

目次

2.6.6	毒性試験の概要文	2
2.6.6.1	まとめ	3
2.6.6.2	単回投与毒性試験	9
2.6.6.3	反復投与毒性試験	10
2.6.6.4	遺伝毒性試験	20
2.6.6.5	がん原性試験	22
2.6.6.6	生殖発生毒性試験	25
2.6.6.7	局所刺激性試験	31
2.6.6.8	その他の毒性試験	32
2.6.6.9	考察及び結論	35
2.6.6.10	図表	43
2.6.6.11	参考文献	43

2.6.6 毒性試験の概要文

本項で使用した略号及び用語の定義一覧を表 2.6.6-1 に示す。

表 2.6.6-1 略号及び用語の定義一覧

略号及び用語	定義
ALP	アルカリホスファターゼ
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ
APTT	活性化部分トロンボプラスチン時間
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC _{24h}	時間 0 から投与後 24 時間まで外挿した血漿中濃度－時間曲線下面積
C _{0.1h}	投与後 0.1 時間の血漿中濃度
C _{0.05h}	投与後 0.05 時間の血漿中濃度
C _{max}	最高血漿中濃度
DMSO	ジメチルスルホキシド
F ₀	親世代
F ₁	第 1 世代
F ₂	第 2 世代
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
ICH	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
M5	代謝物：ミラベグロン脱アシル体 (M16) -N ^o -アセチル体, YM-538852, M-5
M8	代謝物：ミラベグロン-N- α 位酸化体（フェニル酢酸誘導体），YM-538853, M-8
M11	代謝物：ミラベグロン-O-グルクロニド，YM-382984, RB-3
M12	代謝物：ミラベグロンケトン酸化体（M18）-N-COO-グルクロニド，YM-538858, RB-6
M13	代謝物：ミラベグロン-N-COO-グルクロニド，YM-538859, RB-9
M14	代謝物：ミラベグロン-N ^o -グルクロニド，YM-554028, RB-11
M15	代謝物：ミラベグロン-N-O-グルクロニド，YM-9636324, H1
M16	代謝物：ミラベグロン脱アシル体，YM-208876
MCH	平均赤血球血色素量
MCHC	平均赤血球血色素濃度
MCV	平均赤血球容積
NZW	New Zealand White
PT	プロトロンビン時間
S9	肝ホモジネートの 9000×g 上清
SD	Sprague-Dawley

2.6.6.1 まとめ

ミラベグロンの非臨床における安全性を評価する目的で、ラット及びイヌを用いた単回投与毒性試験、ラット、イヌ及びカニクイザルを用いた反復投与毒性試験、細菌、ヒトリンパ球及びラットを用いた遺伝毒性試験、マウス及びラットを用いたがん原性試験、ラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験、ウサギを用いた局所刺激性試験及びその他の毒性試験（モルモットを用いた皮膚感作性試験、不純物に関する試験及び溶血性試験）を実施した。すべての重要な試験は医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）適合試験として医薬品毒性試験法ガイドラインあるいは日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイドラインに準拠して実施した。

実施した主要な毒性試験の一覧を表 2.6.6-2 に示す。

表 2.6.6-2 毒性試験プログラム

試験の種類及び期間	投与経路	動物種
単回投与毒性試験	経口	ラット及びイヌ
反復投与毒性試験		
2 週間	経口	ラット、イヌ及びカニクイザル
13 週間	経口	ラット及びカニクイザル
26 週間	経口	ラット
52 週間	経口	カニクイザル
2 週間	静脈内	ラット及びカニクイザル
遺伝毒性試験		
復帰突然変異試験	—	ネズミチフス菌及び大腸菌
染色体異常試験	—	ヒト末梢血リンパ球
小核試験	経口	ラット
がん原性試験	経口	マウス及びラット
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	経口	ラット
胚・胎児発生に関する試験	経口	ラット及びウサギ
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	経口	ラット
局所刺激性試験		
皮膚刺激性試験	経皮	ウサギ
眼粘膜刺激性試験	結膜嚢内	ウサギ
血管局所刺激性試験	静脈内、静脈周囲	ウサギ
その他の毒性試験		
皮膚感作性試験	経皮	モルモット
不純物に関する毒性試験	経口	ラット
溶血性試験	—	ヒト血液

ミラベグロンの投与経路は臨床投与経路に準じて経口投与とした。静脈内投与の臨床試験を実施する目的で静脈内投与用製剤処方を用いた静脈内投与毒性試験、血管局所刺激性試験及び溶血性試験を実施した。

非げっ歯類動物種のうち、イヌは β アドレナリン受容体作動薬に対して他の動物種に比べて高感受性であることが知られており [1, 2, 3]、本薬をイヌに投与した場合にも極めて低い投与量から本薬の β アドレナリン受容体刺激作用に基づくと考えられる毒性が認められた。したがって、イヌは薬理作用に関連する毒性の検出には適しているが、それらの毒性が発現する投与量あるいは曝露量のヒトへの外挿性は低いと考えられたことから、非げっ歯類における反復投与毒性の評価は主としてカニクイザルを用いて実施した。

単回投与毒性

ラット単回経口投与毒性試験（300, 500 及び 800 mg/kg）において 300 mg/kg 以上の群の雌雄で自発運動の低下、流涎及び流涙、300 mg/kg 群の雌雄で色素涙が認められた。500 mg/kg 以上の群の雌雄で腹臥及び一過性の体重減少が認められた。800 mg/kg 群の雌雄で散瞳及び色素涙、雄で間代性痙攣、雌で横臥及び被毛の汚れが認められ、投与後 24 時間以内に雄 5 例中 2 例及び雌 5 例中 3 例が死亡した。死亡動物 1 例の剖検において肝臓の淡色化及び小葉明瞭化が認められ、病理組織学的検査において小葉周辺性に肝細胞の肥大及び空胞変性が認められた。概略の致死量は雌雄とも 800 mg/kg と推定された。

イヌ単回経口投与毒性試験（0.3, 3 及び 30 mg/kg）において 0.3 mg/kg 以上の群の雌雄で心拍数の増加及び皮膚の発赤が認められ、病理組織学的検査において 0.3 mg/kg 群の雄及び 3 mg/kg 群の雌雄で頬骨腺腺房の巣状性拡張及び頬骨腺の組織破壊が認められた。30 mg/kg 群では雌雄で嘔吐が認められ、雄は横臥、浅呼吸/喘ぎ呼吸を呈して投与後約 50 分に死亡した。病理組織学的検査において雌で頬骨腺の壊死が認められた。概略の致死量は雄が 30 mg/kg、雌が 30 mg/kg 以上と推定された。

反復投与毒性

ラット 2 週間反復経口投与毒性試験（10, 30, 100 及び 300 mg/kg/day）において 30 mg/kg 以上の群の雌雄でアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）の増加、本薬の β_3 アドレナリン受容体刺激作用に起因すると考えられる白色脂肪細胞の脂肪滴の減少、雄で中性脂肪の減少、肝臓及び腎臓の体重比重量の増加、雌でアルカリホスファターゼ（ALP）の増加が認められた。100 mg/kg 以上の群の雌雄で血小板数の減少、摂水量及び血漿中カリウムの増加、尿中ナトリウム及び塩素の総排泄量の増加、雄で体重増加量の低値、ALP、総コレステロール、リン脂質及び尿中カリウムの総排泄量の増加、心臓の体重比重量の増加、精巣及び精囊の実重量あるいは体重比重量の減少、雌で肝臓及び腎臓の体重比重量の増加、大動脈周囲の褐色脂肪細胞の脂肪滴の減少が認められた。300 mg/kg 群の雌雄で自発運動の低下、体重増加抑制、摂餌量の減少、網赤血球率の減少、尿蛋白の増加、胸腺の実重量及び体重比重量の減少が認められた。雄で尿量の増加、前立腺の実重量及び体重比重量の減少、大動脈周囲の褐色脂肪細胞の脂肪滴の減少及び精囊分泌液減少が認められた。雌で流涙、眼分泌物、白血球数、リンパ球数、ヘマトクリット値及び平均赤血球容積（MCV）の減少、総コレステロール、リン脂質及び尿中カリウムの総排泄量の増加、心臓の実重量、脾臓、卵巣及び子宮の実重量及び体重比重量の減少、子宮の萎縮、胸腺の萎縮及び骨髄の造

血低下が認められた。投与期間中に認められた所見は休薬により回復性を示した。無毒性量は 10 mg/kg/day と推定された。

ラット 13 週間反復経口投与毒性試験（10, 30, 100 及び 300 mg/kg/day）において 10 mg/kg 以上の群の雄で中性脂肪の減少、雌で白色脂肪細胞の脂肪滴の減少が認められた。30 mg/kg 以上の群の雌雄で血小板数の減少、血漿中カリウムの増加、クレアチニンの減少及び耳下腺のチモーゲン顆粒の減少が認められた。雄で流涎、体重増加抑制、摂餌量及び摂水量の増加、リン脂質の減少及び ALT の増加、褐色脂肪細胞の脂肪滴の減少が認められ、雌で流涎、尿中塩素の総排泄量の増加が認められた。100 mg/kg 以上の群の雌雄で ALP の増加、尿 pH の低下、尿蛋白及びビリルビン陽性反応、肝臓のマクロファージ及びクッパー細胞にリポフスチンの沈着が認められた。雄で流涎、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、尿中ナトリウム及び塩素排泄量の増加、 α_1 -グロブリン分画比率の減少、白色脂肪細胞の脂肪滴の減少及び骨髓のマクロファージにリポフスチンの沈着が認められた。雌で流涎、腹部膨満、摂餌量の増加、アルブミン濃度の増加、肝臓及び腎臓の実重量あるいは体重比重量の増加、子宮の実重量及び体重比重量の減少が認められた。300 mg/kg 群では雌 16 例中 2 例が死亡した。雌雄で下顎部の脱毛、アルブミン分画比率、アルブミン・グロブリン比及び総コレステロールの増加、胸腺の実重量及び体重比重量の減少、顎下腺の顆粒管好酸性顆粒減少、肝細胞腫脹、腎臓の尿細管上皮にリポフスチンの沈着、盲腸の粘膜固有層マクロファージにリポフスチン及びヘモジデリンの沈着及び胸腺の萎縮が認められた。雄で下顎部の被毛の汚れ、耳介の蒼白、散瞳、アルブミン濃度及び総ビリルビンの増加、白血球数、単球比率及び血糖の減少、膀胱の結石、肝臓の小葉中心性肝細胞壊死及び線維化が認められた。雌で泌尿・生殖器付近の被毛の汚れ、体重増加抑制、摂水量の増加、リンパ球比率、ALT 及びリン脂質の増加、好中球比率及び α_1 -グロブリン分画比率の減少、下垂体の実重量及び体重比重量の減少、褐色脂肪細胞の脂肪滴の減少、骨髓のマクロファージにリポフスチンの沈着及び子宮の萎縮が認められた。投与期間中に認められたほとんどの所見は休薬により回復性を示した。無毒性量は 10 mg/kg/day と推定された。

ラット 26 週間反復経口投与毒性試験（3, 10, 30 及び 100 mg/kg/day）において 3 mg/kg 以上の群の雌で本薬の β アドレナリン受容体刺激作用に起因すると考えられる流涎が認められた。10 mg/kg 以上の群の雌雄でクレアチニンの減少、雄で腹臥、流涎及び摂餌量の増加、血小板数の減少、血漿中カリウムの増加、尿中カリウム及び塩素の総排泄量の増加、雌で白色脂肪細胞の脂肪滴の減少が認められた。30 mg/kg 以上の群の雌雄で流涎、肝細胞の好酸性化及び褐色脂肪細胞の脂肪滴減少、雄で体重増加抑制、摂水量の増加、ヘマトクリット値、ヘモグロビン量、MCV 及び平均赤血球血色素量 (MCH) の増加、中性脂肪の減少、ALT の増加、尿浸透圧上昇、pH 低下、ビリルビン増加、胸腺の実重量の減少、白色脂肪細胞の脂肪滴の減少、脾臓にヘモジデリンの沈着の増加、雌で腹臥、摂餌量の増加、血漿中カリウムの増加、尿中塩素の総排泄量の増加、肝臓の実重量あるいは体重比重量の増加、耳下腺のチモーゲン顆粒の減少が認められた。100 mg/kg 群の雌雄で尿蛋白の増加、雄で総コレステロール、ALP、無機リン、総蛋白、アルブミン濃度、 β 及び γ -グロブリン濃度の増加、 α_1 -グロブリン（濃度及び分画比率）の減少、尿中ナトリウムの総排

泄量の増加，尿量の減少，尿の黄褐色化，脳及び脾臓の実重量の減少，耳下腺のチモーゲン顆粒の減少が認められた。雌で摂水量の増加，MCV の増加，血小板数，中性脂肪及び血漿中塩素の減少，尿 pH の低下及びビリルビンの増加，胸腺の実重量及び体重比重量の減少が認められた。投与期間中に認められたほとんどの所見は休薬により回復性を示した。無毒性量は 3 mg/kg/day と推定された。

ラット 2 週間反復静脈内投与毒性試験（1, 3 及び 10 mg/kg/day）において 3 mg/kg 以上の群の雌雄で白色脂肪細胞の脂肪滴の減少が認められた。10 mg/kg 群の雌雄で散瞳，自発運動の低下及び腹臥，雌で摂餌量の増加が認められた。無毒性量は 3 mg/kg/day と推定された。

イヌ 2 週間反復経口投与毒性試験（1, 3, 10 及び 20 mg/kg/day）において，1 mg/kg 以上の群の雌雄で皮膚の発赤，頬骨腺の変性及び炎症が認められた。1 mg/kg 群の雌で眼周囲の腫脹が認められ，眼，眼瞼及び鼻口部の腫脹，眼球突出が認められた 3 mg/kg 群の雌 1 例が投与 6 日に剖検された。3 mg/kg 以上の群の雌雄で流涎，雌で嘔吐及び眼分泌物が認められた。3 mg/kg 群の雌雄 1 例で強膜の充血が認められた。10 mg/kg 以上の群の雌雄で心拍数の増加，P 波及び QRS 間隔の延長，T 波の増高，雄で嘔吐及び眼分泌物が認められた。20 mg/kg 群の雌雄で眼周囲の腫脹及び心室頻拍，雌で眼の炎症が認められ，5 例中 1 例の雌が死亡し，投与 7 日までに全例が剖検された。病理組織学的検査において左心室心内膜の出血，左心室心筋変性及び肝臓の門脈周囲に空胞形成が認められた。本試験において無毒性量は特定できなかった。

イヌ 3 日間反復経口投与唾液腺毒性確認試験（投与量：20 mg/kg/day）において皮膚，眼結膜及び口腔粘膜の潮紅，嘔吐，自発運動の低下，潜血便，流涎，眼結膜蒼白，摂餌量の減少，ALP 及び ALT の軽度な増加が認められた。病理組織学的検査において唾液腺（顎下腺，大舌下腺，小舌下腺，耳下腺及び頬骨腺）の腺房細胞の萎縮及び壊死，導管の拡張，導管上皮の壊死，剥離，増生及び鉍質沈着，間質の水腫，出血，血栓及び細胞浸潤が認められ，これらの変化は頬骨腺で顕著であった。4 週あるいは 13 週間の休薬後には腺房細胞萎縮，導管の増生を伴う線維化及び鉍質沈着が認められたが，所見の程度は軽減していた。肝臓で小葉周辺性の肝細胞肥大，小葉中心性及び周辺性の脂肪滴沈着，小葉中心性のグリコーゲン顆粒の増加が認められたが，13 週間の休薬後にはこれらの所見は認められなかった。

カンクイザル 2 週間反復経口投与毒性試験（10, 30 及び 60 mg/kg/day）において 30 mg/kg 群の雌で投与初日に眼瞼下垂及び口粘膜の蒼白化が認められた。60 mg/kg 群の雌雄で眼瞼下垂及び口粘膜の蒼白化，横臥，腹臥，自発運動の低下，心室頻拍，PR 及び QRS 間隔の延長が認められた。無毒性量は 10 mg/kg/day と推定された。

カンクイザル 13 週間反復経口投与毒性試験（3, 10 及び 30 mg/kg/day）において 10 mg/kg 以上の群の雌雄で PR 間隔の延長傾向あるいは延長，白色脂肪組織で細胞質内に多数の小脂肪滴を有する小型脂肪細胞が認められた。30 mg/kg の雄で QRS 間隔の延長傾向及び心室頻拍が認められた。投与期間中に認められた所見は休薬により回復性を示した。無毒性量は 3 mg/kg/day と推定された。

カンクイザル 52 週間反復経口投与毒性試験（3, 10 及び 30 mg/kg/day）において 3 mg/kg 群の雌雄及び 30 mg/kg 群の雄の白色脂肪組織で多房性細胞質を有する小型脂肪細胞が認められた。

30 mg/kg 群の雌雄で投与初期に眼瞼下垂，自発運動の低下，よろめき歩行及び口粘膜の蒼白化，PR，QRS 及び QTc 間隔の延長あるいは延長傾向が認められた。本試験における無毒性量は 10 mg/kg/day と推定された。

