137	138.3	160.4
		20	0.25	603	692.4	720.5
		80	0.25	2267	3487.0	3530.1

サンプルは投与0.25、0.5、1、3及び6時間後に採取した。24時間目のサンプルは181回目の投与後、剖検時採取した。

表中の値は平均値。対照群の値は内因性インスリンを示す。

—: 測定せず

2.6.6.3.3 イヌ 1 ヶ月間反復投与毒性試験 (TK を含む)

(添付資料 4.2.3.2-6, 4.2.3.2-7)

グルリジン (バッチ 1120) の 0、1、3 及び 10 単位/kg/日を各群雌雄各 3 例のイヌ (ビーグル犬、
より入手) に、1 日 1 回 1 ヶ月間にわたり皮下投与した。対照群には投与群と同数の雌雄にプラセボ (バッチ 1085) を投与した。試験開始時の動物の月齢は雄が約 9 ヶ月齢、雌が約 10 ヶ月齢で、平均体重は雄 10.8 kg、雌 9.9 kg であった。

1、3 及び 10 単位/kg/日投与群には 100 単位/mL のグルリジンを含む注射液をそれぞれ 0.01、0.03 及び 0.10 mL/kg を、対照群にはプラセボ 0.10 mL/kg を投与した。各群雌雄各 2 例を最終投与約 20 時間後に安楽致死させた。各群の残りの雌雄各 1 例は、約 4 週間の回復期間後に安楽致死させた。3 単位/kg/日投与群の雌 1 例及び 10 単位/kg/日投与群の雄 1 例は予定屠殺日前に安楽致死せなければならなかったため、これらの動物については回復期間後の検査は実施できなかった。

観察及び検査項目は、一般状態、体重、摂餌量、神経学的検査、眼科学的検査、心電図、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検、臓器重量、病理組織学的検査及び TK 測定であった。

3 単位/kg/日投与群の雌 1 例及び 10 単位/kg/日投与群の雄 1 例を除き、すべてのイヌは試験終了時まで生存した。2 例の瀕死動物は強直性間代性痙攣を伴う著しい低血糖症状を示したため、試験開始後それぞれ 24 日目及び 8 日目に安楽致死させた。

3 単位/kg/日投与群及び 10 単位/kg/日投与群の他のすべての動物においては、顕著な低血糖症状がみられた。1 単位/kg/日投与群の動物では被験物質に関連した症状は観察されなかった。一過性の低血糖症状を除けば、全投与群のすべての動物は良好な健康状態であった。

血清グルコースの減少が、グルリジン投与後に観察された。血清グルコース値は 1、3 及び 10 単位/kg/日投与群でそれぞれ投与約 3、6 及び 24 時間後に正常に復した。

表 2.6.6-6 に示すように、本試験では 0.5、1 及び 2 時間後に測定した平均血清グルコース濃度は、用量に関連した低下を示した。

表 2.6.6-6 イヌ 1 ヶ月間投与試験における平均血清グルコース濃度

イヌ 1 ヶ月間投与試験における投与 0.5, 1 及び 2 時間後測定時点の平均血清グルコース濃度		
投与量 (単位/kg/日)	平均±標準偏差 (mmol/L)	%
0	5.84 ± 0.44	100
1	2.64 ± 0.67	45.2
3	2.02 ± 0.16	34.6
10	1.95 ± 0.26	33.4

投与 1 日目の血清グルコース濃度より算出

いくつかの検査項目において統計学的に有意な増加が観察されたが、それらは散発的で、生理的範囲内の変化であり毒性学的に意味のあるものではなかった。

投与期間中に安楽致死させた2例の病理組織学的検査の結果、一般的に知られている低血糖を示唆する変化は全くみられなかった。

病理組織学的観察により、精巣上体に剥離した生殖細胞の明らかな脱落が認められた。これは試験終了時、安楽致死させた10単位/kg/日投与群のすべての雄及び3単位/kg/日投与群雄1例に認められた。10単位/kg/日投与群の1例では、この所見は精巣胚上皮の病理組織学的変化に関係しているものと考えられた。対照群を含む他の投与群のイヌと比較して、10単位/kg/日投与群の雄では脾臓におけるヘモジデリン沈着の軽度増加及び注射部位の軽微な炎症反応が認められた。

その他の検査パラメータに関しては被験物質に関連した影響は全く認められなかった。

以上の結果から、本試験における無毒性量は1単位/kg/日であった。なお、回復期間終了時において、評価可能であったいずれの動物においても、特記すべき所見は認められなかった。

血清中グルリジン濃度を1回目及び29回目の投与後に測定した。血清サンプルは投与前及び投与0.5、1、2、3、6及び24時間後に、各投与群雌雄各最大3例より採取した。

血清中のグルリジンの濃度は前述と同様、ラジオイムノアッセイにより測定した。

TK測定結果を表2.6.6-7に示した。対照群では、アッセイの交差反応性により内因性インスリンが検出された。1単位/kg/日投与においても、イヌは大量のグルリジンに2～3時間以上にわたって全身的に曝露されていた。蓄積性及び性差は認められなかった。

表 2.6.6- 7 イヌ 1 ヲ月間投与試験における TK

グルリジン 投与	性	投与量 (単位/kg/日)	t _{max} (時間)	C _{max} (ng/mL)	AUC _(0-24hr) (ng・h/mL)
1 回目	雄	0	5.0	2.34	31.4
		1	0.8	16.8	50.2
		3	0.8	80.0	203.2
		10	2.0	216	895.2
	雌	0	5.0	1.24	19.2
		1	0.7	14.5	44.5
		3	1.0	59.9	179.4
		10	1.7	211	951.1
29 回目	雄	0	1.5	1.38	18.6
		1	0.7	28.7	60.0
		3	1.0	130	225.4
		10	1.5	265	914.8
	雌	0	2.7	1.68	25.4
		1	0.7	27.1	59.0
		3	1.5	142	302.5
		10	1.2	345	1111.3

サンプルは投与前、投与 0.5, 1, 2, 3, 6 及び 24 時間後に採取した。
表中の値は平均値。対照群の値は内因性インスリンを示す。

2.6.6.3.4 イヌ 6 ヲ月間反復投与毒性試験（TK を含む）

（添付資料 4.2.3.2-8, 4.2.3.2-9）

グルリジン（バッチ 1215）の 0、0.5、1 及び 2 単位/kg/日を各群雌雄各 4～5 例のイヌ（ビーグル犬、XXXXXXXXXXより入手）に 1 日 1 回 6 ヲ月間にわたり皮下投与した。試験開始時の動物の月齢は雌雄とも約 8 ヲ月齢、平均体重は雄 10.8 kg、雌 9.3 kg であった。100 単位/mL のグルリジンを溶媒で希釈して 2、4 及び 8 単位/mL とし、各投与群に 0.25 mL/kg を投与した。対照群にはプラセボ（バッチ 1214）0.25 mL/kg を投与した。

2 単位/kg/日投与群の雄 1 例と雌 1 例が、強直性間代性痙攣を伴った重篤な低血糖症状を示したため、これらのイヌをそれぞれ投与 73 日目及び 150 日目に安楽致死させた。投与群の他の動物は試験終了時まで生存し、各群雌雄各 3 例は最終投与の翌朝安楽致死させた。すべての投与群の雌雄各 1 例は約 4 週間の回復期間終了後に安楽致死させた。

観察及び検査項目は、一般状態、体重、摂餌量、神経学的検査、眼科学的検査、心電図、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検、臓器重量、病理組織学的検査、インスリン抗体測定及びグルリジンの血清中濃度であった。

投与期間中に安楽致死させた動物を除き、他のすべての動物は良好な健康状態を示し、0.5 単位/kg/日投与群及び1 単位/kg/日投与群並びに2 単位/kg/日投与群の生存例には被験物質に関連した一般状態の変化は認められなかった。

体重においては、対照群と、0.5 単位/kg/日投与群、1 単位/kg/日投与群及び2 単位/kg/日投与群のその他の生存例（5 例中4 例）に被験物質投与に関連した変化はみられなかった。

投与期間中に安楽致死させた2 単位/kg/日投与群の雄に軽度の体重減少がみられた。同群の雌では、投与98 日目以降、体重増加は軽度ではあったが統計学的に有意な減少がみられた。

被験物質に関連した摂餌量の変化は観察されなかった。

神経学的検査、眼科学的検査及び心電図検査においては、試験開始時と比較して被験物質に関連した変化は観察されなかった。

血液学的検査では、いずれの検査項目においても被験物質に関連した変化は認められなかった。

血液生化学的検査では、投与群のすべての動物が、被験物質の薬理学的作用として血清グルコース濃度減少を示した。血清グルコース濃度は、0.5、1 及び2 単位/kg/日投与群でそれぞれ投与約2、3 及び6 時間後に正常範囲内に回復した。その他の検査項目に関しては、被験物質に関連した変化は認められなかった。

表 2.6.6- 8に示したように、本試験では投与0.5、1 及び2 時間後の3 時点での平均血清グルコース濃度は用量依存性に明瞭な低下を示した。

表 2.6.6- 8 イヌ6 ヶ月間投与試験における平均血清グルコース濃度

イヌ6 ヶ月間投与試験における投与0.5、1 及び2 時間後測定時点の平均血清グルコース濃度		
投与量（単位/kg/日）	平均±標準偏差 (mmol/L)	%
0	6.58±0.22	100
0.5	3.99±1.27	60.6
1	3.47±1.14	52.7
2	2.80±0.24	42.5

投与2 日目の血清グルコース濃度より算出

尿検査では被験物質に関連した変化は認められなかった。

剖検時、投与期間中に安楽致死させた雄の心臓、肝臓、腎臓、副腎、消化管、膀胱及び脾臓に循環不全を示唆する変化がみられた。投与期間中に安楽致死させた雌では、胃に未消化の餌が充

満してみられたのみであった。その他の生存例では、投与終了時における臓器重量に何ら異常はみられなかった。

病理組織学的には、投与期間中安楽致死させた2単位/kg/日投与群の雄に、低血糖に伴うと考えられる海馬領域の明らかな神経細胞壊死がみられた。さらに、胸腺の皮質壊死と、脾臓とリンパ節にそれぞれリンパ濾胞の壊死やリンパ球の枯渇が観察された。腎臓にはショックを示す病理組織学的変化が観察された。投与期間中に安楽致死させた2単位/kg/日投与群の雌には、グルリジン投与に関連した病理組織学的変化は全くみられなかった。2単位/kg/日投与群の生存例並びに1及び0.5単位/kg/日投与群には、グルリジン投与に起因にした病理組織学的変化は認められなかった。

結論として、グルリジンの0.5、1及び2単位/kg/日をイヌに1日1回、6ヵ月間皮下投与した結果、2単位/kg/日投与群の2例が重篤な低血糖症状を示したため安楽致死させた。グルリジンを1日1回、6ヵ月間投与した場合のイヌにおける無毒性量は1単位/kg/日であった。

血清中グルリジン濃度を投与30回目及び176回目に測定した。血清サンプルは、投与0.5、1、2、3、6及び24時間後に、単一時点採取法を用いて、各時点4例の動物より採取した。2単位/kg/日投与群では、血清サンプルは30回目投与後5例の動物より採取した。

血清中のグルリジン濃度をラジオイムノアッセイにより測定した。対照群ではアッセイの交差反応性により、内因性インスリンが検出された。0.5単位/kg/日投与においてもイヌは大量のグルリジンに2～3時間以上にわたり全身的に曝露されていた。蓄積性及び性差は観察されなかった。グルリジンの投与30回目及び176回目のTK測定結果を表2.6.6-9に示した。

表 2.6.6- 9 イヌ 6 ヶ月間投与試験における TK

グルリジン 投与	性	投与量 (単位/kg/日)	t _{max} (時間)	C _{max} (ng/mL)	AUC _(0-24hr) (ng・h/mL)
30 回目	雄	0	3.8	2.7	30.0
		0.5	0.5	7.2	39.4
		1	0.6	26.9	97.7
		2	0.8	69.6	173.6
	雌	0	1.8	2.4	29.5
		0.5	0.5	7.1	48.6
		1	0.5	26.6	67.5
		2	0.6	66.5	154.1
176 回目投与	雄	0	2.8	3.3	34.9
		0.5	0.6	9.4	50.8
		1	0.6	30.4	138.4
		2	0.9	60.0	170.8
	雌	0	3.3	3.4	43.1
		0.5	0.6	7.2	49.3
		1	0.5	18.8	57.6
		2	0.8	50.2	139.3

サンプルは投与前、投与 0.5, 1, 2, 3, 6 及び 24 時間後に採取した。
表中の値は平均値。対照群の値は内因性インスリンを示す。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

2.6.6.4.1 細菌を用いた復帰突然変異試験—Ames 試験

(添付資料 4.2.3.3.1-1)

Salmonella typhimurium の TA100、TA1535、TA1537 及び TA98 並びに *Eschericia coli* の WP2uvrA 菌株を用いて、グルリジン（バッチ番号 Kromasil C18 Op- 3-13/98）の変異原性試験を行った。ラット肝ホモジネート由来の代謝活性化系の存在下及び非存在下において、別々に 2 回の変異原性試験を実施した。いずれの試験系においても、被験物質は脱イオン水に懸濁し、各菌株は 5 段階の用量（50 ～ 5000 µg/プレート）に曝露した。

変異原性物質を含まない対照群では、自然発生復帰コロニー数は施設背景データの範囲内であった。すべての陽性対照物質で、復帰コロニー数が増加した。

グルリジンの細胞毒性は、プレート取り込み法及びプレインキュベーション法で行った結果、代謝活性化系の有無にかかわらず認められなかった。また、グルリジンは代謝活性化系の存在下及び非存在下でいずれの菌株においても復帰変異コロニー数の有意な増加を示さなかった。

以上の結果、グルリジンは試験した濃度範囲では、代謝活性化の有無に関わらず、変異原性を示さなかった。

2.6.6.4.2 ほ乳動物培養細胞を用いた *In vitro* 染色体異常試験

(添付資料 4.2.3.3.1-2)

グルリジン（バッチ番号 Op-3-13/98）の *in vitro* でのチャイニーズハムスター肺由来 V 79 細胞における染色体異常誘発の有無を調べた。各用量毎に 2 枚のプレートを用いて 2 回の実験を行った。

被験物質は細胞培養液（MEM）に懸濁し表 2.6.6- 10 に示す濃度で試験した。

表 2.6.6- 10 ほ乳動物培養細胞を用いた染色体異常試験

S9-mix 非存在下	S9-mix 存在下
3 時間処理：500, 1600, 5000 µg/mL 20 時間処理：500, 1600, 5000 µg/mL	3 時間処理：500, 1600, 5000 µg/mL

これらの濃度範囲は、溶解性及び細胞毒性を調べた予備試験の結果に基づいて設定した。予備試験では最高濃度の 5000 µg/mL では明らかな分裂指数の低下を示さなかった。ガイドラインでは、5000 µg/mL が濃度の上限とされているため、本試験においてはそれ以上の濃度は使用しなかった。

最高濃度でもグルリジンは染色体異常を有する細胞数の有意な増加を示さなかった。

陽性対照として用いた適切な変異原性物質は、染色体異常の有意な増加を示した。このことは、試験系の感度及び S9-mix が有効であったことを示していた。

グルリジンは、本実験条件下で代謝活性化系の有無に関わらず、V79 チャイニーズハムスター細胞の染色体突然変異（染色体異常）を誘発しなかった。

2.6.6.4.3 げっ歯を用いた *In vivo* 小核試験

（添付資料 4.2.3.3.2-1）

骨髓細胞における小核誘発を調べるため、ラットを用いて小核試験を実施した。

グルリジン（バッチ番号 1215）は溶媒（バッチ番号 1310）に溶解し、各群雌雄各 5 例のラット（Sprague-Dawley 系、XXXXXXXXXXより入手）に 0、100、300 及び 1000 単位/kg/日を 24 時間の間隔をおいて 2 回皮下投与した。シクロフォスファミド（Endoxan[®]）を陽性対照物質として使用し、雌雄各 5 例のラットに 40 mg/kg を 1 回経口投与した。

グルリジンの 100、300 及び 1000 単位/kg 投与群にそれぞれ 10、30 及び 100 単位/mL のグルリジンを 10 mL/kg 投与した。対照群にはプラセボ 10 mL/kg を投与した。

試験開始時、動物は 6 週齢で、体重は雄で 183 ～ 202 g、雌で 139 ～ 160 g であった。試験方法に従い、動物は 2 回目の投与 24 時間後に安楽致死させた。検査項目は、一般状態、剖検及び小核誘発を調べるための骨髓検査であった。

グルリジン 1000 単位/kg 投与により雄 3 例が死亡したため、動物を追加した。

毒性症状は観察されず、剖検の結果、グルリジン投与に関連した肉眼所見は認められなかった。

小核を含む多染性赤血球数の増加はみられなかった。雌雄とも総赤血球数に対する多染性赤血球数の割合はグルリジン投与で変化はなく、また、対照群値の 20 % 以上であった。

陽性対照群では、小核を有する多染性赤血球数の統計学的に有意な増加がみられた。この結果は試験系の感度が高かったことを示していた。総赤血球に対する多染性赤血球の割合は、有意な程度までには変化しなかった。

本試験条件下では、グルリジンは小核試験で陰性であることが示された。

2.6.6.5 がん原性試験（TK 評価を含む）

インスリンは代謝活性に加えて弱い細胞分裂能を有していることは良く知られており、分子構造が修飾されたインスリンアナログ製剤は細胞分裂能を亢進させる懸念がある。長期投与試験として行ったラット 12 ヶ月間反復投与毒性試験においてグルリジンのがん原性の有無を調べた。インスリンアナログ製剤である Asp-B10^{Ref. 2.6-19, Ref. 2.6-20}により乳腺腫瘍が誘発されたため、試験デザイン及びラットの系統に関して同一条件で試験を実施した。

2.6.6.5.1 ラットにおける 12 ヶ月間反復投与毒性試験

（添付資料 4.2.3.4.2-3）

投与量選択の根拠は、先に実施したラット 1 ヶ月間及び 6 ヶ月間投与毒性試験の結果及びその TK 測定結果に基づいて、グルリジンの投与量を 5、20 及び 50 単位/kg、投与頻度を 1 日 2 回とした。投与量は、アメリカ合衆国 FDA の CAC 委員会の投与量選択推奨基準にも合致していた。低血糖による二次的な動物の死亡を最小限にとどめるようにする一方、最高投与量での評価が可能となるよう 1 日 2 回の投与法を選択した。

高用量において、また可能性として中高用量においても、死亡により評価できる動物数が減少した場合に備えて、低用量として 2.5 単位/kg、1 日 2 回の投与を設定した。この投与量はヒトの推定臨床用量の数倍に相当する。

比較対照薬として用いたヒトインスリンの用量段階は、以前に行われた他のインスリン誘導体やアナログ製剤を使った試験結果に基づいて設定した。グルリジンとの比較のため、投与量 5、20 及び 50 単位/kg、1 日 2 回の同じ投与方法を選択した。グルリジン（バッチ番号 1352 及び 1376/1）の 2.5、5、20 又は 50 単位/kg を各群雌雄各 30 例のラット（Sprague Dawley 系 CD）に 1 日 2 回（約 8 時間間隔）、12 ヶ月間（最長 381 日）にわたり皮下投与した（1 日総投与量 5、10、40 又は 100 単位/kg）。比較対照群としてヒトインスリン（バッチ番号 40H051）の 5、20 又は 50 単位/kg を、各群雌雄各 30 例に 1 日 2 回（1 日総投与量 10、40 又は 100 単位/kg/日）グルリジンと同様に皮下投与した。対照群には、投与群と同数の雌雄にプラセボ（バッチ 1318、1351、1399、1460）を投与した。試験開始時、動物は約 6～7 週齢で、平均体重は雄 235 g、雌 170 g であった。検査項目は、一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、抗体価測定、臓器重量、剖検、病理組織学的検査及び Ki-67 免疫細胞化学検査とした。

159 例のラットが投与期間中に死亡し、4 例のラットを瀕死状態のため安楽致死させた。グルリジンの 2 x 20 及び 2 x 50 単位/kg/日投与群またはヒトインスリン投与群では、表 2.6.6-11 に示す通り、死亡例は投与量に依存して増加した。

表 2.6.6- 11 グルリジンのラット 12 ヶ月間毒性試験における死亡又は屠殺時別累積死亡数（各群雌雄各 30 例）

	対照		グルリジン								ヒトインスリン					
	溶媒		2 x 2.5 単位/kg/日		2 x 5 単位/kg/日		2 x 20 単位/kg/日		2 x 50 単位/kg/日		2 x 5 単位/kg/日		2 x 20 単位/kg/日		2 x 50 単位/kg/日	
月数	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
<2	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1	—	1	—	4	3
<4	—	1	1	—	—	—	1	1	1	1	2	—	3	2	11	5
<6	1	1	1	1	—	—	2	1	5	2	2	—	8	5	16	15
<8	2	1	2	1	—	—	7	3	10	6	2	2	15	6	24	19
<10	2	1	3	1	1	—	9	3	15	12	3	3	17	10	27	23
<12	5	1	4	2	2	2	9	7	20	16	6	3	21	11	28	26

全般的に雄は雌よりも影響が強く現れ、同じ投与量で比較した場合、死亡数は常にヒトインスリンの方がグルリジンよりも多かった。病理組織学的には、試験終了前に死亡した 22 例のラットの海馬に好酸性神経細胞壊死がみられ、これはインスリン投与による著しい低血糖に起因すると思われる変化であった。これらの脳の病変と、早期に死亡した 40 例のラットにみられた一般状態の変化から、死亡原因が低血糖であることが強く示唆された。被験物質投与群にみられたその他の死亡例も、著しい低血糖によるものと思われた。

グルリジン 2 x 50 単位/kg/日投与群雄の平均体重は統計学的に対照群に比べ有意に高かった（試験 50 日以後）。グルリジンの 2 x 5、2 x 20 及び 2 x 50 単位/kg/日投与群雌の平均体重は、試験 8 日目以後（2 x 5 単位/kg/日投与群では 141 日目まで、2 x 20 単位/kg/日投与群では 309 日目まで）、投与量に依存して、また統計学的に有意に高かった。試験終了前に対照群と比較した平均体重の差は、2 x 50 単位/kg/日投与群の雄と雌においてそれぞれ約 16 % 及び 13 % に達し、これらの投与群における試験期間を通しての体重増加量はそれぞれ 20 % 及び 24 % 高かった。

ヒトインスリンの 2 x 50 単位/kg/日投与群雄の平均体重は統計学的に有意に高かった（試験 22 日目以後）。すべてのヒトインスリン投与群雌の平均体重は、投与 8 日目以降（2 x 5 単位/kg/日投与群では試験 155 日目まで）用量依存性に、また統計学的に有意に高かった。2 x 50 単位/kg/日投与群の雄と雌では、対照群に比較して平均体重の差は最大それぞれ 19 %（試験 162 日目）及び 27 %（試験終了時）であった。試験終了時の体重増加量は生存動物数が少なかったため計算しなかった。試験期間を通しての相対平均摂餌量は、すべてのグルリジン投与群で同等であった（相対摂餌量が軽度（+8 %）増加した 2 x 50 単位/kg/日投与群を除く）。他の投与群雌雄で平均体重が増加していることを考慮すると、これは各投与群において絶対摂餌量が比例的に増加している

ことを示していた。ヒトインスリンの2 x 5 単位/kg/日投与群及び2 x 20 単位/kg/日投与群雌においては、試験全体を通して相対平均摂餌量は同等であった。2 x 20 単位/kg/日投与群雄(+14 %)及び2 x 50 単位/kg/日投与群(雄: +31 %, 雌: +13 %)では、試験全体を通して相対平均摂餌量が増加した。他の投与群雌雄の平均体重増加を考慮すると、この変化は絶対摂餌量が2 x 5 単位/kg/日投与群及び2 x 20 単位/kg/日投与群雌においては比例的に増加し、2 x 20 単位/kg/日投与群雄及び2 x 50 単位/kg/日投与群では比例的増加を上回るものであった。

早期に死亡した159例中25例においては、死亡に先立ち低血糖時にみられる典型的な一般状態(横臥又は腹臥、失調歩行、痙攣及び/又は自発運動低下)が1～数回にわたり観察された。それ以外には明らかに被験物質に関連した一般状態の変化は観察されなかった。対照群を含むすべての投与群の頸背部注射部位に硬結がみられた。硬結は雄では投与35～52週の間に各群2～13例に、また、雌では46～50週の間で認められたが、雄に比べ例数は少なく各群0～4例であった。投与部位の硬結を示した動物の中には浮腫又は外傷(滲出性又は痂皮状)が認められるものもあった。しかし、こうした変化は硬結を伴わない動物の頸部にも観察された。

触診できる腫瘍の発生頻度は、全般的に、すべての被験物質投与群雄及びグルリジン投与群雌で同等であった。触診できた腫瘍の総数は、ヒトインスリンの2 x 20 及び2 x 50 単位/kg/日投与群雌においてわずかに多かった。

血液学的検査においては、毒性学的に意味のある変化は認められなかった。しかし、グルリジン(2 x 50 単位/kg/日投与群雄及びすべての雌)及びヒトインスリン(2 x 5 及び2 x 20 単位/kg/日投与群雄のみ)投与群の一部において、軽度ではあるが統計学的に有意なトロンボプラスチン時間の延長が認められた。このトロンボプラスチン時間の延長はわずかであり、また必ずしも明確な用量依存性はなかったため、毒性学的に意味のあるものとは思われなかった。

血液生化学的検査においては、グルリジン(すべての投与群雄、2 x 20 及び2 x 50 単位/kg/日投与群雌)及びヒトインスリン(2 x 5 及び2 x 20 単位/kg/日投与群雄、2 x 20 及び2 x 50 単位/kg/日投与群雌)を投与した動物において、用量依存性の統計学的に有意な血清グルコースの上昇がみられた。採血は被験物質投与約24時間後に行われており、血清グルコースの上昇は、被験物質投与に関係した、用量依存性の低血糖に対するリバウンド現象を反映したものであり、毒性学的に意味のあるものではないと考えられた。

尿素窒素はグルリジン(2 x 20 及び2 x 50 単位/kg/日投与群雄並びに2 x 50 単位/kg/日投与群雌)並びにヒトインスリン(2 x 5 及び2 x 20 単位/kg/日投与群雄並びに2 x 50 単位/kg/日投与群雌)投与で用量依存性に有意な減少が認められた。観察された変化はたん白同化作用を反映していると推測され、被験物質の薬理学的作用によるものであると考えられた。

臓器重量においては絶対、相対重量とも毒性学的に意味のある差は認められなかった。剖検時グルリジンの2 x 2.5、2 x 5 及び2 x 20 単位/kg/日投与群及びヒトインスリンの2 x 20 及び2 x 50 単位/kg/日投与群に、乳腺に肉眼的異常を有する雌ラットの数が増加していた。

