トルリシティ皮下注 0.75 mg アテオス

2.6.6　毒性試験の概要文

日本イーライリリー株式会社

目次

2.6.6　毒性試験の概要文 1
2.6.6.1　まとめ 1
2.6.6.2　単回投与毒性試験 3
2.6.6.3　反復投与毒性試験 4
2.6.6.3.1　マウスを用いた 1 ヵ月間反復投与毒性試験 4
2.6.6.3.2　ラットを用いた 1 ヵ月間反復投与毒性試験 6
2.6.6.3.3　ラットを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験 7
2.6.6.3.4　ラットを用いた 6 ヵ月間反復投与毒性試験及び 1 ヵ月間回復性試験 8
2.6.6.3.5　サルを用いた 1 ヵ月間反復投与毒性試験 9
2.6.6.3.6　サルを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験及び 1 ヵ月間回復性試験 10
2.6.6.3.7　サルを用いた 9 ヵ月間反復投与毒性試験及び 2 ヵ月間回復性試験 12
2.6.6.4　遺伝毒性試験 13
2.6.6.5　がん原性試験 13
2.6.6.5.1　ラットを用いた長期がん原性試験 13
2.6.6.5.2　rasH2 トランスジェニックマウスを用いた短期がん原性試験 16
2.6.6.6　生殖発生毒性試験 18
2.6.6.6.1　雄ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 18
2.6.6.6.2　雌ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 19
2.6.6.6.3　ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験 21
2.6.6.6.4　ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験 22
2.6.6.6.5　ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 24
2.6.6.6.6　新生児ラットを用いた毒性試験 27
2.6.6.7　局所刺激性試験 31
2.6.6.8　その他の毒性試験 31
2.6.6.8.1　光安全性試験 31
2.6.6.8.2　免疫原性試験 31
2.6.6.8.3　免疫毒性試験 31
2.6.6.8.4　補足的毒性試験 31
2.6.6.8.4.1　ラットを用いた 1 年間反復投与毒性試験 32
2.6.6.8.4.2　Zucker 糖尿病肥満ラットを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験 34
2.6.6.8.4.3　サルを用いた 1 年間反復投与毒性試験 37
2.6.6.9　考察及び結論 39
2.6.6.10　図表 47
2.6.6.11　参考文献 48

2.6.6　毒性試験の概要文

2.6.6.1　まとめ

LY2189265（以下、デュラグルチド）の毒性を評価するため、マウス、ラット及びサルを用いた反復投与毒性試験（マウスは 1 ヵ月間、ラットは最長 6 ヵ月間、サルは最長 9 ヵ月間）、ラット及び rasH2 トランスジェニックマウスを用いたがん原性試験、ラット及びウサギを用いた一連の生殖発生毒性試験並びに新生児ラットを用いた毒性試験を実施した。また、グルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）受容体作動薬の安全性リスクとして懸念されている甲状腺 C 細胞腫瘍及び膵炎/膵癌の発現に対するデュラグルチドの影響を評価するため、上述の毒性試験に加えて正常動物（ラット及びサル）並びに糖尿病モデルラットを用いた補足的毒性試験を実施した。

GLP-1 受容体のアミノ酸配列は動物種間で相同性が高く、ヒトと同様にげっ歯類及びサルにおいてデュラグルチドの薬理作用が確認されている。開発早期に実施したラットを用いた 1 ヵ月間反復投与毒性試験では Fischer 344 ラットを用いたが、その後イーライリリー・アンド・カンパニーの標準的な毒性試験で用いられる系統が変更され、以降の毒性試験では Sprague Dawley ラットを用いた。デュラグルチドの毒性プロファイルは両系統のラットで類似しており、系統の変更は毒性評価に影響しないと判断した。非げっ歯類には、高用量を投与可能であること、顕著な免疫原性を示さないこと並びに他の GLP-1 受容体作動薬の毒性評価に多く用いられていることから、カニクイザルを選択した。胚・胎児発生に関する試験の第二の動物種には、薬理作用が確認されているニュージーランドホワイトウサギを選択した。

デュラグルチドの臨床での用法・用量は 0.75 mg を週 1 回皮下投与であるが、毒性を感度よく検出するため、毒性試験では曝露が持続し、かつ長期間の反復投与が可能な週 2 回皮下投与を選択した。

毒性試験は日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイドラインに従って実施し、長期間臨床適応されるバイオテクノロジー応用医薬品に求められる事項を満たしている。主要な毒性試験、トキシコキネティクス（TK）試験及び安全性薬理試験は、試験実施時に有効であった医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）を遵守して実施した。毒性試験の用量設定のための予備試験は、GLP 遵守下では実施しなかった。以下に、デュラグルチドの毒性試験成績の概要を示す。

反復投与毒性試験

- GLP-1 受容体を介した薬理作用に関連した変化として、マウス、ラット及びサルにおいて摂餌量減少及びそれに伴う体重低下が認められた。
- マウスを用いた 1 ヵ月間、ラットを用いた最長 6 ヵ月間及びサルを用いた最長 9 ヵ月間の反復投与毒性試験において、標的器官毒性は認められなかった。