カニクイザル 2 週間反復静脈内投与試験（0.3，1 及び 3 mg/kg/day）において 1 mg/kg 群の雄で PR 間隔の延長及び心室頻拍が認められた。3 mg/kg 群の雌雄で PR 及び QRS 間隔の延長，心室頻拍が認められた。雄 1 例で昏睡が認められ，雌で尿素窒素の軽度な増加が認められた。無毒性量は 0.3 mg/kg/day と推定された。

遺伝毒性

ネズミチフス菌及び大腸菌を用いた復帰突然変異試験（1.6～5000 µg/plate）において，代謝活性化系の存在下及び非存在下に遺伝子突然変異誘発性は認められなかった。

ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験（110～1280 µg/mL）において，代謝活性化系の存在下及び非存在下に 3 時間処理した場合に染色体異常を持つ細胞数の軽度な増加が認められたが，いずれも強い細胞毒性を示す濃度（細胞生存率 40%未満）における変化であった。

ラットを用いた小核試験（100，200 及び 400 mg/kg/day）において，小核誘発性は認められなかった。

がん原性

マウス 104 週間投与がん原性試験（25，50 及び 100 mg/kg/day）において，すべての投与群で投与開始後約 3 カ月まで対照群と比較して体重の高値が散見されたが，その後は体重増加抑制が認められた。すべての投与群で投与期間を通して摂餌量の増加が認められた。いずれの群においても腫瘍の発生頻度の増加は認められなかった。

ラット 104 週間投与がん原性試験（雄 12.5，25 及び 50 mg/kg/day，雌 25，50 及び 100 mg/kg/day）において 100 mg/kg 群の雌で死亡の増加が認められた。すべての投与群の雌雄で投与期間を通して摂餌量の増加が認められ，雄で用量依存的な体重増加抑制が認められた。いずれの群においても腫瘍の発生頻度の増加は認められなかった。

生殖発生毒性

雄ラット授胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（30，100 及び 300 mg/kg/day）において，全投与群で体重増加抑制及び摂餌量の減少が認められた。30 及び 100 mg/kg 群では投与後期には摂餌量の増加が認められた。300 mg/kg 群では振戦及び自発運動の低下が認められ，20 例中 14 例が死亡したため，評価できなかった。雄ラットの授胎能及び着床までの初期胚発生に対する無毒性量は 100 mg/kg/day と推定された。

雌ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（30，100 及び 300 mg/kg/day）において 100 mg/kg 群で摂餌量の増加が認められた。300 mg/kg 群では自発運動の低下，被毛の汚れ，流涙，振戦，体重及び摂餌量の減少が認められ，20 例中 2 例の動物が死亡し，1 例の動物が瀕死屠殺された。この群では発情休止期の延長，黄体数，着床数及び生存胎児数の減少が認められたが，交尾までに要した日数，交尾率，受胎率，着床前死亡率及び着床後死亡率に影響は認められなかつ

た。雌ラットの生殖機能に対する無毒性量は 100 mg/kg/day, 初期胚発生に対する無毒性量は 300 mg/kg/day と推定された。

ラット胚・胎児発生に関する試験（10, 30, 100 及び 300 mg/kg/day）において 100 mg/kg 以上の群で母動物の体重増加抑制及び摂餌量の減少, 胎児の波状肋骨の増加及び中足骨骨化数の低値が認められた。300 mg/kg 群では 3 例の母動物の死亡が認められ, 胎児体重の低下, 肩甲骨及び前腕骨の屈曲, 胸骨分節及び仙尾椎骨の骨化数の低値が認められた。100 mg/kg 群で実施した生後 4 日の出生児の骨格検査において波状肋骨の増加が認められた。胚・胎児発生に対する無毒性量は 30 mg/kg/day と推定された。

ラット胎児で認められた波状肋骨の回復性試験（100 mg/kg/day）において母動物で体重増加抑制及び摂餌量の減少が認められた。妊娠末期胎児で波状肋骨の増加及び胸骨分節及び左右中手骨の骨化数の低値が認められたが, 生後 4 日及び 63 日の出生児では認められなかったことから, これらの変化は発育に伴い回復するものと考えられた。

ウサギ胚・胎児発生に関する試験（3, 10, 及び 30 mg/kg/day）において 10 mg/kg 以上の群で母動物の摂餌量の減少及び胎児体重の低値が認められた。30 mg/kg 群で母動物の体重減少あるいは増加抑制が認められ, 1 例が横臥及び呼吸困難を呈して死亡した。胎児で着床後死亡胚数の増加, 大動脈拡張, 巨心及び肺副葉欠損の増加, 胸骨分節癒合の増加, 中手骨及び前後肢の中節骨の数の低値が認められた。胚・胎児発生に対する無毒性量は 3 mg/kg/day と推定された。

ウサギ胎児で認められた心血管系の異常に対する β_1 アドレナリン受容体遮断薬の影響に関する試験（30 mg/kg/day）において, ミラベグロン投与群で母動物の体重増加抑制及び摂餌量の減少, ミラベグロン及びメトプロロール（3 mg/kg/day）投与群で母動物の摂餌量の減少が認められた。ミラベグロン投与群で認められた胎児における大動脈拡張及び巨心の発現頻度の増加は, メトプロロールを併用することにより減少したことから, ウサギ胎児で発現した大動脈の拡張及び巨心はミラベグロンの β_1 アドレナリン受容体刺激作用に起因している可能性が示唆された。

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（10, 30 及び 100 mg/kg/day）において 100 mg/kg 群で母動物 2 例の死亡及び体重増加抑制が認められ, 出生児で 4 日生存率の低値及び体重増加抑制が認められた。母動物の生殖機能に対する無毒性量は 100 mg/kg/day, 出生児に対する無毒性量は 30 mg/kg/day と推定された。

局所刺激性

ウサギ皮膚刺激性試験において皮膚刺激性は認められなかった。

ウサギ眼粘膜刺激性試験において軽微な眼粘膜刺激性が認められたが, 直ちに洗浄することにより眼粘膜刺激性は軽減された。

ウサギ血管局所刺激性試験において静脈内投与により注射部位とその下流に限局性浮腫が認められたが, 投与後 8 時間までに消失した。静脈周囲投与により投与部位周囲に浮腫及び紅斑が投与後 24 時間まで認められ, 投与後 48～96 時間には紫斑が認められた。病理組織学的検査において皮下組織に炎症性反応が認められた。

その他の毒性

モルモット皮膚感作性試験（Adjuvant and Patch 法及び Buehler 法）において中等度の皮膚感作性が認められた。

約 1%（実測値：1.51%）の不純物（YM-181687）を含むミラベグロン原薬を用いたラット 2 週間反復経口投与毒性試験（3 及び 10 mg/kg/day）において、3 mg/kg 以上の群の雌で腸間膜リンパ節周囲の白色脂肪細胞の小型化が認められた。10 mg/kg 群の雌雄で摂餌量の増加，雄でフィブリノーゲン及び β グロブリン比の増加，雌で AST 及び ALT の増加，中性脂肪の減少が認められた。無毒性量は 3 mg/kg/day と推定された。

溶血性試験においてヒト血液に対して溶血性は認められなかった。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

2.6.6.2.1 ラット単回経口投与毒性試験……………添付資料 4.2.3.1-1

ミラベグロンを 0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し，300，500 及び 800 mg/kg の投与量で 16 時間絶食した 1 群雌雄各 5 匹の F344 ラット（8 週齢）に単回強制経口投与した。

動物の生死及び一般状態の観察，体重測定を行い，死亡動物は速やかに剖検した。生存動物は 14 日間の観察期間の後剖検し，肉眼的に異常が認められた部位について病理組織学的検査を実施した。

全ての投与群の雌雄で自発運動の低下，流涎及び流涙が認められた。さらに 300 mg/kg 群の雌雄で色素涙，500 mg/kg 以上の群の雌雄で腹臥，800 mg/kg 群の雌雄で散瞳及び色素涙，雄で間代性痙攣，雌で横臥及び被毛の汚れが認められた。800 mg/kg 群では投与後 24 時間以内に雄 2 例及び雌 3 例が死亡した。

500 mg/kg 以上の雌雄で一過性の体重減少が認められた。

800 mg/kg 群で死亡した雄 1 例の剖検において肝臓の淡色化及び小葉明瞭化が認められ，病理組織学的検査において小葉周辺性の肝細胞の肥大及び空胞変性が認められた。

以上の結果より，ミラベグロンをラットに単回経口投与した際の概略の致死量は雌雄とも 800 mg/kg と推定された。

2.6.6.2.2 イヌ単回経口投与毒性試験……………添付資料 4.2.3.1-2

ミラベグロンの乳糖 2 倍散あるいは乳糖 20 倍散をゼラチンカプセルに充填し，0.3，3 及び 30 mg/kg の投与量で一夜絶食した 1 群雌雄各 1 匹のビーグル犬（約 12 カ月齢）に単回経口投与した。対照群には乳糖を同様の方法で投与した。

一般状態の観察，体重及び摂餌量の測定，心電図検査，血圧測定，血液学的検査，血液化学的検査を実施した。14 日間の観察期間の後，剖検及び器官重量測定を行い，心臓，頬骨腺及び剖検で異常が認められた組織について病理組織学的検査を実施した。また，単回投与後に採血し，血漿中薬物濃度を測定した。

すべての群の雌雄で投与後 1 時間から皮膚の発赤及び心拍数の増加が認められた。さらに 30 mg/kg 群の雌雄で嘔吐が認められ、雄は横臥、浅呼吸及び喘ぎ呼吸を呈して投与後約 50 分に死亡した。

病理組織学的検査において 0.3 mg/kg 群の雄及び 3 mg/kg の雌雄で頬骨腺腺房の巣状性拡張及び頬骨腺の組織破壊が認められ、30 mg/kg 群の雌で頬骨腺の壊死が認められた。

生存例では体重、摂餌量、血圧、血液学的検査、血液化学的検査、器官重量及び剖検において薬物投与に関連した変化は認められなかった。

以上の結果より、ミラベグロンをイヌに単回経口投与した際の概略の致死量は、雄が 30 mg/kg、雌が 30 mg/kg 以上と推定された。死亡がみられなかった 3 mg/kg におけるミラベグロンの C_{max} は、雄が 241 ng/mL、雌が 369 ng/mL であり、臨床推奨用量（50 mg、2.7.2.2.2.3.1 性差及び高齢者試験 [CL-072]）における C_{max} （男性 43.5 ng/mL、女性 66.3 ng/mL）の 5.5 倍及び 5.6 倍であった。3 mg/kg におけるミラベグロンの曝露量（ AUC_{24h} ）は、雄が 1155 ng·h/mL、雌が 732 ng·h/mL であり、臨床推奨用量における曝露量（男性 341 ng·h/mL、女性 512 ng·h/mL）の 3.4 倍及び 1.4 倍であった。なお、30 mg/kg 群で死亡した雄の投与後 50 分の血漿中薬物濃度は 3028 ng/mL であった。

2.6.6.3 反復投与毒性試験

2.6.6.3.1 ラット 2 週間反復経口投与毒性試験……………添付資料 4.2.3.2-1

ミラベグロンを 0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、10、30、100 及び 300 mg/kg/day の投与量で 1 群雌雄 16 匹の F344 ラット（8 週齢）に 1 日 1 回 2 週間反復経口投与した。対照群には 0.5%メチルセルロース水溶液を同様の方法で投与した。1 群雌雄各 6 匹を休薬動物とし、投与期間終了後 2 週間の回復性を検討した。

一般状態の観察、体重、摂餌量及び摂水量の測定、眼科検査、耳介反射、血液学的検査、血液化学的検査、尿検査、剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。別に 1 群雌雄各 8 匹の動物を用いて投与 1 日及び 14 日における血漿中薬物濃度を測定した。

300 mg/kg 群の雌雄で自発運動の低下、雌で流涙及び眼分泌物が認められた。100 mg/kg 群の雌雄で摂餌量の増加、雄で体重増加量の低値、300 mg/kg 群の雌雄で体重増加抑制及び摂餌量の減少が認められた。100 mg/kg 群の雌雄及び 300 mg/kg 群の雄で摂水量の増加が認められた。

血液学的検査において 100 mg/kg 以上の群の雌雄で血小板数の減少、300 mg/kg 群の雌雄で網赤血球率の減少、雌でヘマトクリット値、MCV、白血球数及びリンパ球数の減少が認められた。

血液化学的検査において 30 mg/kg 以上の群の雌雄で ALT の増加、雄で中性脂肪の減少、雌で ALP の増加が認められた。100 mg/kg 以上の群の雌雄でカリウムの増加、雄で ALP、総コレステロール及びリン脂質の増加が認められた。300 mg/kg 群の雌で総コレステロール及びリン脂質の増加が認められた。

尿検査において 100 mg/kg 以上の群の雌雄でナトリウム及び塩素の総排泄量の増加，雄でカリウム総排泄量の増加が認められた。300 mg/kg 群では雌雄で尿蛋白の増加，雄で尿量の増加，雌でカリウム総排泄量の増加が認められた。

器官重量測定において 30 mg/kg 以上の群の雄で肝臓及び腎臓の体重比重量の増加が認められた。100 mg/kg 以上の群の雄で心臓の体重比重量の増加，精巣及び精囊の実重量あるいは体重比重量の減少，雌で肝臓及び腎臓の体重比重量の増加が認められた。300 mg/kg 群の雌雄で胸腺の実重量及び体重比重量の減少，雄で前立腺の実重量及び体重比重量の減少，雌で心臓の実重量の減少，脾臓，卵巣及び子宮の実重量及び体重比重量の減少が認められた。

剖検において 100 mg/kg 以上の群の雌雄で腸間膜リンパ節周囲の白色脂肪の減少が認められた。300 mg/kg 群の雄で前立腺及び精囊の小型化，雌で胸腺の萎縮及び子宮の小型化が認められた。

病理組織学的検査において 30 mg/kg 以上の群の雌雄で薬理作用（ β_3 アドレナリン受容体刺激作用）に関連した変化であると考えられる腸間膜リンパ節周囲の白色脂肪細胞の脂肪滴減少が認められ，100 mg/kg 以上の群の雌及び 300 mg/kg 群の雄で心臓の大動脈周囲の褐色脂肪細胞の脂肪滴の減少が認められた。300 mg/kg 群の雄で精囊分泌液減少，雌で子宮の萎縮，胸腺の萎縮及び骨髓の造血低下が認められた。

眼科検査及び耳介反射において薬物投与に関連した変化は認められなかった。

休薬期間終了後にも 300 mg/kg 群の雄で心臓及び肝臓の体重比重量の高値が認められ，100 mg/kg 以上の群の雌雄で白色脂肪の脂肪滴の減少が認められたが，投与期間中に認められたすべての変化は休薬期間中に消失あるいは回復傾向を示した。

以上の結果より，本試験における無毒性量は 10 mg/kg/day と推定された。10 mg/kg/day における投与 2 週のミラベグロンの曝露量（AUC_{24h}）は，雄が 542 ng·h/mL，雌が 450 ng·h/mL であり，臨床推奨用量における曝露量の 1.6 倍及び 0.9 倍であった。最小毒性量である 30 mg/kg/day における投与 2 週のミラベグロンの曝露量（AUC_{24h}）は，雄が 2004 ng·h/mL，雌が 2901 ng·h/mL であり，臨床推奨用量における曝露量の 5.9 倍及び 5.7 倍であった。

2.6.6.3.2 ラット 13 週間反復経口投与毒性試験 …………… 添付資料 4.2.3.2-2

ミラベグロンを 0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し，10，30，100 及び 300 mg/kg/day の投与量で 1 群雌雄各 10～16 匹の F344 ラット（8 週齢）に 1 日 1 回 13 週間反復経口投与した。対照群には 0.5%メチルセルロース水溶液を同様の方法で投与した。対照群，100 mg/kg 群及び 300 mg/kg 群の雌雄各 6 匹を休薬動物とし，投与期間終了後 4 週間の回復性を検討した。

一般状態の観察，体重，摂餌量及び摂水量の測定，眼科検査，耳介反射，血液学的検査，血液化学的検査，尿検査，剖検，器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。各群雄 2 匹について肝臓の電子顕微鏡検査を実施した。別に 1 群雌雄各 8 匹の動物を用いて投与 1 日及び 13 週における血漿中薬物濃度を測定した。

300 mg/kg 群の雌 2 例が投与 10 週及び 13 週に死亡した。死亡動物において心臓及び肺の水腫が認められた。30 mg/kg 以上の群の雄で流涎，雌で流涙が認められた。100 mg/kg 以上の群の雄で流

涙，雌で流涎及び腹部膨満が認められた。300 mg/kg 群の雌雄で下顎部の脱毛，雄で下顎部の被毛の汚れ，耳介等の蒼白，散瞳，軟便，間代性痙攣及び呼吸促迫，雌で泌尿・生殖器付近の被毛の汚れが認められた。30 mg/kg 以上の群の雄及び 300 mg/kg 群の雌で体重増加抑制が認められた。30 mg/kg 以上の群の雄及び 100 mg/kg 以上の群の雌で摂餌量の増加が認められた。30 mg/kg 以上の群の雄及び 300 mg/kg 群の雌で摂水量の増加が認められた。