病理組織学的検査では、表2.6.6-12に示すとおり、すべてのグルリジン及びヒトインスリン投与群の雌に乳腺腫瘍が低頻度で観察されたが、対照群においては観察されなかった。雌ラットに

おける乳腺腫瘍の頻度は、溶媒対照群と比較して、2 x 2.5 単位/kg/日投与群及び 2 x 20 単位/kg/日投与群でより高かった。しかし、死亡率調整 PETO-Trend 検定による明確な用量依存性は認められなかった。さらに、乳腺の腫瘍性病変はヒトインスリン投与群においても同様の頻度で認められ、Mann-Whitney の U 検定により解析した結果、グルリジン投与群とヒトインスリン投与群との間に統計学的有意差は認められなかった。対照群において乳腺腫瘍が観察されなかったことは例外的である。投与群における乳腺腫瘍の発生頻度は社内背景データの値と同程度であり、また用量依存性がないことから、観察された乳腺腫瘍は自然発生的であると考えられる。

表 2.6.6- 12 グルリジンのラット 12 ヶ月間投与毒性試験における乳腺腫瘍をもつ雌 SD ラットの頻度（各群 30 例）

	対照	グルリジン				ヒトインスリン		
		2 x 2.5 単位/kg/日	2 x 5 単位/kg/日	2 x 20 単位/kg/日	2 x 50 単位/kg/日	2 x 5 単位/kg/日	2 x 20 単位/kg/日	2 x 50 単位/kg/日
乳腺腫瘍を有する総動物数： 良性及び悪性	0	6*	3	6*	3	3	6*	4

*Fisher の直接確率法片側検定により有意に増加 ($p < 0.05$)

PETO-Trend 検定により、グルリジン投与群に腫瘍頻度に関して用量依存性はみられなかった ($p < 0.01$)

投与部位では、対照群を含むほとんどのグルリジン及びヒトインスリン投与群の雄に、また、しばしば雌においても投与に関連した悪性線維性組織球腫が観察された。局所刺激性に関しては、溶媒、グルリジン及びヒトインスリンのすべての投与量及び濃度に対し中等度の忍容性が認められた。

結論として、実施した試験条件下ではグルリジン及びヒトインスリンのいずれもがん原性があるとは考えられなかった。

なお、本試験においてインスリン抗体の測定を行った。その結果、対照群と投与群のグルリジントレーサー結合値においては有意差を認めなかった。雄ラットの各投与群におけるヒトインスリントレーサー結合値に有意差は認められず、グルリジンのトレーサー結合値の範囲内にあった。しかし、雌のヒトインスリントレーサー結合値は明らかに高い値を示した。(詳細は2.6.6.8.2に記載)。

2.6.6.5.2 ラット 14 日間投与試験における TK

(添付資料 4.2.3.4.2-1, 4.2.3.4.2-2)

グルリジンとヒトインスリンの全身性曝露について調べるためにラットの 14 日間反復投与により TK 測定を行った。投与量及び投与方法はラット 12 ヶ月間投与毒性試験と同様に行った。

グルリジン（バッチ番号 1376/1）の 2.5、5、20 又は 50 単位/kg を各群雌雄各最大 10 例のラット（Sprague Dawley 系 CD、XXXXXXXXXXより入手）に 1 日 2 回（約 8 時間間隔）、14 日間にわたり皮下投与した。比較対照群としてヒトインスリン（バッチ番号 40H051）の 5、20 又は 50 単位/kg を各群雌雄各 30 例に 1 日 2 回、グルリジンと同様に皮下投与した。投与開始時の動物の週齢は 8 ～ 9 週齢、平均体重は雄 239g、雌 191g であった。

血清中のグルリジン及びヒトインスリンの濃度を 27 回/28 回投与（試験 14 日目）後に測定した。血清サンプルは投与 0.25、0.5、1、3 及び 6 時間後に、各採取時点で最大 2 例の動物から非連続的に採取した。さらに 27 回投与時のみ 24 時間後サンプルを、各投与群の雌雄各最大 2 例より採取した。

血清中グルリジン及びヒトインスリンの濃度をラジオイムノアッセイ法により測定した。対照群では、アッセイの交差反応性により内因性インスリンを検出した。結果をグルリジン及びヒトインスリンの ng/mL で表した。1 ng の純品に対するグルリジン及びヒトインスリンの変換係数は 28.6 及び 28.7 μ 単位である。定量限界は 0.2 ng/mL であった。

27回/28回投与後のグルリジンのTK測定結果を表2.6.6-13に要約した。

表 2.6.6- 13 ラット 14 日間投与試験におけるグルリジンの TK

グルリジン 投与	性	投与量 (単位/kg/日)	t _{max} (時間)	C _{max} (ng/mL)	AUC _(0~6h) (ng・h/mL)	AUC _(0~24h) *
27 回目	雄	0	0.25	2.98	—	101.2
		2 x 2.5	0.25	57.7	50.8	231.2
		2 x 5	0.25	188	160.0	599.9
		2 x 20	0.25	672	755.7	2559.6
		2 x 50	0.5	1569	2294.9	6656.8
	雌	0	24	2.79	—	67.9
		2 x 2.5	0.25	63.9	57.1	277.5
		2 x 5	0.25	140	131.1	533.7
		2 x 20	0.25	755	716.6	2571.5
		2 x 50	0.25	1666	2113.6	7816.2
28 回目	雄	0	0.25	5.54	—	—
		2 x 2.5	0.25	61	79.2	—
		2 x 5	0.25	166	186.2	—
		2 x 20	0.25	766	999.1	—
		2 x 50	0.25	1647	2677.1	—
	雌	0	0.25	2.93	—	—
		2 x 2.5	0.25	104	74.3	—
		2 x 5	0.25	177	183.6	—
		2 x 20	0.25	873	930.9	—
		2 x 50	0.25	2565	3087.9	—

*27 回目投与後 24 時間までの値 (28 回目投与後を含む)

表中の値は平均値。対照群の値は内因性インスリンを示す。

—: 測定せず

27回/28回目投与後のヒトインスリンの TK 測定結果を表 2.6.6- 14に要約した。

表 2.6.6- 14 ラット 14 日間投与試験におけるヒトインスリンの TK

ヒトインスリン投与	性	投与量 (単位/kg/日)	t _{max} (時間)	C _{max} (ng/mL)	AUC _(0~6h) (ng・h/mL)	AUC _{(0~24h)*} (ng・h/mL)
27 回目	雄	0	24	3.61	—	113.9
		2x 5	0.25	224	342.5	1000.8
		2x 20	0.50	834	1515.9	3675.4
		2x 50	0.50	2184	3776.2	10073.5
	雌	0	24	2.71	—	71.7
		2x 5	0.25	224	431.9	1156.8
		2x 20	0.50	1206	1799.8	5466.1
		2x 50	0.50	3002	3823.0	9729.9
28 回目	雄	0	0.25	5.99	—	—
		2x 5	0.25	258	347.8	—
		2x 20	0.50	881	1471.5	—
		2x 50	0.50	2009	4385.0	—
	雌	0	0.25	3.37	—	—
		2x 5	0.50	265	483.3	—
		2x 20	0.25	1338	2236.2	—
		2x 50	0.25	2390	3434.6	—

*27 回目投与後 24 時間までの値 (28 回目投与後を含む)
表中の値は平均値。対照群の値は内因性インスリンを示す。
—: 測定せず

対照群では、アッセイの交差反応性により内因性インスリンを検出した。最低用量の皮下投与後においても、ラットは大量のグルリジン及びヒトインスリンに 1 時間以上にわたり全身的に曝露された。両被験物質とも性差は観察されなかった。

2.6.6.5.3 ラット 6 ヶ月間及び 12 ヶ月間試験における細胞分裂活性の評価

通常の HE 染色では検出できない発癌過程での細胞分裂活性を検出するため、ラット 6 ヶ月間及び 12 ヶ月間反復投与試験において、細胞分裂マーカー(Ki-67)を用いた評価を行った。この評価は、「インスリンアナログ製剤のがん原性の非臨床評価に関する資料作成時の留意点」(EMEA-CPMP Points to consider document on the non-clinical assessment of the carcinogenic potential of insulin analogues, CPMP/SWP/372/01, London, November 15, 2001) に準じて行った。通常、細胞分裂活性

の増加は既存の新生物の増殖を促進する。従って、評価は自然発生腫瘍の発症が高頻度である臓器に焦点を当てて実施した。雌ラットでは通常、乳腺腫瘍はもっとも高頻度に発症する自然発生腫瘍であり、特にこの試験で用いた Sprague Dawley 系では顕著である。そのため、乳腺における細胞増殖活性に関しても検討を行った。

2.6.6.5.3.1 ラット 6 ヶ月間投与毒性試験における細胞分裂マーカーKi-67 の免疫組織化学的検出法を用いた乳腺の細胞分裂活性の評価

(添付資料 4.2.3.2-3)

Sprague-Dawley 系ラットを用いたグルリジンの 6 ヶ月間投与毒性試験から得られた乳腺の細胞分裂活性をレトロスペクティブに検査する目的で試験を実施した。Ki-67 免疫組織化学検査は、80 単位/kg/日投与群及び対照群のすべてのラット皮膚/乳腺及び腸管/腸間膜リンパ節のパラフィン切片について実施した。

マウス抗ラット Ki-67 抗体、(クローン MIB-5(DAKO))、ビオチン化ウサギ抗マウス抗体 (DAKO) 及びストレプトアビジン-ビオチンペルオキシダーゼ複合体 (DAKO) を用いて増殖性細胞を検出した。酵素活性は H_2O_2 /AEC の基質/発色基質の混合物により可視化し、hemalaun を用いて対比染色を行った。

回復試験に用いた動物を除き、80 単位/kg/日投与群と対照群の雌ラットを発情周期のステージにより群分けした。発情周期のステージは膣の病理組織学的検査により判定した。統計学上の理由のため、1 群 2 例以上の群のみを乳腺の細胞分裂活性の評価対象とした。腸管及び腸間膜リンパ節は高い細胞分裂活性を示すことが知られており、そのため陽性対照として使用した。ラベル指数の計算のため、乳腺組織の腺構造中の 1000 個以上の細胞を無作為に選んだ視野中で計数した。細乳管構造、終末乳芽及び腺房乳芽を有する細胞数を計測した。びまん性又は点状の赤い色素が核に認められる細胞を陽性とした。各個体のラベル指数は、計測した総核数 (1000 個以上) に対する陽性にラベルされた核のパーセントとして表した。

発情周期のステージにより分割した対照群とグルリジンの 80 単位/kg/日投与群の有意差についてデータを評価するため、Wilcoxon の 2 標本 Z 検定 (Mann-Whitney による U 検定) による統計解析を行った。

高用量群内では、4 例のラットが発情後期、3 例が発情間期、3 例が発情期にあった。対照群では、4 例のラットが発情後期、4 例が発情間期、1 例が発情期にあった。発情期の動物数は少な過ぎたため、統計解析はできなかった。

乳腺組織の細胞増殖活性に関する統計解析の結果、Wilcoxon の 2 標本 Z 検定 (検定法確認、可能であれば次のページの記載方法と統一する) ではグルリジン 80 単位/kg/日投与群と対照群の間に有意差はみられなかった。

したがって、細胞分裂マーカーKi-67 の免疫組織化学による検出結果及びその統計学的評価から、乳腺細胞の分裂に及ぼすグルリジンの影響は認められなかった。

2.6.6.5.3.2 ラット 12 ヶ月間投与毒性試験における細胞分裂マーカーKi-67 の免疫組織化学的検出法を用いた乳腺の細胞分裂活性の評価

(添付資料 4.2.3.4.2-3)

グルリジン又は比較対照として用いたヒトインスリンを Sprague-Dawley 系ラット () に 12 ヶ月間投与し、乳腺における細胞分裂を調べた。

通常の H-E 切片の病理組織学的検査では腫瘍発現が促進されているかどうか観察できないので、細胞の分裂活性が増加しているかどうかについて調べた。グルリジン 2 x 20 単位/kg/日及び 2 x 50 単位/kg/日投与群、ヒトインスリン 2 x 20 単位/kg/日投与群並びに対照群のすべての雌の非腫瘍性乳腺組織について Ki-67 免疫組織化学検査（実験方法の詳細は 6 ヶ月間投与試験を参照）を実施した。乳腺の増殖活性は明らかにラットの週齢に関連していた。高用量群の死亡例は試験期間中均等にみられており、死亡例に関しては Ki-67 の解析から除外した。

乳腺の増殖は明らかにホルモン状態に依存している。したがって、ラットの発情周期のステージごとに分類し、同じステージの動物の Ki-67 指標について投与群と対照群の間で比較した。ヒトインスリン 2 x 50 単位/kg/日投与群では、12 ヶ月後の予定屠殺時までわずか 4 例の雌しか生存していなかったため、増殖活性を評価しなかった。本試験の目的は、被験物質が腫瘍誘発作用があるか推定するために非腫瘍組織の細胞分裂活性を調べることであり、グルリジン及びヒトインスリンの両投与群に認められた乳腺組織の腫瘍は評価から除外した。

計測した総数 1000 個以上の腺細胞内に検出された Ki-67 陽性細胞数から、個々のラットについてラベル指数を計算した。増殖指数は対照群、グルリジン 2 x 20 単位/kg/日及び 2 x 50 単位/kg/日投与群並びにヒトインスリン 2 x 20 単位/kg/日投与群の雌ラットそれぞれについて互いに対比し、Wilcoxon の 2 標本 Z 検定 (Mann-Whitney による U 検定) を用いて評価した。平均増殖指数と標準偏差を表 2.6.6- 15 に示した。

表 2.6.6- 15 グルリジンのラット 12 ヶ月間投与毒性試験における雌乳腺組織の Ki-67 ラベル指数

	対照	グルリジン		ヒトインスリン
		2 x 20 単位/kg/日	2 x 50 単位/kg/日	2 x 20 単位/kg/日
発情後期	5.06 ± 2.38	5.13 ± 1.69	5.10 ± 3.59	5.48 ± 3.46
発情間期	6.11 ± 2.39	4.74 ± 2.23	5.87 ± 2.00	6.47 ± 4.04
発情期	6.03 ± 0.73	6.06 ± 2.90	5.94 ± 3.17	5.99 ± 2.83

平均値 ± 標準偏差、単位：%

CTD 第二部 一非臨床概要－2.6.6毒性試験概要文
アピドラ注

非腫瘍性乳腺組織細胞分裂活性に関して、Wilcoxon の 2 標本 Z 検定を用いた対比の結果、統計学的解析では、グルリジン投与群又はヒトインスリン投与群と対照群の間に有意差は認められなかった。

さらに、Kruskall Wallis 検定により、すべての投与群内の発情周期間に有意差が無いことが示された。また統計学的評価のために 1 群動物数を多くして、最終的に各周期のデータを組み合わせた。その結果、各群の動物数は 14 ～ 22 例となった。すべての実験群の平均増殖指数と標準偏差は表 2.6.6- 16 の通りである。

表 2.6.6- 16 グルリジンのラット 12 ヶ月間投与毒性試験における雌乳腺組織の Ki-67 ラベル指数

対照	グルリジン		ヒトインスリン
	2 x 20 単位/kg/日	2 x 50 単位/kg/日	2 x 20 単位/kg/日
5.67 ± 2.22	5.24 ± 2.01	5.55 ± 2.81	5.48 ± 3.29

平均値 ± 標準偏差、単位：%

前述の解析と同じように、Wilcoxon の 2 標本 Z 検定を用いて統計学的解析を行った。その結果、グルリジンまたはヒトインスリン投与群と対照群の間に細胞分裂活性に関して有意差は認められなかった。

結論として、細胞分裂マーカー Ki-67 の免疫組織化学の結果及びその統計学的評価により、グルリジン又はヒトインスリンの投与に関連した乳腺における全般的な細胞分裂活性への影響は認められなかった。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験（用量設定試験及び TK 評価を含む）

2.6.6.6.1 ラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に及ぼす試験ー 生殖毒性 Seg I 試験

（添付資料 4.2.3.5.1-1）

本試験は、グルリジン（Sprague-Dawley 系雌雄ラットの交配前、交配期間中及び交配した雌の妊娠 6 日まで皮下投与し、その生殖能及び初期胎児発生に及ぼす影響を調べるために実施した。比較の目的で、ヒトインスリンも試験に含めた。

グルリジン（バッチ 1309）の 0、1、3.15 及び 10 単位/kg/日を、また、ヒトインスリン（バッチ H 037）の 1 及び 10 単位/kg/日を各群雌雄各 23 例のラット（Sprague-Dawley 系、XXXXXXXXXXより入手）に 1 日 1 回皮下投与した。雄に対しては交配前 4 週間、交配期間中、及び交配後から屠殺されるまで（試験の約 7～8 週目）継続して投与した。雌に対しては交配前 2 週間及び交尾した雌には交尾後 6 日目まで継続投与した（精子確認日を 0 日として起算）。対照群には投与群と同数の雌雄にプラセボを投与した。投与開始時の動物の週齢は 8～10 週齢で、平均体重は雄 305 g、雌 209 g であった。グルリジン 1、3.15 及び 10 単位/kg/日投与群には 0.20、0.63 及び 2 単位/mL のグルリジンを、ヒトインスリン 1 及び 10 単位/kg/日投与群には 0.2 及び 2 単位/mL のヒトインスリンを、対照群には溶媒のみをそれぞれ 5 mL/kg 投与した。

すべての群について一般状態を毎日観察した。体重変化及び摂餌量は、雌については試験期間中、雄については交配前期間中に測定した。交配期間終了後、雄を剖検した。すべての雄について、各精巣上体尾部より採取したサンプル中の精子の数と運動性を調べた。雌は妊娠 17 日目に安楽致死させた。子宮を切開し、生存胎児数、死亡胎児数及び肉眼的異常の有無を調べた。

グルリジンの 10 単位/kg/日投与群の雌 2 例が投与 7 日目及び 21 日目に死亡した。ヒトインスリンの 10 単位/kg/日投与群の雌雄各 2 例が投与 3～28 日目の間に死亡した。これら投与群でみられた動物の症状は、腹臥、横臥、うずくまり、粗毛及び喘ぎ呼吸であった。また、ヒトインスリンの 10 単位/kg/日投与群の生存例雌 1 例には、血液様の凝固物が眼瞼に付着していた。

体重及び摂餌量には、被験物質投与による影響はみられなかった。

ヒトインスリンの 10 単位/kg/日投与群においては交尾までの期間が延長する傾向があった。他の投与群においては、発情周期、性周期及び生殖能は被験物質投与の影響を受けなかった。

妊娠動物数並びに子宮内発育は、被験物質投与の影響を受けなかった。同様に、黄体数、着床前胚死亡率、吸収胚数又は死亡胚数に差はみられなかった。着床数及び生存胎児数には被験物質投与による影響はみられなかった。

精巣上体の精子数はヒトインスリンの 10 単位/kg/日投与群において軽度低下した。その他の投与群においては、精子数は同等であり、被験物質に関連した影響はみられなかった。精子の運動性に関する検査では、いずれの投与群においても、被験物質投与に関連した影響は認められなかった。

剖検では被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

結論として、グルリジン及びヒトインスリンを交配前、交配期間中及び妊娠 6 日目までの期間 1 日 1 回 Sprague-Dawley 系ラットに投与した結果、10 単位/kg/日の投与量で一般状態の変化及び死亡が認められた。また、ヒトインスリンの 10 単位/kg/日投与群では、交尾までの期間の軽度延長及び精巣上体における精子数の軽度減少が観察された。

グルリジンの 3.15 単位/kg/日及びヒトインスリンの 1 単位/kg/日を投与した群では有害作用は観察されなかった。

以上の結果から、本試験におけるグルリジンの親動物に対する無毒性量は、それぞれ雄の一般毒性及び生殖能ともに 10 単位/kg/日、雌の一般毒性は 3.15 単位/kg/日、生殖能は 10 単位/kg/日であった。胎児に対する無毒性量は 10 単位/kg/日であった。

また、ヒトインスリンの親動物に対する無毒性量は、雄の一般毒性及び生殖能ともに 1 単位/kg/日、雌の一般毒性 1 単位/kg/日、生殖能 10 単位/kg/日であった。胎児に対する無毒性量は 10 単位/kg/日と考えられた。

2.6.6.6.2 ラットにおける胚-胎児発生に関する試験―生殖毒性 SegII 試験

用量設定試験

(添付資料 4.2.3.5.2-1)

グルリジン（バッチ 1215）の 0、15、50、150 及び 500 単位/kg/日を各群交配した 6 例の雌ラット（Sprague-Dawley 系、XXXXXXXXXXより入手）に妊娠 6～17 日目（精子を確認した日を 0 日とした）まで 1 日 1 回皮下投与した。3、10、30 又は 100 単位/mL のグルリジンを 5 mL/kg 投与した。対照群にはプラセボを同量投与した。投与開始時の動物の週齢は 9～11 週齢、平均体重は 203 g であった。ラットは妊娠 20 日目に安楽致死させた。検査項目は一般状態の観察を毎日行い、体重及び摂餌量は一定期間ごとに測定した。

剖検時に母動物の外表及び内臓を検査して、肉眼的異常の有無を調べた。子宮を切開して生存胎児、死亡胎児及び吸収胚の数を数えた。胎児体重、頭臀長及び胎盤重量を測定した。胎児については、肉眼的的外表異常の有無を調べた。

500 単位/kg/日投与群ではすべての動物が妊娠 7 日目までに死亡した。15、50 及び 150 単位/kg/日投与群の各 2 例が妊娠 6 日目の最初の投与後に死亡した。動物は腹臥、跳躍性及び回転性痙攣、眼の漿液性分泌物、喘ぎ呼吸及び自発運動低下を呈した。

体重は被験物質 15、50 及び 150 単位/kg/日投与で影響はみられなかった。摂餌量は 150 単位/kg/日で軽度に増加した。

剖検時、被験物質に関連した所見はみられなかった。

対照群 1 例及び 15 単位/kg/日投与群 1 例が妊娠しなかった。死亡例には子宮内に着床痕も受胎産物もみられなかった。胎児体重及び頭臀長は 150 単位/kg/日投与群で軽度に減少した。他の動物では帝王切開時に異常は観察されなかった。

この結果、グルリジンの 10 単位/kg/日が本試験の最高用量として適切であると考えられた。

本試験

(添付資料 4.2.3.5.2-2)

本試験は、グルリジンを交配した Sprague-Dawley 系雌ラットに妊娠 6 ～ 17 日目までの期間、1 日 1 回皮下投与した際の、母動物の健康状態及び胚、胎児の発生に及ぼす影響を調べる目的で実施した。ヒトインスリンを比較の目的で試験に含めた。グルリジン（バッチ 1215）の 0、1、3.15 及び 10 単位/kg/日またはヒトインスリン（バッチ H 037）1 及び 10 単位/kg/日を各群 20 ～ 25 例よりなる交配した雌ラット（Sprague-Dawley 系、XXXXXXXXXXより入手）に妊娠 6 ～ 17 日目（精子確認日を 0 日と起算）まで 1 日 1 回皮下投与した。グルリジンの 1、3.15 及び 10 単位/kg/日投与群には 0.2、0.63、及び 2 単位/mL のグルリジンを、ヒトインスリン 1 及び 10 単位/kg/日投与群には 0.2 及び 2 単位/mL のヒトインスリンを、対照群にはプラセボをそれぞれ 5 mL/kg 投与した。投与開始時の動物の週齢は 9 ～ 12 週齢、平均体重は 206 g であった。動物は妊娠 20 日目に安楽致死させた。死亡及び毒性症状の有無を調べるため、毎日一般状態の観察を行った。体重及び摂餌量は一定期間毎に測定した。

剖検時、妊娠動物を検査して肉眼的異常の有無を調べた。子宮を切開し、生存胎児、死亡胎児及び吸収受胎産物の数を調べた。胎児の体重、頭臀長、性比及び胎盤重量を調べた。また、胎児の外表、内臓及び骨格の観察を行った。

グルリジンの 10 単位/kg/日投与群 2 例が妊娠 6 日目の初回投与後死亡した。ヒトインスリンの 10 単位/kg/日投与群 4 例が妊娠 6 ～ 14 日目に死亡した。これらの群で観察された症状は自発運動低下、腹臥、横臥、跳躍性及び回転性痙攣であった。

グルリジン 10 単位/kg/日投与群において軽度の体重増加抑制が認められた。他の投与群においては、被験物質投与による体重への影響は認められなかった。

摂餌量はすべての投与群で同等であり、被験物質投与による影響はみられなかった。本試験では投与 0.5、1 及び 2 時間後に平均血中グルコース濃度を測定した。表 2.6.6- 17 に示した通り、グルリジン及びヒトインスリン投与により、用量依存性の血中グルコース濃度の減少がみられた。この変化は投与 4 時間後には回復した。

表 2.6.6- 17 ラットを用いた胚ー胎児発生試験における 0.5, 1 及び 2 時間の時点で測定した平均血
中グルコース濃度

被験物質	投与量 (単位/kg/日)	平均値±標準偏差 (mmo/L)	%
グルリジン	0	3.97±0.20	100
	1	2.58±0.57	65.0
	3.15	1.91±0.18	48.1
	10	1.60±0.34	40.3
ヒトインスリン	0	3.97±0.20	100
	1	3.30±0.83	83.1
	10	1.44±0.54	36.3

剖検時、被験物質投与に関連した影響はみられなかった。

帝王切開時、異常は観察されなかった。吸収された初期又は後期受胎産物数の増加はみられなかった。胎児体重、頭臀長、同腹児数、性比及び他の投与群の胎児体重に被験物質投与の影響はみられなかった。

波状及び/又は肥厚肋骨の頻度が、ヒトインスリンの 10 単位/kg/日投与群の胎児において軽度増加した。被験物質投与との関連を完全には否定することはできなかったが、この所見は明らかに母動物に対する毒性量で発生したものである。

結論として、グルリジン及びヒトインスリンの 10 単位/kg/日を妊娠 6 ～ 17 日目まで、Sprague-Dawley 系ラットに毎日投与すると、一般状態の変化と死亡がみられた。ヒトインスリン投与群の胎児に母動物の毒性量で軽微な肋骨異常の発現頻度のわずかな上昇が認められた。

グルリジンの 3.15 単位/kg/日及びヒトインスリンの 1 単位/kg/日を毎日投与しても、母動物に対する毒性又は胚胎児に対する毒性はみられなかった。

本試験の結果、グルリジン及びヒトインスリンにはラットにおける催奇形性はみられなかった。本試験における母動物に対する無毒性量は、グルリジンでは一般毒性 3.15 単位/kg/日、生殖能 10 単位/kg/日、ヒトインスリンでは一般毒性 1 単位/kg/日、生殖能 10 単位/kg/日であった。胎児発生に対する無毒性量は、グルリジンでは 3.15 単位/kg/日、ヒトインスリンでは 1 単位/kg/日であった。

TK

(添付資料 4.2.3.5.2-3)