- 臨床用量における血漿中濃度－時間曲線下面積（AUC）[1]の 264 倍に相当する用量（16.29 mg/kg）をラットに 6 ヵ月間反復投与したとき、膵臓の炎症、壊死、過形成及び腫瘍は認められなかった。
- 臨床用量における AUC の 774 倍に相当する用量（8.15 mg/kg）をサルに 9 ヵ月間反復投与したとき、C 細胞の腫瘍並びに膵臓の炎症、壊死、過形成及び腫瘍は認められなかった。

がん原性試験

- ラットを用いた長期がん原性試験において、臨床用量における AUC の 12.2 倍以上に相当する用量（0.5 mg/kg 以上）で生存率低下を伴わない C 細胞腺腫並びに C 細胞腺腫/癌（合算）の発現頻度の統計学的に有意な上昇が認められた。また、臨床用量における AUC の 95.0 倍に相当する用量（5 mg/kg）で C 細胞癌の発現頻度の数的な上昇が認められた。膵臓の炎症、壊死、過形成及び腫瘍は認められなかった。
- rasH2 トランスジェニックマウスを用いた短期がん原性試験において、臨床用量における AUC の 7.56 倍に相当する用量（3 mg/kg）で C 細胞及び膵臓の炎症、壊死、過形成及び腫瘍は認められなかった。

生殖発生毒性試験

- 催奇形性を示唆する所見は認められなかった。
- 臨床用量における AUC のそれぞれ 71.1 倍及び 21.2 倍に相当する用量（4.89 mg/kg 及び 0.41 mg/kg）を妊娠ラット及びウサギに投与したとき、母動物の摂餌量減少及び体重低下に関連して胎児骨格に対する影響が認められた。
- 臨床用量における AUC の 26.8 倍に相当する用量（1.63 mg/kg）を妊娠ラットに投与したとき、母動物の摂餌量減少及び体重低下が認められ、F1 児の雌に記憶障害が認められた（Biel 型水迷路による評価）。
- 臨床用量における AUC の 149 倍に相当する用量（7 mg/kg）を雌雄の新生児ラットに生後 7 日から投与したとき、Biel 型水迷路による評価において記憶障害は認められなかった。

補足的毒性試験

＜糖尿病を呈さない正常な雄ラット＞

- 臨床用量における AUC のおよそ 95.0 倍に相当する用量（5 mg/kg）を 1 年間反復投与したとき、C 細胞の限局性過形成の発現頻度の上昇が認められたが、これらの変化は試験 52 週より早期の評価時点では認められなかった。

[1] 日本人 2 型糖尿病患者に 0.75 mg の用量で週 1 回、反復皮下投与したときの定常状態における $AUC_{0\text{-}168h}$（H9X-JE-GBDP 試験）

- いずれの評価時点においても、形態計測学的評価により定量した C 細胞容積に対するデュラグルチド投与の影響は認められなかった。C 細胞容積に対する影響が認められなかったことに一致して、C 細胞のびまん性過形成の発現頻度の上昇や血漿中カルシトニン濃度（ベースライン及びカルシウム刺激時）の上昇は認められなかった。

＜糖尿病を呈する雄 Zucker 糖尿病肥満（ZDF）ラット＞

- 臨床用量における AUC の 48.6 倍までに相当する用量（5 mg/kg）を 3 ヵ月間反復投与したとき、膵外分泌腺の自然発生病変の発現頻度及び重症度が軽度に上昇した。
- 壊死を伴う炎症や膵外分泌腺バイオマーカーの顕著な上昇等の膵炎を示唆する所見は認められなかった。

＜糖尿病を呈さない正常な雄サル＞

- 臨床用量における AUC のおよそ 774 倍に相当する用量（8.15 mg/kg）を 1 年間反復投与したとき、血清中カルシトニン濃度の上昇、甲状腺の重量増加及び組織像の変化、C 細胞の増殖性並びに形態計測学的評価により定量した C 細胞容積の変化は認められなかった。
- アミラーゼ及びリパーゼ活性の変化、膵臓の炎症、壊死、異形成性の膵管増殖並びにヒト膵上皮内腫瘍（PanIN）に相当する病変は認められなかった。
- 4/19 例で小葉間膵管における杯細胞数の軽微から中等度の増加が認められたが、その他の関連する毒性所見が認められなかったことから毒性と判断しなかった。