血液学的検査において 30 mg/kg 以上の群の雌雄で血小板数の減少が認められた。300 mg/kg 群の雄で白血球数及び単球比率の減少，雌でリンパ球比率の増加及び好中球比率の減少が認められた。

血液化学的検査において 10 mg/kg 以上の群の雄で中性脂肪の減少が認められた。30 mg/kg 以上の群の雌雄でカリウムの増加及びクレアチニンの減少，雄で ALT の増加及びリン脂質の減少が認められた。100 mg/kg 以上の群の雌雄で ALP の増加，雄で AST の増加及び α_1 -グロブリン分画比率の減少，雌でアルブミン濃度の増加が認められた。300 mg/kg 群の雌雄で総コレステロールの増加，アルブミン分画比率及びアルブミン・グロブリン比の増加，雄で血糖の減少，アルブミン濃度及び総ビリルビンの増加，雌で ALT 及びリン脂質の増加， α_1 -グロブリン分画比率の減少が認められた。

尿検査において 30 mg/kg 以上の群の雌で塩素の総排泄量の増加が認められた。100 mg/kg 以上の群の雌雄で pH の低下，蛋白及びビリルビンの陽性反応，雄でナトリウム及び塩素排泄量の増加，雌で浸透圧の増加が認められた。

器官重量測定において 30 mg/kg 以上の群の雄で肝臓，腎臓及び精巣の体重比重量の増加が認められた。100 mg/kg 以上の群の雌で肝臓及び腎臓の実重量あるいは体重比重量の増加，子宮の実重量及び体重比重量の減少が認められた。300 mg/kg 群の雌雄で胸腺の実重量及び体重比重量の減少，雄で前立腺，精囊及び顎下腺の実重量あるいは体重比重量の減少，雌で下垂体の実重量及び体重比重量の減少が認められた。

剖検において 10 mg/kg 以上の雌及び 100 mg/kg 以上の雄で白色脂肪組織の減少が認められた。300 mg/kg 群の雌雄で胸腺の萎縮，雄で膀胱の結石，雌で子宮の萎縮が認められた。

病理組織学的検査において 10 mg/kg 以上の群の雌で白色脂肪細胞の脂肪滴の減少が認められた。

30 mg/kg 以上の群の雌雄で耳下腺のチモーゲン顆粒の減少，雄で褐色脂肪細胞の脂肪滴の減少が認められた。100 mg/kg 以上の群の雌雄で肝臓のマクロファージ及びクッパー細胞にリポフスチンの沈着，雄で白色脂肪細胞の脂肪滴の減少及び骨髄のマクロファージにリポフスチン沈着が認められた。300 mg/kg 群の雌雄で顎下腺の顆粒管好酸性顆粒減少，肝細胞腫脹，腎臓の尿細管上皮にリポフスチンの沈着，盲腸の粘膜固有層マクロファージにリポフスチン及びヘモジデリン沈着及び胸腺の萎縮，雄で肝臓の小葉中心性肝細胞壊死及び線維化，雌で褐色脂肪細胞の脂肪滴減少，骨髄のマクロファージにリポフスチン沈着及び子宮の萎縮が認められた。

電子顕微鏡検査において 30，100 及び 300 mg/kg 群の 1，1 及び 2 例で肝細胞に残渣小体の増加が認められた。また，300 mg/kg 群の 1 例でクッパー細胞に残渣小体が認められた。

眼科検査及び耳介反射において薬物投与に関連した変化は認められなかった。

投与期間中に認められたほとんどの変化は、4週間の休薬期間により回復性を示したが、回復4週においても雄で体重増加抑制が認められた。休薬期間終了後に100 mg/kgの雄でリン脂質及び総コレステロールの低値、雌でALTの低値、300 mg/kgの雌雄でリン脂質及び総コレステロールの低値、ALPの高値、雄で中性脂肪の低値、器官重量において100 mg/kg群の雌及び300 mg/kg群の雌雄で腎臓の実重量または体重比重量の高値が認められた。病理組織学的検査において顎下腺の顆粒管好酸性顆粒減少、耳下腺のチモーゲン顆粒減少、肝臓、腎臓及び骨髄でリポフスチン沈着、盲腸でリポフスチンあるいはヘモジデリン沈着が認められた。

以上の結果より、本試験における無毒性量は10 mg/kg/dayと推定された。10 mg/kg/dayにおける投与13週のミラベグロンの曝露量(AUC_{24h})は、雄が918 ng·h/mL、雌が818 ng·h/mLであり、臨床推奨用量における曝露量の2.7倍及び1.6倍であった。最小毒性量である30 mg/kg/dayにおける投与13週のミラベグロンの曝露量(AUC_{24h})は、雄が5170 ng·h/mL、雌が3511 ng·h/mLであり、臨床推奨用量における曝露量の15.2倍及び6.9倍であった。

2.6.6.3.3 ラット 26 週間反復経口投与毒性試験 …………… 添付資料 4.2.3.2-3, 4.2.3.2-4

ミラベグロンを0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、3, 10, 30 及び100 mg/kg/dayの投与量で1群雌雄各12~18匹のF344ラット(8週齢)に1日1回26週間反復経口投与した。対照群には0.5%メチルセルロース水溶液を同様の方法で投与した。対照群、30 mg/kg群及び100 mg/kg群の雌雄各6匹を休薬動物とし、投与期間終了後13週間の回復性を検討した。

一般状態の観察、体重、摂餌量及び摂水量の測定、眼科検査、耳介反射、血液学的検査、血液化学的検査、尿検査、剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。別に1群雌雄各8匹の動物を用いて投与26週における血漿中薬物濃度を測定した。

3 mg/kg以上の群の雌で流涙が認められた。10 mg/kg以上の群の雄で腹臥及び流涙が認められた。30 mg/kg以上の群の雌雄で流涎、雌で腹臥が認められた。30 mg/kg以上の群の雄で体重増加抑制が認められた。10 mg/kg以上の群の雄及び30 mg/kg以上の群の雌で摂餌量の増加が認められた。30 mg/kg以上の群の雄及び100 mg/kg群の雌で摂水量の増加が認められた。

血液学的検査において10 mg/kg以上の群の雄で血小板数の減少が認められた。30 mg/kg以上の群の雄でヘマトクリット値、ヘモグロビン量、MCV及びMCHの増加が認められた。100 mg/kg群の雌でMCVの増加、血小板数の減少が認められた。

血液化学的検査において10 mg/kg以上の群の雌雄でクレアチニンの減少、雄でカリウムの増加が認められた。30 mg/kg以上の群の雄で中性脂肪の減少、ALTの増加、雌でカリウムの増加が認められた。100 mg/kg群の雄で総コレステロール、ALP、無機リン、総蛋白、アルブミン濃度、 β 及び γ -グロブリン濃度の増加、 α_1 -グロブリン(濃度及び分画比率)の減少、雌で中性脂肪及び塩素の減少が認められた。

尿検査において10 mg/kg以上の群の雄でカリウム及び塩素の総排泄量の増加が認められた。30 mg/kg以上の群の雄で尿浸透圧上昇、pHの低下、ビリルビンの増加、雌で塩素の総排泄量の増

加が認められた。100 mg/kg 群の雌雄で蛋白の増加，雄でナトリウムの総排泄量の増加，尿量の減少，尿の黄褐色化，雌で pH の低下及びビリルビンの増加が認められた。

器官重量測定において 30 mg/kg 以上の群の雄で胸腺の実重量の減少，雌で肝臓の実重量あるいは体重比重量の増加が認められた。100 mg/kg 群の雄で脳及び脾臓の実重量の減少，雌で胸腺の実重量及び体重比重量の減少が認められた。

剖検において 10 mg/kg 以上の群の雌で白色脂肪の減少が認められた。30 mg/kg 以上の群の雄で白色脂肪の減少及び褐色脂肪の暗色化が認められた。100 mg/kg 群の雌で褐色脂肪細胞の暗色化が認められた。

病理組織学的検査において 10 mg/kg 以上の群の雌で白色脂肪細胞の脂肪滴の減少，肝臓の微小肉芽腫の減少が認められた。30 mg/kg 以上の群の雌雄で肝細胞の好酸性化及び褐色脂肪細胞の脂肪滴減少，雄で白色脂肪細胞の脂肪滴減少，脾臓のヘモジデリン沈着の増加，雌で耳下腺のチモーゲン顆粒減少が認められた。100 mg/kg 群の雄で耳下腺のチモーゲン顆粒の減少が認められた。

追加実施した肝臓の電子顕微鏡検査（添付資料 4.2.3.2-4）において 100 mg/kg 群の雌雄で肝細胞及びクッパー細胞の微細顆粒状物質を含む大型のライソゾーム，雄で肝細胞のグリコーゲン顆粒の減少が認められた。

眼科検査及び耳介反射において薬物投与に関連した変化は認められなかった。

13 週間の休薬後に血液化学的検査において 30 及び 100 mg/kg 群の雄で中性脂肪の低値が認められた。剖検において 30 mg/kg の群の雄及び 100 mg/kg 群の雌雄で褐色脂肪細胞の暗色化が認められた。病理組織学的検査において 100 mg/kg 群の雌雄で白色脂肪細胞中の脂肪滴の減少が認められたが，回復傾向が認められた。その他の投与期間中に認められた変化は休薬することによりいずれも消失した。

以上のことから，本試験における無毒性量は雌雄とも 3 mg/kg/day と推定された。3 mg/kg/day における投与 26 週のミラベグロンの曝露量（AUC_{24h}）は，雄が 110 ng·h/mL，雌が 113 ng·h/mL であり，臨床推奨用量における曝露量の 0.3 倍及び 0.2 倍であった。最小毒性量である 10 mg/kg/day における投与 26 週のミラベグロンの曝露量（AUC_{24h}）は，雄が 1098 ng·h/mL，雌が 854 ng·h/mL であり，臨床推奨用量における曝露量の 3.2 倍及び 1.7 倍であった。

2.6.6.3.4 ラット 5 日間反復静脈内投与毒性試験（投与量設定試験）…………… ……………添付資料 4.2.3.2-5（参）

ミラベグロンを 8.4%のショ糖を含む 20 mmol/L クエン酸緩衝液に溶解し，3，10 及び 30 mg/kg/day の投与量で 1 群雌雄各 5 匹の F344 ラット（8 週齢）に 1 日 1 回 5 日間反復静脈内投与し，一般状態の観察，体重及び摂餌量の測定，剖検を実施した。対照群には 8.4%のショ糖を含む 20 mmol/L クエン酸緩衝液を同様の方法で投与した。

10 mg/kg 以上の群の雌雄において自発運動の低下，散瞳，腹臥が認められた。30 mg/kg 群の雌雄で振戦，間代性痙攣，緩徐呼吸，喘ぎ呼吸，流涙及び流涎，雄で浅速呼吸，雌で呼吸深大及び

泌尿器周囲の被毛の汚れが認められ、雄全例、雌2例が死亡した。30 mg/kg の雌の生存例で体重及び摂餌量の減少が認められた。

剖検において薬物投与に関連した変化は認められなかった。

以上の結果より、ラット2週間反復静脈内投与毒性試験における最高投与量として10 mg/kg/dayを設定した。

2.6.6.3.5 ラット2週間反復静脈内投与毒性試験……………添付資料4.2.3.2-6

ミラベグロンを8.4%のショ糖を含む20 mmol/Lクエン酸緩衝液に溶解し、1, 3及び10 mg/kg/dayの投与量で1群雌雄各12匹のF344ラット（8週齢）に1日1回2週間反復静脈内投与した。対照群には8.4%のショ糖を含む20 mmol/Lクエン酸緩衝液を同様の方法で投与した。

一般状態の観察、体重、摂餌量及び摂水量の測定、眼科検査、耳介反射、血液学的検査、血液化学的検査、尿検査、剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。別に1群雌雄各16匹の動物を用いて、投与1日及び14日における血漿中薬物濃度を測定した。

10 mg/kg群の雌雄で投与直後に一過性の散瞳、自発運動の低下及び腹臥が認められた。10 mg/kg群の雌で摂餌量の増加が認められた。

病理組織学的検査において3 mg/kg以上の群の雌雄で白色脂肪細胞の脂肪滴の減少が認められた。

体重及び摂水量測定、眼科検査、耳介反射、血液学的検査、血液化学的検査、尿検査、剖検、器官重量測定において薬物投与に関連した変化は認められなかった。

以上のことから、本試験における無毒性量は雌雄ともに3 mg/kg/dayと推定された。3 mg/kg/dayにおける投与2週のミラベグロンの $C_{0.1h}$ は、雄が819 ng·h/mL、雌が652 ng·h/mLであり、曝露量（AUC_{24h}）は、雄が1223 ng·h/mL、雌が900 ng·h/mLであった。

2.6.6.3.6 イヌ2週間反復経口投与毒性試験……………添付資料4.2.3.2-7

ミラベグロンの乳糖2倍散あるいは乳糖20倍散をゼラチンカプセルに充填し1, 3, 10及び20 mg/kg/dayの投与量で1群雌雄各3～5匹のビーグル犬（35～42週齢）に1日1回2週間反復経口投与した。対照群には乳糖を同様の方法で投与した。

一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定、心電図検査、眼科検査、血液学的検査、血液化学的検査、尿検査、剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。投与1日及び14日に採血し、血漿中薬物濃度を測定した。

20 mg/kg群で雌1例が投与3日に死亡した。そのため20 mg/kg群の他の動物への投与は中止し、投与6あるいは7日に剖検した。3 mg/kg群の雌1例では眼、眼瞼及び鼻口部の腫脹及び眼球突出のため投与の継続が困難になったため、投与6日に剖検した。

1 mg/kg以上の群の雌雄で皮膚の発赤が認められ、1 mg/kg群の雌1例で眼周囲の腫脹が認められた。3 mg/kg以上の群の雌雄で流涎、雌で嘔吐及び眼分泌物が認められた。3 mg/kg群の雌雄1

例で強膜の充血が認められた。10 mg/kg 以上の群の雄で嘔吐及び眼分泌物が認められた。20 mg/kg 群の雌雄で眼周囲の腫脹，雌で眼の炎症が認められた。

心電図検査において 10 mg/kg 以上の群の雌雄で心拍数の増加，P 波及び QRS 間隔の延長，T 波の増高が認められた。20 mg/kg 群の雄 1 例及び雌 2 例で心室頻拍が認められた。

剖検において 20 mg/kg 群の雌雄で硬く褪色した頬骨腺が認められた。20 mg/kg 群の雌の途中死亡例で心臓の褪色，淡色点／領域及び過剰の心嚢液が認められた。さらに肝臓の小葉像明瞭，肺の褪色領域，脾臓の淡色点／領域，胸腺の点状出血が認められた。

病理組織学的検査において 1 mg/kg 以上の群の雌雄で頬骨腺の変性及び炎症が認められた。20 mg/kg 群の雄で肝臓の門脈周囲の空胞形成，雌で左心室心筋変性が認められた。20 mg/kg 群の雌の途中死亡例で左心室内膜の出血，肝臓の門脈周囲の空胞形成，脾臓赤脾髄中の限局性虚血領域，胸腺の出血／うっ血が認められた。

体重及び摂餌量測定，眼科検査，血液学的検査，血液化学的検査，尿検査，器官重量測定において薬物投与に関連した変化は認められなかった。

以上の結果より，本試験における無毒性量は 1 mg/kg/day 未満と推定された。1 mg/kg/day における投与 2 週のミラベグロンの曝露量（AUC_{24h}）は，雄が 313 ng·h/mL，雌が 269 ng·h/mL であった。

2.6.6.3.7 イヌ 3 日間反復経口投与唾液腺毒性確認試験……………添付資料 4.2.3.2-8

イヌ単回及び 2 週間反復経口投与毒性試験において，ミラベグロンの投与により唾液腺に顕著な変化が認められたことから，それら変化の回復性について検討した。

ミラベグロンの乳糖 2 倍散をゼラチンカプセルに充填し，20 mg/kg/day の投与量で 14 匹の雌ビーグル犬（9 カ月齢）に 1 日 1 回 3 日間経口投与した。対照群（雌 3 匹）には乳糖を同様の方法で投与した。

一般状態の観察，体重及び摂餌量の測定，血液化学的検査を実施した。最終投与の翌日，休薬 4 及び 13 週に，それぞれ 4，4 及び 6 匹を剖検して唾液腺の器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。投与 3 日に採血し血漿中薬物濃度を測定した。

20 mg/kg 群で皮膚（全身または腹部）の潮紅，眼結膜及び口腔粘膜の潮紅が全例で認められ，さらに嘔吐，自発運動の低下，潜血便，流涎及び眼結膜蒼白が認められた。投与期間中に体重の減少が 1 例で，摂餌量の減少が 7 例で認められた。