TK 測定のため、グルリジン（バッチ 1215）1、3.15 及び 10 単位/kg/日を別途準備した各群 10 例の交配した雌ラット（Sprague-Dawley 系、XXXXXXXXXXより入手）に妊娠 6 ～ 12 日目（交尾確認日を 0 日とした）まで 1 日 1 回皮下投与した。1、3.15 及び 10 単位/kg/日投与群には 0.20、0.63 及び 2 単位/mL のグルリジンをそれぞれ 5 mL/kg 投与した。投与開始時の動物の

週齢は 9 ～ 11 週齢、平均体重は 210 g であった。動物は妊娠 12 日目に安楽致死させた。血漿中グルリジン濃度は 7 回目投与後に測定した。血漿サンプルは投与後 0.25、0.5、1、2 及び 4 時間の各採取時点で最大 2 例より採取した。血漿中のグルリジンの濃度はラジオイムノアッセイにより測定した。この方法でグルリジン及びラット内因性インスリンを含む免疫反応性インスリンの定量が可能である。変換係数は、1 ng が 28.6 µ単位の純品に相当する。定量限界は 0.2 ng/mL であった。

すべての投与群で毎日一般状態を観察した。体重及び摂餌量は試験期間を通じて測定した。

剖検時、肉眼的異常の有無を調べるため、母動物の外表及び内臓を観察した。子宮を切開し、黄体数及び受胎産物数を数えた。また、被験物質の血漿中濃度を測定した。

10 単位/kg/日投与群 1 例が妊娠 9 日に死亡した。この動物は跳躍性及び回転性痙攣、腹臥、知覚麻痺及び不規則呼吸を呈した。

体重増加量及び摂餌量には、被験物質投与による影響は認められなかった。

剖検時、死亡した 10 単位/kg/日投与群の動物の肝臓は暗褐色であった。

帝王切開では異常はみられなかった。

ラットは最低用量の 1 単位/kg/日投与群でも大量のグルリジンに全身的に曝露され、また投与量の増加に伴って比例的以上の C_{max} の増加を示した。

グルリジン 7 回目投与後の TK 測定結果を表 2.6.6- 18 に示した。

グルリジンの最高血漿中濃度はすべての投与群で投与 15 分後（最初のサンプル採取）にみられ、その濃度は 1、3.15 及び 10 単位/kg/日投与群でそれぞれ 10.6、46.7 及び 159 ng/mL であった。

対照群を設けなかったため、アッセイの交差反応性による内因性インスリンを測定できなかった。血液採取のスケジュールが限られていたため、濃度曲線下面積（AUC）を得ることはできなかった。

表 2.6.6- 18 グルリジン 7 回目投与後の TK 測定結果

グルリジン 投与	性	投与量 (単位/kg/日)	T _{max} (h)	C _{max} (ng/mL)
7 回目	雌	1	0.25	10.6
		3.15	0.25	46.7
		10	0.25	159

2.6.6.6.3 ウサギにおける胚-胎児発生試験－生殖毒性 SegII 試験

用量設定試験

(添付資料 4.2.3.5.2-5)

グルリジン（バッチ 1215）の 0、2、10 及び 50 単位/kg/日を各群 6 例の交配した雌ウサギ（ヒマラヤ種、[REDACTED]より入手）に妊娠 6～18 日（交配日を妊娠 0 日とした）まで 1 日 1 回皮下投与した。2、10 及び 50 単位/kg/日投与群には 4、20 及び 100 単位/mL のグルリジンを、対照群にはプラセボをそれぞれ 0.5 mL/kg 投与した。試験開始時の動物の月齢は 5～10 ヶ月齢、平均体重は 2.5 kg であった。動物は妊娠 29 日目に安楽致死させた。毎日、すべての群の一般状態を調べた。体重及び摂餌量は試験期間を通して測定した。

剖検時、母動物の肉眼的異常の有無を外表及び内臓について観察した。子宮を切開して生存胎児、死亡胎児及び吸収受胎産物の数を数えた。また、胎児体重、頭臀長及び胎盤重量を測定した。胎児については、肉眼的に検査して外表異常の有無を調べた。

10 及び 50 単位/kg/日投与群の各 4 例が妊娠 13 日目までに死亡した。10 及び 50 単位/kg/日投与群の各 1 例が瀕死状態となったため妊娠 10 日目に安楽致死させた。2 単位/kg/日投与群の 1 例が妊娠 16 日目に死亡し、同群の他の 1 例が流産したため妊娠 22 日目に安楽致死させた。これらの動物は腹臥又は横臥を示し、また跳躍性や回転性の痙攣並びに自発運動低下を呈した。

体重には被験物質投与による影響はみられなかった。

摂餌量は 2 及び 10 単位/kg/日投与群において軽度増加した。

剖検時、死後発見された 50 単位/kg/日投与群 2 例は、膀胱が膨満し緊張していた。2 単位/kg/日投与群 1 例及び 50 単位/kg/日投与群 2 例において、一方の子宮角と膣の接合が欠如していた。また、10 単位/kg/日投与群 1 例では、両側の子宮角と膣の接合が欠如していた。

50 単位/kg/日投与群 1 例は妊娠していなかった。死後発見例には、子宮内に着床痕あるいは受胎産物は認められなかった。胎児体重及び頭臀長は投与群で変化は認められなかった。子宮内胎児死亡数は 2 及び 10 単位/kg/日投与群で増加がみられた。

本試験結果に基づき、グルリジンの 1.5 単位/kg/日が本試験の最高用量として適当であると考えられた。

本試験

（添付資料 4.2.3.5.2-6）

本試験は、グルリジンの母動物の一般状態及び胚、胎児の発生に及ぼす影響を調べるために実施した。

グルリジン（バッチ 1215）の 0、0.25、0.5 及び 1.5 単位/kg/日またはヒトインスリン（バッチ H 037）の 0.25 及び 1.50 単位/kg/日を各群 20～26 例の交配した雌ウサギ（ヒマラヤ種、[REDACTED]より入手）に妊娠 6～18 日目（交配日を妊娠 0 日とした）まで 1 日 1 回皮下投与した。グルリジンの 0.25、0.5 及び 1.5 単位/kg/日投与群には 0.5、1 及び 3 単位/mL のグルリジンを、またヒトインスリン 0.25 及び 1.50 単位/kg/日投与群には 0.5 及び 3 単位/mL のヒトインスリンを、対照群には溶媒のみをそれぞれ 0.5 mL/kg 投与した。投与開始時の動物の月齢は 5～9 ヶ月齢、平均体重は 2.5 kg であった。動物は妊娠 29 日目に安楽致死させた。毎日、死亡の有無及び一般状態を観察した。体重及び摂餌量は、試験期間中、一定期間ごとに測定した。

CTD 第二部 ー非臨床概要ー2.6.6毒性試験概要文
アピドラ注

剖検時、妊娠動物の肉眼的異常の有無を観察した。子宮を切開し、生存胎児、死亡胎児及び吸収胎産物の数を数えた。胎児体重、頭臀長、性比及び胎盤重量を調べ、さらに胎児の外表、内臓及び骨格を検査した。

グルリジン 1.5 単位/kg/日投与群の 2 例が妊娠 8 日目と 12 日目に死亡した。同群の他の 2 例が、妊娠 23 日目と 27 日目に流産したためこれらを安楽致死させた。ヒトインスリン 1.5 単位/kg/日投与群 4 例が妊娠 8 ～ 16 日目の間に死亡し、さらに 1 例が痙攣による後肢骨折（動物はケージから飛び出し床に落下した）のため安楽致死させた。同群の雌 1 例が妊娠 26 日目に早産したため安楽致死させた。これらの投与群にみられた症状は、自発運動低下、腹臥、横臥、跳躍性及び回転性痙攣、流涎増加、運動失調、喘ぎ呼吸、浅呼吸、微弱拍動、変色尿及び摂餌量の減少であった。腹臥や横臥はグルリジンの 0.5 単位/kg/日投与群 1 例においても観察された。

体重増加量はすべての群で同等であった。

摂餌量は 1.5 単位/kg/日の両投与群で一過性に軽度増加した。被験物質を投与した他の投与群では、摂餌量は影響を受けなかった。

表 2.6.6- 19 に示すように、グルリジン及びヒトインスリンの両被験物質の投与により、投与 0.5、1 及び 2 時間後に測定した平均血中グルコース濃度において、用量依存性のある減少がみられた。この減少は 0.25 単位/kg/日投与群では投与後 4 時間には正常に復したが、それよりも高い投与群では 4 時間後においても減少がみられた。

表 2.6.6- 19 ウサギを用いた胚－胎児発生試験における投与後 0.5, 1 及び 2 時間の時点における平均血中グルコース濃度

被験物質	投与量 (単位/kg/日)	平均値±標準偏差 (mmo/L)	%
グルリジン	0	4.12±0.06	100
	0.25	2.25±0.54	54.6
	0.5	1.99±0.27	48.3
	1.5	1.63±0.18	39.6
ヒトインスリン	0	4.12±0.06	100
	0.25	2.20±0.34	53.4
	1.5	1.29±0.20	31.3

剖検時には被験物質投与に関連した影響はみられなかった。

帝王切開では、両被験物質の高用量群において、同腹児総数の減少を示した母動物数が増加した（グルリジン：4 例、ヒトインスリン：5 例）。生存胎児数減少を伴った着床後死亡数の著しい

増加がヒトインスリンの 1.5 単位/kg/日投与群においてみられた。グルリジンについては、0.5 及び 1.5 単位/kg/日投与群において着床後死亡数は軽度増加した。

グルリジンの 0.25 単位/kg/日投与群及びヒトインスリンの 0.25 単位/kg/日投与群においては、帝王切開時に異常は観察されなかった。

上記ヒトインスリンの 1.5 単位/kg/日投与群における生存胎児数に関する所見を除けば、胎児体重、胎児頭臀長、同腹児数、性比及び胎児体重において、被験物質投与の影響はみられなかった。

形態学的検査により、グルリジンの 1.5 単位/kg/日投与群及びヒトインスリンの 1.5 単位/kg/日投与群において、脊柱及び肋骨の異常をもつ胎児の頻度が軽度に上昇しているのが観察された。これらの異常は胸椎及び腰椎の側彎、脊椎弓又は脊椎体の形成不全、低形成、形成異常、癒合、断片化又は転位並びに肋骨の形成不全、短小化、又は癒合などであった。これらの所見は両高用量群に集中して観察されたため、被験物質投与との関連は否定できなかった。

結論として、グルリジン又はヒトインスリン 1.5 単位/kg/日をヒマラヤ種ウサギに妊娠 6～18 日目まで 1 日 1 回投与すると、一般状態の変化と死亡が観察された。同腹児総数の減少がみられた母動物と吸収胚の数が増加した。胎児の形態学的観察により、脊柱及び肋骨に異常をもつ胎児数が増加していることが示された。

グルリジンの 0.5 単位/kg/日投与群 1 例に一般状態の変化も観察された。同群においては吸収胚の頻度が軽度増加した。胎児の形態学的観察では被験物質の影響は観察されなかった。

グルリジン及びヒトインスリンの 0.25 単位/kg/日投与群においては、母動物に対する毒性も胚-胎児に対する毒性も観察されなかった。

本試験に関しては、母動物における一般毒性及び生殖能に対する無毒性量は、グルリジン及びヒトインスリンとも 0.25 単位/kg/日であった。また、胎児発生に対する無毒性量は、グルリジン及びヒトインスリンとも 0.25 単位/kg/日であった。

TK

(添付資料 4.2.3.5.2-7)

TK 測定のため、グルリジン（バッチ 1215）の 0.25、0.5 及び 1.5 単位/kg/日を別途準備した各群 10 例の交配した雌ウサギ（ヒマラヤ種、XXXXXXXXXXより入手）に妊娠 6～12 日目（交配日を妊娠 0 日とした）まで 1 日 1 回皮下投与した。0.25、0.5 及び 1.5 単位/kg/日投与群には、それぞれ 0.5、1 及び 3 単位/mL のグルリジンを 0.5 mL/kg 投与した。動物は妊娠 12 日目に安楽致死させた。すべての群において一般状態を毎日観察した。体重及び摂餌量は試験期間を通じて測定した。

剖検時に妊娠動物を観察して外表及び内臓の肉眼的異常の有無を調べた。子宮を切開し、黄体数及び受胎産物数を数えた。

血漿中のグルリジン濃度は 7 回目投与後の妊娠 12 日目に測定した。血漿サンプルは投与 0.25、0.5、1、2 及び 4 時間後の各採血時点において、最大 2 例の動物より採取した。血漿中のグルリジンの濃度はラジオイムノアッセイにより測定した。この方法により、グルリジン及び内因性ラ

ットインスリンなどの免疫反応性インスリンを測定することができる。結果はグルリジンの ng/mL で表した。

変換係数は、1 ng が純品の 28.6 μ 単位に相当する。定量限界は 0.2 ng/mL であった。

1.5 単位/kg/日投与群 1 例が妊娠 7 日目に死亡した。この動物は、死亡日以前に跳躍性及び回転性の痙攣を呈した。0.5 単位/kg/日投与群 1 例及び 1.5 単位/kg/日投与群の他の 1 例が妊娠 8 日目にそれぞれ跳躍性及び回転性の痙攣を起こした。

体重増加量及び摂餌量は、被験物質投与により明らかには影響されなかった。

剖検時、1.5 単位/kg/日投与群 1 例において、片側子宮角と膣の接合の欠如がみられた。1.5 単位/kg/日投与群の死後発見例には 5 個の黄体が観察されたのみであった。

7 回目投与後のグルリジンの TK 測定結果を表 2.6.6- 20 に示した。

表 2.6.6- 20 グルリジン 7 回目投与後の TK 測定結果

グルリジン 投与	性	投与量 (単位/kg/日)	T _{max} (h)	C _{max} (ng/mL)
7 回目	雌	0.25	0.25	7.8
		0.5	0.25	15.3
		1.5	0.50	80.2

対照群を設けなかったため、アッセイの交差反応性により測定される内因性インスリンを測定できなかった。グルリジンの最低用量である 0.25 単位/kg/日でも、投与後、ウサギは大量のグルリジンに全身的に曝露された。血液採取のスケジュールが限られていたため、濃度曲線下面積 (AUC) を得ることはできなかった。

2.6.6.6.4 ラットにおける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ー生殖毒性 SegIII 試験

(添付資料 4.2.3.5.3-1)

本試験は、グルリジン Sprague-Dawley 系雌ラットに胚-胎児発生期及び授乳期に皮下投与した場合の、グルリジンの出生前及び出生後の毒性を調べるために行った。ヒトインスリンを比較のために試験に含めた。

グルリジン (バッチ 1215) の 0、1、3.15 及び 8 単位/kg/日またはヒトインスリン (バッチ H 037) 1 及び 8 単位/kg/日を各群 23 例の交配した雌ラット (Sprague-Dawley 系、XXXXXXXXXXより入手) に妊娠 6 日目～分娩後 21 日目まで 1 日 1 回皮下投与した。グルリジン 1、3.15 及び 8 単位/kg/日投与群には 0.2、0.63、及び 1.6 単位/mL のグルリジンを、ヒトインスリン 1 及び 8 単位/kg/日投与群には 0.2 及び 1.6 単位/mL のヒトインスリンを、対照群にはプラセボをそれぞれ 5 mL/kg 投与した。試験開始時の動物の週齢は 10～12 週齢、平均体重は 206 g であった。

すべての群について、一般状態を観察した。体重は妊娠期間中及び授乳期間中に測定し、摂餌量は妊娠期間中に測定した。

母動物には自然分娩させ、産児を離乳期まで哺育させた。産児の成長発育及び行動を授乳期並びに離乳後の期間にわたって評価した。F₁世代の雌雄各 23 例を可能な限り多く同腹児より選び、成熟期まで成育させた。これらの動物を使用して水迷路試験による学習能の評価や性成熟の評価を行った。また、交配後、自然分娩させ、生殖能の評価も行った。F₂世代の分娩後、すべての動物を安楽致死させた。

グルリジン 8 単位/kg/日投与群の雌 4 例がそれぞれ試験 6、22、22 及び 43 日目に死亡した。ヒトインスリンの 8 単位/kg/日投与群の雌 9 例がそれぞれ試験 6、7、18、22、22、24、24、26 及び 42 日目に死亡した。これら投与群に認められた症状は、自発運動低下、粗毛、腹臥、跳躍性及び回転性の痙攣、漿液性眼分泌物及び流涎であった。その他の投与群では毒性症状はみられなかった。

体重はグルリジン 8 単位/kg/日投与群において、妊娠期間及び授乳期間に軽度で一過性に減少した。グルリジンの 8 単位/kg/日投与群又はヒトインスリンの 8 単位/kg/日投与群において、軽度で一過性の摂餌量減少がみられた。グルリジン又はヒトインスリンを F₀動物に投与しても、F₁動物の体重には影響は認められなかった。

妊娠期間の長さは、グルリジン又はヒトインスリンの投与により変化しなかった。着床数、生存胎児数あるいは死亡胎児数、過剰着床痕数及び出生率は両群で同等であった。産児の性比はグルリジン又はヒトインスリンの投与により変化は認められなかった。

生理学的発達（耳介の展開、発毛、切歯萌出、眼瞼開裂）、学習及び記憶能は、すべての投与群で同等であった。F₁動物の外部生殖器の発達も、すべての投与群で同等であった。

交配試験のために選択した産児の生殖能は、グルリジン又はヒトインスリンの F₀動物への投与による影響はみられなかった。同様に、F₁動物の妊娠及び分娩は、親動物にグルリジン又はヒトインスリンを投与しても影響は認められなかった。F₀及び F₁動物の剖検時にいくつかの変化がみられたが、そのいずれも投与に関連したものとは考えられなかった。

結論として、グルリジン又はヒトインスリン 8 単位/kg/日を Sprague-Dawley 系ラットの胚-胎児発生期及び授乳期に F₀動物に毎日投与することにより、一般状態の変化及び死亡が認められた。F₀動物の出生パラメータや授乳に対して、また F₁動物の生後発育、生殖能又は妊娠に対して影響はみられなかった。一方、グルリジンの 3.15 単位/kg/日及びヒトインスリンの 1 単位/kg/日投与群では何ら有害作用は認められなかった。

以上の結果から、本試験に関しては、母動物における一般毒性に対する無毒性量は、グルリジン 3.15 単位/kg/日、ヒトインスリンで 1 単位/kg/日、生殖能に対する無毒性量は、グルリジン、ヒトインスリンとも 8 単位/kg/日であった。F₁雌雄における一般毒性及び生殖能に対する無毒性量は、グルリジン、ヒトインスリンともいずれも 8 単位/kg/日であった。また、F₂胎児に対する無毒性量は、グルリジン、ヒトインスリンとも 8 単位/kg/日であった。

2.6.6.7 局所刺激性試験

2.6.6.7.1 ウサギにおける局所刺激性試験（皮下/ 静脈内/ 静脈周囲/ 筋肉内）

(添付資料 4.2.3.6-1)

本試験は、ウサギにおけるグルリジンの局所刺激性を調べるため実施した。

100 単位/mL の市販用グルリジン製剤（バッチ Bod 432/34/5）を各群 4 例の雌ウサギ（New Zealand 白色種、XXXXXXXXXXより入手）に、皮下（0.1 mL）、静脈内（0.5 mL）、静脈周囲（0.1 mL）又は筋肉内（0.5 mL）に単回投与した。対照として生理食塩液（9 mg/mL）を各投与経路ともグルリジンと同量投与した。試験開始時の動物の月齢は 2 ヶ月齢以上、平均体重は 4.0 ～ 5.1 kg であった。

皮下投与は側腹皮下に、静脈内投与は耳介静脈に、静脈周囲投与は耳介静脈周囲に、また筋肉内投与は背部筋肉に行った。グルリジンの投与は右側に、生理食塩液の投与は左側に行った。

インスリン投与により懸念される低血糖ショックの予防のため、グルリジンの投与直後に、20 %のブドウ糖液約 20 mL を各ウサギの頸部皮下に投与した。動物の行動を観察し、各群 2 例のウサギについては投与 24 時間後に投与部位を観察し、他の 2 例については投与 120 時間後に観察した。投与 24 及び 120 時間後に、各 2 例の動物を安楽致死させ、投与部位を切開して照明下で観察し、病理組織学的検査のために固定した。

グルリジン製剤を皮下及び静脈内投与した結果、数例の投与部位に軽度出血が認められたものの良好な局所忍容性が示された。同様の軽度出血は生理食塩液を投与した数例にも認められた。静脈周囲投与では皮下組織に被験物質の蓄積、顆粒球浸潤及び線維芽細胞反応が認められ、中等度の忍容性が示された。また、筋肉内投与では壊死、組織球浸潤、線維芽細胞反応及び筋芽細胞反応が認められ、中等度の忍容性が示された。

以上の結果、ウサギはグルリジン皮下投与時の忍容性は良好であった。

2.6.6.8 その他の毒性試験（実施している場合）

2.6.6.8.1 ラット 6 ヶ月間投与毒性試験におけるインスリン抗体の検出

（添付資料 4.2.3.2-3, 4.2.3.2-5）

グルリジンのラット 6 ヶ月間反復投与毒性試験（2.6.6.3.2 参照）の一環として、インスリン抗体の定量を行った。

グルリジンの 0、5、20 及び 80 単位/kg/日を各群雌雄各最大 10 例のラットに 1 日 1 回、6 ヶ月間皮下投与した。血清中のインスリン抗体の濃度を 24 回目及び 181 回目投与時の投与約 24 時間後に検査した。

インスリン抗体は半定量の ^{125}I -グルリジントレーサー結合アッセイにより測定した。結果は% B/T（サンプルカウント/カウント総数 x 100）で表した。

24 回目及び 181 回目投与後、対照群に比較して投与群では ^{125}I -グルリジントレーサー結合率の増加はみられなかった。このことは、ラットにおいてインスリン抗体の産生がなかったことを示唆した。これらの結果を表 2.6.6- 21 に示した。

表 2.6.6- 21 ラット 6 ヶ月間試験におけるインスリン抗体

グルリジン 投与	性	投与量 (単位/kg/日)	平均グルリジントレー サー結合率(% B/T)
24 回目	雄	0	5.08
		5	5.64
		20	5.43
		80	5.42
	雌	0	5.33
		5	5.39
		20	5.81
		80	5.35
181 回目	雄	0	4.72
		5	4.66
		20	4.24
		80	4.37
	雌	0	4.99
		5	4.80
		20	4.82
		80	5.16

サンプルは投与約 24 時間後に採取した。

2.6.6.8.2 ラット 12 ヶ月間投与毒性試験におけるインスリン抗体の検出

(添付資料 4.2.3.4.2-3, 4.2.3.4.2-4)

グルリジンのラット 12 ヶ月間反復投与毒性試験 (2.6.6.5.1 参照) の一環としてインスリン抗体を測定した。

ラット 14 日間反復投与 TK 試験においてインスリン抗体の測定を行った結果、抗体結合によりグルリジン又はヒトインスリンの測定が干渉される可能性が示された (2019-0119/2019-0119V01)。このため、12 ヶ月間投与試験においても 14 日間反復投与 TK 試験と同じ投与量、同じ投与方法で実施した。グルリジンの 0、2.5、5、20 及び 50 単位/kg を、また、ヒトインスリンの 5、20 及び 50 単位/kg を各群雌雄各最高 30 例のラットに 1 日 2 回、12 ヶ月間にわたり皮下投与した。血清中のグルリジン又はヒトインスリンの抗体濃度は、最終投与後 (約 12 ヶ月後) の試験終了屠殺日に採取したサンプルを用いて測定した。グルリジン又はヒトインスリンの抗体は、半定量的な ^{125}I -グルリジン又は ^{125}I -ヒトインスリントレーサー結合アッセイにより測定した。結果は % B/T (サンプルカウント/カウント総数 $\times 100$) で表した。

グルリジンの 12 ヶ月間反復投与後、投与群雌雄ラットのグルリジントレーサー結合率は溶媒対照群に比較して増加していなかった。このことは、ラットにおいてグルリジンの抗体は産生されなかったことを示している。

ヒトインスリンでは、ヒトインスリンの溶媒対照を設定しなかったため、グルリジンプラセボトレーサー結合率と比較した。12 ヶ月間反復投与後、雄ラットにおいては、ヒトインスリントレーサー結合率の増加はみられず、ヒトインスリン抗体の産生がなかったことが示された。しかしながら、雌ラットにおいては、ヒトインスリントレーサー結合率の増加がみられヒトインスリン抗体の産生が示された。

本試験結果から、14 日間反復投与 TK 試験 (2019-0119/2019-0119V01) の雌ラットにおいてヒトインスリントレーサー結合によりヒトインスリンの測定に干渉がみられたと必ずしも結論付けることはできなかったが、また除外することもできなかった。

ただ、グルリジン抗体による干渉は 14 日間反復投与 TK 試験では除外可能であることが示された。

最終投与日の平均グルリジン及びヒトインスリントレーサー結合率を表 2.6.6- 22 に示した。

表 2.6.6- 22 ラット 12 ヶ月間試験におけるインスリン抗体

被験物質	性	投与量 (単位/kg/日)	平均グルリジントレー サー結合率(% B/T)
グルリジン 最終投与後 (約 12 ヶ月)	雄	0	5.16
		2 x 2.5	5.05
		2 x 5	5.04
		2 x 20	5.12
		2 x 50	5.32
	雌	0	5.48
		2 x 2.5	5.45
		2 x 5	5.35
		2 x 20	5.50
		2 x 50	5.51
ヒトインスリン 最終投与後 (約 12 ヶ月)	雄	2 x 5	5.61
		2 x 20	6.69
		2 x 50	6.92
	雌	2 x 5	18.43
		2 x 20	24.68
		2 x 50	27.63

2.6.6.8.3 イヌ 6 ヶ月間投与毒性試験におけるインスリン抗体の検出

(添付資料 4.2.3.2-8, 4.2.3.2-10)

グルリジンのイヌ 6 ヶ月間反復投与毒性試験(2.6.6.3.4 参照)に含めて、インスリン抗体の測定を行った。各群雌雄各 4 例のイヌにグルリジンの 0、0.5、1 及び 2 単位/kg/日を 1 日 1 回、6 ヶ月間皮下投与した。30 回目及び 176 回目投与時の投与約 24 時間後に、血清中インスリン抗体濃度を測定した。2 単位/kg/日投与群では、血清サンプルは 30 回目投与後 5 例の動物より採取した。

インスリン抗体は、半定量的に ^{125}I -グルリジントレーサー結合アッセイにより測定した。結果は % B/T (サンプルカウント/カウント総数 x 100) により表した。表 2.6.6- 23 にデータを要約した。対照群に比較して 0.5 単位/kg/日投与群では ^{125}I -グルリジントレーサー結合率に増加はみられなかったが、1 及び 2 単位/kg/日投与群の少数例においては、30 回目及び 176 回目投与後にトレーサー結合率の増加がみられた。これらの結果は、イヌにおいてインスリン抗体の産生があったことを示している。少数例においてインスリン抗体が高かったが、反復投与毒性試験結果の解釈に影響を及ぼすことはなかった。さらに、試験期間中、免疫毒性を示唆する所見は認められなかった。

表 2.6.6- 23 イヌ 6 ヶ月間試験におけるインスリン抗体

グルリジン 投与	性	投与量 (単位/kg/日)	平均グルリジントレー サー結合率(% B/T)
30 回目	雄	0	4.07
		0.5	4.34
		1	15.09
		2	6.80
	雌	0	4.07
		0.5	4.21
		1	6.31
		2	4.69
176 回目	雄	0	4.25
		0.5	4.44
		1	17.12
		2	5.84
	雌	0	4.00
		0.5	4.14
		1	4.47
		2	4.87

サンプルは投与約 24 時間後に採取した。

2.6.6.8.4 ウサギを用いた免疫原性試験

(添付資料 4.2.3.7.1-1)

本試験は、グルリジンの皮下投与後のウサギにおける抗体産生を調べるために実施した。グルリジン（バッチ番号 1309）を雌ウサギ（New Zealand 白色種）10 例に 14 週間にわたって週 1 回皮下投与した。比較対照群としてヒトインスリン、ウシインスリンを、また対照群にはプラセボをグルリジン投与群と同数のウサギに同様に投与した。投与開始時の動物の週齢は 19 週齢で、平均体重は 2410 g であった。各投与群の投与は表 2.6.6- 24 の計画にしたがって行った。

表 2.6.6- 24 ウサギにおける抗原性試験計画

試験日	免疫注射（皮下）ー各動物に対する投与量
1	各動物 1 単位（Freund の完全アジュバントを用いて 1:2 の懸濁液）
8	各動物 0.5 単位（同上）
15	各動物 0.25 単位（同上）
22	各動物 0.125 単位（同上）
29	各動物 0.0625 単位（同上）
36; 43; 50; 57; 64; 71; 78; 85; 92	各動物 0.2 単位（Freund の完全アジュバント無し）各投与日に投与

血清サンプルは、各投与日の投与直前及び最終投与の 1 週間後に採取した（1 例のウサギにつき 15 サンプル）。インスリン抗体の検出には以下のトレーサーを使用して放射性免疫沈降法（RIP）により測定した。

- プラセボ群ではグルリジン、ヒトインスリン及びウシインスリンの各トレーサー
- ウシインスリン群ではウシインスリントレーサー
- ヒトインスリン群ではヒトインスリントレーサー
- グルリジン群ではグルリジン及びヒトインスリンの各トレーサー

総結合率（%）及び抗体価に関しては、全体の群平均値、最終サンプルの平均、 C_{max} 及び t_{max} （ C_{max} に到達した時点（週））を求めた。総結合率（%）に関してはレスポnder動物数も解析した。

グルリジン溶液の皮下投与に対し、動物は良好な忍容性を示し、全身性の毒性を示すことはなかった。結節性の腫脹及び膿瘍形成が、初回投与 3 日後より、すべての動物の注射部位に認められた。注射部位の変化はアジュバント（Freund の完全アジュバント）に関連したものと考えられた。

結果を表 2.6.6- 25 に示した。プラセボ群では、全トレーサーの平均結合率は 2.26 ～ 2.94 % であった。平均 C_{max} 結合率は 3.16 ～ 3.66 % の範囲にあった。 t_{max} 中央値は 8 週 ～ 13 週であった。ウシインスリン群の平均結合率は 85.74 %、平均 C_{max} 結合率は 104.84 % であった。 t_{max} 中央値は 4 週であった。ヒトインスリン群では全ての（overall）平均結合率は 31.54 %、平均 C_{max} 結合率は 52.68 %、 t_{max} 中央値は 9 週であった。この群で高い標準偏差が認められたことから、個々の動物で著しいバラツキがあったことを示していた。グルリジン群では、平均結合率は 66.78 %、平均 C_{max} 結合率は 94.08 %、 t_{max} 中央値は 7 週であった。

表 2.6.6- 25 免疫原性パラメータ

投与群 (n=10)		プラセボ	プラセボ	プラセボ (n=9)	グルリジン	ヒトインス リン	ウシインス リン
トレーサー		グルリジン	ヒトインス リン	ウシインス リン	グルリジン	ヒトインス リン	ウシインス リン
パ ラ メ ー タ	全ての平均結合率 (%)	2.26 ± 0.55	2.70 ± 0.33	2.94 ± 0.36	66.78 ± 20.70*	31.54 ± 25.77*	85.74 ± 3.36*
	最終結合率(%)	2.64 ± 0.89	2.98 ± 0.41	3.28 ± 0.48	88.31 ± 20.64*	43.26 ± 39.20*	103.64 ± 3.39*
	平均 C _{max} 結合率 (%)	3.16 ± 1.38	3.33 ± 0.40	3.66 ± 0.54	94.08 ± 17.07*	52.68 ± 35.75*	104.84 ± 2.75*
	結合に至るまでの t _{max} 平均値(週)	9 ± 4	10 ± 4	11 ± 4	7 ± 3	10 ± 4	5 ± 2*
	結合に至るまでの t _{max} 中央値(週)	8	10	13	7	9	4
	全ての平均抗体価				43.15 ± 56.26	8.42 ± 24.45 [†]	80.88 ± 34.82 [†]
	最終抗体価				130.07 ± 214.09	13.44 ± 37.16 [†]	94.86 ± 59.66
	平均 C _{max} 抗体価				145.23 ± 211.18	14.50 ± 39.33 [†]	170.35 ± 85.20

表中の値：平均値±標準偏差

統計学的解析：Wilcoxon 順位和検定

*: 各インスリン投与群とそれに対応するプラセボ群との有意差(p < 0.0001, α = 0.05)

†: グルリジン投与群とヒトインスリン投与群との有意差(p = 0.0089, α = 0.05)

‡: グルリジン投与群とウシインスリン投与群との有意差(p = 0.0147, α = 0.05)

概ね、グルリジンの免疫原性はヒトインスリンとウシインスリンの免疫原性の間にあった。

平均抗体価はグルリジン群、ヒトインスリン群及びウシインスリン群でそれぞれ 43.15、8.42、及び 80.88 であった。平均 C_{max} 抗体価はグルリジン群、ヒトインスリン群及びウシインスリン群でそれぞれ 145.23、14.50 及び 170.35 であった。

各投与群でみられた結合率をプラセボの値と比較するために、Wilcoxon の順位和検定を用いた。プラセボに対する全ての投与群（グルリジン、ヒトインスリン又はウシインスリン投与群）で、全ての（overall）平均結合率（%）、最終結合率（%）及び C_{max} 結合率（%）において有意差が認められた。t_{max} 値に関してはウシインスリン投与群はプラセボに対し統計学的有意差を示したが、グルリジン及びヒトインスリン投与群とプラセボ群では統計学的有意差は認められなかった。

全ての平均抗体価に関し、グルリジンとウシインスリンの間で Wilcoxon の順位和検定により統計学的有意差が認められたが、最終抗体価又は C_{max} 抗体価においては有意差は認められなかった。グルリジンの抗体価は、全ての平均抗体価、最終抗体価及び C_{max} 抗体価において、ヒトインスリン抗体価と比較して統計学的に有意差がみられた。

グルリジン投与群においては、グルリジントレーサー及びヒトインスリントレーサーとの結合を測定し、相関を計算した。最大の相関は 5.8 % ～ 54.7 % の範囲にあり、4 週 ～ 11 週でみられ、試験期間終了時には 0.0 % ～ 15.8 % の間に減少した。感作ウサギにおける *in vivo* の影響を調べることはこの試験の目的ではなかったため、グルリジン抗体の中和効果に関しては、結論付けることはできなかった。

試験の結果、グルリジンの投与によりウサギにおいてグルリジン抗体が産生されることが判明した。グルリジンにより誘発された免疫原性の程度は、ウシインスリンの免疫原性とヒトインスリンの免疫原性の間にあった。

2.6.6.8.5 添加物トロメタモールの毒性試験

本剤には添加物としてトロメタモールが含まれている。表 2.6.6- 26 に本剤 1 mL 中の成分・分量を示す。

表 2.6.6- 26 本剤 1 mL 中の成分・分量

成分	分量
グルリジン	3.49 mg (100 単位)
m-クレゾール	3.15 mg
トロメタモール	6.00 mg
塩化ナトリウム	5.00 mg
ポリソルベート 20	0.01 mg
水酸化ナトリウム	適量
塩酸	適量
注射用水	適量

上記成分中、トロメタモールの国内での皮下投与による使用前例は、1 日最大使用量が 2.4 mg であり、本剤の推定 1 日最大臨床用量（速効型インスリンの最大維持量：100 単位）から概算すると、トロメタモールの皮下投与での最大 1 日投与量は 6 mg と推測される。このことから、トロメタモールは新規添加物の範疇になるが、トロメタモールの静脈内投与での使用前例が 1 日最大使用量 266.20 mg であることより、トロメタモールの全身曝露におけるヒトへの安全性は十分評価されているものと考ええる。

また、グルリジンの単回投与毒性試験、反復投与毒性試験、生殖発生毒性試験及び遺伝毒性試験（*in vivo*）では、今回臨床試験で用いる製剤と同量のトロメタモールを含有する製剤が用いられ、1 日臨床使用最大量を超えるトロメタモールが投与されている。また、局所刺激性試験では

臨床での推定 1 日最大用量と同程度（体重 50 kg として 6 mg）のトロメタモールが投与されているが（表 2.6.6- 27）、トロメタモールの投与による局所刺激性はみられなかった。

さらに、トロメタモールを眼科用剤として 200 mg/mL までの使用前例があること、トロメタモールは極めて水に溶解しやすいことを加味すると、局所に投与しても残留する可能性は少なく刺激性は少ないと考えられる。

薬物動態においては、ヒトにトロメタモールを静脈内投与すると、血中半減期 1.2 時間（ $t_{1/2}$ （ α ））及び 5.6 時間（ $t_{1/2}$ （ β ））で 2 相性に減少する。生体内に吸収されたトロメタモールは、細胞間液に分布し、その後排泄される。ヒトにおいては、静脈内投与 24 時間後で尿中に投与量の 82 %が、イヌでは 8 時間後で 75 %以上が排泄されることが報告されている^{Ref. 2.6-21}。また、ウサギでは、投与 24 時間後に 52 ~ 76 %が尿中に排泄されることが報告されている（アシドーシス治療剤サム®セット添付資料、大塚製薬）。このことから、トロメタモールの薬物動態はヒトと動物で大きな差はないと考えられる。

以上のことより、本剤の成分中に皮下投与での使用前例を上回るトロメタモールが配合されているが、臨床試験に用いても安全性上問題はないと考える。

表 2.6.6- 27 毒性試験で投与されたトロメタモール量

種	試験名	トロメタモール量 ¹⁾ (mg/kg)
ラット	単回投与	60
イヌ	単回投与	2.4
ラット	1 ヶ月間反復	30
	6 ヶ月間反復	6
イヌ	1 ヶ月間反復	0.6
	6 ヶ月間反復	1.5
ラット	Seg.I	30
	Seg.II	30
ウサギ	Seg.II	3
ラット	In vivo 遺伝毒性	60
ウサギ	局所刺激性	0.12*
臨床での 1 日最大量**		0.12**

1): トロメタモールの投与量 = 6 mg/mL（グルリジンまたはプラセボ中の含量）x 最大投与容量 (mL/kg)

*: ウサギの体重を 5 kg として概算

** : 本剤の 1 日最大使用量を 100 単位としたときのトロメタモールの 1 日最大使用量は 6 mg であり、ヒトの体重を 50 kg として概算

2.6.6.9 考察及び結論

グルリジンの毒性を、国際的ガイドラインを遵守して総合的に評価した。グルリジンの単回投与及び反復投与毒性、並びに遺伝毒性、がん原性、生殖発生毒性、局所刺激性及び免疫原性を評価するための試験を実施した。これらの毒性試験において、予期された毒性所見以外に変化は認められなかった。反復投与毒性試験及び生殖発生毒性試験において観察されたすべての毒性学的影響は、被験物質の過度の薬理学的作用による低血糖に起因したものであり、これらの所見はヒトインスリンで知られている結果、あるいはいくつかの試験において比較対照薬として用いたヒトインスリンでみられる所見に類似していた。

反復投与毒性試験において、グルリジンに関連した毒性学的に意味のある影響は用量依存性でかつ可逆的であり、また薬理学的投与量では、観察されないものであった。観察されたほとんどすべての所見は、レギュラーのインスリンに関して知られている所見（痙攣、ショック、脳病変）に類似していた。また、イヌにみられた精巣上体及び精巣の変化も低血糖に起因するものであると考えられた^{Ref. 2.6-22, Ref. 2.6-23}。グルリジンに関連した類似の所見は、Novo Nordisk が開発した超速効型のアスパルト（インスリンアスパルト）を投与したラットにおいても観察されている。

ラットの 12 ヶ月間投与毒性試験では、グルリジン又はヒトインスリンを投与したすべての投与群で乳腺腫瘍が認められたが、対照群では観察されなかった。しかし、対照群で乳腺腫瘍が観察されなかったことはむしろ例外的である。弊社の社内背景データによると、本試験で用いた Charles River Sprague-Dawley 系ラットでは、少なくとも 3 %の動物が通常 12 ヶ月以内に乳腺腫瘍を発現している。したがって、対照群では投与群と同じ頻度の乳腺腫瘍が予測されていた。ラットは一般的に乳腺腫瘍を自然発生的に発生させる傾向にあり、特に Sprague-Dawley 系ラットは他の系統に比較して感受性が高い^{Ref. 2.6-24, Ref. 2.6-25, Ref. 2.6-26}。こうした知見及び PETO-Trend 検定で乳腺腫瘍頻度はグルリジンの投与量に依存していなかったことから、乳腺腫瘍の発現はグルリジン投与に起因した可能性は低いと考えられた。これは、Ki-67 免疫組織化学を用いたラット 12 ヶ月間及び 6 ヶ月間投与毒性試験における乳腺の *in vivo* 増殖能評価でも支持されている。これらいずれの試験においても、グルリジンもヒトインスリンも乳腺組織に対する細胞分裂作用は全く示さなかった。この所見は、*in vitro* の薬理試験データにおいてヒトインスリン及びグルリジンとも細胞分裂作用を示さなかったことと一致している。

同様の乳腺腫瘍の所見は、アスパルトにおいても観察されている。Sprague-Dawley 系ラット 12 ヶ月間投与毒性試験においては、アスパルト投与群では対照群に比較して高い乳腺腫瘍を呈した。また、アスパルトとヒトインスリンの間で乳腺腫瘍発生頻度に有意差はなかった^{Ref. 2.6-19, Ref. 2.6-20}。

グルリジンのがん原性に関するこれまでの試験結果を要約すると以下の通りである。

- ・ グルリジン及びヒトインスリンを投与した群において、乳腺腫瘍の発生が認められたが、その発生頻度は両群で同程度であり、また用量依存性が認められなかった。
- ・ グルリジンは、広範囲に行った *in vitro* の試験から、細胞分裂作用を示さず、インスリンと差は認められなかった。

- ・ Ki-67 免疫組織化学により、グルリジンの *in vivo* における乳腺の細胞増殖能を評価した結果、グルリジンの乳腺に対する細胞分裂の影響は、ヒトインスリンと同様認められなかった。
- ・ ラット 12 ヶ月試験ではグルリジンやインスリン投与群で認められた乳腺腫瘍の発生頻度を社内背景データと比較してみた場合、その発生頻度は背景データ正常範囲内であり、同試験で対照群に乳腺腫瘍の発生が認められなかったのは例外的なことであった。

結論として、信頼できる科学的実験に基づき、ヒトインスリンとアミノ酸配列が異なるグルリジンの細胞増殖活性はヒトインスリンと同程度であり、がん原性のリスクが既存のヒトインスリン製剤を越える可能性は低いと考えられた。

生殖発生毒性試験においては、グルリジンは、ラットで高用量を投与した親動物に対する毒性や反復投与試験で認められた変化と同様の毒性が認められたが、生殖能、胚-胎児発生及び産児の生後成長並びに発達に対して毒性作用を示さなかった。胚-胎児発生に及ぼす有害作用（胚-胎児死亡；骨格奇形）はウサギにおいてのみ観察され、また、毒性は、母動物に低血糖を誘発する毒性量でのみ認められた。同様の毒性はヒトインスリンによっても観察された。低血糖により誘発された所見以外の毒性は全く認められないことを示したこれら生殖試験の全体的成績は、一般にインスリンで良く知られている有害作用と一致している^{Ref. 2.6-27、Ref. 2.6-28、Ref. 2.6-29、Ref. 2.6-30}。

ウサギ局所刺激性試験において、グルリジンは、ヒトでの臨床適用経路である皮下投与で良好な忍容性を示した。

グルリジン投与により少数例のイヌに抗体産生が認められた。病理組織学的及び臨床病理学的観察から免疫学的作用は無いものと考えられる。また、ウサギの免疫原性試験でインスリン抗体の産生が認められたが、ICH ガイドライン（『バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価』）に示されているように、必ずしもヒトとの関連性は高くないと考えられる。

なお、本剤の開発において、非臨床毒性試験に関して更に検討すべきことが考えられた。その内容は以下のとおりである。

（１）イヌの 6 ヶ月間反復投与毒性試験でみられた神経壊死に関する検討

イヌの 6 ヶ月反復投与毒性試験において、高用量群の雄 5 例中 1 例（動物番号 8301）を投与 73 日目に、雌 5 例中 1 例（動物番号 8320）を投与 150 日目に一般状態の悪化のため安楽致死させた。この 2 例とも強直性痙攣を示し、またこの内の 1 例（動物番号 8301）に病理組織学的検査で海馬に限局性の神経細胞壊死がみられた。この神経細胞壊死は、グルリジンの直接作用ではなく、重度の低血糖状態が長期間繰り返されたことによって誘発されたものと考えられる。その理由を以下に示した。

- 1) イヌの6ヵ月反復投与毒性試験での血中グルリジン濃度と血糖降下作用との関連性をみると、血中グルリジン濃度の増加に伴って、血糖値が低下した（図 2.6.6- 1）。
- 2) 一般に、正常イヌは、インスリンに対する感受性に個体差が大きいことが知られている。本試験での個別データでは、安楽致死させたイヌは、低血糖の程度が強い傾向にあった。例えば、投与2日目の投与後1時間目の血糖値をみると、動物番号 8301（雄）のイヌは 1.7 mmol/L、動物番号 8320（雌）のイヌは 2.3 mmol/L と、他の動物に比べて低い値であった（表 2.6.6- 28雄：2.2 ～ 2.7 mmol/L、雌：2.8 ～ 3.5 mmol/L）。さらに、この2例は、低血糖の持続時間が他のイヌに比べて長い傾向がみられた（表 2.6.6- 28）。
- 3) 神経細胞壊死のみられたイヌは、動物番号 8301 のみで、この個体の低血糖の程度は強い傾向にあった（表 2.6.6- 28）。
- 4) グルリジンが直接神経細胞壊死に関与しているのであれば、イヌの6ヵ月反復投与毒性試験に用いた用量より高い 10 単位/kg を投与した 1 ヶ月間反復投与毒性試験において、神経細胞に何らかの障害が誘発するものと思われる。しかしながら、1 ヶ月間反復投与毒性試験の 10 単位/kg 投与群には、病理組織学的検査で何ら脳に変化はみられなかった。
- 5) 低血糖によるストレス反応によって、海馬は遅発性の障害を受けやすいことが報告されている Ref. 2.6-31、Ref. 2.6-32、Ref. 2.6-33、Ref. 2.6-34。

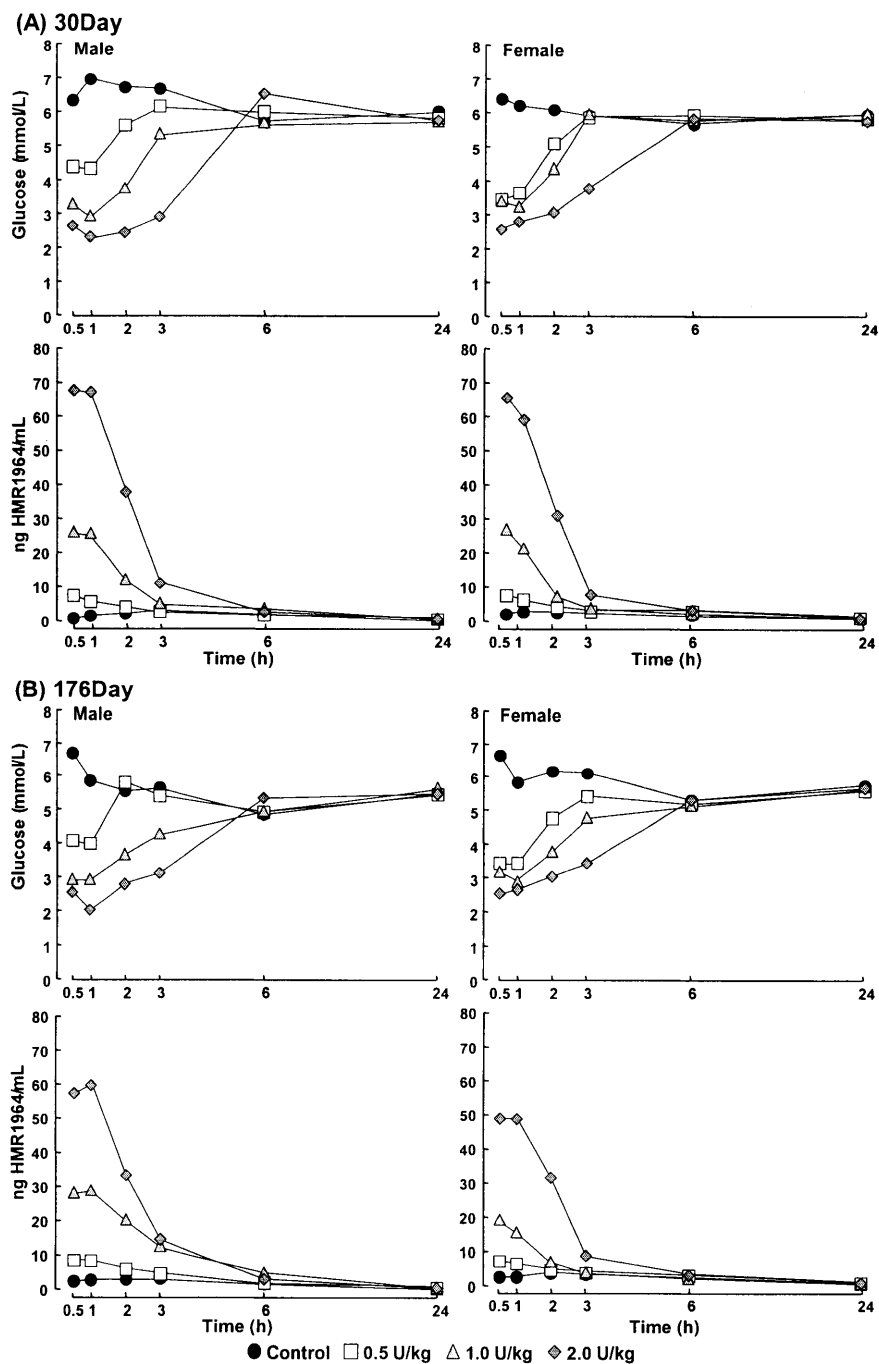


図 2.6.6- 1 イヌの 6 カ月間反復投与毒性試験における血糖値及び血中グルリジン濃度の変化

表 2.6.6- 28 イヌに 2 単位/kg 投与した 6 ヶ月間反復投与毒性試験での血糖値の変動（個別データ）

投与量	2 単位/kg									
性	雄					雌				
動物番号	8301	8302	8303	8304	8305	8318	8319	8320	8321	8322
生死	73 日目 安楽致死	生存	生存	生存	生存	生存	生存	150 日目 安楽致死	生存	生存
神経細胞壊死の有無	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
投与後 2 日目										
0.5 時間	3.0	1.9	2.3	2.4	2.7	2.9	2.9	2.9	3.4	2.7
1 時間	1.7	2.3	2.3	2.2	2.7	3.3	3.5	2.3	3.0	2.8
2 時間	1.9	3.1	2.6	2.7	2.9	4.5	4.1	2.6	3.6	2.7
3 時間	3.3	4.8	3.6	3.8	3.4	5.4	4.8	2.7	4.1	3.2
6 時間	5.5	6.1	6.4	5.7	6.8	6.2	6.9	5.4	5.6	5.7
24 時間	6.2	5.6	6.6	6.1	6.2	6.0	6.0	6.1	5.8	6.2
投与後 30 日目										
0.5 時間	2.0	3.1	2.7	2.3	3.0	3.1	3.2	1.0	2.7	2.8
1 時間	1.7	3.2	2.6	1.5	2.5	3.6	4.1	1.1	2.6	2.5
2 時間	1.8	3.1	2.7	1.7	2.8	4.2	4.3	1.5	3.0	2.3
3 時間	1.7	4.5	3.6	1.8	2.8	4.6	5.9	2.5	3.4	2.4
6 時間	6.3	6.0	6.5	6.7	7.1	6.2	5.6	6.0	5.9	5.3
24 時間	6.1	5.3	5.4	6.0	5.9	6.0	5.7	5.3	5.8	5.8
投与後 90 日目										
0.5 時間		1.9	2.5	1.7	2.8	2.0	3.4	1.7	2.5	2.1
1 時間		1.8	2.2	1.3	2.4	2.4	3.7	1.0	2.1	1.5
2 時間		1.6	2.7	1.6	2.8	3.2	4.3	1.7	3.0	1.9
3 時間		2.9	2.5	1.8	2.9	2.9	5.1	2.5	4.1	1.9
6 時間		5.9	6.3	5.8	6.8	5.4	6.5	5.4	6.3	5.0
24 時間		5.2	5.0	5.4	5.8	6.4	5.9	6.0	5.9	5.6
投与後 176 日目										
0.5 時間		2.5	2.7	2.3	2.8	3.0	2.6		2.1	2.5
1 時間		2.1	2.3	1.7	2.1	3.2	2.8		2.4	2.2
2 時間		3.6	3.1	2.3	2.2	3.8	2.9		2.9	2.5
3 時間		5.0	3.1	2.1	2.3	3.5	3.8		3.5	2.9
6 時間		4.9	5.7	5.0	5.7	5.4	5.8		5.7	4.2
24 時間		4.8	5.8	5.5	5.7	5.7	6.0		5.6	5.2