投与終了後の剖検において頬骨腺の暗赤色化，肝臓の腫大及び黄色化，心臓の左心室内膜の暗赤色点散在，左心室外膜の白色斑，十二指腸潰瘍が認められた。

投与終了後の剖検例において 1 例で顎下腺の体重比重量の高値が認められた。投与終了後の剖検例（4 例）の病理組織学的検査において頬骨腺で間質水腫，出血，細胞浸潤，腺房細胞の壊死及び萎縮，導管の拡張，導管上皮の壊死，剥離及び増生，鉍質沈着，血栓が認められた。大舌下腺で間質水腫，細胞浸潤，導管拡張，腺房の内腔の拡張が認められた。小舌下腺で導管拡張，腺房の内腔拡張，間質細胞浸潤，顎下腺で腺房細胞の萎縮，耳下腺で腺房細胞の萎縮，導管上皮内

及び周囲間質への細胞浸潤が認められた。また、肝臓で小葉周辺性の肝細胞肥大、小葉中心性及び周辺性の脂肪滴沈着、小葉中心性のグリコーゲン顆粒の増加が認められた。

休薬 2 日に実施した血液化学的検査において ALP 及び ALT の増加が認められた。

4 週休薬後の剖検例(4 例)において 1 例で顎下腺の実重量及び体重比重量の高値が認められた。病理組織学的検査において頬骨腺の腺房細胞の萎縮、導管増生を伴う線維化、導管上皮の鉍質沈着、顎下腺の腺房細胞の萎縮、肝臓の小葉中心性及び周辺性グリコーゲン顆粒の増加、好酸性化が認められた。

13 週間休薬後の剖検例(6 例)の病理組織学的検査において頬骨腺の腺房細胞の萎縮、導管増生を伴う線維化、導管上皮の鉍質沈着、顎下腺の腺房細胞の萎縮、大舌下腺で腺房細胞の萎縮及び間質性細胞浸潤、小舌下腺で腺房細胞の萎縮及び間質性細胞浸潤、導管拡張、導管上皮の鉍質沈着が認められた。

以上のことから、イヌにおいて認められた頬骨腺を主とする唾液腺の病理組織学的変化は、13 週間休薬後には変化の修復像と考えられる腺房細胞の萎縮及び導管増生を伴う線維化が認められたのみであり、休薬により変化は修復することが示唆された。20 mg/kg/day における投与 3 日のミラベグロンの曝露量(AUC_{24h})は、12855 ng·h/mL であり、臨床推奨用量における曝露量の 25.1 倍であった。

2.6.6.3.8 カニクイザル 2 週間反復経口投与毒性試験……………添付資料 4.2.3.2-9

ミラベグロンを 0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、10、30 及び 60 mg/kg/day の投与量で、1 群雌雄各 3~4 匹のカニクイザル(3 歳齢)に 1 日 1 回 2 週間反復経口投与した。対照群には 0.5%メチルセルロース水溶液を同様の方法で投与した。

一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定、心電図検査、眼科検査、血液学的検査、血液化学的検査、尿検査、器官重量測定、剖検及び病理組織学的検査を実施した。投与 1 日及び 2 週に採血し、血漿中薬物濃度を測定した。なお、60 mg/kg 群では投与初日に一般状態及び心電図の重篤な変化が認められたため、雌雄各 1 匹については 2 日間で投与終了し、以降 12 日間休薬して回復性を検討した。

30 mg/kg 群の雌 1 例で眼瞼下垂及び口粘膜の蒼白化が投与初日に認められた。60 mg/kg 群の雌雄で眼瞼下垂、自発運動の低下及び横臥が認められ、雄で口粘膜の蒼白化及び腹臥が認められた。

心電図検査において 60 mg/kg 群の雄 2 例及び雌 1 例で投与初日の投与後 4 時間に心室頻拍が認められた。これらの動物のうち雌雄各 1 例について投与を中止し回復性を検討した。投与を継続した雄 1 例では投与 4、5 及び 14 日にも心室頻拍が認められた。これらの動物のうち心電図パラメータを算出可能であった動物において PR 及び QRS 間隔の延長が認められた。

体重及び摂餌量測定、眼科検査、血液学的検査、血液化学的検査、尿検査、器官重量測定、剖検及び病理組織学的検査において薬物投与に関連した変化は認められなかった。

投与 2 日で投与を中止した雌雄各 1 匹の動物において休薬期間中に薬物投与に関連した変化は認められなかった。

以上の結果より、本試験における無毒性量は 10 mg/kg/day と推定された。10 mg/kg/day における投与 2 週のミラベグロンの曝露量 (AUC_{24h}) は、雄が 1460.76 ng·h/mL、雌が 1462.32 ng·h/mL であり、それぞれ臨床推奨用量における曝露量の 4.3 倍及び 2.9 倍であった。最小毒性量である 30 mg/kg/day における投与 2 週のミラベグロンの曝露量 (AUC_{24h}) は、雄が 5597.83 ng·h/mL、雌が 4312.24 ng·h/mL であり、臨床推奨用量における曝露量の 16.4 倍及び 8.4 倍であった。

2.6.6.3.9 カニクイザル 13 週間反復経口投与毒性試験……………添付資料 4.2.3.2-10

ミラベグロンを 0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、3、10 及び 30 mg/kg/day の投与量で、1 群雌雄各 3～5 匹のカニクイザル (3-4 歳齢) に 1 日 1 回 13 週間反復経口投与した。対照群には 0.5%メチルセルロース水溶液を同様の方法で投与した。対照群及び 30 mg/kg 群の雌雄各 2 匹について投与期間終了後、4 週間休薬し回復性を検討した。

一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定、心電図検査、眼科検査、糞便潜血検査、聴覚検査、血液学的検査、血液化学的検査、尿検査、器官重量測定、剖検及び病理組織学的検査を実施した。投与 1 日、5 週及び 13 週に採血し、血漿中薬物濃度を測定した。

心電図検査において 10 mg/kg 以上の群の雌雄で PR 間隔の延長傾向あるいは延長が認められた。30 mg/kg 群の雄で QRS 間隔の延長傾向が認められ、雄 1 例で投与 13 週の投与後 2 時間に心室頻拍が認められた。投与最終日に再度実施した心電図検査では心室頻拍は認められなかった。

病理組織学検査において 10 mg/kg 以上の群の雌雄で腸間膜リンパ節周囲白色脂肪組織に細胞質内に多数の小脂肪滴を有する小型脂肪細胞が認められた。

一般状態観察、体重及び摂餌量測定、眼科検査、糞便潜血検査、聴覚検査、血液学的検査、血液化学的検査、尿検査、器官重量測定及び剖検において薬物投与に関連した変化は認められなかった。4 週間の休薬後には腸間膜リンパ節周囲の白色脂肪組織の変化は認められなかった。

以上の結果より、本試験における無毒性量は 3 mg/kg/day と推定された。3 mg/kg/day における投与 13 週のミラベグロンの曝露量 (AUC_{24h}) は、雄が 309.59 ng·h/mL、雌が 368.74 ng·h/mL であり、それぞれ臨床推奨用量における曝露量の 0.9 倍及び 0.7 倍であった。最小毒性量である 10 mg/kg/day における投与 13 週のミラベグロンの曝露量 (AUC_{24h}) は、雄が 1592.72 ng·h/mL、雌が 1501.80 ng·h/mL であり、それぞれ臨床推奨用量における曝露量の 4.7 倍及び 2.9 倍であった。

2.6.6.3.10 カニクイザル 52 週間反復経口投与毒性試験……………添付資料 4.2.3.2-11

ミラベグロンを 0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、3、10 及び 30 mg/kg/day の投与量で、1 群雌雄各 4 匹のカニクイザル (3-4 歳齢) に 1 日 1 回 52 週間反復経口投与した。対照群には 0.5%メチルセルロース水溶液を同様の方法で投与した。

一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定、心電図検査、眼科検査、聴覚検査、糞便潜血検査、血液学的検査、血液化学的検査、尿検査、器官重量測定、剖検及び病理組織学的検査を実施した。投与 1 日、13 週、27 週及び 52 週に採血し、血漿中薬物濃度を測定した。

30 mg/kg 群の雌雄各 2 例で投与初期の投与後 1 時間の観察で眼瞼下垂が認められた。さらに、雄 1 例で投与初日の投与後 1 時間に自発運動の低下、よろめき歩行及び口粘膜蒼白化が認められた。

心電図検査において 30 mg/kg 群で投与開始日、投与 12、25、39 及び 51 週の投与後 2 時間に、雄雌全例の PR 間隔の延長あるいは延長傾向が認められた。さらに雄雌の 2～3 例で散発的な QRS 及び QTc 間隔の延長あるいは延長傾向が認められた。

病理組織学的検査において 3 mg/kg 群の雌雄及び 30 mg/kg 群の雄で心臓周囲あるいは腸間膜リンパ節周囲の白色脂肪組織に多房性細胞質を有する小型脂肪細胞が認められた。

体重及び摂餌量測定、眼科検査、糞便潜血検査、聴覚検査、血液学的検査、血液化学的検査、尿検査、器官重量測定及び剖検において薬物投与に関連した変化は認められなかった。

以上の結果より、本試験における無毒性量は 10 mg/kg/day と推定された。10 mg/kg/day における投与 52 週のミラベグロンの曝露量 (AUC_{24h}) は、雄が 1267.35 ng·h/mL、雌が 1091.94 ng·h/mL であり、それぞれ臨床推奨用量における曝露量の 3.7 倍及び 2.1 倍であった。最小毒性量である 30 mg/kg/day における投与 52 週のミラベグロンの曝露量 (AUC_{24h}) は、雄が 4300.62 ng·h/mL、雌が 4031.14 ng·h/mL であり、臨床推奨用量における曝露量の 12.6 倍及び 7.9 倍であった。

2.6.6.3.11 カニクイザル単回静脈内投与毒性試験（投与量設定試験）

..... 添付資料 4.2.3.2-12（参）

ミラベグロンを 20 mmol/L 塩酸を含む生理食塩液に溶解し、0.1、0.3、1、3 及び 10 mg/kg の投与量で、1 群雌雄各 1 匹のカニクイザル（9 歳齢）に用量漸増法（雌雄各 2 匹を使用）にて単回静脈内投与した。雌雄各 1 匹には 0.3、3 及び 0.1 mg/kg、別の雌雄各 1 匹には 1 及び 10 mg/kg の順に投与した。

一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定、心電図検査、血液学的検査、血液化学的検査、剖検（最終投与の 3 あるいは 14 日後）及び病理組織学的検査を実施した。単回投与後に採血し、血漿中薬物濃度を測定した。

10 mg/kg を投与した雄で投与後約 2 分から流涎、口粘膜の蒼白化及び自発運動の低下が認められた。さらに投与後約 5 分から呼吸困難、瞳孔反射の消失及び散瞳が認められ、投与後 15 分に死亡した。雄が死亡したため雌への 10 mg/kg の投与は中止した。

心電図検査において 0.3 mg/kg 以上を投与した雄で投与後 0.1 時間から PR 間隔の延長が認められ、3 mg/kg を投与した雌で投与後 0.1 時間に PR 及び QRS 間隔の延長が認められた。10 mg/kg を投与した雄で投与後 0.1 時間に心室頻拍が認められた。

剖検において死亡した雄 1 例及びすべての投与が終了した後に剖検した雌 1 例で心臓の乳頭筋に赤色点が認められた。

病理組織学的検査において雌 1 例で心臓のマクロファージ浸潤を伴う乳頭筋の巣状壊死が認められた。

体重及び摂餌量測定、血液学的検査、血液化学的検査において 3 mg/kg 以下の群で薬物投与に関連した変化は認められなかった。

以上の結果より、カニクイザル 2 週間反復静脈内投与試験における最高投与量として雌雄ともに 3 mg/kg/day を設定した。

2.6.6.3.12 カニクイザル 2 週間反復静脈内投与毒性試験……………添付資料 4.2.3.2-13

ミラベグロンを 8.4%のショ糖を含む 20 mmol/L クエン酸緩衝液に溶解し、0.3, 1 及び 3 mg/kg/day の投与量で 1 群雌雄各 3 匹のカニクイザル (3-4 歳齢) に 1 日 1 回 2 週間反復静脈内投与した。対照群には 8.4%のショ糖を含む 20 mmol/L クエン酸緩衝液を同様の方法で投与した。

一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定、心電図検査、眼科検査、血液学的検査、血液化学的検査、尿検査、剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。投与 1 日及び 14 日に採血し、血漿中薬物濃度を測定した。

3 mg/kg 群の雄 1 例で投与 3 日の投与後 1 時間に昏睡が認められた。

心電図検査において 1 mg/kg 群の雄 1 例で投与後 0.1 時間に心室頻拍が認められた。また、別の雄 1 例で投与後 0.1 時間に PR 間隔の軽度な延長が認められた。3 mg/kg 群の雌雄各 2 例で投与後 0.1 あるいは 1 時間に心室頻拍が認められ、雌雄各 1 例で投与後 0.1 時間に PR 間隔の軽度な延長、雌雄各 1 例で投与後 0.1 あるいは 1 時間に QRS 間隔の軽度な延長が認められた。

血液化学的検査において 3 mg/kg 群の雌で尿素窒素の軽度な増加が認められた。

体重及び摂餌量測定、眼科検査、血液学的検査、尿検査、剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査において薬物投与に関連した変化は認められなかった。

以上の結果より、本試験における無毒性量は雌雄ともに 0.3 mg/kg/day と推定された。

0.3 mg/kg/day における投与 2 週のミラベグロンの $C_{0.1h}$ は、雄が 67 ng/mL、雌が 78 ng/mL であり、曝露量 (AUC_{24h}) は、雄が 92 ng·h/mL、雌が 90 ng·h/mL であった。また、最小毒性量である 1 mg/kg/day における投与 2 週のミラベグロンの $C_{0.1h}$ は、雄が 264 ng/mL、雌が 210 ng/mL であり、曝露量 (AUC_{24h}) は、雄が 520 ng·h/mL、雌が 292 ng·h/mL であった。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

2.6.6.4.1 細菌を用いる復帰突然変異試験……………添付資料 4.2.3.3.1-1

ミラベグロンの in vitro における遺伝子突然変異誘発性を検討するために、ネズミチフス菌の TA98, TA100, TA1535, TA1537 株及び大腸菌の WP2uvrA 株を用いた復帰突然変異試験を実施した。ミラベグロンをジメチルスルホキシドに溶解し、1.6~5000 µg/plate の濃度範囲で 6~7 用量を設定し、代謝活性化系 (ラット肝 S9) の存在下及び非存在下にプレインキュベーション法により試験を実施した。1 用量あたり 3 枚 (対照群は 5 枚) のプレートを用いて独立した試験を 2 回実施した。

代謝活性化系の非存在下に 625 µg/plate 以上の用量で、代謝活性化系の存在下に 2500 µg/plate 以上の用量で菌に対する生育阻害が認められた。いずれの菌株においても代謝活性化系の有無にかかわらず、溶媒対照と比較して復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果より、ミラベグロンは本試験条件下においてネズミチフス菌及び大腸菌に対して遺伝子突然変異誘発性を示さないと判断された。

2.6.6.4.2 ヒト末梢血リンパ球を用いる染色体異常試験……………添付資料 4.2.3.3.1-2

ミラベグロンの *in vitro* における染色体異常誘発性を検討するために、代謝活性化系（ラット肝 S9）の存在下及び非存在下に、試験ごとに 3 名の女性ボランティアから採取したヒト末梢血リンパ球を用いて染色体異常試験を実施した。なお、血液は試験ごとに異なる 3 名から等量採取しプールしたものを用いた。ミラベグロンをジメチルスルホキシドに溶解し、最高濃度は 10 mmol/L

（3965 µg/mL）とした。1 回目の試験では代謝活性化系の非存在下及び存在下に 3 時間処理（回復 17 時間）を実施した。2 回目の試験では代謝活性化系の非存在下に 20 時間処理、代謝活性化系の存在下に 3 時間処理（回復 17 時間）を実施した。分裂指数を指標とする細胞毒性に基づき、適切な 3 用量を選択し染色体を観察した。

1 回目の試験で代謝活性化系の非存在下に 3 時間処理した場合に、1255 µg/mL（細胞生存率：33%）の濃度で統計学的に有意な染色体の構造異常を持つ細胞数の増加が認められた。2 回目の試験で代謝活性化系の非存在下に 20 時間処理した場合には、214.7 µg/mL（細胞生存率：42%）の濃度まで染色体の構造異常を持つ細胞数の増加は認められなかった。なお、代謝活性化系の非存在下に 3 時間処理した場合に 1255 µg/mL（細胞生存率：33%）の濃度で、統計学的に有意な染色体の数的異常を持つ細胞数の増加が認められたが、正常範囲内の変動と判断された。

代謝活性化系の存在下に 3 時間処理した場合に、1 回目の試験では 1255 µg/mL（細胞生存率：42%）まで染色体異常を持つ細胞数の増加は認められなかった。2 回目の試験では 1280 µg/mL（細胞生存率：35%）の濃度で、統計学的に有意な染色体の構造異常を持つ細胞数の増加が認められた。