：安楽致死のため測定なし

（単位：mmol/L）

（2）非げっ歯類を用いた 9 ヶ月間反復投与毒性試験の必要性

ICH ガイドライン『バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価』（医薬審 第 326 号、2000 年 2 月 22 日付）において、「4. 4 反復投与毒性試験」の項に「慢性疾患に対する適応が検討されているバイオ医薬品の場合には、製造承認を得るために 6 ヶ月未満又はそれ以上の試験が実施される場合もあるが、一般的には 6 ヶ月の試験期間が適当と考えられてきている。臨床で長期使用を意図するバイオ医薬品の場合は、長期毒性試験の期間について科学的妥当性を明確にしておかなければならない。」と記載されている。バイオ医薬品製剤であるグルリジンを開発するに当たり、既に実施されているイヌの反復投与毒性試験成績を基に、イヌの 9 ヶ月間反復投与毒性試験の必要性について科学的に検討した結果、グルリジンのイヌにおける長期反復投与毒性試験の投与期間は、6 ヶ月間で十分と判断した。その理由を以下に示した。

CTD 第二部 ー非臨床概要ー2.6.6毒性試験概要文
アピドラ注

1. グルリジンは、インスリン同様にインスリン受容体に結合して、血糖降下作用を発現する薬剤である。

2. イヌの 1 及び 6 ヶ月間反復投与毒性試験において、各個体の低血糖の程度又は持続時間に違いがみられ、特に安楽致死させたイヌでは、生存例に比べて低血糖の程度が強いあるいは持続時間が長い傾向にあったことから、イヌのインスリン感受性は個体により差が大きいものと思われた（表 2.6.6- 29、表 2.6.6- 30）。このことから、十分に血糖降下が発現する用量では、低い用量でも死亡発現がみられる可能性は否定できないと考えられる。

3. イヌの 6 ヶ月間反復投与毒性試験で安楽致死させた高用量の 2 単位/kg は 1 日最大臨床使用予定量とほぼ同用量であり、この用量を用いて 9 ヶ月間反復投与毒性試験を実施しても、試験途中に多くのイヌが死亡し、評価できない可能性があるため、9 ヶ月間反復投与毒性試験の高用量としては 2 単位/kg 未満が設定される。ところが、2 単位/kg 未満を 9 ヶ月間反復投与したとしても、低い用量のため、6 ヶ月間反復投与毒性試験でみられた変化以外の新たな所見を得る可能性は低いと思われる。

表 2.6.6- 29 イヌの 1 ヶ月間反復投与毒性試験におけるグルリジン投与群の血糖値の変化（個別データ）

投与用量（単位/kg）		1			3			10		
雄	動物番号	8082	8083	8084	8085	8086	8087	8088	8089	8090
	低血糖	-	-	-	+	+	+	++	+	+
	生死	生存	生存	生存	生存	生存	生存	8 日目 安楽致死	生存	生存
	投与後 1 日目									
	0 時間	5.9	6.2	8.5	5.8	5.7	5.8	5.5	5.7	5.8
	0.5 時間	1.9	2.1	3.2	2.6	1.3	3.2	2.3	1.6	2.1
	1 時間	2.0	2.2	2.3	1.5	1.3	1.4	1.6	1.4	1.5
	2 時間	3.5	3.9	5.2	1.6	1.6	1.4	1.3	1.5	1.9
	3 時間	6.2	7.3	7.7	1.7	3.7	2.5	1.3	2.6	3.0
	6 時間	6.1	5.8	7.9	6.3	5.7	6.6	1.8	4.0	4.7
	24 時間	5.6	5.6	6.6	5.6	5.0	5.6	5.5	5.8	6.0
雌	動物番号	8094	8095	8096	8097	8098	8099	8100	8101	8102
	低血糖	-	-	-	+	+	++	+	+	+
	生死	生存	生存	生存	生存	生存	24 日目 安楽致死	生存	生存	生存
	投与後 1 日目									
	0 時間	5.4	6.6	6.3	6.3	6.1	6.1	6.1	5.7	6.4
	0.5 時間	1.5	2.5	3.4	1.4	3.0	1.6	2.5	2.3	2.2
	1 時間	1.9	2.0	2.2	2.3	2.0	2.6	1.4	1.9	2.2
	2 時間	2.6	1.7	3.5	2.6	3.7	1.3	2.0	2.8	2.6
	3 時間	5.1	6.0	7.1	3.5	4.0	0.8	2.7	4.3	2.1
	6 時間	5.7	5.8	5.3	6.6	6.8	5.5	3.5	7.3	4.2
	24 時間	5.4	6.2	6.2	5.9	5.8	6.4	6.2	6.3	6.5

-: 発現なし、+: 発現、++: 重度の発現

（単位：mmol/L）

表 2.6.6- 30 イヌの 6 ヶ月間反復投与毒性試験におけるグルリジン投与群の血糖値の変化（個別データ）

投与用量 (単位/kg)		0.5				1				2				
雄	動物番号	8293	8294	8295	8296	8297	8298	8299	8300	8301	8302	8303	8304	8305
	低血糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	神経細胞壊死	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	生死	生存	生存	生存	生存	生存	生存	生存	生存	73 日目 安楽致死	生存	生存	生存	生存
	投与後 2 日目													
	0.5 時間	1.8	2.1	3.2	3.5	2.6	2.6	2.3	2.3	3.0	1.9	2.3	2.4	2.7
	1 時間	3.4	4.3	4.5	4.4	4.0	3.7	3.4	3.1	1.7	2.3	2.3	2.2	2.7
	2 時間	5.6	5.8	5.1	6.4	4.9	3.6	4.6	4.1	1.9	3.1	2.6	2.7	2.9
	3 時間	6.4	6.0	5.6	6.7	5.6	5.5	5.4	5.4	3.3	4.8	3.6	3.8	3.4
	6 時間	5.5	5.3	5.0	6.0	6.2	4.9	5.5	4.9	5.5	6.1	6.4	5.7	6.8
	24 時間	6.2	6.5	5.9	5.9	6.3	6.1	6.1	5.5	6.2	5.6	6.6	6.1	6.2
雌	動物番号	8310	8311	8312	8313	8314	8315	8316	8317	8318	8319	8320	8321	8322
	低血糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	神経細胞壊死	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	生死	生存	生存	生存	生存	生存	生存	生存	生存	生存	生存	150 日目 安楽致死	生存	生存
	投与後 2 日目													
	0.5 時間	2.7	3.3	1.9	3.9	1.9	1.9	2.6	2.1	2.9	2.9	2.9	3.4	2.7
	1 時間	4.1	2.8	3.7	3.7	2.7	4.3	3.4	4.0	3.3	3.5	2.3	3.0	2.8
	2 時間	5.6	4.9	4.8	4.4	3.7	5.3	4.8	5.5	4.5	4.1	2.6	3.6	2.7
	3 時間	6.2	6.7	6.2	6.1	5.0	5.7	5.9	6.5	5.4	4.8	2.7	4.1	3.2
	6 時間	5.4	6.1	5.1	6.1	5.3	5.0	5.6	5.4	6.2	6.9	5.4	5.6	5.7
	24 時間	5.5	5.8	6.2	6.4	6.2	6.1	6.5	6.2	6.0	6.0	6.1	5.8	6.2

ー: 発現なし、+: 発現

(単位: mmol/L)

2.6.6.10 図表

図表は本文中に掲載した。

参考文献

- Ref. 2.6-1－Nudel DB, Lee JC, Downing SE. Reciprocal inhibition of cardiac responses to norepinephrine and insulin. *Am J Physiol.* 1977;233(6):H665-9.
(添付資料 4.3-3)
- Ref. 2.6-2－Clausen T, Elbrink J, Martin BR. Insulin controlling calcium distribution in muscle and fat cells. *Acta Endocrinol.* 1974;77:137-43.
(添付資料 4.3-2)
- Ref. 2.6-3－Rowe JW, Young JB, Minaker KL, Stevens AL, Palotta J, Landsberg L. Effect of insulin and glucose infusions on sympathetic nervous system activity in normal man. *Diabetes.* 1981;30:219-25.
(添付資料 4.3-4)
- Ref. 2.6-4－Liang CS, Doherty JU, Faillace R, Maekawa K, Arnold S, Gavras H, et al. Insulin infusion in conscious dogs: effects on systemic and coronary hemodynamics, regional blood flows and plasma catecholamines. *J Clin Invest.* 1982;69:1321-36.
(添付資料 4.3-5)
- Ref. 2.6-5－Christensen NJ. Acute effects of insulin on cardiovascular function and noradrenaline uptake and release. *Diabetologia.* 1983;25:377-81.
(添付資料 4.3-6)
- Ref. 2.6-6－Chalew SA, Sakamoto RN, McCarter R, Hanukoglu A, Kowarski AA, Matjasko J. Quantitative monitoring of brain function, vital signs, and hormonal response during acute insulin-induced hypoglycemia. *J Clin Monit.* 1989;5:229-35.
(添付資料 4.3-38)
- Ref. 2.6-7－Eckert B, Agardh CD. Hypoglycaemia leads to an increased QT interval in normal men. *Clin Physiol.* 1998;18:570-5.
(添付資料 4.3-7)
- Ref. 2.6-8－Marques JLB, George E, Peacey SR, Harris ND, Macdonald IA, Cochrane T, et al. Altered ventricular repolarization during hypoglycaemia in patients with diabetes. *Diabetic Medicine.* 1997;14:648-54.
(添付資料 4.3-8)

Ref. 2.6-9 – インスリン(1996 年、講談社サイエンティフィック刊、葛谷健編)、第 1 章、15 頁

(添付資料 4.3-39)

Ref. 2.6-10 – Drejer K, Kruse V, Larsen UD, Hougaard P, Bjorn S, Gammeltoft S. Receptor binding and tyrosine kinase activation by insulin analogues with extreme affinities studied in human hepatoma HepG2 cells. *Diabetes*. 1991;40:1488-95.

(添付資料 4.3-40)

Ref. 2.6-11 – Finn FM, Titus G, Kamber B, Hofmann K. Binding and autophosphorylating activity of human insulin analogs. *Biol Chem Hoppe-Seyler*. 1989;370:559-64.

(添付資料 4.3-41)

Ref. 2.6-12 – Valverde AM, Lorenzo M, Pons S, White MF, Benito M. Insulin receptor substrate (IRS) proteins IRS-1 and IRS-2; differential signaling in the insulin / insulin-like growth factor-I pathways in fetal brown adipocytes. *Mol Endocrinol*. 1998;12:688-97.

(添付資料 4.3-42)

Ref. 2.6-13 – Miele C, Caruso M, Calleja V, Auricchio R, Oriente F, Formisano P, et al. Differential role of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2 in L6 skeletal muscle cells expressing the Arg¹¹⁵² → Gln insulin receptor. *J Biol Chem*. 1999;274:3094-102.

(添付資料 4.3-43)

Ref. 2.6-14 – Rother KI, Imai Y, Caruso M, Beguinot F, Formisano P, Accili D. Evidence that IRS-2 phosphorylation is required for insulin action in hepatocytes. *J Biol Chem*. 1988;273:17491-7.

(添付資料 4.3-44)

Ref. 2.6-15 – Stenz F, Identification of insulin intermediates and sites of cleavage of native insulin by insulin protease from human fibroblast. *JBC*, 1989; 264(34), 20275-82

(添付資料 4.3-9)

Ref. 2.6-16 – Duckworth W, Degeneration of insulin generated by hepatocytes by insulin protease. *JBC*, 1988;263(4), 1826-33

(添付資料 4.3-10)

Ref. 2.6-17 – Auer RN, Kalimo H, Olsson Y, Siesjö BK The temporal evolution of hypoglycemic brain damage. II. Light- and electron-microscopic findings in the hippocampal gyrus of the rat. *Acta Neuropathol*. 1985 ;67: 25-36

(添付資料 4.3-13)

Ref. 2.6-18 – Auer RN Progress review: Hypoglycemic brain damage. Stroke 1986;17(4): 699-708
(添付資料 4.3-14)

Ref. 2.6-19 – FDA Summary Basis of Approval of Novolog-Insulin Aspart. Application Number 20-986,
Pharmacology Review(s), Toxicology, pp23-30, 2000
(添付資料 4.3-19)

Ref. 2.6-20 – Dideriksen LH, Jorgensen LN, Drejer K Carcinogenic effect of the human insulin analogue B10-
Asp in female rats. Diabetes 1992 ; 41, Suppl. 1: 143A
(添付資料 4.3-45)

Ref. 2.6-21 – Nahas GG, Sutin KM, Fermon C, Streat S, Winklund L, Wahlander S. et al. Guidelines for the
treatment of acidaemia with THAM. Drugs 1998;55, 191-224
(添付資料 4.3-46)

Ref. 2.6-22 – Fukuoka M, Tanimoto T, Zhou Y, Kawasaki N, Tanaka A, Ikemoto I, Machida T. Mechanisim
of testicular atrophy induced by di-n-butylphthalate in rats. Part 1. J. Appl. Toxicol. 1989;9(4):
277-83
(添付資料 4.3-17)

Ref. 2.6-23 – Grootegeed JA, Jansen R, van der Molen H J The role of glucose, pyruvate and lactate in ATP
production by rat spermatocytes and spermatids. Biochem. Biophy. Acta 1984;767: 248-58
(添付資料 4.3-18)

Ref. 2.6-24 – Charles River Deuchland Spontaneous neoplastic lesions and selected non-neoplastic lesions in
the CrI: CD (SD) BR rat. In: Collection of Charles River Lab. Publications, p81, 1992
(添付資料 4.3-25)

Ref. 2.6-25 – Sher SP, Jensen RD, Bokelman DL Spontaneous tumors in control F344 and Charles River-CD
rats and Charles River CD-1 and B6C3HF1 mice. Toxicology Letters 1982;11, 103-10
(添付資料 4.3-23)

Ref. 2.6-26 – van Zwieten MJ, HogenEsch H, Majka JA, Boormann GA Nonneoplastic and neoplastic lesions
of the mammary gland in: Morh U, Dungworth DL, Capen CC: Pathobiology of the Aging Rat,
vol. 2. ILSI Press, Wasington, p. 460-75, 1995
(添付資料 4.3-24)

CTD 第二部 –非臨床概要–2.6.6毒性試験概要文
アピドラ注

- Ref. 2.6-27 – Baeder, C Embryotoxicological/ teratological investigation, including effects on postnatal development, of the new oral antidiabetic glimepiride after oral administration to rats and rabbits. Clin. Rep. 1993;27(5): 1477-92
(添付資料 4.3-32)
- Ref. 2.6-28 – Brinsmade AB. Entwicklungsstörungen am Kaninchenembryo nach Glukosemangel beim trächtigen Muttertier. Nachdruck verboten. Übersetzungsrecht vorbehalten. 1956;140-53
(添付資料 4.3-27)
- Ref. 2.6-29 – Chomette G Entwicklungsstörungen nach Insulinshock beim trächtigen Kaninchen. Beitr. Pathol. Anat. 1995;115: 439-51
(添付資料 4.3-26)
- Ref. 2.6-30 – Hofmann T, Horstmann G, Stammberger I Evaluation of the reproductive toxicity and embryotoxicity of insulin glargin (Lantus) in rats and rabbits. Int. J. Toxicol. 2002;21: 181-9
(添付資料 4.3-33)
- Ref. 2.6-31 – Shimada A, Morita T, Ikeda N, Torii S, Haruna A Hypoglycaemic brain lesions in a dog with insulinoma. J. Comp. Path. 2000;122, 67-71.
(添付資料 4.3-12)
- Ref. 2.6-32 – Auer RN, Wieloch T, Olsson Y, Siesjo BK The distribution of hypoglycemic brain damage. Acta Neuropathol. 1984 ;64. 177-91.
(添付資料 4.3-20)
- Ref. 2.6-33 – Okeda R, Shibutani M, Matsuo T, Tajima T Pathological effects of maternal hypoglycemia on fetal development in cats. Acta Pathol. Jpn. 1992;42, 316-24.
(添付資料 4.3-47)
- Ref. 2.6-34 – Auer RN, Hugh J, Cosegrove E, Curry B Neuropathologic findings in three cases of profound hypoglycemia. Clin. Neuropathol. 1989;8(2), 63-8.
(添付資料 4.3-21)



サノフィ・アベンティス株式会社
東京都新宿区西新宿三丁目 20 番 2 号

アピドラ注

CTD 第二部 ― 非臨床概要

2.6.7 毒性試験概要表

略号一覧表

略称、略号	内容
AUC	濃度時間曲線下面積
F ₀	親世代
F ₁	第一世代
GLP	医薬品の安全性試験の実施に関する基準
ICH	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
MCV	平均赤血球容積
TK	トキシコキネティクス

目次

略号一覧表	2
2.6.7.1 毒性試験一覧表	5
2.6.7.2 トキシコキネティクス試験の一覧表	10
2.6.7.3 A トキシコキネティクス試験成績の一覧	11
2.6.7.3 B トキシコキネティクス試験成績の一覧	12
2.6.7.3 C トキシコキネティクス試験成績の一覧	13
2.6.7.4 毒性試験使用ロット	14
2.6.7.5 単回投与毒性試験	16
2.6.7.6 反復投与毒性試験 - 重要な試験以外の試験	18
2.6.7.7 A 反復投与毒性試験	19
2.6.7.7 B 反復投与毒性試験	21
2.6.7.7 C 反復投与毒性試験	23
2.6.7.7 D 反復投与毒性試験	25
2.6.7.7 E 反復投与毒性試験	27
2.6.7.7 F 反復投与毒性試験	31
2.6.7.8 A <i>In Vitro</i> 遺伝毒性試験	33
2.6.7.8 B <i>In Vitro</i> 遺伝毒性試験	36
2.6.7.9 <i>In Vivo</i> 遺伝毒性試験	38
2.6.7.10 がん原性試験	39
2.6.7.11 生殖発生毒性試験 - 重要な試験以外の試験	40

CTD 第二部 – 非臨床概要 – 2.6.7 毒性試験概要表
アピドラ注

2.6.7.12 生殖発生毒性試験－受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験	41
2.6.7.13 A 生殖発生毒性試験－胚・胎児発生に関する試験	43
2.6.7.13 B 生殖発生毒性試験－胚・胎児発生に関する試験	45
2.6.7.13 C 生殖発生毒性試験－胚・胎児発生に関する試験	47
2.6.7.13 D 生殖発生毒性試験－胚・胎児発生に関する試験	48
2.6.7.13 E 生殖発生毒性試験－胚・胎児発生に関する試験	50
2.6.7.13 F 生殖発生毒性試験－胚・胎児発生に関する試験	52
2.6.7.14 生殖発生毒性試験－出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験	53
2.6.7.15 新生児を用いた試験	56
2.6.7.16 局所刺激性試験	57
2.6.7.17 その他の毒性試験	58

試験の種類	動物種及び系統	投与方法	投与期間	投与 (単位/kg)	GLP 適用	実施施設	試験番号	記載箇所
単回投与毒性試験	マウス Hsd:ICR (CD-1)	皮下	-	1000	適	■ ¹⁾	HMR017853	4.2.3.1-1
	ラット Hsd: Sprague Dawley (SD)	皮下	-	1000	適	■ ¹⁾	HMR017849	4.2.3.1-2
		静脈内	-	100, 1000	適	■■■■■ ²⁾	F20■■■TOX0584	4.2.3.1-3
	イヌ Beagle (予備)	皮下	-	10, 20	非	■■■■■■■■■■ ³⁾	F20■■■TOX0321 Amendment	4.2.3.1-4
	イヌ Beagle	皮下	-	20, 40	適	■■■■■■■■■■ ³⁾	F20■■■TOX0322 Amendment	4.2.3.1-5

5

CTD 第二部 - 非臨床概要 -2.6.7 毒性試験概要表
アピドラ注

一覧表 (続き-1)

試験の種類	動物種/系統	投与方法	投与期間	投与量 (単位/kg/日 ^{a)})	GLP 適用	実施施設	試験番号	記載箇所
反復投与毒性試験	ラット Hsd: Sprague Dawley (SD)	皮下	1 ヶ月間	0, <u>50</u> , 150, 500	適	■ ¹⁾	F19 ■ TOX0178	4.2.3.2-1
		皮下	6 ヶ月間	0, <u>5</u> , 20, 80	適	■ ²⁾	F20 ■ TOX0572 Amendment 1 Amendment 2 Amendment 3	4.2.3.2-3
	イヌ Beagle	皮下	1 ヶ月間	0, <u>1</u> , 3, 10	適	■ ²⁾	F19 ■ TOX0166 Amendment 1	4.2.3.2-6
		皮下	6 ヶ月間	0, 0.5, <u>1</u> , 2	適	■ ²⁾	F20 ■ TOX0570 Amendment 1 Amendment 2	4.2.3.2-8
がん原性試験の代 替として実施 (予 備)	ラット Chales River Sprague Dawley (CD)	皮下	14 日間	0, 2.5, 5, 20, 50(x2 回) ヒトインス リン: 5, 20, 50 (x2 回)	適	■ ²⁾	F20 ■ TOX0038	4.2.3.4.2-1
がん原性試験の代 替として実施	ラット Chales River Sprague Dawley (CD)	皮下	12 ヶ月 間	0, 2.5, 5, 20, 50 (x2 回) ヒトインス リン: 5, 20, 50 (x2 回)	適	■ ²⁾	F20 ■ TOX0209	4.2.3.4.2-3

1): ■

2): ■

一覧表 (続き-2)

試験の種類	動物種/系統	投与方法	投与期間	投与量 (単位/kg/日)	GLP 適用	実施施設	試験番号	記載箇所
遺伝毒性試験	<i>S. typhimurium</i> <i>E.coli</i>	<i>In Vitro</i>	-	0, 50, 160, 500,1600, 5000 μg/plate	適	■ ¹⁾	HMR017717	4.2.3.3.1-1
	V79 チャイニーズハ ムスター肺線維芽細胞	<i>In Vitro</i>	-	500, 1600, 5000 μg/mL	適	■ ¹⁾	HMR017536	4.2.3.3.1-2
	ラット Hsd: Sprague Dawley (SD)	皮下	24 時間 間隔で 2 回	0, 100, 300, 1000	適	■ ²⁾	F20■TOX0065	4.2.3.3.2-1
がん原性試験	未実施 (ラット 12 ヶ月間反復投与毒性試験にてがん原性の有無について評価)							

1): ■

2): ■

CTD 第二部 - 非臨床概要 -2.6.7 毒性試験概要表
アピドラ注

一覧表 (続き-3)

試験の種類	動物種/系統	投与方法	投与期間	投与量 (単位/kg/日)	GLP 適用	実施施設	試験番号	記載箇所
生殖発生毒性試験	ラット Hsd: Sprague Dawley (SD)	皮下	♂: 交配前 4 週間～ 安楽致死時 ♀: 交配前 2 週間か ら妊娠 6 日まで	0, 1, 3.15, 10 (ヒトインスリ ン: 1, 10)	適	2)	F20 TOX0147	4.2.3.5.1-1
	ラット Hsd: Sprague Dawley (SD)	皮下 (DF)	G6 - G17	0, 15, 50, 150, 500	適	2)	F20 TOX0002	4.2.3.5.2-1
	ラット Hsd: Sprague Dawley (SD)	皮下	G6 - G17	0, 1, 3.15, 10 (ヒトインスリ ン: 1, 10)	適	2)	F20 TOX0033	4.2.3.5.2-2
	ラット Hsd: Sprague Dawley (SD)	皮下 (TK)	G6 - G12	1, 3.15, 10	適	2)	F20 TOX0051	4.2.3.5.2-3
	ウサギ Chbb:HM(SPF) Kleirusse	皮下 (DF)	G6 - G18	0, 2, 10, 50	適	2)	F20 TOX0003	4.2.3.5.2-5
	ウサギ Chbb:HM(SPF) Kleirusse	皮下	G6 - G18	0, 0.25, 0.50, 1.50 (ヒトインスリ ン: 0.25, 1.50)	適	2)	F20 TOX0046	4.2.3.5.2-6
	ウサギ Chbb:HM(SPF) Kleirusse	皮下 (TK)	G6 - G12	0.25, 0.50, 1.50	適	2)	F20 TOX0052	4.2.3.5.2-7
	ラット Hsd: Sprague Dawley (SD)	皮下	G6 - 分娩後 21 日	0, 1, 3.15, 8 (ヒトインスリ ン: 1, 8)	適	2)	F20 TOX0295	4.2.3.5.3-1

TK: トキシコキネティクス測定、 DF: 用量設定試験

1):

2):

CTD 第二部 ― 非臨床概要 ― 2.6.7 毒性試験概要表
アピドラ注

一覧表 (続き-4)

試験の種類	動物種/系統	投与方法	投与期間	投与量 (単位/kg/日)	GLP 適用	実施施設	試験番号	記載箇所
局所刺激性試験	ウサギ NZW (CRL: KBL(NZW)BR)	皮下	単回投与 24 時間 後及び 120 時間 後に観察	10	適	[REDACTED] 2)	F20 [REDACTED] TOX0499	4.2.3.6-1
		静脈内		50				
		静脈周囲		10				
		筋肉内		50				
その他の毒性試験 免疫原性試験	ウサギ NZW	皮下	週 1 回注射 14 週間	0, 0.0625, 0.125, 0.2, 0.25, 0.5, 1.0 単位/ 動物 (ヒトインスリン: 0, 0.0625, 0.125, 0.2, 0.25, 0.5, 1.0 単位/ 動物)	適	[REDACTED] 2)	F20 [REDACTED] TOX0018 Amendment	4.2.3.7.1-1

1): [REDACTED]

2): [REDACTED]

2.6.7.2 トキシコキネティクス試験の一覧表

被験物質: グルリジン

試験の種類	試験系	投与方法	投与量 (単位/kg/日) ^a	GLP 適用	試験番号	記載箇所
14 日間トキシコキネティクス試験	ラット	皮下	5, 10, 40, 100	適	F20 KIN0386	4.2.3.4.2-2
1 ヶ月間トキシコキネティクス試験	ラット	皮下	50, 150, 500	適	F20 KIN0560	4.2.3.2-2
6 ヶ月間トキシコキネティクス試験	ラット	皮下	5, 20, 80	適	F20 KIN0120	4.2.3.2-4
1 ヶ月間トキシコキネティクス試験	イヌ	皮下	1, 3, 10	適	F20 KIN0561	4.2.3.2-7
6 ヶ月間トキシコキネティクス試験	イヌ	皮下	0.5, 1, 2	適	F20 KIN0118	4.2.3.2-9
6 ヶ月間インスリン抗体	ラット	皮下	5, 20, 80	適	F20 KIN0121	4.2.3.2-5
12 ヶ月間インスリン抗体	ラット	皮下	5, 10, 40, 100	適	F20 KIN0417	4.2.3.4.2-4
6 ヶ月間インスリン抗体	イヌ	皮下	0.5, 1, 2	適	F20 KIN0119	4.2.3.2-10
トキシコキネティクス (胎児毒性試験)	ラット	皮下	1, 3, 15, 10	適	F20 KIN0331	4.2.3.5.2-4
トキシコキネティクス (胎児毒性試験)	ウサギ	皮下	0.25, 0.5, 1.5	適	F20 KIN0330	4.2.3.5.2-8

a: 1 ng は純物質 28.6 μ単位に相当

2.6.7.3 A トキシコキネティクス試験成績の一覧

被験物質: グルリジン

1 日投与量 (単位/kg/日) ^k	Cmax (ng/mL)			
	ラット		イヌ	
	雄	雌	雄	雌
0.5			7.2 ⁱ , 9.4 ^j	7.1 ⁱ , 7.2 ^j
1			16.8 ^g , 28.7 ^h , 26.9 ⁱ , 30.4 ^j	14.5 ^g , 27.1 ^h , 26.6 ⁱ , 18.8 ^j
2			69.6 ⁱ , 60.0 ^j	66.5 ⁱ , 50.2 ^j
3			80.0 ^g , 129 ^h	59.9 ^g , 142 ^h
5	57.7 ^a , 61 ^b , 138 ^c , 111 ^f	63.9 ^a , 104 ^b , 142 ^c , 137 ^f		
10	188 ^a , 166 ^b	140 ^a , 177 ^b	216 ^g , 265 ^h	211 ^g , 345 ^h
20	414 ^c , 424 ^f	691 ^c , 603 ^f		
40	672 ^a , 766 ^b	755 ^a , 873 ^b		
50	1290 ^c , 1257 ^d	2114 ^c , 1597 ^d		
80	2517 ^c , 2660 ^f	2530 ^c , 2267 ^f		
100	1569 ^a , 1647 ^b	1666 ^a , 2565 ^b		
150	4077 ^c , 4289 ^d	3994 ^c , 3629 ^d		
500	7566 ^c , 10843 ^d	7294 ^c , 8351 ^d		

a: ラット 14 日間試験 – 27 回目投与

b: ラット 14 日間試験 – 28 回目投与

c: ラット 1 カ月間試験 – 1 回目投与

d: ラット 1 カ月間試験 – 23/28 回目投与

e: ラット 6 カ月間試験 – 22 回目投与

f: ラット 6 カ月間試験 – 176/181 回目投与

g: イヌ 1 カ月間試験 – 1 回目投与

h: イヌ 1 カ月間試験 – 29 回目投与

i: イヌ 6 カ月間試験 – 30 回目投与

j: イヌ 6 カ月間試験 – 176 回目投与

k: 1 ng は純物質 28.6 μ単位に相当

2.6.7.3 B トキシコキネティクス試験成績の一覧

被験物質: グルリジン

AUC (ng・h/mL)

投与量 (単位/kg/日) ^k	ラット				イヌ	
	雄		雌		雄	雌
	AUC _(0-6h)	AUC _(0-24h)	AUC _(0-6h)	AUC _(0-24h)	AUC _(0-24h)	AUC _(0-24h)
0.5					39.4 ⁱ , 50.8 ^j	48.6 ⁱ , 49.3 ^j
1					50.2 ^g , 60.0 ^h , 97.7 ⁱ , 138.4 ^j	44.5 ^g , 59.0 ^h , 67.5 ⁱ , 57.6 ^j
2					173.6 ⁱ , 170.8 ^j	154.1 ⁱ , 139.3 ^j
3					203.2 ^g , 225.4 ^h	179.4 ^g , 302.5 ^h
5	50.8 ^a , 79.2 ^b , 143.7 ^c , 140.6 ^f	231.2 ^a , 169.8 ^f	57.1 ^a , 74.3 ^b , 106.8 ^c , 138.3 ^f	277.5 ^a , 160.4 ^f		
10	160.0 ^a , 186.2 ^b	599.9 ^a	131.1 ^a , 183.6 ^b	533.7 ^a	895.2 ^g , 914.8 ^h	951.1 ^g , 1111.3 ^h
20	622.0 ^c , 750.8 ^f	779.5 ^f	625.8 ^c , 692.4 ^f	720.5 ^f		
40	755.7 ^a , 999.1 ^b	2559.6 ^a	716.6 ^a , 930.9 ^b	2571.5 ^a		
50	1303.7 ^c , 1833.2 ^d	1861.0 ^d	1876.1 ^c , 1865.4 ^d	1899.1 ^d		
80	3349.8 ^e , 4589.7 ^f	4717.9 ^f	3210.2 ^e , 3487.0 ^f	3530.1 ^f		
100	2294.9 ^a , 2677.1 ^b	6656.8 ^a	2113.6 ^a , 3087.9 ^b	7816.2 ^a		
150	4557.4 ^c , 7038.6 ^d	7111.9 ^d	5558.6 ^c , 7027.9 ^d	7105.8 ^d		
500	15696.9 ^c , 20903.0 ^d	21934.7 ^d	14589.7 ^c , 15872.9 ^d	16240.6 ^d		

a: ラット 14 日間試験-27 回目投与

b: ラット 14 日間試験-28 回目投与

c: ラット 1 カ月間試験-1 回目投与

d: ラット 1 カ月間試験-23/28 回目投与

e: ラット 6 カ月間試験-22 回目投与

f: ラット 6 カ月間試験-176/181 回目投与

g: イヌ 1 カ月間試験-1 回目投与

h: イヌ 1 カ月間試験-29 回目投与

i: イヌ 6 カ月間試験-30 回目投与

j: イヌ 6 カ月間試験-176 回目投与

k: 1 ng は純物質 28.6 μ単位に相当

2.6.7.3 C トキシコキネティクス試験成績の一覧

被験物質: グルリジン

平均グルリジン抗体トレーサー結合(% B/T)

1 日投与量 (単位/kg/日) ^f	ラット		イヌ	
	雄	雌	雄	雌
0.5			4.34 ^d , 4.44 ^c	4.21 ^d , 4.14 ^e
1			15.09 ^d , 17.12 ^e	6.31 ^d , 4.47 ^e
2			6.80 ^d , 5.84 ^c	4.69 ^d , 4.87 ^e
5	5.64 ^a , 4.66 ^b , 5.05 ^c	5.39 ^a , 4.80 ^b , 5.45 ^c		
10	5.04 ^c	5.35 ^c		
20	5.43 ^a , 4.24 ^b	5.81 ^a , 4.82 ^b		
40	5.12 ^c	5.50 ^c		
80	5.42 ^a , 4.37 ^b	5.35 ^a , 5.16 ^b		
100	5.32 ^c	5.51 ^c		

a: 6 カ月間ラット試験－24 回目投与

b: 6 カ月間ラット試験－181 回目投与

c: 12 カ月間ラット試験－最終投与（約 12 カ月後）

d: 6 カ月間イヌ試験－30 回目投与

e: 6 カ月間イヌ試験－176 回目投与

f: 1 ng は純物質 28.6 μ単位に相当

2.6.7.4 毒性試験使用ロット

被験物質: グルリジン

原薬	製剤			試験番号	試験の種類
バッチ番号	バッチ番号	グルリジン含量	不純物		
*J	-	■% ¹⁾	■% ²⁾	017717	細菌を用いた復帰変異原性試験(Ames 試験)
				017536	染色体異常試験
*K	1069	■mg/mL	■%	017853	マウス単回皮下投与試験
				017849	ラット単回皮下投与試験
*A	1120	■mg/mL	■%	F19■TOX0178	ラット 4 週間皮下投与試験
				F19■TOX0166 Amendment: F20■TOX0669	イヌ 1 ヶ月間皮下投与試験
*B	Bod 432/34/5	■mg/mL	■%	F20■TOX0499	ウサギ局所刺激性試験
*B	1309	■mg/mL	■%	F20■TOX0147	ラット生殖能及び初期胚発生毒性試験
				F20■TOX0018 Amendment: F20■TOX0067	ウサギ免疫原性試験
*B	1215	■mg/ml	■%	F20■TOX0584	ラット単回静脈内投与試験
				F20■TOX0572 Amendment 1: F20■TOX0307 Amendment 2: F20■TOX0405 Amendment 3: F20■TOX0629	ラット 6 ヶ月間皮下投与試験

1) 原薬バッチの試験は、被験物質を含まない水と溶媒を参考に換算

2) 原薬バッチに関連した不純物

被験物質: グルリジン

原薬	製剤			試験番号	試験の種類
バッチ番号	バッチ番号	グルリジン含量	不純物		
*B	1215	■■■ mg/ml	■■■ %	F20■■■ TOX0570 Amendment 1: F20■■■ TOX0146 Amendment 2: F20■■■ TOX0040	イヌ 6 ヶ月間皮下投与試験
				F20■■■ TOX0065	ラット小核試験
				F20■■■ TOX0002	ラット胚・胎児発生毒性試験（用量設定）
				F20■■■ TOX0033	ラット胚・胎児発生毒性試験
				F20■■■ TOX0051	妊娠ラット TK 試験
				F20■■■ TOX0003	ウサギ胚・胎児発生毒性試験（用量設定）
				F20■■■ TOX0046	ウサギ胚・胎児発生毒性試験
				F20■■■ TOX0052	妊娠ウサギ TK 試験
				F20■■■ TOX0295	ラット出生前及び出生後試験
				F20■■■ TOX0321 & Amendment1	イヌ単回皮下投与試験（予備試験）
*H, I	1305	■■■ mg/mL	■■■ %	F20■■■ TOX0322 & Amendment1	イヌ単回皮下投与試験
*C	1352	■■■ mg/mL	■■■ %	F20■■■ TOX0209	ラット 12 ヶ月間皮下投与試験
*E	1376/1	■■■ mg/mL	■■■ %	F20■■■ TOX0038	ラット 14 日間皮下投与試験

2.6.7.5 単回投与毒性試験

被験物質: グルリジン

動物種/系統	投与方法 (溶媒/投与形態)	投与量 (単位/kg)	性別及び 動物数/ 群	最大非致死量 (単 位/kg)	概略の致死量 (単位/kg)	特記すべき所見	記載場所 試験番号
マウス /Hsd: ICR (CD-1)	皮下 (注射用液)	1000	2M 2F	1000	> 1000	なし	4.2.3.1-1 HMR017853
ラット /Hsd: Sprague Dawley (SD)	皮下 (注射用液)	1000	2M 2F	1000	> 1000	なし	4.2.3.1-2 HMR017849
ラット /Hsd: Sprague Dawley (SD)	静脈内 (水溶性製剤)	100, 1000	2M 2F	1000	> 1000	なし	4.2.3.1-3 F20■TOX0584
ビーグル犬	皮下 (注射用液)	10 (給餌前及び給 餌後投与)	2M (1例: 給餌 前、1例: 給 餌後投与)	食餌前投与: <10 食餌後投与: 10	食餌前投与: 10 食餌後投与: >10	10 単位/kg と 20 単位/kg の 食餌前投与した雄各 1 例 が死亡 (内容を確認す る)。 死亡例では自発運動減 少、鎮静、尿失禁、脱 糞、振戦、筋緊張、筋固 縮、強直性及び間代性痙 攣、発声、音及び接触に 対する感受性消失、無感 覚、腹臥/横臥、口腔粘膜 及び結膜の蒼白化/赤色 化、流涎、低体温、呼吸 緩徐、徐脈、泡状嘔吐、 血糖値低下 (食餌後投与 した残りの動物も同様)	4.2.3.1-4 F20■TOX0321 Amendment
		20 (給餌後投与)	1M				

CTD 第二部 ― 非臨床概要 ― 2.6.7 毒性試験概要表
アピドラ注

動物種/系統	投与方法 (溶媒/投与形態)	投与量 (単位/kg)	性別及び 動物数/群	最大非致死量 (単位/kg)	概略の致死量 (単位/kg)	特記すべき所見	記載場所 試験番号
ビーグル犬	皮下 (注射用液)	20, 40 (給餌後投与)	2M	20	40	20 単位/kg: 血液生化学的検査：1 日目 ALAT 上昇、β - globulin 減少、低血糖 40 単位/kg: 雄 1 例死亡。 血液学的検査：1 日目に杆状核好中球及びその比率の増加。 血液化学的検査：1 日目に ASAT, ALAT, ALP, CPK 増加。7 日目トリグリセリド増加、低血糖。 肉眼所見：死亡例の雄で、心外膜及び心内膜に赤色巣、肺赤色。肺、気管、気管支に泡沫液貯留。 病理組織学的所見：死亡例の心内膜下、右心室心筋及び左右の心外膜下に出血。肺にうっ血及び浮腫。肺胞に出血。	4.2.3.1-5 F20■TOX0322 Amendment

2.6.7.6 反復投与毒性試験 - 重要な試験以外の試験

該当する試験なし。

2.6.7.7 A 反復投与毒性試験

被験物質: グルリジン
試験番号: F19●TOX0178
CTD における記載場所: 4.2.3.2-1

報告書の題名: **Four weeks subcutaneous toxicity study in rats**

動物種/系統: ラット/Hsd: Sprague Dawley (SD)

試験開始時週齢: 約 5-6 週齢

初回投与年月日: 19●年●月●日

投与期間: 4 週間

投与方法: 皮下
(100 U/mL: 0.5 ~5
mL/kg 投与)

無毒性量: 50 単位/kg/日

休薬期間: -

溶媒/投与形態: 溶媒

GLP 適用: 適

特記事項: TK データの結果 (4.2.3.2-2 F20●KIN0560 に記載)

投与量 (単位/kg/日)	0 (対照)		50		150		500	
動物数 (投与群 + TK)	M: 10 + 5	F: 10 + 5	M: 10 + 10	F: 10 + 10	M: 10 + 10	F: 10 + 10	M: 10 + 10	F: 10 + 10
トキシコキネティクス:								
AUC _(0-6h) (ng・h/mL) 初回	6.2	7.8	1303.7	1876.1	4557.4	5558.6	15696.9	14589.7
23 回目/28 回目	10.3	8.8	1833.2	1865.4	7038.6	7027.9	20903.0	15872.9
AUC _(0-24h) (ng・h/mL) 初回	/	/	/	/	/	/	/	/
23 回目/28 回目	27.8	27.1	1861.0	1899.1	7111.9	7105.8	21934.7	16240.6
特記すべき所見								
死亡または安楽致死動物数	-	-	-	-	2 (初回投与後)	-	9 (主に尿サン プリング中)	3
体重 (%)	-	-	-	-	-	-	-	-
摂餌量 (%)	-	-	-	-	-	-	-	-
一般状態	-	-	-	-	-	-	-	-
自発運動低下							3 (1-3 日目)	
眼科学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-
血液学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-
血液生化学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-
尿検査	-	/	-	/	-	/	-	/

CTD 第二部 ― 非臨床概要 ―2.6.7 毒性試験概要表
アピドラ注

投与量（単位/kg/日）	0（対照）		50		150		500	
臓器重量（％）	-	-	-	-	-	-	-	-
剖検所見			-	-				
胃内容物無し					2(死後発見)		9(死後発見)	3(死後発見)
注射部位の肥厚/赤色化	3	1			2(死後発見)	1	9(死後発見)	4(3 死後発見)
病理組織学的検査 肺、腎、肝、胸腺等：うっ血	-	-	-	-	2(死後発見)	-	9(死後発見)	3(死後発見)
注射部位：異物性肉芽、線維化、 肉芽組織、出血、浮腫、 フィブリン沈着、 炎症性反応、筋炎	++/+++	++/+++	+ /++	+ /++	+ /++	+ /++	++/+++	++/+++

-: 特記すべき所見なし, +: 軽微, ++: 軽度, +++: 中等度, ++++: 高度, /: 未実施

Student-t 検定（体重）または Wilcoxon 検定（血液学、血液化学、尿検査、相対臓器重量） *: p<0.05, **: p<0.01

2.6.7.7 B 反復投与毒性試験

被験物質: グルリジン
試験番号: F19 TOX0166
CTD における記載場所: 4.2.3.2-6

報告書の題名: HMR1964 Testing for toxicity by repeated subcutaneous administration to dogs over 1 month							
動物種/系統: イヌ、ビーグル/HsdBor.BEAG							
試験開始時週齢: 雄: 約 9 ヲ月齡		投与期間: 1 ヲ月間		無毒性量: 1 単位/kg/日			
雌: 約 10 ヲ月齡							
初回投与年月日: 19 年 月 日		投与方法: 皮下		休薬期間: 約 4 週間			
		(100 U/mL: 0.01 ~ 0.1mL/kg 投与)					
溶媒/投与形態: 溶媒		GLP 適用: 適		特記事項: TK データの結果(4.2.3.2-7 F20 KIN0561 に記載)			

投与量 (単位/kg/日)	0 (対照)		1		3		10	
動物数 (投与群+TK)	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3
トキシコキネティックス:								
AUC _(0-24h) (ng・h/mL) 初回	31.4	19.2	48.1	44.5	203.9	179.4	895.2	951.1
29 回目	18.6	25.4	60.0	59.0	225.4	302.5	914.8	1111.3
特記すべき所見								
死亡または安楽致死動物数	-	-	-	-	-	1	1	-
体重 (%)	-	-	-	-	-	-	-	-
摂餌量 (%)	-	-	-	-	-	-	-	-
一般状態 低血糖に伴う運動低下、不安定な歩行、運動失調、首振り、身震い、横臥、痙攣	-	-	-	-	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++
神経学的状態	-	-	-	-	-	-	-	-
眼科学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-
心電図	-	-	-	-	-	-	-	-
血液学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-

CTD 第二部 ― 非臨床概要 ―2.6.7 毒性試験概要表
アピドラ注

投与量（単位/kg/日）	0（対照）		1		3		10	
血液生化学的検査 血糖値			(初回, 29 回投与) 投与後 0.5-24 時間で時間依存性に減少、1, 3 及び 10 単位/kg/日投与群でそれぞれ約 3, 6, 及び 24 時間後に回復					
尿検査	-	-	-	-	-	-	-	-
臓器重量（%）	-	-	-	-	-	-	-	-
剖検所見 臓器所見	-	-	注射部位、消化管、肺、肝に肉眼所見あり					
病理組織学的検査								
精巣上体：脱落生殖細胞	-	/	-	/	++ (n=1)	/	++/+++ (n=2)	/
精巣：精巣胚上皮壊死	-	/	-	/	-	/	++ (n=1)	/
脾臓：ヘモジデリン沈着	-	-	-	-	-	-	++ (n=2)	-
注射部位：炎症反応	-	-	-	-	-	-	+ (n=1)	-
回復試験： 評価動物数	1	1	1	1	1	0	0	1
特記すべき所見	-	-	-	-	-			-
死亡例の一般状態： 低血糖昏睡に至る強直性間代性痙攣を伴う低血糖						++++ (n=1)	++++ (n=1)	

-: 特記すべき所見なし, +: 軽微, ++: 軽度, +++: 中等度, ++++: 高度

Student-t 検定 (体重、絶対重量) または Wilcoxon 検定 (心電図、血液学、血液生化学、尿検査、相対臓器重量) *: p<0.05, **: p<0.01

2.6.7.7 C 反復投与毒性試験

被験物質: グルリジン
試験番号: F20 TOX0572 (Amendment 1, 2, 3)
CTDにおける記載場所: 4.2.3.2-3

報告書の題名: **HMR 1964 - 6 Month subcutaneous toxicity study in rats**

動物種/系統: ラット/ Sprague Dawley (Harlan)

試験開始時週齢: 約 6-7 週齢

初回投与年月日: 20 年 月 日

溶媒/投与形態: 溶媒

投与期間: 6 ヶ月間

投与方法: 皮下(1 mL/kg)

GLP 適用: 適

無毒性量: 5 単位/kg/日

休薬期間: 約 4 週間

特記事項: TK データの結果(4.2.3.2-4 F20 KIN0120 に記載)

投与量 (単位/kg/日)	0 (対照)		5		20		80	
動物数 (投与群+TK)	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20
トキシコキネティックス:								
AUC _(0-6h) (ng・h/mL) 22 回目	10.8	10.7	143.7	106.8	622.0	625.8	3349.8	3210.2
176/181 回目	10.1	12.4	140.6	138.3	750.8	692.4	4589.7	3487.0
AUC _(0-24h) (ng・h/mL) 22 回目	/	/	/	/	/	/	/	/
176/181 回目	34.3	35.3	169.8	160.4	779.5	720.5	4717.9	3530.1
特記すべき所見								
死亡または安楽致死動物数	-	1	-	-	3	1	11	2
死亡例に見られた一般状態:								
自発運動低下/うずくまり/腹臥/横臥		-			有	有	有	有
死亡例の肉眼所見: 胃内容物無し					1		4	1
体重 (%)	-	-	-	-	-	-	-	-
摂餌量(相対) (%)	54.24 g/kg	-	+ 0.63	-	+ 1.46	-	+ 12.83	-
一般状態	-	-	-	-				
自発運動低下					有(一過性)	有(一過性)	有(一過性)	有(一過性)
うずくまり							有	有
腹臥/横臥							有	有
腹這前進							有(n=1)	
強直性間代性痙攣							有(n=1)	
眼科学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-

CTD 第二部 - 非臨床概要 -2.6.7 毒性試験概要表
アピドラ注

投与量（単位/kg/日）			0（対照）		5		20		80	
血液学的検査										
赤血球数(10 ¹² /L)（最終検査時）			8.65	-	8.31	-	8.54	-	8.29*	-
ヘマトクリット（中間検査時）			-	0.42	-	0.43	-	0.45*	-	0.45*
MCV(10 ⁻¹⁵ L)（中間検査時）			55	56	57	57*	56	57*	59*	59*
MCV(10 ⁻¹⁵ L)（最終検査時値）			-	55	-	56*	-	56*	-	57*
網状赤血球（中間検査時）			-	0.032	-	0.034	-	0.039	-	0.043*
PT(sec.)	（最終検査時）		11.19	11.04	11.22	11.28	11.54*	11.48*	11.65*	11.51*
	（回復期間終了時）		11.44	-	11.43	-	11.59	-	11.86*	-
血液生化学的検査										
糖(mmol/L)	（中間検査時）		6.14	6.39	6.33	6.44	6.79*	6.82	7.76*	7.11*
	（最終検査時値）		13.27	9.64	14.08	9.80	15.34	10.71	16.50*	11.93
総たん白(g/L)（最終検査時値）			63	-	63	-	61*	-	60*	-
グロブリン(g/L)（最終検査時値）			34	-	35	-	32*	-	31*	-
尿検査			-	-	-	-	-	-	-	-
臓器重量（％）										
肝	絶対	（最終検査時値）	14.036 g	-	+ 9.63	-	- 6.11	-	- 8.45	-
		（最終検査時値）	30.550 g/kg	-	- 0.37	-	- 10.82*	-	- 11.79*	-
	相対	（回復期間終了時）	32.300 g/kg	-	- 6.97	-	- 4.31	-	- 6.67*	-
剖検所見			-	-	-	-	-	-	-	-
病理組織学的検査			-	-	-	-	-	-	-	-
追加試験：										
乳腺における増殖活性の評価 （Ki-67免疫組織化学検査）				-		/		/		-
インスリン抗体の定量： グルリジン tracer binding			-	-	-	-	-	-	-	-
回復試験： 評価動物数			10	10	10	10	9	9	5	9
特記すべき所見（PT、肝重量を除く）			-	-	-	-	-	-	-	-

-: 特記すべき所見なし, +: 軽微, ++: 軽度, +++: 中等度, ++++: 高度、/: 未実施

Student-t 検定 (体重) または Wilcoxon 検定 (血液学、血液生化学、相対臓器重量) *: $p<0.05$, **: $p<0.01$

2.6.7.7 D 反復投与毒性試験

被験物質: グルリジン
試験番号: F20 TOX0570 (Amendment 1, 2)
CTD における記載場所: 4.2.3.2-8

報告書の題名: HMR 1964 Testing for toxicity by repeated subcutaneous administration to dogs over 6 months

動物種/系統: イヌ、ビーグル/HsdCpb:DOBE

試験開始時週齢: 約 8 カ月齢

初回投与年月日: 20 年 月 日

溶媒/投与形態: 溶媒

投与期間: 6 カ月間

投与方法: 皮下 (0.25mL/kg)

GLP 適用: 適

無毒性量: 1 単位/kg/日

休薬期間: 約 4 週間

特記事項: TK データの結果 (4.2.3.2-9 F20 KIN0118 に記載)

投与量 (単位/kg/日)	0 (対照)		0.5		1		2	
動物数 (投与群)	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 5	F: 5
トキシコキネティックス:								
AUC _(0-24h) (ng・h/mL)	30 回目	29.5	39.4	48.6	97.7	67.5	173.6	154.1
	176 回目	43.1	50.8	49.3	138.4	57.6	170.8	139.3
特記すべき所見								
死亡または安楽致死動物数							1	1
死亡例に見られた一般状態: 強直性間代性痙攣を伴う低血糖							++++	++++
死亡例の体重(%)	12.18 kg n=4						-17.08 n=1	
死亡例の肉眼所見: ・心、肝、腎、副腎、消化管、膀胱、 脾の変化 (循環器系異常: うっ血) ・胃の未消化内容物							++	++
死亡例の病理: ・大脳: 海馬-神経細胞壊死 ・胸腺の皮質壊死、脾臓及びリンパ節 におけるリンパ球の壊死/枯渇 ・ショック腎							++ ++++ +++	-
最終値								

CTD 第二部 ― 非臨床概要 ― 2.6.7 毒性試験概要表
アピドラ注

投与量（単位/kg/日）	0（対照）		0.5		1		2	
体重（％）	-	11.08 - 11.50 kg	-	-	-	-	-	- 0.90～ - 7.23*
摂餌量(相対)（％）	-	-	-	-	-	-	-	-
一般状態	-	-	-	-	-	-	-	-
眼科学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-
神経学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-
心電図	-	-	-	-	-	-	-	-
血液学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-
血液生化学的検査 血糖値			投与後 0.5 - 24 時間で時間依存性に減少、0.5, 1.0, 2.0 単位/kg/日投与群 でそれぞれ 2, 3, 6 時間後に回復。					
尿検査	-	-	-	-	-	-	-	-
臓器重量（％）	-	-	-	-	-	-	-	-
剖検所見	-	-	-	-	-	-	-	-
病理組織学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-
追加試験：インスリン抗体価測定 Tracer binding (%B/T)								
投与 30 日目	4.07	4.07	4.34	4.21	15.09	6.31	6.80	4.69
投与 176 日目	4.25	4.00	4.44	4.14	17.12	4.47	5.84	4.87
回復試験：評価動物数	1	1	1	1	1	1	1	1
特記すべき所見	-	-	-	-	-	-	-	-

-: 特記すべき所見なし, +: 軽微, ++: 軽度, +++: 中等度, ++++: 高度

Student-t 検定（体重、絶対重量）または Wilcoxon 検定（心電図、血液学、血液生化学、尿検査、相対臓器重量、心電図）*: p<0.05, **: p<0.01

2.6.7.7 E 反復投与毒性試験

被験物質: グルリジン
試験番号: F20■TOX0209
CTD における記載箇所: 4.2.3.4.2-3

報告書の題名: **HMR 1964 12 month subcutaneous toxicity study in rats**

動物種/系統: ラット/Charles River Sprague Dawley (CD)

試験開始時週齢: 約 6-7 週齢

投与期間: 12 ヶ月間

休薬期間: ー

初回投与年月日: 20■年■月■日

投与方法: 皮下(1 mL/kg)