以上の結果より、本試験条件下において認められた染色体異常を持つ細胞数の統計学的に有意な増加は、いずれも細胞生存率が 40%に満たない強い細胞毒性を示す濃度においてのみ認められた変化であることから、ミラベグロンはヒトリンパ球に対して生物学的に意義のある染色体異常誘発性を示さないと判断された。

2.6.6.4.3 ラットを用いる小核試験……………添付資料 4.2.3.3.2-1

ミラベグロンの *in vivo* における染色体異常誘発性を検討するために、ラットを用いた小核試験を実施した。ミラベグロンを 0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、1 群 8 匹の F344 雄ラット（7 週齢）に 24 時間間隔で 2 回強制経口投与した。陰性対照群（16 匹）には 0.5%メチルセルロース水溶液を同様の方法で投与し、陽性対照群（8 匹）にはシクロホスファミドを 80 mg/kg の投与量

で単回経口投与した。最終投与後 24 時間に動物を屠殺し、骨髓塗抹標本作製した。アクリジンオレンジ染色後、蛍光顕微鏡下に観察し、小核を有する多染性赤血球の出現頻度及び全赤血球に対する多染性赤血球の割合を求めた。

まず、125, 250 及び 500 mg/kg の投与量で試験を実施したが、500 mg/kg 群において 5 例の動物の死亡が認められ、評価に必要な動物数が確保できなかったため試験を中止した。次に 100, 200, 300 及び 400 mg/kg の投与量で試験を実施したところ、いずれの群においても死亡は認められなかったため、100, 200 及び 400 mg/kg 群の 3 群について小核の観察を行った。その結果、ミラベグロンを投与したいずれの群においても陰性対照群と比較して小核を有する多染性赤血球の出現頻度の増加は認められず、全赤血球に対する多染性赤血球の割合にも変化は認められなかった。

以上の結果より、ミラベグロンはラット骨髓に対して小核誘発作用を示さないと判断された。

2.6.6.5 がん原性試験

2.6.6.5.1 マウス 2 週間反復投与毒性試験（投与量設定試験）

..... 添付資料 4.2.3.4.1-1（参）

マウスがん原性試験の投与量設定試験であるマウス 13 週間反復経口投与毒性試験の投与量設定のために、マウス 2 週間反復経口投与毒性試験を実施した。ミラベグロンを 0.5%メチルセルローズ水溶液に懸濁し、1 群雌雄各 10 匹の B6C3F₁ マウス（6 週齢）に 30, 100 及び 300 mg/kg/day の投与量で 1 日 1 回 2 週間反復経口投与した。対照群には 0.5%メチルセルローズ水溶液を同様の方法で投与した。

一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定を行い、投与終了後に剖検した。別に 1 群雌雄各 25 匹の動物を用いて投与 1 日及び 2 週における血漿中薬物濃度を測定した。

100 mg/kg 群の雌雄で初回投与後約 30 分に自発運動の低下が認められた。300 mg/kg 群の雄 4 例及び雌 2 例で自発運動の低下、間代性痙攣、腹臥及び横臥が認められ、初回投与後約 30 分から 1 時間に死亡した。300 mg/kg 群の生存動物では、雌雄で初回投与後約 30 分にほぼ全例で自発運動の低下がみられ、雌で腹臥、横臥及び間代性痙攣が認められた。これらの症状は投与後約 2 時間には消失した。投与 2 日の投与後約 30 分にも雌雄で自発運動の低下が認められたが、投与 3 日以降はいずれの動物にも異常は認められなかった。

ミラベグロンを投与した全群で体重及び摂餌量の増加が認められた。

剖検において薬物投与に関連した変化は認められなかった。

以上の結果より、がん原性試験の投与量設定試験であるマウス 13 週間経口投与毒性試験の最高投与量として 200 mg/kg/day を設定した。

2.6.6.5.2 マウス 13 週間反復経口投与毒性試験（投与量設定試験）

.....添付資料 4.2.3.4.1-2（参），4.2.3.4.1-3（参）

がん原性試験の投与量設定の目的で，ミラベグロンを 0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し，1 群雌雄各 12 匹の B6C3F₁ マウス（6 週齢）に 50，100 及び 200 mg/kg/day の投与量で 1 日 1 回 13 週間反復経口投与した。対照群には 0.5%メチルセルロース水溶液を同様の方法で投与した。

一般状態の観察，体重及び摂餌量の測定を行い，投与終了後に剖検した。別に 1 群雌雄各 35 匹の動物を用いて投与 1 日及び 13 週における血漿中薬物濃度を測定した。

50 mg/kg 以上の群の雌雄で投与 9 週以降に腹臥が認められた。腹臥の持続時間は高投与量群で長く，また発現頻度も高かった。200 mg/kg 群の雌 1 例が投与 43 日の投与後 2 時間に死亡した。この動物では初回投与の投与後約 30 分後に自発運動の低下がみられたが，その後明らかな異常は認められなかった。また，サテライト群において 200 mg/kg を投与した雄 2 例が初回投与の投与後約 1 時間に死亡した。200 mg/kg 投与群の生存動物では，雌雄全例で初回投与の投与後約 30 分に自発運動の低下がみられたが，投与後約 2 時間には消失し，その後異常はみられなかった。すべての群で体重及び摂餌量の増加が認められた。

剖検において 50 mg/kg 以上の群の雄 1～2 例，雌 2～4 例で腺胃の暗赤色巣が認められた。途中死亡動物では異常は認められなかった。

後日追加実施した病理組織学的検査（添付資料 4.2.3.4.1-3（参））において，50 mg/kg 以上の群の雌雄でハダー腺の色素沈着の増加，腎臓の褐色脂肪細胞の脂肪滴の小型化，肝細胞のグリコーゲンの増加，皮下（鼠蹊部）の白色脂肪細胞の小型化及び脂肪滴の微細小胞化，雄で腎臓の皮質尿細管上皮細胞の空胞減少，雌で副腎の X 帯の退行，顎下腺及び耳下腺の腺房細胞の萎縮，胸腺の萎縮が認められた。100 mg/kg 以上の群の雄で脾臓の髄外造血の亢進，胸腺の萎縮が認められた。200 mg/kg 群の雌雄で肝細胞の小葉中心性肥大，雌で耳下腺の腺房細胞の単細胞壊死が認められた。

以上の結果より，ミラベグロンのマウスがん原性試験の最高投与量として 100 mg/kg/day を設定した。

2.6.6.5.3 マウス 104 週間経口投与がん原性試験..... 添付資料 4.2.3.4.1-4

ミラベグロンを 0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し，1 群雌雄 70 匹の B6C3F₁ マウス（5-6 週齢）に 25，50 及び 100 mg/kg/day の投与量で 1 日 1 回 104 週間反復経口投与した。対照群には 0.5%メチルセルロース水溶液を同様の方法で投与した。

一般状態の観察，体重及び摂餌量の測定を実施した。途中死亡動物はその都度，生存動物については 104 週間投与終了後に剖検し，全例について病理組織学的検査を実施した。別に 1 群雌雄各 20 匹の動物を用いて投与 52 週における血漿中薬物濃度を測定した。

ミラベグロンを投与したいずれの群においても動物の生存率への影響及び一般状態の変化は認められなかった。

ミラベグロンを投与したすべての群の雌雄で投与約3カ月まで対照群と比較して体重の高値が散見されたが、その後は体重増加抑制が認められた。25, 50 及び 100 mg/kg 群の 104 週間投与終了時の体重は、対照群と比較して雄が 96%, 91% 及び 90%, 雌が 88%, 84% 及び 82% であった。一方、ミラベグロンを投与したすべての群の雌雄で投与期間を通して摂餌量の増加が認められ、25, 50 及び 100 mg/kg 群の投与 104 週における摂餌量は、対照群と比較して雄が 110%, 112% 及び 118%, 雌が 111%, 113% 及び 116% であった。

病理組織学的検査において薬物投与に関連した腫瘍の発生頻度の増加は認められなかった。認められた腫瘍性変化は B6C3F₁ マウスにおいて通常観察される変化であった。また、薬物投与に関連した非腫瘍性変化の増加も認められなかった。

以上の結果より、ミラベグロンはマウスに対してがん原性を示さないと判断された。最高投与量である 100 mg/kg/day における投与 52 週のミラベグロンの曝露量 (AUC_{24h}) は、雄が 12905 ng·h/mL, 雌が 10713 ng·h/mL であり、それぞれ臨床推奨用量における曝露量の 37.8 倍及び 20.9 倍であった。

2.6.6.5.4 ラット 104 週間経口投与がん原性試験 添付資料 4.2.3.4.1-5

ミラベグロンを 0.5% メチルセルロース水溶液に懸濁し、1 群雌雄 60 匹の F344 ラット (5-6 週齢) に、雄は 12.5, 25 及び 50 mg/kg/day, 雌は 25, 50 及び 100 mg/kg/day の投与量で 1 日 1 回 104 週間反復経口投与した。対照群には 0.5% メチルセルロース水溶液を同様の方法で投与した。

一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定を実施した。途中死亡動物はその都度、生存動物については 104 週間投与終了後に剖検し、全例について病理組織学的検査を実施した。別に 1 群雌雄各 12 匹の動物を用いて投与 52 週における血漿中薬物濃度を測定した。

100 mg/kg 群の雌で死亡の増加が認められ、104 週間投与終了時の生存動物数は 24 匹であり、生存率は 40% であった。

12.5 mg/kg 以上の群の雄で口周囲に透明あるいは赤色分泌物が認められ、50 mg/kg 以上の群の雌で口周囲に透明分泌物が認められた。100 mg/kg 群の雌で口のびらん/痂皮の増加が認められた。

ミラベグロンを投与したすべての群の雄で用量依存的な体重増加抑制が認められ、12.5, 25 及び 50 mg/kg 群の雄の 104 週間投与終了時の体重は、対照群と比較して 98%, 95% 及び 88% であった。25, 50 及び 100 mg/kg 群の雌の投与 104 週間投与終了時の体重は、対照群と比較して 100%, 98% 及び 96% であった。一方、ミラベグロンを投与したすべての群の雌雄で投与期間を通して摂餌量の増加が認められた。12.5, 25 及び 50 mg/kg 群の雄の投与 104 週における摂餌量は、対照群と比較して 117%, 119% 及び 121% であり、25, 50 及び 100 mg/kg 群の雌の投与 104 週における摂餌量は、対照群と比較して 121%, 114% 及び 120% であった。

病理組織学的検査において薬物投与に関連した腫瘍の発生頻度の増加は認められなかった。認められた腫瘍性変化は F344 ラットにおいて通常観察される変化であった。また、薬物投与に関連した非腫瘍性変化の増加も認められなかった。

以上の結果より、ミラベグロンはラットに対してがん原性を示さないと判断された。最高投与量における投与 52 週のミラベグロンの曝露量(AUC_{24h})は、雄が 12990 ng·h/mL、雌が 23043 ng·h/mL であり、それぞれ臨床推奨用量における曝露量の 38.1 倍及び 45.0 倍であった。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

2.6.6.6.1 雄ラット授胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

添付資料 4.2.3.5.1-1

ミラベグロンを 0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、30, 100 及び 300 mg/kg/day の投与量で 1 群 20 匹の Sprague-Dawley 系雄ラット (10-11 週齢) に、交配前 2 週間及び交配期間を通して剖検前日まで 1 日 1 回強制経口投与した。対照群には 0.5%メチルセルロース水溶液を同様の方法で投与した。

一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定を実施し、2 週間投与後無処置の雌と交配させ、雌は妊娠 14 日に帝王切開し、黄体数、着床数、生存胚数及び死亡胚数を記録した。雄は雌の帝王切開終了後に剖検した。別に 1 群雄 8 匹の動物を用いて投与 1 日及び 15 日における血漿中薬物濃度を測定した。

300 mg/kg 群で振戦及び自発運動の低下が認められ、交配前 2 週間の投与期間中に 14 例の動物が死亡した。死亡例では肺の暗赤色化、暗赤色斑あるいは暗赤色点、腺胃部の暗赤色点が認められた。

ミラベグロンを投与したすべての群で体重増加抑制及び摂餌量の減少が認められたが、30 及び 100 mg/kg 群では投与 8 日以降に摂餌量の増加が認められた。

30 及び 100 mg/kg 群で雄の交尾率、交尾までに要した日数及び授胎率、妊娠動物の黄体数、着床数、着床前死亡率、着床後死亡率及び生存胚数に薬物投与に関連した影響は認められなかった。なお、14 例の動物が死亡した 300 mg/kg 群における結果は評価対象としなかった。

以上の結果より、雄動物における一般毒性学的な無毒性量は 30 mg/kg/day 未満、雄動物の授胎能及び初期胚発生に対する無毒性量は 100 mg/kg/day と推定された。100 mg/kg/day における投与 15 日のミラベグロンの曝露量 (AUC_{24h}) は 31800 ng·h/mL であり、臨床推奨用量における曝露量の 93.3 倍であった。

2.6.6.6.2 雌ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

添付資料 4.2.3.5.1-2

ミラベグロンを 0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、30, 100 及び 300 mg/kg/day の投与量で各群 20 匹の Sprague-Dawley 系雌ラット (9 週齢) に、交配前 14 日から交配期間及び妊娠 7 日まで 1 日 1 回強制経口投与した。対照群には 0.5%メチルセルロース水溶液を同様の方法で投与した。

一般状態及び性周期の観察、体重及び摂餌量の測定を実施し、妊娠 13 日に帝王切開し、黄体数、着床数、生存胎児数及び死亡胎児数を記録した。

300 mg/kg 群で自発運動の低下、被毛の汚れ、流涙及び振戦が認められ、2 例が死亡（投与 2 及び 19 日）し、1 例が瀕死屠殺（投与 10 日）された。100 mg/kg 群で摂餌量の増加が認められたが、300 mg/kg 群では体重及び摂餌量の減少が認められた。

300 mg/kg 群で発情休止期の延長、黄体数、着床数及び生存胎児数の減少が認められた。いずれの群においても、交尾までに要した日数、交尾率、受胎率、着床前死亡率及び着床後死亡率に薬物投与に関連した影響は認められなかった。

以上の結果より、雌動物に対する一般毒性学的な無毒性量は 100 mg/kg/day、生殖機能に対する無毒性量は 100 mg/kg/day、初期胚発生に対する無毒性量は 300 mg/kg/day と推定された。

2.6.6.6.3 ラット胚・胎児発生に関する試験（投与量設定試験）……………

……………添付資料 4.2.3.5.2-1（参）

ミラベグロンを 0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、30、100 及び 300 mg/kg/day の投与量で 1 群 10 匹の Sprague-Dawley 系雌ラット（交配時 11-12 週齢）に妊娠 7 日から 17 日まで強制経口投与した。対照群には 0.5%メチルセルロース水溶液を同様の方法で投与した。

母動物の一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定を実施し、妊娠 20 日に帝王切開し、胎児の外表、内臓及び骨格を観察した。

母動物において 300 mg/kg 群で振戦、自発運動の低下及び膺からの出血が 3 例で認められ、これらの動物のうちの 2 例が死亡した。100 mg/kg 群で一過性の摂餌量低下が認められ、300 mg/kg 群で体重減少あるいは増加抑制、摂餌量の低下が認められた。30 及び 100 mg/kg 群で胎盤重量の増加が認められたが、剖検及び胎盤の肉眼的観察において薬物投与に関連した影響は認められなかった。

胎児において 100 mg/kg 以上の群で波状肋骨の増加、胸骨分節及び仙尾椎骨の骨化数の減少が認められた。300 mg/kg で胎児体重の低下、肩甲骨、前腕骨、上腕骨の屈曲及び中足骨の骨化数の減少が認められた。生存胎児数、死亡胎児数、着床後死亡率、性比、外表及び内臓の形態に薬物投与に関連した影響は認められなかった。

以上の結果より、ラットにおける胚・胎児発生に関する試験の最高投与量として 300 mg/kg/day を設定した。

2.6.6.6.4 ラット胚・胎児発生に関する試験……………添付資料 4.2.3.5.2-2

ミラベグロンを 0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、10、30、100 及び 300 mg/kg/day の投与量で 1 群 17～20 匹の Sprague-Dawley 系雌ラット（交配時 11-12 週齢）に妊娠 7 日から 17 日まで強制経口投与した。対照群には 0.5%メチルセルロース水溶液を同様の方法で投与した。

母動物の一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定を実施し、妊娠 20 日に帝王切開し、胎児の外表、内臓及び骨格を観察した。対照群及び 100 mg/kg 群には出生児観察群（1 群 20 匹）を設定し、

生後4日における出生児の骨格を観察した。別に1群雌8匹の動物を用いて妊娠7日及び17日に血漿中薬物濃度を測定した。

母動物において300 mg/kg 群で3例の動物が振戦、自発運動の低下及び呼吸数の減少、尿道口周囲の被毛の汚れあるいは膣からの出血を呈して死亡し、剖検において肺の暗赤色化が認められた。300 mg/kg 群の生存動物では振戦、膣からの出血及び尿道口周囲の被毛の汚れが各1例で認められた。300 mg/kg 群で体重増加抑制が認められた。100 mg/kg 群で妊娠8日に、300 mg/kg 群で妊娠8~12日に摂餌量の低下が認められたが、30及び100 mg/kg 群では妊娠14日以降に摂餌量の高値が認められた。30及び100 mg/kg 群で胎盤重量の増加が認められたが、胎盤の肉眼的観察において薬物投与に関連した影響は認められなかった。

胎児において100 mg/kg 以上の群で波状肋骨の増加及び左右中足骨骨化数の低値が認められた。300 mg/kg 群で胎児体重の低値、肩甲骨、前腕骨、上腕骨及び下腿骨の屈曲、胸骨分節及び仙尾椎骨の骨化数の低値が認められた。着床後死亡率、生存胎児数、死亡胎児数、胎児の性比、外表及び内臓の形態に薬物投与に関連した影響は認められなかった。

出生児観察群(100 mg/kg/day)の母動物において体重増加抑制が認められた。妊娠8日に摂餌量の減少が認められたが、妊娠7日及び20日には高値が認められた。妊娠期間及び出生児数に影響は認められず、母動物の剖検において異常は認められなかった。出生児において雌の体重の高値が認められたが、剖検において異常は認められなかった。生後4日の骨格検査において胸骨分節の癒合及び波状肋骨の増加が認められた。

以上の結果より、母動物及び胚・胎児発生に対する無毒性量はいずれも30 mg/kg/day と推定された。30 mg/kg/day における妊娠17日のミラベグロンの曝露量(AUC_{24h})は、3166 ng·h/mLであり、臨床推奨用量における曝露量の6.2倍であった。

2.6.6.6.5 ラット胚・胎児発生に関する試験（波状肋骨の回復性に関する試験）……

……………添付資料4.2.3.5.2-3

ラット胚・胎児発生に関する試験において波状肋骨を主とする骨格の変化が認められたため、波状肋骨の生後の回復性について検討した。

ミラベグロンを0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、100 mg/kg/dayの投与量で1群39匹のSprague-Dawley系雌ラット(11-12週齢)に妊娠7日から17日まで強制経口投与した。対照群には0.5%メチルセルロース水溶液を同様の方法で投与した。

母動物の一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定を実施し、19匹を妊娠20日に帝王切開し、妊娠末期胎児の観察を実施した。20匹を分娩させ、出生児の授乳期間中及び離乳後の観察を実施し、生後4日及び生後63日に骨格検査を実施した。

母動物において体重増加抑制が認められた。妊娠8日に摂餌量の低値が認められたが、妊娠16日及び20日には高値が認められた。胎盤重量の増加が認められたが、胎盤の肉眼的観察、帝王切開、分娩及び剖検において薬物投与に関連した変化は認められなかった。

妊娠末期胎児において波状肋骨の増加及び胸骨分節及び左右中手骨の骨化数の低値が認められた。出生児において生後 4 日及び 63 日の骨格検査で波状肋骨は認められなかった。

以上の結果より、ミラベグロンをラットの器官形成期に投与した際に認められた波状肋骨は生後の発育に伴い回復するものと考えられた。

2.6.6.6.6 ウサギ胚・胎児発生に関する試験（投与量設定試験）……………

……………添付資料 4.2.3.5.2-4（参）

ミラベグロンを 0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、10, 30, 100, 250, 500 及び 1000 mg/kg の投与量で 1 群 3 匹の New Zealand White 非妊娠雌ウサギ（19-21 週齢）に単回強制経口投与したところ、100 mg/kg 群で 1 例、250 mg/kg 以上の群で全例が死亡した。続いてミラベグロンを 0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、10, 30 及び 60 mg/kg/day の投与量で 1 群 3 匹の New Zealand White 非妊娠雌ウサギ（22-23 週齢）に 5 日間強制経口投与したところ、30 mg/kg 以上の群で摂餌量の低下が認められ、60 mg/kg 群で呼吸数の増加及び振戦が認められた。これらの結果より、ウサギにおける胚・胎児発生に関する試験の投与量設定試験の投与量として 3, 10 及び 30 mg/kg/day を設定した。

ミラベグロンを 0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、3, 10 及び 30 mg/kg/day の投与量で 1 群 4～6 匹の New Zealand White ウサギ（22-23 週齢）に妊娠 6 日から 20 日まで強制経口投与した。対照群には 0.5%メチルセルロース水溶液を同様の方法で投与した。

母動物の一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定を実施し、妊娠 29 日に帝王切開し、胎児の外表、内臓及び骨格を観察した。

母動物において 30 mg/kg 群で呼吸数の増加及び振戦が認められた。10 mg/kg 以上の群で体重及び摂餌量の減少が認められた。剖検、胎盤の形態及び重量に薬物投与に関連した変化は認められなかった。

胎児において 10 mg/kg 以上の群で胎児体重の低値が認められた。着床後死亡率、生存胎児数、死亡胎児数、胎児の性比、外表、内臓及び骨格の形態に薬物投与に関連した変化は認められなかった。

以上の結果より、ウサギ胚・胎児発生に関する試験の最高投与量として 30 mg/kg/day を設定した。

2.6.6.6.7 ウサギ胚・胎児発生に関する試験……………添付資料 4.2.3.5.2-5

ミラベグロンを 0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、3, 10 及び 30 mg/kg/day の投与量で 1 群 17～22 匹の New Zealand White ウサギ（18-21 週齢）に妊娠 6 日から 20 日まで強制経口投与した。対照群には 0.5%メチルセルロース水溶液を同様の方法で投与した。

母動物の一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定を実施し、妊娠 29 日に帝王切開し、胎児の外表面、内臓及び骨格を観察した。別に 1 群雌 5 匹の動物を用いて妊娠 6 及び 20 日に血漿中薬物濃度を測定した。

母動物において 30 mg/kg 群の 1 例が横臥及び呼吸困難を呈した後死亡し、剖検において肺の左右後葉に赤色斑が認められた。また、トキシコキネティクス群において 1 例が死亡、1 例が流産した。30 mg/kg 群で体重減少あるいは増加抑制が認められ、10 mg/kg 以上の群で摂餌量の減少が認められた。胎盤の形態及び重量に薬物投与に関連した変化は認められなかった。

胎児において 10 mg/kg 以上の群で体重の低値が認められた。30 mg/kg 群で着床後死亡胚数の増加、内臓検査で大動脈拡張、巨心及び肺副葉欠損の増加、骨格検査で胸骨分節癒合の増加、中手骨及び前後肢の中節骨の数の低値が認められた。胎児の性比、外表の形態に薬物投与に関連した変化は認められなかった。

以上の結果より、母動物及び胚・胎児発生に対する無毒性量はいずれも 3 mg/kg/day と推定された。3 mg/kg/day における妊娠 20 日のミラベグロンの曝露量 (AUC_{24h}) は 363.65 ng·h/mL であり、臨床推奨用量における曝露量の 0.7 倍であった。最小毒性量である 10 mg/kg/day における妊娠 20 日のミラベグロンの曝露量 (AUC_{24h}) は 7229.46 ng·h/mL であり、臨床推奨用量における曝露量の 14.1 倍であった。

2.6.6.6.8 ウサギ胚・胎児発生に関する試験で認められた胎児所見に関する基礎的検討試験（心拍数の測定）…………… 添付資料 4.2.3.5.2-7（参）

ウサギにおける胚・胎児発生に関する試験で認められた胎児の大動脈の拡張及び巨心の発現機序を解明する目的で、ミラベグロンをウサギに単回経口投与した際の心拍数を測定した。

ミラベグロンを 0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、3、10 及び 30 mg/kg の投与量で 1 群 2 匹の New Zealand White 雌ウサギ（21-22 週齢）に単回強制経口投与し、心拍数を測定した。

10 mg/kg 以上の群で心拍数の増加が認められた。心拍数の増加は投与後 1 時間から認められ、10 mg/kg 群では投与後 4 時間まで、30 mg/kg 群では投与後 8 時間まで持続し、30 mg/kg 群でより顕著な心拍数の増加が認められた。

以上の結果より、ミラベグロンをウサギに経口投与することにより、10 mg/kg 以上の投与量で用量依存的に心拍数が増加することが示された。

2.6.6.6.9 ウサギ胚・胎児発生に関する試験で認められた胎児所見に関する基礎的検討試験（β₁ アドレナリン受容体遮断薬の影響）…… 添付資料 4.2.3.5.2-6（参）

ウサギにおける胚・胎児発生に関する試験で認められた胎児の大動脈拡張及び巨心の発現機序を解明する目的で、β₁ アドレナリン受容体遮断薬であるメトプロロールの影響について検討した。

ミラベグロン及びメトプロロールを 0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、ミラベグロン（30 mg/kg/day）投与群並びにミラベグロン（30 mg/kg/day）及びメトプロロール（3 mg/kg/day）

投与群を設定し、1群9～10匹のNew Zealand White ウサギ（16週齢）に妊娠6日から20日まで強制経口投与した。対照群（4匹）には0.5%メチルセルロース水溶液を同様の方法で投与した。

母動物の一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定を実施し、妊娠29日に帝王切開し、胎児の外表及び内臓を検査した。また、妊娠15日の投与前及び投与後1, 4, 8, 24時間に心拍数を測定した。

母動物においてミラベグロン投与群では体重増加抑制及び摂餌量の減少が認められ、ミラベグロン及びメトプロロール投与群では摂餌量の減少が認められた。ミラベグロン投与群では投与後4及び8時間に心拍数の増加が認められたが、ミラベグロン及びメトプロロール投与群では投与後4時間までは心拍数の増加は認められず、投与後8時間に心拍数の増加が認められた。

胎児の内臓検査においてミラベグロン投与群では大動脈拡張（74.3%）及び巨心（30.8%）の発現頻度の増加が認められた。一方、ミラベグロン及びメトプロロール投与群では大動脈拡張（27.3%）及び巨心（2.92%）の発現頻度はミラベグロン投与群と比較して顕著に減少した。

以上のようにミラベグロンを投与した母動物における心拍数増加並びに胎児における大動脈拡張及び巨心の発現頻度の増加は、 β_1 アドレナリン受容体遮断薬であるメトプロロールを同時投与することにより抑制されたことから、これらの所見はミラベグロンの β_1 アドレナリン受容体刺激作用に起因している可能性が示唆された。

2.6.6.6.10 ウサギの非妊娠期間及び妊娠期間における血漿中薬物濃度測定試験 ……………

…………… 添付資料 4.2.3.5.2-8（参）

ミラベグロンを0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、3, 10及び30 mg/kg/dayの投与量で1群6匹のNew Zealand White 雌ウサギ（16週齢）に7日間反復経口投与し、投与1日及び7日に採血した。7日間の休薬期間の後、無処置の雄と交配させ、妊娠6日から20日まで反復経口投与し、妊娠6日及び20日に採血した。ミラベグロン、代謝物M5, M11, M12, M13, M14, M15及びM16を血漿中濃度測定対象とした。投与期間及び休薬期間中に動物の一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定を実施した。妊娠21日に剖検し、妊娠の有無を確認した。

一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定、剖検において薬物投与に関連した変化は認められなかった。剖検において全例の妊娠が確認された。

ミラベグロン及び代謝物の平均 C_{max} 及び AUC_{24h} は、用量比以上に増加し、非妊娠期間及び妊娠期間ともに投与初日と比較して反復投与後に高値を示す傾向にあった。また、ミラベグロン及び代謝物の平均 C_{max} 及び AUC_{24h} は、非妊娠期間と比較して妊娠期間の方がわずかに高値を示した。3, 10及び30 mg/kg群における妊娠20日のミラベグロンの C_{max} 及び AUC_{24h} を、非妊娠期間の投与7日の値と比較した場合、 C_{max} はそれぞれ1.8, 1.2及び1.4倍高く、 AUC_{24h} はそれぞれ2.0, 1.5及び1.7倍高かった。なお、代謝物の平均血漿中濃度は、M5及びM16が高く、M12及びM15は低かった。

ミラベグロン及び代謝物の血漿中濃度には大きな個体差が認められた。試験期間を通して、3 mg/kg群の1例、10 mg/kg群の1例、30 mg/kg群の2例で、同一群の他の動物と比較してミラベ

グロン濃度が高く、妊娠 20 日の AUC_{24h} を比較した場合、最大で約 25 倍高かった。これらの動物では、M5 及び M16 濃度が極端に低く、他の代謝物は高めの傾向にあった。これらのことから、ウサギではミラベグロンから M5 及び M16 への代謝能に個体差が存在することが示唆された。

2.6.6.6.11 ラット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……………

……………添付資料 4.2.3.5.3-1

ミラベグロンを 0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、10, 30 及び 100 mg/kg/day の投与量で 1 群 19～20 匹の Sprague-Dawley 系雌ラット（交配開始時 11-12 週齢）に妊娠 7 日から授乳 20 日まで強制経口投与した。対照群には 0.5%メチルセルロース水溶液を同様の方法で投与した。

母動物について一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定、周産期の分娩、妊娠日数、産児数及び授乳期の哺育状況の観察を実施した。授乳 21 日に出生児を離乳し、母動物を剖検した。出生児について生死の観察、体重測定を実施し、身体的発達、感覚機能及び反射、行動、生殖能について検査した。

母動物において 100 mg/kg 群で妊娠 21 及び 22 日に各 1 例が死亡し、妊娠期間及び授乳期間を通して体重増加抑制が認められた。30 mg/kg 以上の群で妊娠期間の初期に摂餌量の減少が認められた。

出生児において 100 mg/kg 群の雌雄で 4 日生存率の低下が認められ、授乳期間中に体重増加抑制が認められた。雄では出生後 70 日まで、雌では出生後 35 日まで体重の低値が認められた。

母動物の一般状態、周産期の分娩、妊娠日数、産児数及び授乳期の哺育状況、出生児の身体的発達、感覚機能及び反射、行動、生殖能について薬物投与に関連した変化は認められなかった。

以上の結果より、母動物における一般毒性学的な無毒性量は 10 mg/kg/day、母動物の生殖能に対する無毒性量は 100 mg/kg/day、出生児に対する無毒性量は 30 mg/kg/day と推定された。

2.6.6.7 局所刺激性試験

2.6.6.7.1 ウサギ皮膚刺激性試験……………添付資料 4.2.3.6-1

ミラベグロンの皮膚刺激性を検討するために、注射用蒸留水を用いてペースト状にした 0.5 g のミラベグロンを 3 匹の日本白色種雄性ウサギ（17 週齢）の除毛した背部皮膚に 4 時間貼付し、除去後 1, 24, 48 及び 72 時間に皮膚を観察した。

いずれの観察時間においても刺激性反応は認められなかった。

以上の結果より、ミラベグロンはウサギの皮膚に対して刺激性を示さないと判断された。

2.6.6.7.2 ウサギ眼粘膜刺激性試験……………添付資料 4.2.3.6-2

ミラベグロンの眼粘膜刺激性を検討するために、100 mg のミラベグロンを 6 匹の日本白色種雄性ウサギ（10 週齢）の右眼結膜嚢内に投与した。3 匹を非洗浄群とし、残りの 3 匹を洗浄群とし

た。洗浄群では投与後 30 秒に結膜嚢内を微温湯を用いて洗浄した。角膜、虹彩及び結膜について投与後 1, 24, 48 及び 72 時間に観察した。

非洗浄群では全例で投与後 1 時間に軽度な結膜発赤及び浮腫が認められたが、投与後 24 あるいは 48 時間までに消失した。洗浄群では 2 例で投与後 1 時間に軽度な結膜発赤が認められたが、投与後 24 時間までに消失した。

以上の結果より、ミラベグロンはウサギの眼粘膜に対して刺激性を有するが、その程度は軽微かつ一過性であり、洗浄することにより刺激性は軽減することが示された。

2.6.6.7.3 ウサギ血管局所刺激性試験……………添付資料 4.2.3.6-3

ミラベグロンを 8.4%のショ糖を含む 20 mmol/L クエン酸緩衝液に溶解し 10 mg/mL の濃度に調製し、1 群雄 3 匹の日本白色種ウサギ（10 週齢）の右耳に、静脈内投与群には 0.05 mL、静脈周囲投与群には 0.2 mL の容量で単回投与した。対照として左耳に生理食塩液を投与した。

一般状態及び注射部位とその周辺の観察を実施し、投与後 96 時間に剖検し、注射部位とその周辺について病理組織学的検査を実施した。

静脈内投与した動物の注射部位とその下流に限局性浮腫が認められ、投与後 8 時間までに消失した。病理組織学的変化は認められなかった。

静脈周囲投与した動物の投与部位周囲に浮腫及び紅斑が投与後 24 時間まで認められ、投与後 48～96 時間には紫斑が認められた。病理組織学的検査において、皮下組織に炎症性反応（浮腫、炎症細胞浸潤、出血及び肉芽組織）が認められた。

動物の一般状態に薬物投与に関連した変化は認められなかった。

以上の結果より、臨床における静脈内投与製剤と同様の処方で 10 mg/mL の濃度に調製されたミラベグロンは、静脈内投与により回復性のある軽度な刺激性を示し、静脈周囲投与により皮下組織の炎症性反応を伴う刺激性を誘発することが示され、静脈内投与製剤の使用にあたっては正確な投与を行う必要があると考えられた。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 モルモット皮膚感作性試験（Adjuvant and Patch 法）……………