投与頻度: 1 日 2 回 (約 8 時間間隔)

溶媒/投与形態: 溶媒

GLP 適用: 適

結論: グルリジン及びヒトインスリンはいずれもがん原性はなし

特記事項: 比較目的の為、インスリンとしてヒトインスリンを試験に組み込んだ。TK は別の試験で実施。(4.2.3.4.2-1 F20■TOX0038, 4.2.3.4.2-2 F20■KIN0386)

投与量 (単位/kg/日)	2 x 0 (対照)		2 x 2.5		2 x 5		2 x 20		2 x 50	
動物数	M: 30	F: 30	M: 30	F: 30	M: 30	F: 30	M: 30	F: 30	M: 30	F: 30
特記すべき所見										
死亡または安楽致死動物数	5	1	4	2	2	2	9	7	20	16
体重 (%) # 8 日目	-	190.3 g	-	-	-	+ 1.9*	-	+ 0.8*	-	+ 2.4*
50 日目	432.6 g	-	-	-	-	-	-	-	+ 4.6*	-
141 日目	-	309.9 g	-	-	-	+ 3.2*	-	+ 6.9*	-	+ 8.7*
309 日目	-	365.5g	-	-	-	-	-	+ 4.1*	-	+ 10.8*
365 日目	651.8 g	384.6 g	-	-	-	-	-	-	+ 12.7*	+ 13.0*
摂餌量(相対) (%) (1 日目- 365 日目までの平均)	48.84g/kg/日	60.70g/kg/日	- 0.7	- 1.6	- 3.8	- 4.8	+ 2.1	- 4.4	+ 7.6	- 2.4
死亡例の一般状態 死亡前の症状 (1~数種)										
横臥	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-
腹臥	1	-	-	-	-	-	-	-	1	2
失調歩行	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-
痙攣	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-

CTD 第二部 - 非臨床概要 -2.6.7 毒性試験概要表
アピドラ注

投与量 (単位/kg/日)	2 x 0 (対照)		2 x 2.5		2 x 5		2 x 20		2 x 50	
自発運動低下	1	-	-	2	1	-	1	1	1	2
全群：背頸部；注射部位硬結(35週～52週)	13	4	6	1	3	2	2	0	2	1
浮腫	3	4	2	1	3	0	1	0	2	1
浸出性の創傷	3	3	3	2	1	2	0	0	1	0
痂皮を伴った創傷	3	6	10	13	8	8	12	9	9	16
触診可能な腫瘍										
腫瘍の数	1	1	0	2	0	0	0	2	0	2
腫瘍を有する動物数	1	1	0	1	0	0	0	2	0	2
眼科学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
血液学的検査：プロトロンビン時間	11.79	11.32	12.03	11.45*	12.23	11.62*	11.92	11.52*	12.30*	11.94*
血液生化学的検査： 血糖 (mmol/L) (投与後 24 時間値)	11.15	10.70	12.88*	10.29	13.76*	11.31	14.96*	12.50*	20.39*	13.04*
尿素窒素 (mmol/L)	5.19	5.46	5.17	5.53	4.87	5.45	4.39*	5.29	3.85*	5.01*
臓器重量 (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
肉眼所見：乳腺に関係した所見 形成物/結節	/	1	/	4	/	2	/	5	/	1
病理組織学的検査										
死亡例：大脑海馬内好酸性神経細胞壊死	0	0	0	1	0	0	0	2	2	3
全群：乳腺腫瘍	-	0	-	6*	-	3	-	6*	-	3
投与部位：悪性線維性組織球腫	6	0	6	1	2	0	1	0	2	1
追加試験：インスリン抗体価 Tracer binding (%B/T) ^e	-	5.48	-	5.45	-	5.35	-	5.50	-	5.51
Ki-67 免疫組織化学	/	-	/	/	/	/	/	-	/	-

-: 特記すべき所見なし, +: 軽微, ++: 軽度, +++: 中等度, ++++: 高度、/:未実施

Student-t 検定 (体重) または Wilcoxon 検定 (血液学、血液生化学、相対臓器重量) *: p<0.05, **: p<0.01

#: 体重増加を基に統計学的計算を行った。 e: サンプルのカウント/総カウント x 100

比較対照薬: ヒトインスリン

投与量 (単位/kg/日)	2 x 0 (対照) ^y		2 x 5		2 x 20		2 x 50	
動物数	M: 30	F: 30	M: 30	F: 30	M: 30	F: 30	M: 30	F: 30
特記すべき所見								
死亡または安楽致死動物数	5	1	6	3	21	11	28	26
体重 (%) [#] 8 日目	-	190.3 g	-	+ 1.3*	-	- 0.9*	-	+ 2.8*
22 日目	354.1 g	227.5 g	-	+2.8*	-	+1.6*	+ 3.8*	+5.7*
155 日目	545.1g	312.6 g	-	+ 3.7*	-	+ 8.2*	+14.4*	+ 17.6*
162 日目	548.9 g	314.3 g	-	-	-	+ 9.5*	+ 19.2*	+ 19.0*
365 日目	651.8 g	384.6 g	-	-	-	+ 6.8*	+ 13.8***	+ 27.4*
摂餌量(相対) (%) (1 日目-365 日目までの平均)	48.84g/kg/日	60.70g/kg/日	+ 4.2	- 0.6	+14.2	+ 3.1	+ 30.9	+13.2
死亡例の一般状態 死亡前の症状 (1 ~ 数種)								
横臥	-	-	-	-	-	-	3	2
腹臥	1	-	-	-	1	2	-	2
失調歩行	1	-	-	-	1	-	-	1
痙攣	-	-	-	-	-	-	-	-
自発運動低下	1	-	-	-	3	2	3	1
全群: 背頸部; 注射部位硬結(35 週~52 週)	13	4	7	2	2	0	2	0
浮腫	3	4	2	1	0	0	1	0
浸出性の創傷	3	3	7	1	5	2	3	3
痂皮を伴った創傷	3	6	7	3	7	5	2	4
触診可能な腫瘍								
腫瘍の数	1	1	0	2	0	4	1	7
腫瘍を有する動物数	1	1	0	2	0	4	1	4
眼科学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-
血液学的検査: プロトロンビン時間	11.79	-	12.10*	-	12.33*	-	12.65***	-

CTD 第二部 ― 非臨床概要 ―2.6.7 毒性試験概要表
アピドラ注

投与量 (単位/kg/日)	2 x 0 (対照) ^y		2 x 5		2 x 20		2 x 50	
血液生化学的検査： 血糖 (mmol/L) (投与後 24 時間値)	11.15	10.70	16.78*	10.75	15.12*	12.65*	15.50***	15.60*
尿素窒素 (mmol/L)	5.19	5.46	4.78*	5.70	4.00*	5.32	4.05*	4.55*
臓器重量 (%)	-	-	-	-	-	-	-	-
肉眼所見：乳腺に関係した所見 形成物/結節	/	1	/	1	/	5	/	7
病理組織学的検査								
死亡例：大脑海馬内好酸性神経壊死	0	0	0	0	3	2	4	5
全群：乳腺腫瘍	-	0	-	3	-	6*	-	4
投与部位：悪性線維性組織球腫	6	0	3	2	0	1	2	0
追加試験： インスリン抗体価測定 Tracer binding (%B/T) ^e	-	5.48	-	18.43	-	24.68	-	27.63
Ki-67 免疫組織化学	/	-	/	/	/	-	/	/

-: 特記すべき所見なし, +: 軽微, ++: 軽度, +++: 中等度, ++++: 高度、/:未実施

Student-t 検定 (体重) または Wilcoxon 検定 (血液学、血液生化学、相対臓器重量) *: p<0.05, **: p<0.01

***: 試験終了時、動物数が少なかったため統計学的評価はできなかった。

#: 体重増加を基に統計学的計算を行った。

y: ヒトインスリンの対照群はグルリジンの対照群と同じ

e: サンプルのカウント/総カウント x 100

2.6.7.7 F 反復投与毒性試験

被験物質: グルリジン
試験番号: F20■TOX0038
CTD における記載箇所: 4.2.3.4.2-1

報告書の題名: **HMR 1964 – 14 day subcutaneous toxicokinetics study in rats**

動物種/系統: ラット/Charles River Sprague Dawley

試験開始時週齢: 約 8-9 週齢

投与期間: 14 日間

休薬期間:

初回投与年月日: 20■年■月■日

投与方法: 皮下(1 mL/kg)

投与頻度: 1 日 2 回(約 8 時間間隔)

溶媒/投与形態: 溶媒

GLP 適用: 適

特記事項: 比較目的の為、インスリンとしてヒトインスリンも試験に組み込んだ。血漿中濃度測定の為、主試験(F20■TOX0209)の補足的皮下投与トキシコキネティクス試験。TK 試験の結果 (4.2.3.4.2-2 F20■KIN00386)

投与量 (単位/kg/日/日)	2 x 0 (対照)		2 x 2.5		2 x 5		2 x 20		2 x 50	
動物数	M: 2	F: 2	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10
トキシコキネティクス:										
AUC _(0-6h) (ng・h/mL) 27 回目	-	-	50.8	57.1	160	131.1	755.7	716.6	2294.9	2113.6
28 回目	-	-	79.2	74.3	186.2	183.6	999.1	930.9	2677.1	3087.9
AUC _(0-24h) (ng・h/mL) 27 回目	101.2	67.9	231.2	277.5	599.9	533.7	2559.6	2571.5	6656.8	7816.2
特記すべき所見										
死亡または安楽致死動物数	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
体重 (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
摂餌量(絶対) (%) (1 日目-14 日目までの平均)	322.7g/匹/日	232.3g/匹/日	- 1.6	+ 9.7	+ 3.7	+ 5.4	+ 2.4	+ 6.1	+ 7.0	+ 9.4
摂餌量(相対) (%) (1 日目-14 日目までの平均)	90.53g/kg/日	88.15g/kg/日	- 3.7	+ 6.6	+ 2.6	+ 3.9	+ 2.9	+ 6.1	+ 3.8	+ 7.8
一般状態	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-: 特記すべき所見なし

CTD 第二部 - 非臨床概要 -2.6.7 毒性試験概要表
アピドラ注

比較対照薬: ヒトインスリン

投与量 (単位/kg/日/日)	2 x 0 (対照)		2 x 5		2 x 20		2 x 50	
動物数	M: 2	F: 2	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10
トキシコキネティクス:								
AUC _(0-6h) (ng・h/mL) 27 回目	-	-	342.5	431.9	1515.9	1799.8	3776.2	3823.0
28 回目	-	-	347.8	483.3	1471.5	2236.2	4385.0	3434.6
AUC _(0-24h) (ng・h/mL) 27 回目	113.9	71.7	1000.8	1156.8	3675.4	5466.1	10073.5	9729.9
特記すべき所見								
死亡または安楽致死動物数	-	-	-	-	-	-	-	2
体重 (%)	-	-	-	-	-	-	-	-
摂餌量(絶対) (%) (1 日目 - 14 日目までの平均)	322.7g/匹/日	232.3g/匹/日	+ 3.5	+ 14.7	+ 4.8	+ 10.0	+ 11.2	+ 15.0
摂餌量(相対) (%) (1 日目 - 14 日目までの平均)	90.53 /kg/日	88.15g/kg/日	+ 2.2	+ 9.2	+ 3.7	+ 7.1	+ 7.7	+ 8.5
一般状態	-	-	-	-	-	-	-	-

-: 特記すべき所見なし

2.6.7.8 A *In Vitro* 遺伝毒性試験

被験物質: グルリジン
試験番号: HMR017717
CTD における記載箇所: 4.2.3.3.1-1

報告書名: HMR1964 Bacterial reverse mutation test		
試験系の種類: 細菌を用いた復帰突然変異試験	独立して実施した試験数: 2	処理年月日: 19 年 月 日
菌株: <i>S. typhimuriu</i> 及び <i>E.coli</i>	プレート数: 3	GLP 適用: 適
代謝活性化系: Aroclor-誘導ラット肝 S9, 10%	分析細胞数/培養: –	細胞毒性: なし
溶媒: 脱イオン水	陽性対照用の溶媒: 窒化ナトリウムのみ	遺伝毒性: なし
処理: プレート法で 48 時間	DMSO、脱イオン水	

CTD 第二部 - 非臨床概要 -2.6.7 毒性試験概要表
アピドラ注

代謝活性化	被験物質	濃度/用量段階 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Assay # 00 (プレート法) 復帰コロニー数 (Mean $\pm$ SD)				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2uvrA
代謝活性化なし	グルリジン	0	30.7 $\pm$ 5.1	115.0 $\pm$ 19.3	8.0 $\pm$ 4.4	7.0 $\pm$ 1.7	21.0 $\pm$ 1.7
		50	24.3 $\pm$ 4.0	116.0 $\pm$ 9.5	9.3 $\pm$ 2.9	6.0 $\pm$ 1.0	17.3 $\pm$ 1.2
		160	27.0 $\pm$ 2.6	129.3 $\pm$ 13.1	6.3 $\pm$ 1.5	5.3 $\pm$ 2.5	18.3 $\pm$ 3.1
		500	29.3 $\pm$ 1.5	138.3 $\pm$ 14.2	7.3 $\pm$ 3.5	5.0 $\pm$ 3.6	20.0 $\pm$ 1.0
		1600	25.3 $\pm$ 1.2	126.3 $\pm$ 15.2	6.0 $\pm$ 2.6	5.0 $\pm$ 3.6	18.0 $\pm$ 3.0
		5000	29.0 $\pm$ 6.1	133.7 $\pm$ 13.6	8.7 $\pm$ 2.1	6.7 $\pm$ 2.5	19.7 $\pm$ 2.5
	Sodium azide	1		387.0 $\pm$ 39.8	275.0 $\pm$ 10.1		
	9-Aminoacridine	50				164.7 $\pm$ 7.4	
	2-Nitrofluorene	2.5	643.7 $\pm$ 38.8				
代謝活性化あり	グルリジン	MNNG	4				236.3 $\pm$ 12.4
		0	26.7 $\pm$ 7.2	119.7 $\pm$ 4.2	5.0 $\pm$ 0.0	6.0 $\pm$ 1.7	27.7 $\pm$ 2.1
		50	30.0 $\pm$ 1.7	115.3 $\pm$ 25.7	6.0 $\pm$ 2.0	7.0 $\pm$ 3.0	17.3 $\pm$ 0.6
		160	25.7 $\pm$ 2.3	116.7 $\pm$ 18.9	4.3 $\pm$ 3.2	6.0 $\pm$ 2.0	16.7 $\pm$ 2.1
		500	28.0 $\pm$ 4.0	108.7 $\pm$ 10.0	7.3 $\pm$ 2.5	4.3 $\pm$ 0.6	17.0 $\pm$ 2.0
		1600	28.3 $\pm$ 4.5	127.3 $\pm$ 15.0	8.3 $\pm$ 0.6	6.0 $\pm$ 1.0	19.3 $\pm$ 3.8
		5000	25.7 $\pm$ 2.1	130.7 $\pm$ 25.1	7.0 $\pm$ 2.0	8.3 $\pm$ 3.1	19.7 $\pm$ 3.2
	2-Aminoanthracene	0.5	1518.3 $\pm$ 83.6	1365.3 $\pm$ 253.4			
		1			116.3 $\pm$ 21.7	480.0 $\pm$ 43.3	
		30					121.7 $\pm$ 12.9

MNNG: 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine

CTD 第二部 ― 非臨床概要 ― 2.6.7 毒性試験概要表
アビドラ注

代謝活性化	被験物質	濃度/用量段階 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Assay # 01 (ブレインキューベーション法) 復帰コロニー数 (Mean $\pm$ SD)				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2uvrA
代謝活性化なし	グルリジン	0	19.7 $\pm$ 3.1	183.0 $\pm$ 16.5	10.0 $\pm$ 2.6	8.7 $\pm$ 1.5	18.3 $\pm$ 4.5
		50	21.7 $\pm$ 2.1	181.3 $\pm$ 10.4	8.3 $\pm$ 5.0	10.7 $\pm$ 2.1	20.7 $\pm$ 2.1
		160	20.3 $\pm$ 2.1	173.7 $\pm$ 6.7	9.7 $\pm$ 2.5	8.3 $\pm$ 3.1	22.7 $\pm$ 3.1
		500	28.0 $\pm$ 3.5	166.0 $\pm$ 13.1	8.3 $\pm$ 2.1	6.7 $\pm$ 2.5	17.3 $\pm$ 2.5
		1600	27.0 $\pm$ 4.4	160.3 $\pm$ 28.4	5.7 $\pm$ 0.6	6.3 $\pm$ 4.5	15.7 $\pm$ 3.5
		5000	22.7 $\pm$ 1.2	157.3 $\pm$ 7.8	7.7 $\pm$ 3.1	6.3 $\pm$ 4.9	17.7 $\pm$ 2.1
	Sodium azide	1		551.3 $\pm$ 50.8	412.3 $\pm$ 16.3		
	9-Aminoacridine	50				88.7 $\pm$ 33.1	
	2-Nitrofluorene	2.5	766.7 $\pm$ 8.7				
	MNNG	4					176.0 $\pm$ 12.8
代謝活性化あり	グルリジン	0	25.0 $\pm$ 3.6	175.7 $\pm$ 11.0	8.7 $\pm$ 3.1	9.0 $\pm$ 1.0	20.7 $\pm$ 3.5
		50	26.7 $\pm$ 2.5	166.0 $\pm$ 12.5	10.7 $\pm$ 2.5	7.3 $\pm$ 3.8	19.3 $\pm$ 6.5
		160	22.7 $\pm$ 1.5	175.3 $\pm$ 15.8	7.7 $\pm$ 1.5	9.7 $\pm$ 0.6	20.0 $\pm$ 3.6
		500	23.7 $\pm$ 5.5	185.7 $\pm$ 9.3	8.7 $\pm$ 3.2	7.0 $\pm$ 1.7	16.3 $\pm$ 1.5
		1600	27.7 $\pm$ 4.0	177.7 $\pm$ 19.6	8.0 $\pm$ 1.0	5.0 $\pm$ 0.0	21.3 $\pm$ 1.5
		5000	25.3 $\pm$ 3.1	175.0 $\pm$ 7.5	11.0 $\pm$ 2.0	11.0 $\pm$ 1.7	13.7 $\pm$ 2.1
	2-Aminoanthracene	0.5	1277.7 $\pm$ 101.9	1694.7 $\pm$ 45.0			
		1			188.0 $\pm$ 3.0	227.7 $\pm$ 3.5	
		30					194.3 $\pm$ 10.0

MNNG: 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine

2.6.7.8 B *In Vitro* 遺伝毒性試験

被験物質: グルリジン
試験番号: HMR017536
CTD における記載場所: 4.2.3.3.1-2

報告書名: **HMR 1964 *In vitro* mammalian chromosome aberration test in V79 chinese hamster cells**

試験系の種類: 染色体異常試験	独立して実施した試験数: 2	処理年月: 19 年 月 日
系統: チャイニーズハムスター肺線維芽細胞 V79 細胞株	プレート数: 2	GLP 適用: 適
代謝活性化系: Aroclor-誘導ラット	分析細胞数/培養: 25 – 100 metaphase	細胞毒性: なし
肝 S9 0, 3 mg/mL ^a		
溶媒: MEM ^b	陽性対照の溶媒: MEMb	遺伝毒性: なし
処理: 初回実験: S9mix 存在下あるいは非存在下で 3 時間処理、濃度 500, 1600, 5000 µg/mL		
2 回目: S9mix 非存在下で 20 時間処理、濃度 500, 1600, 5000 µg/mL		

1 回目実験 (概要表)

代謝活性化	被験物質	濃度(µg/mL)	分析細胞数		染色体異常細胞 (%)		
			1	2	Gap を含む Mean 1 + 2	Gap を除く Mean 1 + 2	交換 Mean 1 + 2
代謝活性化なし	溶媒	0	100	100	0.5	0.0	0.0
	グルリジン	500	100	100	1.0	0.0	0.0
		1600	100	100	0.0	0.0	0.0
		5000	100	100	1.5	1.0	0.0
	陽性対照 EMS ^c	1500	50	50	16.0	15.0	10.0
代謝活性化あり	溶媒	0	100	100	1.5	0.0	0.0
	グルリジン	500	100	100	0.5	0.0	0.0
		1600	100	100	0.5	0.5	0.5
		5000	100	100	0.0	0.0	0.0
	陽性対照 CPA ^d	3.0	50	50	18.0	18.0	12.0

2 回目実験 (概要表)

代謝活性化	被験物質	濃度(μg/mL)	分析細胞数		染色体異常細胞 (%)		
			1	2	Gap を含む Mean 1 + 2	Gap を除く Mean 1 + 2	交換 Mean 1 + 2
代謝活性化なし	溶媒	0	100	100	0.5	0.5	0.0
	グルリジン	500	100	100	0.0	0.0	0.0
		1600	100	100	1.0	0.5	0.0
		5000	100	100	0.5	0.0	0.0
	陽性対照 EMS ^c	400	50	50	16.0	16.0	9.0

a: 最終蛋白濃度

b: MEM (minimal essential medium)

c: EMS (ethyl methane sulfonate)

d: CPA (cyclophosphamide = Endoxan[®])

2.6.7.9 *In Vivo* 遺伝毒性試験

被験物質: グルリジン
試験番号: F20■TOX0065
CTD における記載箇所: 4.2.3.3.2-1

報告書名: グルリジンの雌雄 SD 系ラットを用いたは乳類赤血球小核試験

試験系の種類: *In vivo* 小核試験

動物種/系統: ラット/Hsd: Sprague Dawley

投与方法: 被験物質 / 皮下投与

評価した細胞: 多染性赤血球

試験開始時週齢: 約 6 週齢

CPA^a / 経口投与

分析細胞数/動物: 2000

投与開始日: 20■年 ■月 ■日

遺伝毒性: なし

毒性/細胞毒性: 1000 単位/kg/日: 3 例死亡(雄)

溶媒: プラセボ溶液

曝露証明: なし

サンプリング時間: 最終投与 24 時間後

処理: 24 時間間隔で 2 回

GLP 適用: 適

特記事項: なし

被験物質	投与量(単位/kg/日)	動物数、性	Mean PCEs ±SD	Mean % MN-PCEs ±SD
溶媒	0	5M	0.49 ± 0.05	0.11 ± 0.10
グルリジン	100	5M	0.55 ± 0.03	0.17 ± 0.08
	300	5M	0.50 ± 0.02	0.11 ± 0.05
	1000	5M	0.49 ± 0.08	0.21 ± 0.04
Cyclophosphamide	40 mg/kg	5M	0.44 ± 0.07	1.14 ± 0.30
溶媒	0	5F	0.49 ± 0.04	0.16 ± 0.04
グルリジン	100	5F	0.51 ± 0.02	0.17 ± 0.08
	300	5F	0.53 ± 0.04	0.17 ± 0.04
	1000	5F	0.47 ± 0.04	0.17 ± 0.06
Cyclophosphamide	40 mg/kg	5F	0.47 ± 0.05	1.35 ± 0.29

a: Cyclophosphamide = Endoxan[®]

2.6.7.10 がん原性試験

がん原性試験としては行わなかったが、ラット 12 ヶ月間皮下投与毒性試験でがん原性の有無について検討した。

2.6.7.11 生殖発生毒性試験 - 重要な試験以外の試験

該当する試験なし。

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

被験物質: グルリジン
試験番号: F20■TOX0147
CTD における記載場所: 4.2.3.5.1-1

報告書の題名: **HMR 1964 Subcutaneous male and female fertility and early embryonic toxicity study in rats**

試験計画: ICH4.1.1 に準拠

動物種/系統: ラット/Hsd: Sprague Dawley (SD) 投与方法: 皮下(5 mL/kg) 投与期間: 雄: 交配 4 週間前から安楽致死時(約試験 7-8 週目)
雌: 交配 2 週間前から妊娠 6 日まで

試験開始週齢: 約 8-10 週齢

初回投与年月日: 20■年■月■日

交配成立日: Day 0

帝王切開日: 妊娠 17 日目

無毒性量: グルリジン

ヒトインスリン

F₀ 雄: 一般毒性 10 単位/kg/日 1.0 単位/kg/日

F₀ 雄: 生殖能 10 単位/kg/日 1.0 単位/kg/日

F₀ 雌: 一般毒性 3.15 単位/kg/日 1.0 単位/kg/日

F₀ 雌: 生殖能 10 単位/kg/日 10 単位/kg/日

F₁ 胎児: 10 単位/kg/日 10 単位/kg/日

溶媒/投与形態: プラセボ溶液

GLP 適用: 適

特記事項: 比較目的の為に、インスリンとしてヒトインスリンも本試験に組み込まれた。

投与量(単位/kg/日)	0 (対照)	1	3.15	10	ヒトインスリン	
					1	10
雄						
評価動物数	23	23	23	23	23	23
死亡あるいは安楽致死動物数	0	0	0	0	0	2
一般状態						
死亡例: 腹臥、横臥、うずくまり、粗毛、喘ぎ呼吸	-	-	-	-	-	P
生存例:	-	-	-	-	-	-
剖検	-	-	-	-	-	-
体重 (%)	-	-	-	-	-	-
摂餌量 (%)	-	-	-	-	-	-
平均交配所要日数	3.3	6.5	5.8	5.2	7.1	8.0
交尾動物数	23	22	23	21	22	21

CTD 第二部 - 非臨床概要 -2.6.7 毒性試験概要表
アピドラ注

投与量(単位/kg/日)	0 (対照)	1	3.15	10	ヒトインスリン	
					1	10
授胎動物数	19	22	21	19	20	19
精巣上体内平均精子数 (%)	3394.8	-0.14	-2.4	+2.7	-1.4	-14.1*
投与量(単位/kg/日)	0 (対照)	1	3.15	10	ヒトインスリン	
					1	10
雌						
評価動物数	23	23	23	23	23	23
死亡あるいは安楽致死動物数	0	0	0	2	0	2
一般状態						
死亡例：腹臥、横臥、うずくまり、粗毛、喘ぎ呼吸	-	-	-	P	-	P
生存例：横臥、血涙	-	-	-	-	-	P (n=1)
剖検	-	-	-	-	-	-
交配前体重 (%)	-	-	-	-	-	-
妊娠時体重 (%)	-	-	-	-	-	-
交配前摂餌量 (%)	-	-	-	-	-	-
妊娠時摂餌量 (%)	-	-	-	-	-	-
平均交配所用日数	3.3	6.5	5.8	5.2	7.1	8.0
精子が確認された雌動物数	23	22	23	21	22	21
妊娠動物数	19	23	21	18	20	19
流産あるいは全胚吸収母体数	0	0	0	0	0	0
平均黄体数	14.6	16.0	16.7	16.3	16.4	15.3
平均着床数	13.4	14.5	15.4	14.9	14.9	13.6
平均着床前死亡率 (%)	8.63	9.52	7.55	8.64	9.52	11.50
平均生存胚数	12.5	13.5	14.4	13.5	14.2	13.2
平均吸収胚数	0.89	1.00	1.05	1.39	0.65	0.47
死亡胚数	17	23	22	25	13	9
平均着床後死亡率 (%)	6.67	6.20	6.68	9.43	4.13	3.51