……………添付資料 4.2.3.7.1-1

ミラベグロンの皮膚感作性について Adjuvant and Patch 法により検討した。フロイント完全アジュバントを皮内投与した後、ミラベグロンを 1%あるいは 10%の濃度で流動パラフィンに懸濁した投与液 0.1 mL をパッチテスト用絆創膏に含ませ、1 群雄 10 匹の Hartley 系モルモット（6 週齢）に 24 時間閉塞貼付する感作操作を 3 日間反復して実施した。初回感作後 6 日に感作部位に 10%ラウリル硫酸ナトリウム 0.1 g を開放塗布し、翌日に各投与液 0.2 mL をろ紙に含ませ 48 時間閉塞貼付した。媒体感作群では流動パラフィンを、陽性対照群では 2,4-ジニトロクロロベンゼンを用いて同様の方法で感作した。感作終了後 20 日にミラベグロンを 2%あるいは 10%の濃度で流動パラ

フィンに懸濁した投与液 0.1 mL をろ紙に含ませ 24 時間閉塞貼付し惹起した。惹起後 24 及び 48 時間に皮膚反応を観察した。

媒体感作群において 2%及び 10%のミラベグロンで惹起した部位に紅斑が認められ、ミラベグロンは皮膚一次刺激性を有すると考えられた。

1%ミラベグロン感作群において 2%及び 10%のミラベグロンで惹起した部位に紅斑が認められ、その一部は浮腫を伴っていた。両惹起部位の陽性率は 24 及び 48 時間のいずれも 80%であった。媒体で惹起した部位に皮膚反応は認められなかった。

10%ミラベグロン感作群において 2%及び 10%のミラベグロンで惹起した部位に紅斑が認められ、一部は浮腫を伴っていた。2%ミラベグロン惹起部位の陽性率は 24 及び 48 時間のいずれも 80%であり、10%ミラベグロン惹起部位の陽性率は 24 及び 48 時間のいずれも 90%であった。媒体で惹起した部位に皮膚反応は認められなかった。

陽性対照群において全例（5 匹）で 2,4-ジニトロクロロベンゼンで惹起した部位に紅斑、浮腫が認められ、陽性率は 24 及び 48 時間のいずれも 100%であった。

媒体感作群においてミラベグロンは皮膚一次刺激性を有することが示されたため、皮膚一次刺激性を考慮して陽性率を算出したところ、1%ミラベグロン感作群では 2%及び 10%のいずれの惹起部位でも 24 時間で 10%、48 時間で 60%であり、10%ミラベグロン感作群では 2%及び 10%のいずれの惹起部位でも 24 時間で 20%、48 時間で 50%であった。

以上の結果より、ミラベグロンは 1%及び 10%の感作濃度、2%及び 10%の惹起濃度において、いずれも中等度の皮膚感作性を有すると判断された。

2.6.6.8.2 モルモット皮膚感作性試験（Buehler 法）……………添付資料 4.2.3.7.1-2

Adjuvant and Patch 法により実施した皮膚感作性試験においてミラベグロンが中等度の皮膚感作性を有することが示されたため、ミラベグロンの皮膚感作性についてフロイント完全アジュバントを用いない試験系である Buehler 法により検討した。

ミラベグロンを 1%あるいは 10%の濃度で流動パラフィンに懸濁した投与液 0.1 mL をろ紙に含ませ、1 群雄 10 匹の Hartley 系モルモット（4 週齢）に 24 時間閉塞貼付する感作操作を 1 週間に隔日で 3 回、3 週連続して合計 9 回反復して実施した。媒体感作群では流動パラフィンを、陽性対照群では 2,4-ジニトロクロロベンゼンを用いて同様の方法で感作した。最終感作終了後 14 日にミラベグロンを 2%あるいは 10%の濃度で流動パラフィンに懸濁した投与液 0.1 mL をろ紙に含ませ 24 時間閉塞貼付し、除去後 24 及び 48 時間に皮膚の観察を行った。

媒体感作群において 2 例の動物の 2%及び 10%のミラベグロンで惹起した部位に 24 時間の観察で紅斑が認められ、ミラベグロンは弱い皮膚一次刺激性を有すると考えられた。

1%ミラベグロン感作群において 2%及び 10%のミラベグロンで惹起した部位に紅斑が認められ、一部は浮腫を伴っていた。両惹起部位の陽性率は 24 及び 48 時間いずれも 40%であった。媒体で惹起した部位に皮膚反応は認められなかった。

10%ミラベグロン感作群において2%及び10%のミラベグロンで惹起した部位に紅斑が認められ、一部は浮腫を伴っていた。両惹起部位の陽性率は24及び48時間のいずれも50%であった。媒体で惹起した部位において皮膚反応は認められなかった。

陽性対照群において全例（5匹）において2,4-ジニトロクロロベンゼンで惹起した部位に紅斑、浮腫が認められ、陽性率は24及び48時間のいずれも100%であった。

以上の結果より、ミラベグロンは1%及び10%の感作濃度、2%及び10%惹起濃度において、いずれも中等度の皮膚感作性を有すると判断された。

2.6.6.8.3 高レベルの不純物を含む原薬を用いたラット2週間反復経口投与毒性試験

.....添付資料4.2.3.7.6-1

ミラベグロン原薬中に含まれる不純物であるYM-181687の毒性について検討する目的で、高レベルのYM-181687を含有する原薬を用いてラット2週間反復経口投与毒性試験を実施した。すなわち、約1%（実測値：1.51%）のYM-181687を含むミラベグロンを0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、3及び10 mg/kg/dayの投与量で1群雌雄各10匹のF344ラット（8週齢）に1日1回2週間反復経口投与した。対照群には0.5%メチルセルロース水溶液を同様の方法で投与した。

一般状態の観察、体重、摂餌量及び摂水量の測定、眼科検査、耳介反射、血液学的検査、血液化学的検査、尿検査、剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。別に1群雌雄各4匹の動物を用いて投与1日及び2週に血漿中薬物濃度を測定した。

10 mg/kg群の雌雄で摂餌量の増加が認められた。雄でフィブリノーゲン及びβグロブリン比の増加、雌でAST及びALTの増加、中性脂肪の減少が認められた。

病理組織学的検査において3 mg/kg以上の群の雌で薬理作用に関連した腸間膜リンパ節周囲の白色脂肪細胞の小型化が認められた。

一般状態、体重及び摂水量測定、眼科検査、耳介反射、尿検査、器官重量及び剖検において薬物投与に関連した変化は認められなかった。

以上の結果より、本試験における無毒性量は3 mg/kg/dayと推定された。

2.6.6.8.4 溶血性試験.....添付資料4.2.3.7.7-1

ミラベグロンの*in vitro*における溶血性について検討した。ミラベグロンを8.4%のショ糖を含む20 mmol/Lクエン酸緩衝液に溶解し、10 mg/mL溶液を調製した。5名の健康成人から採取した血液0.1 mLとミラベグロンの10 mg/mL溶液1 mLを混和し、37℃で30分間インキュベートした。遠心分離後の上清について溶血の有無を肉眼により観察した。同時に溶媒、生理食塩液、注射用蒸留水について同様の操作を実施した。

ミラベグロン溶液及び生理食塩液において溶血性は認められなかった。一方、溶媒では低pH（pH：2.92）によると考えられる軽度な溶血が認められ、注射用蒸留水では明らかな溶血が認められた。

以上の結果より、ミラベグロンはヒト血液に対して溶血性を示さないものと判断された。

2.6.6.8.5 尿蛋白に及ぼす影響に関する試験……………添付資料 4.2.3.7.7-2（参）

ミラベグロンのラット反復経口投与毒性試験の高投与量群で顕著な尿蛋白陽性反応が認められたが、他の腎機能パラメータに影響はなく、腎臓における病理組織学的変化も認められなかったことから、ミラベグロンの尿蛋白測定系に及ぼす影響について検討した。すなわち、ミラベグロンを 10%ジメチルスルホキシド溶液に溶解し、0.01～2 mg/mL の濃度に調製し、以下の試験に供した。

定性試験として指示薬の異なる 2 種類の試験紙（マルティスティックス及び BM テスト）を用いてミラベグロンの反応性を検討した。なお、ミラベグロンのラット反復経口投与毒性試験ではマルティスティックスが使用された。その結果、マルティスティックスでは 0.25 mg/mL 以上で蛋白陽性反応を示したが、BM テストでは検討した最高濃度の 2 mg/mL でのみわずかに蛋白陽性反応を示し、試験紙の種類によってミラベグロンの反応性に違いがあることが示された。

さらに定性試験として煮沸法とスルホサリチル酸法でミラベグロンの反応性を検討したところ、検討した最高濃度である 2 mg/mL まで蛋白陽性反応を示さなかった。

定量試験としてピロガロールレッド・モリブデン錯体発色法について検討したところ、ミラベグロンは 0.25 mg/mL 以上の濃度で濃度依存的に蛋白陽性反応を示した。

以上の結果より、ミラベグロンは複数の尿蛋白測定系に対して影響を及ぼし、蛋白陽性反応を示すことが明らかとなり、ラット反復経口投与毒性試験の高投与量群で認められた尿蛋白陽性反応は、尿中に排泄されたミラベグロンの直接の影響による偽陽性反応である可能性が示唆された。

2.6.6.9 考察及び結論

2.6.6.9.1 中枢神経系への影響

マウス、ラット、イヌ及びカニクイザルにおいて自発運動の低下、腹臥、横臥あるいは眼瞼下垂が認められた。安全性薬理試験においてもラットで自発運動の低下、腹臥、横臥、眼瞼閉鎖、筋緊張の低下、正向反射の消失等の症状が認められており（2.6.2.4.1.1 中枢神経系に及ぼす作用）、これらの症状は本薬の投与による影響と考えられた。いずれの動物種を用いた毒性試験においても中枢神経系（脳及び脊髄）に病理組織学的変化は認められず、認められた症状は休薬により回復性を示した。

ラット 26 週間反復投与毒性試験の中枢神経系に対する無毒性量（3 mg/kg/day）における曝露量は臨床推奨用量における曝露量を下回っていた（表 2.6.6-3）。ラット及びカニクイザルを用いた分布試験（概要表 2.6.5.8 単回経口投与後の組織分布）において本薬の中枢移行性は低いことが示されており、骨格筋への直接作用によりこれらの症状が発現した可能性も考えられた。

2.6.6.9.2 心血管系への影響

イヌにおいて低投与量から顕著な心拍数の増加及び皮膚の発赤/潮紅が認められた。心拍数の増加はイヌのほか、ラット、カニクイザル及びウサギを用いた安全性薬理試験でも認められており（2.6.2.6 考察及び結論）、本薬の β アドレナリン受容体刺激作用に基づく変化と考えられた。皮膚の発赤は末梢血管拡張を示唆する変化であり、これも本薬の β アドレナリン受容体刺激作用に基づく変化と考えられた。イヌは β アドレナリン受容体刺激作用に対して高感受性であることが知られており[1,2,3]、臨床推奨用量における曝露量を下回る曝露量においてこれらの所見が認められた。

イヌ及びカニクイザルの心電図検査において PR あるいは QRS 間隔の一過性の延長が認められた。同様の変化はカニクイザルを用いた安全性薬理試験でも認められており（2.6.2.4.1.2.6 無麻酔カニクイザルの心血管系及び呼吸系に及ぼす作用）、本薬の投与に関連した変化と考えられた。本薬は *in vitro* においてナトリウム電流の抑制作用を示したことから（2.6.2.4.2.1.1 心筋イオンチャネルに対する作用）、PR あるいは QRS 間隔の延長は本薬のナトリウム電流抑制作用に起因している可能性が示唆された。また、カニクイザル 52 週間反復投与毒性試験において初回投与時を含む散発的な QTc 間隔の延長が認められたが、投与期間中に複数回実施した心電図測定において明らかな再現性は認められなかった。本薬の心血管系への影響は安全性薬理試験において詳細に検討されており（2.6.2.4 安全性薬理試験）、本薬が QTc 間隔の延長を引き起こす可能性は低いと考えられることから、カニクイザルにおける散発的な QTc 間隔の延長は心拍数あるいは QRS 間隔の変動に伴う二次的変化である可能性が考えられた。

イヌ及びカニクイザルの心電図検査において心室頻拍が認められた。同様の所見はイヌを用いた安全性薬理試験でも認められた（2.6.2.4.3.2.1 心血管系及び呼吸系に対するミラベグロンの作用）。代表的な非選択的 β アドレナリン受容体作動薬であるイソプロテレノールあるいは β_1 アドレナリン受容体作動薬であるドブタミンでは過量投与により、容易に心室頻拍を誘発することが知られており[4]、本薬の投与により高投与量群で認められた心室頻拍は過度な β_1 アドレナリン受容体刺激作用によるものと考えられた。また、静脈内投与（3 mg/kg/day）したカニクイザル 1 例において投与 3 日の投与後に一過性の昏睡が認められた。この動物では投与 1 日、8 日及び 14 日の心電図検査で心室頻拍が認められていることから、心室頻拍に伴う一過性の血圧の低下により、昏睡が認められたものと考えられた。イヌ動脈灌流左室切片を用いた試験（2.6.2.4.2.1.2 イヌ動脈灌流左室切片に対する作用）の比較対照として用いたイソプロテレノールは 0.1 $\mu\text{mol/L}$

（24.8 ng/mL）以上の濃度で心室頻拍誘発作用が認められたが、本薬は試験した最高濃度である 0.75 $\mu\text{mol/L}$ （300 ng/mL）まで心室頻拍を示さなかったことから、本薬の心室頻拍誘発作用はイソプロテレノールと比較して弱いと考えられた。

さらに、ラットにおいて死亡動物（300 mg/kg/day）で心臓の水腫が認められ、イヌにおいて致死投与量（20 mg/kg/day）で左心室心内膜出血及び心筋変性が認められた。これらの所見も本薬の過量投与による β_1 アドレナリン受容体刺激作用による影響と考えられた[1]。カニクイザルでは 60 mg/kg/day まで薬物投与に関連した心臓の病理組織学的変化は認められなかった。ラット及びイヌにおける心臓の病理組織学的変化に対する無毒性量は 100 及び 10 mg/kg/day であり、このと

きの曝露量はそれぞれ臨床推奨用量における曝露量の 58.7～83.2 倍及び 13.8～25.1 倍であった (表 2.6.6-3)。

2.6.6.9.3 肝臓への影響

ラットにおいて ALT, AST 及び ALP の増加, 肝重量の増加, 肝細胞の腫脹あるいは好酸性化が認められた。13 週間反復経口投与試験の最高投与量 (300 mg/kg/day) で肝酵素の顕著な高値 (AST : 2525 U/L, ALT : 3700 U/L) 及び肝細胞壊死が認められた雄 1 例を除いて, 肝酵素の増加は最大でも対照群の 2 倍程度であり, 肝臓に障害性の変化は認められなかった。これらの変化は休薬により回復性を示すことが確認された。電子顕微鏡検査において肝細胞のグリコーゲン顆粒の減少, 肝細胞及びクッパー細胞に微細顆粒状物質を含む大型のライソゾームが認められたが, 細胞の微細構造あるいは容積に明らかな変化は認められなかった。これらの変化は本薬の脂肪代謝の亢進に関連した変化である可能性が示唆された (2.6.6.9.6 脂肪細胞への影響)。

イヌでは死亡が認められた投与量 (20 mg/kg/day) においてのみ ALP 及び ALT の増加及び肝細胞肥大, 空胞形成あるいは細胞質の淡明化が認められたが, 休薬することにより回復性が確認された。カニクイザルでは本薬の投与に関連した変化は認められなかった。

ミラベグロンのラット 26 週間経口投与毒性試験及びイヌ 2 週間経口投与毒性試験における肝臓に対する無毒性量は 10 mg/kg/day であった。ラット及びイヌの 10 mg/kg/day における曝露量は, 臨床推奨用量における曝露量のそれぞれ 1.7～3.2 倍及び 13.8～25.1 倍であった (表 2.6.6-3)。

表 2.6.6-3 反復投与毒性試験における曝露量と臨床推奨用量における曝露量の比較

試験種	動物種	投与期間	投与量 (mg/kg/day)	曝露量比 ^a			
				C _{max}		AUC _{24h}	
				雄	雌	雄	雌
反復投与 毒性	ラット	26 週間	3	0.5	0.5	0.3	0.2
			10	3.7	2.4	3.2	1.7
			30	16.5	10.0	25.0	11.7
			100	65.7	34.9	83.2	58.7
	イヌ	2 週間	1	1.1	0.8	0.9	0.5
			3	7.7	4.7	4.1	2.8
			10	39.8	23.2	25.1	13.8
			20 ^b	44.0	32.5	24.6	15.4
	カニクイ ザル	52 週間	3	2.7	1.5	1.2	0.7
			10	7.2	3.6	3.7	2.1
			30	16.5	11.2	12.6	7.9

a : 高齢者に臨床推奨用量 (50 mg) を反復投与した時の値 (2.7.2.2.2.3.1 性差及び高齢者試験 [CL-072]) との比較

b : 単回投与時の値

2.6.6.9.4 腎臓への影響

ラットの血液化学的検査において血漿中カリウムの増加及び塩素の減少，尿検査においてナトリウム，カリウム及び塩素の総排泄量の増加，浸透圧上昇，pH 低下，尿量の増減，尿の黄褐色化及びビリルビンの増加が認められ，器官重量の測定において腎重量の増加が認められた。しかしながら，腎臓に病理組織学的変化は認められず，休薬後の回復性も確認された。また，イヌ及びカニクイザル反復投与毒性試験において腎臓に対する影響を示唆する変化は認められなかったことから，本薬の腎臓に対する影響はラットに限定的な影響である可能性が考えられた。ラット 26 週間経口投与毒性試験での腎臓に対する無毒性量（3 mg/kg/day）における曝露量は臨床推奨用量における曝露量を下回っていた（表 2.6.6-3）。

2.6.6.9.5 唾液腺への影響

イヌにおいて低投与量から頬骨腺の腺房の拡張，変性あるいは炎症が認められた。一般状態の観察において認められた眼周囲あるいは鼻口部の腫脹，眼球突出等の症状は，頬骨腺の変化に起因した症状と考えられた。これらの所見の確認のために実施したイヌ 3 日間反復経口投与唾液腺毒性確認試験では，特に頬骨腺において腺房細胞の萎縮及び壊死，間質の水肿，出血及び細胞浸潤，導管の拡張，導管上皮細胞の壊死，剥離，増生及び鉍質沈着，血栓が認められた。導管内に分泌物が貯留して内腔が拡張していたことから，唾液の流出障害が生じた可能性が考えられたが，導管の閉塞性変化あるいは腺房細胞に分泌亢進を示唆する変化は認められなかった。13 週間休薬後にはこれらの変化の修復像と考えられる腺房細胞の萎縮及び導管増生を伴う線維化が認められたのみであり，これらの変化は休薬することにより修復することが示唆された。

ラットでは流涎，口周囲分泌物，下顎部の被毛の汚れ，顎下腺重量の増加及び耳下腺のチモーゲン顆粒の減少が認められたが，イヌで認められたような病理組織学的障害は認められなかった。また，カニクイザルでは唾液腺（顎下腺及び耳下腺）への影響は認められなかった。βアドレナリン受容体は唾液腺において主に蛋白質分泌の調節に関与していることが報告されており [5]，本薬の唾液腺への作用はβアドレナリン受容体刺激作用に関連した変化である可能性が考えられた。しかしながら，本薬の唾液腺に対する影響には大きな種差が認められ，特にイヌの頬骨腺で重篤な変化が認められた。唾液腺のうち頬骨腺は哺乳類ではイヌ及びネコのみ認められ，ラット，カニクイザルあるいはヒトには存在しないという解剖学的な種差が存在することから，イヌで認められた唾液腺への顕著な影響が臨床使用において発現する可能性は低いと考えられた。

なお，βアドレナリン受容体は涙腺の分泌にも関与していることが報告されており [6]，ラット及びイヌで認められた流涙，眼分泌物等の所見も本薬のβアドレナリン受容体刺激作用に関連した変化である可能性が考えられた。

2.6.6.9.6 脂肪細胞への影響

ラット、マウス及びカニクイザルにおいて白色脂肪細胞の小型化、白色脂肪細胞の脂肪滴の減少あるいは微細小胞化、褐色脂肪細胞の脂肪滴の減少あるいは小型化が認められた。また、ラットでは中性脂肪の減少が認められた。これらの変化は各動物種で低投与量から認められた。脂肪細胞における β_3 アドレナリン受容体は、脂肪代謝及びエネルギー消費の調節に関与していることが知られており [7]、これらの変化は β_3 アドレナリン受容体刺激作用に基づく変化であると考えられた。なお、ラット及びマウスにおいて認められた摂餌量の増加及び体重の変動あるいは肝臓、盲腸及び骨髄等へのリポフスチンの沈着も脂肪細胞の β_3 アドレナリン受容体を介した脂肪代謝及びエネルギー消費の亢進に関連した変化である可能性が考えられた。

2.6.6.9.7 遺伝毒性及びがん原性

ミラベグロンは細菌を用いた復帰突然変異試験において遺伝子突然変異誘発性を示さなかった。ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験において代謝活性化系の非存在下あるいは存在下に染色体異常を有する細胞数の増加が認められたものの、いずれも細胞生存率が 40%未満という強い細胞毒性を示す処理濃度においてのみ認められた変化であり、ラットを用いた小核試験において最大耐量まで小核誘発性は認められなかったことから、本薬が *in vivo* において毒性学的に意義のある染色体異常誘発性を示す可能性は低いと考えられた。

さらに、ミラベグロンを 104 週間反復経口投与したマウス及びラットのがん原性試験において薬物投与に関連した腫瘍の発生頻度の増加は認められなかったことから、ミラベグロンはがん原性を示さないものと考えられた。マウス及びラットがん原性試験の最高投与量におけるミラベグロンの曝露量は臨床推奨用量における曝露量のそれぞれ 20.9～37.8 倍及び 38.1～45.0 倍であった（表 2.6.6-4）。

表 2.6.6-4 がん原性試験における曝露量と臨床推奨用量における曝露量の比較

試験種	動物種	投与期間	投与量 (mg/kg/day)	曝露量比 ^a			
				$C_{\max}$		AUC _{24h}	
				雄	雌	雄	雌
がん原性	マウス	104 週間	25	15.0	18.2	5.8	4.7
			50	30.3	14.2	13.9	9.1
			100	43.4	28.7	37.8	20.9
	ラット	104 週間	12.5/25	22.8	17.1	10.3	11.6
			25/50	24.6	29.5	18.1	23.9
			50/100	50.3	56.9	38.1	45.0

a：高齢者に臨床推奨用量（50 mg）を反復投与した時の値（2.7.2.2.2.3.1 性差及び高齢者試験 [CL-072]）との比較

2.6.6.9.8 胚・胎児及び出生児への影響

ラット胚・胎児発生に関する試験において 100 mg/kg/day 以上で骨格異常及び変異（主として波状肋骨）の発現頻度の用量依存的な増加が認められた。同様の所見は他の β アドレナリン受容体作動薬でも認められており、 β アドレナリン受容体遮断薬の同時投与により発現が抑制されることが報告されていることから [8,9]、本薬の β アドレナリン受容体刺激作用に基づく変化であると考えられた。追加試験（2.6.6.6.5 ラット胚・胎児発生に関する試験（波状肋骨の回復性に関する試験））において波状肋骨は他の β アドレナリン受容体作動薬と同様に生後の発育に伴って消失することが確認された。ラット胎児に対する無毒性量（30 mg/kg/day）における母動物の曝露量は臨床推奨用量における曝露量の 6.2 倍であった。一方、骨格異常及び変異が認められた投与量である 100 mg/kg/day における曝露量は、臨床推奨用量における曝露量の 21.5 倍であった（表 2.6.6-5）。

ウサギ胚・胎児発生に関する試験において 30 mg/kg/day で胎児の大動脈拡張及び巨心の発現頻度の増加が認められた。2.6.6.6.9 ウサギ胚・胎児発生に関する試験で認められた胎児所見に関する基礎的検討試験（ β_1 アドレナリン受容体遮断薬の影響）において、これらの所見は β_1 アドレナリン受容体遮断薬であるメトプロロールの同時投与により抑制されたことから、本薬の β_1 アドレナリン受容体刺激作用に起因した変化であると考えられた。また、本薬の投与により認められた心拍数の増加はメトプロロールの投与により抑制された。メトプロロールによる心拍数増加の抑制作用は短時間で消失したことから、メトプロロールの経口投与による作用時間は短いものと考えられ、このことが胎児の大動脈及び心臓への影響を完全には抑制できなかった理由と考えられた。ウサギ胎児に対する無毒性量（3 mg/kg/day）における母動物の曝露量は臨床推奨用量における曝露量を下回っていた。一方、大動脈拡張及び巨心が認められた投与量である 30 mg/kg/day における曝露量は、臨床推奨用量における曝露量の 35.7 倍であった（表 2.6.6-5）。

ラット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において 100 mg/kg で出生児の 4 日生存率の低下及び体重増加抑制が認められた。出生時の生存児数及び体重に影響はなく、授乳期間中の母動物の一般状態にも変化は認められなかったことから、これら所見の原因として本薬による母動物の乳汁分泌抑制あるいは乳汁を介した出生児の本薬への曝露の影響の可能性が考えられた。なお、ラットを用いた組織分布試験の成績から、ミラベグロン由来成分は胎盤を通過し胎児へ移行すること及び乳汁を介して哺乳児の組織へ分布することが示唆されている（概要表 2.6.5.13 妊娠又は授乳動物における試験）。

表 2.6.6-5 生殖発生毒性試験における曝露量と臨床推奨用量における曝露量の比較

試験種	動物種	投与期間	投与量 (mg/kg/day)	曝露量比 ^a	
				C _{max}	AUC _{24h}
				雌	雌
生殖毒性	ラット	妊娠 7-17 日	10	0.6	0.9
			30	6.0	6.2
			100	19.5	21.5
			300	46.3	95.6
	ウサギ	妊娠 6-20 日	3	3.7	0.7
			10	41.5	14.1
			30	89.6	35.7

a：高齢者に臨床推奨用量（50 mg）を反復投与した時の値（2.7.2.2.3.1 性差及び高齢者試験 [CL-072]）との比較

2.6.6.9.9 皮膚感作性

モルモット皮膚感作性試験は皮膚を介して化合物に曝露された場合の接触感作性のリスクを評価する目的で実施された。ミラベグロンはモルモット皮膚感作性試験において中等度の皮膚感作性を示したことから、本薬に経皮曝露する可能性が考えられる原薬あるいは製剤の製造現場において本薬を取り扱う際には、原薬に直接接触しないように注意を払う必要があると考えられた。

2.6.6.9.10 代謝物の毒性

ヒト血漿中で認められたミラベグロンの 8 種の代謝物（M5, M8, M11, M12, M13, M14, M15 及び M16）について、ヒト血漿中薬物濃度が測定された（2.7.2.2.3.1 性差及び高齢者試験 [CL-072]）。その結果、ヒト血漿中で投与薬物に関連するすべての曝露量（未変化体及び代謝物の総和）の 10%を超える主代謝物は M11 及び M12 の 2 種であることが確認された。M11 及び M12 は薬理活性が認められていない（2.6.2.2.5.1 ヒト β アドレナリン受容体に対する刺激作用）グルクロン酸抱合体であり（2.6.4.5.2 代謝物の構造推定及び同定）、反復投与毒性試験に使用した動物種であるラット及びカンクイザルにおいて、定常状態でのヒトの曝露量に匹敵する曝露量が得られたことから（2.6.4.5.4 ヒト血漿中に認められた代謝物の動物における血漿中濃度）、M11 及び M12 の安全性はこれまでに実施した毒性試験において適切に評価されていると考えられた。主代謝物以外の 6 種のヒト血漿中代謝物についても毒性試験動物種において、定常状態でのヒト曝露量を上回る曝露量が得られており、これらの代謝物の安全性もこれまでに実施した毒性試験において適切に評価されていると考えられた。

2.6.6.9.11 原薬及び製剤中の不純物の毒性

原薬中に含まれる可能性のある不純物のうち、YM-181687 の申請規格は $\leq$ 0.1%であり（2.3.S.4.1 規格及び試験方法）、ICH ガイドライン Q3A(R2)において安全性の確認が必要となる閾値を越える

規格が設定されている。YM-181687 はミラベグロンの光学異性体であり、毒性試験に使用した原薬のすべてのロットに含有されていた（表 2.6.6-6）。

表 2.6.6-6 毒性試験に使用した原薬のロットと YM-181687 の含有量

ロット番号	YM-181687 の含有量 (%)	主な試験の種類
申請規格	≤ 0.08 %	—
K02	0.08	ラット及びイヌ単回投与試験，ラット，イヌ及びカニクイザル 2 週間投与試験，ラット及びカニクイザル 13 週間投与試験，in vitro 及び in vivo 遺伝毒性試験，雌ラット受胎能及び初期胚発生試験，ラット及びウサギ胚・胎児発生試験
K1780005	0.02	カニクイザル 52 週間投与試験
K1780006	0.02	ラット 26 週間投与試験
K1780211	0.03	マウス及びラットがん原性試験，雄ラット授胎能及び初期胚発生試験，ラット出生前及び出生後の発生・母体機能試験

また，約 1%（実測値：1.51%）の YM-181687 を含有する原薬を用いたラット 2 週間反復経口投与毒性試験における無毒性量は 3 mg/kg/day であり，このときの YM-181687 の投与量は臨床推奨用量（50 mg）における YM-181687 の最大 1 日投与量の約 23 倍に相当した（表 2.6.6-7）。

表 2.6.6-7 YM-181687 の一日最大投与量

	YM-181687 の含有量	YM-181687 の最大 1 日投与量 ^a
臨床推奨用量：50 mg/day	≤ 0.08 %	≤ 0.1 mg
ラット 2 週間経口投与試験の無毒性量：3mg/kg/day	1.51%	2.265 mg

a：ヒトの体重を 50 kg として計算した。

以上のことから，原薬中に含まれる YM-181687 について申請規格（≤ 0.08 %）における安全性は適切に確認されていると考えられた。なお，製剤中に含まれる可能性のある不純物の規格は，いずれも ICH ガイドライン Q3B（R2）において安全性の確認が必要となる閾値以下に設定されている。

2.6.6.9.12 結論

ミラベグロンの非臨床における安全性を評価するために，単回投与毒性試験，反復投与毒性試験，遺伝毒性試験，がん原性試験，生殖発生毒性試験，局所刺激性試験及びその他の毒性試験（皮膚感作性試験，不純物に関する試験及び溶血性試験）を実施した。その結果，ミラベグロンのβアドレナリン受容体刺激作用に起因すると考えられる影響が心血管系，脂肪組織及び唾液腺において認められた。その他に中枢神経系，肝臓及び腎臓に対する毒性が認められた。これらの毒性の発現には種差が認められ，臨床推奨用量における曝露量に満たない曝露量で発現した毒性も認められたが，いずれも回復性が確認された。

ミラベグロンに毒性学的に意義のある遺伝毒性及びがん原性は認められなかった。皮膚感作性試験において中等度の皮膚感作性が認められたことから、本薬に経皮曝露する可能性のある原薬あるいは製剤の製造現場では十分な注意が必要であると考えられた。生殖発生毒性試験においてラット胎児で認められた骨格異常及び変異（主として波状肋骨）の増加は、生後の発育に伴って消失することが確認され、ウサギ胎児で認められた内臓異常（大動脈拡張及び巨心）の増加は、 β_1 アドレナリン受容体遮断薬によって抑制されることが確認された。これらの所見はミラベグロンの β アドレナリン受容体刺激作用に起因する所見と考えられ、いずれも臨床推奨用量における曝露量を上回る曝露量において認められた所見であった。

2.6.6.10 図表

図表は各項の本文中の適切な場所に記載した。

2.6.6.11 参考文献

1. Kahn DS, Rona G, Chappel CI. Isoproterenol-induced cardiac necrosis. Ann. N.Y. Acad Sci 1969;256:285-93.
2. Ida H. Pharmacology of formoterol, (α RS)-3-formamido-4-hydroxy- α -[[[(α RS)-p-methoxy- α -methylphenethyl] amino] methyl] benzylalcohol fumarate dihydrate (BD40A). OyoYakuri 1981;21:201-10.
3. Shen YT, Cervoni P, Claus T, Vatner SF. Differences in β_3 -adrenergic receptor cardiovascular regulation in conscious primates, rats and dogs. J Pharmacol Exp Ther 1996;278:1435-43.
4. Sandusky GE, Means JR, Todd GC. Comparative cardiovascular toxicity in dogs given inotropic agents by continuous intravenous infusion. Toxicologic Pathology 1990;18:268-78.
5. Abe K, Inoue H, Yokota Y. Effects of the selective β_2 -adrenergic Agonists, procaterole and terbutaline, on protein secretion by rat submandibular glands. J Dent Res 1985;64:886-90.
6. Friedman ZY, Lowe M, Selinger Z. β -adrenergic receptors stimulated peroxidase secretion from rat lacrimal gland. Biochimica et Biophysica Acta 1981;675:40-5.
7. Ursino MG, Vasina V, Raschi E, Crema F, Ponti F. The β_3 -adrenoceptor as a therapeutic target: Current perspectives. Pharmacol Res 2009;59:221-34.
8. Sterz H, Sponer G, Neubert P. A postulated mechanism of β -sympathomimetic induction of rib and limb anomalies in rat fetuses. Teratology 1985;31:401-12.
9. Sato T. Reproduction study of formoterol fumarate (BD40A) (1): Teratological study in rats. OyoYakuri 1984;27:239-49.