-: 特記すべき所見なし, P: 有り

検定方法: Student t-test (体重)、Wilcoxon 順位和検定 (体重 100g 当たりの平均摂餌量、精子数、精子運動能、黄体数、着床数、生存胚数、死亡胚数、着床前死亡率、着床後死亡率) *: p<0.05, **: p<0.01

2.6.7.13 A 生殖発生毒性試験－胚・胎児発生に関する試験

被験物質: グルリジン
試験番号: F20■TOX0002
CTD における記載箇所: 4.2.3.5.2-1

報告書の題名: **HMR 1964 Subcutaneous embryo-foetal toxicity range-finding study in rats**

試験計画: ICH4.1.3 に準拠

動物種/系統: ラット/Hsd: Sprague Dawley (SD)

投与方法: 皮下
(5mL/kg)

投与期間: G6-17

試験開始週齢: 約 9-11 週齢

交配成立日: Day 0

本試験における最高投与量: 10 単位/kg/日

初回投与年月日: 20■年■月■日

帝王切開日: G20

特記事項: 用量設定試験

溶媒/投与形態: 溶媒

GLP 適用: 適

投与量 (単位/kg/日)	0 (対照)	15	50	150	500
母体/雌動物:					
妊娠動物数	5	5	6	6	6
死亡あるいは安楽致死動物数	0	2	2	2	6
流産あるいは全胚吸収母体数	0	0	0	0	- ^b
死亡例の一般状態: 腹臥、跳躍性及び回転性痙攣 漿液性分泌物、喘ぎ、自発運動低下	-	P	P	P	P
剖検	-	-	-	-	-
体重 (%)	-	-	-	-	-
摂餌量 (%) (Day 0 – Day 20 間での平均)	358.1g	-	-	+7.6	-
平均黄体数	15.0	13.7	15.3	13.5	- ^b
平均着床数	14.6	12.0	15.0	13.5	- ^b
平均着床前死亡率 (%)	2.7	13.9	1.7	0.0	- ^b

CTD 第二部 ― 非臨床概要 ― 2.6.7 毒性試験概要表
アピドラ注

投与量 (単位/kg/日)	0 (対照)	15	50	150	500
胎児：評価母体数	5	3	4	4	0
生存胎児数	72	35	56	50	0
平均吸収胚数	0.2	0.3	1.0	1.0	0
死亡胎児数	0	0	0	0	0
平均着床後死亡率(%)	1.5	2.6	6.6	6.9	- ^b
平均胎児体重(g)	3.548	3.570	3.507	3.258	- ^b
頭臀長(%)	37.5 mm	-	-	-5.6	- ^b

-: 特記すべき所見なし、P: 有り G=妊娠日齢

b: 計画予定外死亡は全ての計算から削除

2.6.7.13 B 生殖発生毒性試験―胚・胎児発生に関する試験

被験物質: グルリジン
試験番号: F20■TOX0033
CTD における記載場所: 4.2.3.5.2-2

報告書の題名: **HMR 1964 Subcutaneous embryo-foetal toxicity study in rats**

試験計画: ICH4.1.3 に準拠

動物種/系統: ラット/Hsd: Sprague Dawley (SD)

投与方法: 皮下
(5mL/kg)

投与期間: G6-17

試験開始週齢: 約 9-12 週齢

交配成立日: Day 0

無毒性量: グルリジン

ヒトインスリン

初回投与年月日: 20■年■月■日

帝王切開日: G20

F₀ 雌: 一般毒性 3.15 単位/kg/日 1.0 単位/kg/日

溶媒/投与形態: 溶媒

GLP 適用: 適

F₀ 雌: 生殖能 10 単位/kg/日 10 単位/kg/日

F₁ 胎児: 3.15 単位/kg/日 1.0 単位/kg/日

特記事項: 比較目的の為、インスリンとしてヒトインスリンを本試験に組み込んだ。TK 試験は別の試験として実施 (4.2.3.5.2-3

F20■TOX0051, 4.2.3.5.2-4 F20■KIN0331)

投与量 (単位/kg/日)	0 (対照)	1	3.15	10	ヒトインスリン	
					1	10
母体/雌動物						
妊娠動物数	20	18	17	20	17	23
死亡あるいは安楽致死動物数	0	0	0	2	0	4
流産あるいは全胚吸収母体数	1	0	0	0	0	0
死亡例の一般状態: 自発運動低下、腹臥/横臥 跳躍性及び回転性痙攣	-	-	-	P	-	P
剖検	-	-	-	-	-	-
体重 (%)						
day 3	223.8 g	-	-	-3.7*	-	-
day 6	236.8 g	-	-	-3.5*	-	-
day 13	263.8 g	-	-	-4.3*	-	-
day 16	286.2 g	-	-	-4.5*	-	-
day 18	311.0 g	-	-	-4.7*	-	-
day 20	342.9 g	-	-	-6.1*	-	-

CTD 第二部 - 非臨床概要 -2.6.7 毒性試験概要表
アピドラ注

投与量 (単位/kg/日)	0 (対照)	1	3.15	10	ヒトインスリン	
					1	10
摂餌量 (%)	-	-	-	-	-	-
血糖値		用量依存性に減少、投与後 4 時間正常に回復			用量依存性に減少、投与後 4 時間正常に回復	
平均黄体数	14.8	14.7	14.6	14.1	14.9	14.6
平均着床数	14.2	14.1	13.4	12.5	13.6	14.1
平均着床前死亡率 (%)	4.06	4.60	9.44	12.54	10.80	3.62
胎児：評価母体数	19	18	17	19	17	19
生存胎児数	259	208	210	219	214	238
平均吸収胚数	0.58	2.5	1.0	0.89	1.06	1.58
死亡胎児数	0	0	0	1	0	0
平均着床後死亡率(%)	3.92	19.32	8.03	8.96	8.9	11.7
平均胎児体重(g)	3.5	3.7	3.7	3.5	3.7	3.5
胎児の性比 (M/F)	57.5/42.5	50.5/49.5	49.0/51.0	47.9/52.1	53.3/46.7	59.7/40.3
胎児の異常：						
外表異常	-	-	-	-	-	-
内臓異常	-	-	-	-	-	-
骨格異常						
肋骨：波状/肥厚						
胎児数 (%)	0	1(0.9)	0	1(0.9)	0	9 (7.3)
母体数 (%)	0	1(5.6)	0	1(5.3)	0	3 (15.8)

-: 特記すべき所見なし, P: 有り G=妊娠日齢

検定方法: Student t-test 又は Wilks 多重検定 (体重、胎児体重、胎盤重量、頭臀長)、Wilcoxon 順位和検定 (体重 100g 当たりの平均摂餌量、黄体数、着床数、着床前死亡率、着床後死亡率、生存胎児数、死亡胎児数、吸収胚数)、Jackknife t-検定 (胎児の外表、内臓及び骨格異常) *: p<0.05, **: p<0.01

2.6.7.13 C 生殖発生毒性試験―胚・胎児発生に関する試験

被験物質: グルリジン
試験番号: F20■TOX0051
CTD における記載場所: 4.2.3.5.2-3

報告書名: **HMR 1964 Subcutaneous toxicokinetics study in pregnant rats**

試験計画: ICH4.1.3 に準拠

動物種/系統: ラット/Hsd: Sprague Dawley (SD)

投与方法: 皮下

投与期間: G6-12

(5mL/kg)

試験開始週齢: 9-11 週齢

交配成立日: Day 0

初回投与年月日: 20■年■月■日

帝王切開日: G12

溶媒/投与形態: 溶媒

GLP 適用: 適

特記事項: 血漿中濃度を測定するための本試験 4.2.3.5.2-2 F20■TOX0033 の補足的生殖発生毒性試験。TK 試験の結果は別途、データベースシートに報告 (4.2.3.5.2-4 F20■KIN0331 参照)

投与量 (単位/kg/日/日)	1	3.15	10
動物数:	10	10	10
トキシコキネティクス 7回目投与: C _{max} (ng/mL)	10.6	46.7	159
母体/雌動物			
妊娠動物数	10	10	10
死亡あるいは安楽致死動物数	0	0	1
流産あるいは全胚吸収母体数	0	0	0
死亡例の一般状態: 跳躍性及び回転性痙攣、腹臥、意識混濁、不規則呼吸	-	-	P
死亡例の剖検: 暗褐色肝	-	-	P
体重 (%)	-	-	-
摂餌量 (%)	-	-	-

-: 特記すべき所見なし, P: 有り G=妊娠日齢

2.6.7.13 D 生殖発生毒性試験－胚・胎児発生に関する試験

被験物質: グルリジン
試験番号: F20■TOX0003
CTD における記載箇所: 4.2.3.5.2-5

報告書の題名: **HMR 1964 Subcutaneous embryo-foetal toxicity range-finding study in rabbits**

試験計画: ICH4.1.3 に準拠

動物種/系統: ウサギ/Chbb:HM (SPF) Kleinrusse

投与方法: 皮下

投与期間: G6-18

試験開始週齢: 約 5-10 カ月齢

交配成立日: Day 0

本試験における最高用量: 1.5 単位/kg/日

初回投与年月日: 20■年■月■日

帝王切開日: G29

溶媒/投与形態: 溶媒

GLP 適用: 適

投与量 (単位/kg/日/日)	0(対照)	2	10	50
母体/雌動物				
妊娠動物数	6	6	6	5
死亡あるいは安楽致死動物数	0	2	5	5
流産あるいは全胚吸収母体数	0	0	0	0
着床痕なしの死亡例数	0	1	1	3
受胎産物なしの死亡例数	0	1	3	2
死亡例の一般状態: 腹臥/横臥、跳躍性及び回転性痙攣、自発運動低下	-	P	P	P
死亡例の剖検: 膀胱: 膨満 片側子宮角から膣接合部の欠如 両側子宮角から膣接合部の欠如		1	1	2 2
体重 (%)	-	-	-	-
摂餌量 (%)				
Day 6 - 10	69.2 g	+ 41.3	+ 5.2	-
Day 10 - 13	79.0 g	+ 23.7	- 5.9	-
Day 13 - 16	61.6 g	+ 50.0	+ 16.9	-
Day 16 - 19	70.2 g	+ 37.7	c	-

CTD 第二部 ― 非臨床概要 ― 2.6.7 毒性試験概要表
アピドラ注

投与量 (単位/kg/日/日)	0(対照)	2	10	50
平均黄体数	8.8	7.3	7.0	- ^b
平均着床数	8.2	4.8	6.0	- ^b
平均着床前死亡率 (%)	7.7	32.7	14.3	- ^b
胎児：評価母体数	6	4	1	0
生存胎児数	47	13	2	-
平均吸収胚数	0.4	1.5	4.0	- ^b
死亡胎児数	0	0	0	-
子宮体内死亡数 (%)	2	+ 200	+ 100	- ^b
平均着床後死亡率(%)	4.9	26.9	66.7	- ^b
平均胎児体重(g)	36.1	41.6	43.3	-

-. 特記すべき所見なし, P: 有り G=妊娠日齢

b: 計画外死亡は全ての計算から除外。

c: 餌の散乱

2.6.7.13 E 生殖発生毒性試験―胚・胎児発生に関する試験

被験物質: グルリジン
試験番号: F20■TOX0046
CTD における記載箇所: 4.2.3.5.2-6

報告書名: **HMR 1964 Subcutaneous embryo-fetal toxicity study in rabbits**

試験計画: ICH4.1.3 に準拠

動物種/系統: ウサギ/Chbb:HM (SPF) Kleinrusse

投与方法: 皮下

投与期間: G6-18

試験開始週齢: 5-9 ヲ月齡

交配成立日: Day 0

無毒性量: グルリジン

ヒトインスリン

初回投与年月日: 20■年■月■日

帝王切開日: G29

F₀ 雌: 一般毒性 0.25 単位/kg/日 0.25 単位/kg/日

溶媒/投与形態: 溶媒

GLP 適用: 適

F₀ 雌: 生殖能 0.25 単位/kg/日 0.25 単位/kg/日

F₁ 胎児: 0.25 単位/kg/日 0.25 単位/kg/日

特記事項: 比較目的の為に、インスリンとしてヒトインスリンを本試験に組み込んだ。TK 試験は別の試験として実施(4.2.3.5.2-8
F20■KIN0330)

投与量 (単位/kg/日)	0(対照)	0.25	0.50	1.50	ヒトインスリン	
					0.25	1.50
母体/雌動物						
妊娠動物数	19	18	16	22	19	24
死亡あるいは安楽致死動物数	0	0	0	4	0	6
流産あるいは全胚吸収母体数	1	1	0	5	0	5
一般状態: 自発運動低下、跳躍性及び回転性痙攣、 流涎増加、運動失調、喘ぎ、浅呼吸、かす かな鼓動、退色尿、摂餌量 (干し草) 減少 腹臥、横臥	- -	- -	- P (n=1)	P P	- -	P P
剖検	-	-	-	-	-	-
体重 (%)	-	-	-	-	-	-
1 日摂餌量 (g)/ 100g 体重 (% ^a) Day 6 - 10	3.1	-	-	+ 19.4*	-	+ 16.1

CTD 第二部 ― 非臨床概要 ― 2.6.7 毒性試験概要表
アピドラ注

投与量 (単位/kg/日)	0(対照)	0.25	0.50	1.50	ヒトインスリン	
					0.25	1.50
血糖値(Day 12) (%)						
Time slot: 15 min	4.598 mmol/L	- 30.1	- 30.6	- 40.3	- 18.9	- 32.1
Time slot: 30 min	4.175 mmol/L	- 39.6	- 45.0	- 56.2	- 38.3	- 64.8
Time slot: 1h	4.065 mmol/L	-59.8	- 54.8	- 63.3	- 48.2	- 73.7
Time slot: 2h	4.120 mmol/L	-36.5	- 55.8	- 61.7	-53.3	-67.4
Time slot: 4h	4.012 mmol/L	+ 1.8	- 18.5	- 33.7	+3.1	- 43.9
平均黄体数	7.2	7.8	7.7	8.7	7.9	8.1
平均着床数	6.8	7.2	6.6	8.0	7.0	7.4
平均着床前死亡率 (%)	6.20	8.07	13.56	8.27	12.12	7.39
胎児：評価母体数	18	17	16	14	19	14
生存胎児数	107	106	83	84	116	63*
平均吸収胚数	0.9	1.0	1.4	2.0	0.9	2.9
死亡胎児数	0	0	0	0	0	0
平均着床後死亡率(%)	15.63	14.43	22.44	23.44	13.43	38.17*
平均胎児体重(g)	40.0	39.7	41.4	38.5	41.1	41.5
胎児の性比 (M/F)	52.3/47.7	50.0/50.0	44.6/55.4	56.0/44.0	50.9/49.1	52.4/47.6
胎児の異常：						
外表異常	-	-	-	-	-	-
内臓異常	-	-	-	-	-	-
骨格異常：脊柱及び肋骨の欠損	-	-	-	胎児における発 現率の軽度増加	-	胎児における発 現率の軽度増加

-: 特記すべき所見なし, P: 有り G=妊娠日齢

検定方法：Student t-test 又は Wilks 多重検定（体重、胎児体重、胎盤重量、頭臀長）、Wilcoxon 順位和検定（体重 100g 当たりの平均摂餌量、黄体数、着床数、着床前死亡率、着床後死亡率、生存胎児数、死亡胎児数、吸収胚数）、Jackknife t-検定（胎児の外表、内臓及び骨格異常）*: p<0.05, **: p<0.01

2.6.7.13 F 生殖発生毒性試験－胚・胎児発生に関する試験

被験物質: グルリジン
試験番号: F20 TOX0052
CTD における記載場所: 4.2.3.5.2-7

報告書名: HMR 1964 Subcutaneous toxicokinetic study in rabbits		
試験計画: ICH4.1.3 に準拠		
動物種/系統: ウサギ/ Chbb: HM(SPF) Kleinrusse	投与方法: 皮下	投与期間: G6-12
試験開始週齢: 約 5-10 ヲ月齡	交配成立日: Day 0	
初回投与年月日: 20 年 月 日	帝王切開日: G12	
溶媒/投与形態: 溶媒	GLP 適用: 適	
特記事項: 血漿中濃度を測定するための本試験 4.2.3.5.2-6 F20 TOX0046 の補足的生殖發生毒性試験。TK 試験の結果は別途、データベースシートに報告 (4.2.3.5.2-8 F20 KIN0330 参照)。		

投与量 (単位/kg/日/日)	0.25	0.5	1.5
動物数:	10	10	10
トキシコキネティクス 7回目投与: C _{max} (ng/mL)	7.8	15.3	159
母体/雌動物			
妊娠動物数	10	10	10
死亡あるいは安楽致死動物数	0	0	1
流産あるいは全胚吸収母体数	0	0	0
一般状態: 跳躍性及び回転性痙攣	-	1	1 例:死亡 1 例:生存
剖検: 片側子宮角から膣接合部の欠如	-	-	1
黄体数	-	-	1 死亡例 (5 のみ)
体重 (%)	-	-	-
摂餌量 (%)	-	-	-

-: 特記すべき所見なし, G=妊娠日齢

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

被験物質: グルリジン
試験番号: F20■TOX0295
CTD における記載場所: 4.2.3.5.3-1

報告書の題名: **HMR 1964 Subcutaneous pre- and postnatal toxicity study in rats**

試験計画: ICH4.1.2 に準拠

動物種/系統: ラット/Hsd: Sprague Dawley (SD)

投与方法: 皮下

無毒性量: グルリジン

ヒトインスリン

試験開始週齢: 約 10-12 週齢

投与期間: G6 - L21

F₀雌: 一般毒性 3.15 単位/kg/日

1 単位/kg/日

初回投与年月日: 20■年 ■月 ■日

交配成立日: Day 0

F₀雌: 生殖能 8 単位/kg/日

8 単位/kg/日

同腹児子の調整/非調整: 非調整

GLP 適用: 適

F₁雄: 8 単位/kg/日

8 単位/kg/日

F₁雌: 8 単位/kg/日

8 単位/kg/日

F₂胎児: 8 単位/kg/日

8 単位/kg/日

溶媒/投与形態: プラセボ溶媒

特記事項: 比較目的の為に、インスリンとしてヒトインスリンも本試験に組み込まれた。

投与量 (単位/kg/日)	0 (対照)	1	3.15	8	ヒトインスリン	
					1	8
F₀ 雌:						
妊娠動物数	20	19	19	18	16	19
死亡あるいは安楽致死動物数	0	0	0	4	0	9
流産あるいは全胚吸収母体数	0	1	1	0	0	0
一般状態: 自発運動低下、粗毛、腹臥、跳躍性及び回転性痙攣、漿液性眼分泌物、流涎	-	-	-	P	-	P
剖検	-	-	-	-	-	-
妊娠時体重 (%) #						
Day 9	247.4 g	- 2.7*	- 1.0*	- 2.0*	-	-
Day 13	261.3 g	-	-	- 2.1*	-	-
授乳時体重 (%) #						
Day 0	262.0 g	-	-	- 4.8*	-	-
Day 4	262.1 g	-	- 2.6*	- 4.0*	-	-
妊娠時相対摂餌量 (%)						
Day 9-13	7.9 g	-	-	- 6.3*	-	-
Day 13-16	7.7 g	-	-	- 5.2*	-	- 5.2*

CTD 第二部 - 非臨床概要 -2.6.7 毒性試験概要表
アピドラ注

報告書の題名：HMR 1964 Subcutaneous pre- and postnatal toxicity study in rats						
平均妊娠期間（日数）	23.0	22.9	23.0	23.1	22.9	22.9
異常分娩	-	-	-	-	-	-
F₁ 出生児（離乳前）：						
評価母体数	20	18	18	15	16	13
平均着床数	11.8	13.2	13.4	12.3	13.6	13.4
過剰着床痕数/腹	0.20	0.79	1.00	0.39	0.63	0.42
平均出生児数/腹	11.6	12.4	12.3	11.9	13.0	13.0
平均生存出生児数/腹	11.0	11.8	11.5	11.2	12.1	12.1
平均死亡出生児数/腹	0.60	0.58	0.84	0.67	0.88	0.89
出生 4 日後生存率	96.3	96.2	93.6	98.7	96.3	97.7
離乳時生存率 (%)	92.4	93.2	91.9	97.1	94.0	95.8
哺育されなかった出生児数(Unreared Litters)	1	1	2	0	0	0
出生児体重変化 ^a (g)	-	-	-	-	-	-
出生児性比 (% 雄)	48.5	46.8	48.9	44.9	43.3	48.6
出生児一般状態	-	-	-	-	-	-
出生児剖検	-	-	-	-	-	-
F₁ 雄（離乳後）：						
離乳後評価動物数	5.0	5.9	5.2	4.9	4.7	5.9
死亡及び安楽致死動物数	0	1(交換)	0	1	0	0
一般状態	-	-	-	-	-	-
剖検	-	-	-	-	-	-
体重変化 ^b (g)	-	-	-	-	-	-
摂餌量 ^c (%)	-	-	-	-	-	-
包皮の分離	34.7	34.7	34.0	33.7	34.3	34.6
感覚機能	-	-	-	-	-	-
運動機能	-	-	-	-	-	-
学習及び記憶	-	-	-	-	-	-
平均交配所用日数	4.7	5.5	4.0	4.0	3.4	4.1
交尾動物数	21	22	23	23	23	22
授胎動物数	19	20	19	17	20	21

-: 特記すべき所見なし, P: 有り G=妊娠日齢, L=授乳日齢, a: 出生から離乳まで, b: 離乳から交配まで, c: 離乳終了時, #: 統計学的計算は体重増加に基づく
検定方法: Student t-test 又は Wilks 多重検定 (親動物体重、胎児体重)、Wilcoxon 順位和検定 (体重 100g 当たりの平均摂餌量、着床数、生存出生児数、死亡出生児数、着床痕数、妊娠期間、出生 4 日後生存率、離乳時生存率)、Fisher の直接確立検定 (哺育されなかった出生児数) *: p<0.05, **: p<0.01

CTD 第二部 - 非臨床概要 - 2.6.7 毒性試験概要表
アピドラ注

投与量（単位/kg/日/日）	0 (対照)	1	3.15	8	ヒトインスリン	
					1	8
F₁ 雌（離乳後）：						
離乳後評価動物数	5.7	6.3	6.0	5.6	6.6	6.4
死亡あるいは瀕死安楽致死動物数	0	0	0	0	0	0
一般状態	-	-	-	-	-	-
剖検	-	-	-	-	-	-
交配前体重 ^a (g)	-	-	-	-	-	-
妊娠時体重変化(g)	-	-	-	-	-	-
交配前摂餌量 ^b (%)	-	-	-	-	-	-
妊娠時摂餌量 ^b (%)	-	-	-	-	-	-
膣開口までの平均日齢（日数）	32.3	32.0	31.7	31.8	32.2	32.5
感覚機能	-	-	-	-	-	-
運動量	-	-	-	-	-	-
学習及び記憶	-	-	-	-	-	-
平均交配所用日数	4.7	5.5	4.0	4.0	3.4	4.1
精子が確認された雌動物数	21	22	23	23	23	22
妊娠動物数	19	20	19	17	20	21
平均妊娠期間	23.3	23.1	23.3	23.0	23.3	23.2
異常分娩	-	-	-	-	-	-
F₂ 胎児：						
評価胎児数	19	20	19	17	19	21
平均胚数/腹	13.7	13.1	13.6	14.2	14.6	12.7
平均生存胚数/腹	13.4	12.5	12.9	14.2	13.4	12.3
平均死亡胚数/腹	0.3	0.6	0.7	0.0	1.2	0.4
胎児体重変化(g)	-	-	-	-	-	-
胎児の性比(% 雄)	47	49	47	55	51	52
胎児の一般状態	-	-	-	-	-	-
胎児の剖検所見	-	-	-	-	-	-

-: 特記すべき所見なし, P: 有り G=妊娠日齢, L=授乳日齢

検定方法: Student t-test 又は Wilks 多重検定（親動物体重、胎児体重）、Wilcoxon 順位和検定（体重 100g 当たりの平均摂餌量、着床数、生存出生児数、死亡出生児数、着床痕数、妊娠期間、出生 4 日後生存率、離乳時生存率）、Fisher の直接確立検定（哺育されなかった出生児数）*: p<0.05, **: p<0.01

a: 出生から離乳まで b: 離乳から交配まで c: 離乳終了時 #: 統計学的計算は体重増加に基づく。

2.6.7.15 新生児を用いた試験

新生児を用いた試験は実施していない。

2.6.7.16 局所刺激性試験

被験物質: グルリジン
試験番号: F20■TOX0499
CTD における記載箇所: 4.2.3.6-1

報告書の題名 : **Single-dose local tolerance study in rabbits (Intravenous/ Subcutaneous/ Paravenous/ Intramuscular)**

動物種/系統	投与方法	投与量(単位)	性別及び一群の動物数	特記すべき所見	試験番号
ウサギ/アルビノニュージール ンドホワイト (CRL: KBL(NZW)BR)	皮下	10	雌 4 例/群	皮下及び静脈内投与では良好な忍 容性が認められた。静脈周囲及び 筋肉内投与でも中等度の忍容性が 認められた。	F20■TOX0499
	静脈内	50			
	静脈周囲	10			
	筋肉内	50			

2.6.7.17 その他の毒性試験

被験物質: グルリジン
試験番号: F20■TOX0018
CTD における記載箇所: 4.2.3.7.1-1

報告書の題名: Testing of recombinant human insulin (HMR1964) on antigenic determinants following repeated administration to rabbits

動物種/系統	投与方法	投与期間	投与量 (単位/匹)	性別及び一群の動物数	特記すべき所見	試験番号
ウサギ /ニュージーランド ホワイト	皮下	1回/週 14週間	プラセボ(陰性対照): 0 単位/匹 ウシインスリン(陽性対照): 0.0625, 0.125, 0.2*, 0.25, 0.5, 1.0 単位/匹 グルリジン: 0.0625, 0.125, 0.2*, 0.25, 0.5, 1.0 単位/匹 ヒトインスリン: 0.0625, 0.125, 0.2*, 0.25, 0.5, 1.0 単 位/匹 全ての投与量は Freund の完 全アジュバントで 1:2 のエ マルジョンとした。 *: Freund の完全アジュバン ト無し	雌 10 例/群	初回投与後、最初の 3 日間で全 てのウサギの投与部位に結節性 腫脹と膿瘍が認められた。皮膚 の反応はアジュバントに関連し たものと考えられた。ウサギで はグルリジン抗体はヒトインス リンと弱い交差反応性を示し た。グルリジン抗体の産生、即 ちグルリジンの免疫原性は、ウ シインスリンとヒトインスリン の中間であった。	F20■TOX0018