結論

- デュラグルチドの毒性試験で認められた主要な変化は、摂餌量減少及びそれに伴う体重低下、ラットにおける生存率低下を伴わない C 細胞腫瘍の発現頻度の上昇並びにラット及びウサギにおける母動物の摂餌量減少及び体重低下に関連した胎児骨格に対する影響であり、他の GLP-1 受容体作動薬の毒性試験で報告されている所見と類似していた。
- ラットにおける C 細胞腫瘍の発現頻度の上昇は、臨床用量よりも高い曝露量でのみ認められた。ラット C 細胞の増殖性変化は非遺伝毒性的機序を介したものと考えられ、またサルと比較してラット C 細胞はデュラグルチドに対する反応性が高いと考えられた。しかしながら、C 細胞の増殖性変化が起こる機序は明らかではなく、ヒトにおける反応性がラットよりもサルに類似するかも明らかでないことから、ヒトにおける安全性の慎重な評価は依然として重要である。
- 正常ラット及びサル並びに糖尿病を呈する ZDF ラットにおいて、膵炎を示唆する所見は認められなかった。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

独立した単回投与毒性試験は実施していない。サルを用いた単回投与心血管系安全性薬理試験（第 2.6.2.4.1.2 項）並びにマウス、ラット及びサルを用いた反復投与毒性試験

（第 2.6.6.3 項）において、デュラグルチドの急性毒性を評価した。サルを用いた単回投与心血管系安全性薬理試験では、デュラグルチドを 1 又は 10 mg/kg の用量で雌雄サルに単回皮下投与し、投与 3 日後まで観察を行った。いずれの用量においても死亡は認められず、薬理作用に関連した嘔吐及び顕著な摂餌量減少が試験期間を通して認められた。摂餌量減少は 1 mg/kg 群では投与 3 日後に回復したが、10 mg/kg 群では投与 3 日後にも認められた。マウス、ラット及びサルを用いた反復投与毒性試験では、最高用量（それぞれ 100、20 及び 10 mg/kg）を初回投与したときの忍容性は良好で、すべての個体は初回投与後に生存した。

2.6.6.3　反復投与毒性試験

マウス、ラット及びサルを用いて TK 評価を含む反復投与毒性試験を実施した。001178-T（ヘミ接合）CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic マウスを用いた短期がん原性試験の用量設定のため、マウス毒性試験には 001178-T（ヘミ接合）マウスの代替動物とされている 001178-W（野生型）マウスを用いた（Storer et al. 2010）。Fischer 344 ラット、Sprague Dawley ラット及びカニクイザルは医薬品の安全性試験で一般的に使用され、デュラグルチドの薬理作用が示されていることから選択した。デュラグルチドの臨床での用法は週 1 回皮下投与であるが、毒性を感度よく検出するため、反復投与毒性試験では曝露が持続し、かつ長期間の反復投与が可能な週 2 回皮下投与を選択した。

2.6.6.3.1　マウスを用いた 1 ヵ月間反復投与毒性試験

（添付資料 4.2.3.2.1、8224143 試験、表 2.6.7.7A）

001178-T（ヘミ接合）CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic マウスを用いた短期がん原性試験の用量設定のため、雌雄 001178-W（野生型）マウス（7 週齢）にデュラグルチドを週 2 回、約 4 週間（計 9 回）反復皮下投与し、毒性及び TK を評価した。

用量設定は、Crl:CD-1 マウス（5 例/性/群）にデュラグルチドを 0、1、10 及び 100 mg/kg の用量で 2 週間反復皮下投与した予備試験成績に基づく（8216121 試験、表 2.6.7.6）。この予備試験では、100 mg/kg 群（TK 評価群）の雌 1 例が試験 4 日に体重減少（試験 1 日と比較して 27%減少）、糞排泄量減少、円背位、活動性低下、斜視及び削痩を呈して瀕死となり、試験 7 日に安楽殺された。その他の個体は計画剖検時まで生存した。デュラグルチド投与による一般状態の変化は認められなかった。生存例では、試験 1～4 日にかけて用量依存的な摂餌量減少及びそれに伴う体重減少が認められた。1、10 及び 100 mg/kg 群の試験 4 日における体重は、試験 1 日と比較してそれぞれ約 2%、9%及び 15%減少したが、それ以降は体重の増加が認められ、試験終了時には溶媒対照群との明らかな体重の差は認められなかった。摂餌量及び体重の減少は、GLP-1 受容体を介した薬理作用に関連した変化と考えられた。当試験で認められた病理組織学的所見は摂餌量及び体重の変化に関連したものであり、軽微であったことから毒性と判断しなかった。この予備試験成績に基づき、1 ヵ月間反復投与毒性試験では体重及び摂餌量に明らかな影響が現れると予想される 100 mg/kg を高用量に、影響がほとんど現れないと予想される 1 mg/kg を低用量に設定した。中用量群は、等比中項の 10 mg/kg と設定した。

試験デザインを表 2.6.6-1 に示す。毒性評価項目は死亡、一般状態、体重、体重増加量、摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、器官重量、剖検及び病理組織学的検査とした。

表 2.6.6-1　マウス 1 ヵ月間毒性試験の試験デザイン

用量 (mg/kg)	例数		投与液濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)
	雄	雌		
毒性評価群				
0[a]	10	10	0[a]	10
1	10	10	0.1	10
10	10	10	1	10
100	10	10	10	10
トキシコキネティクス評価群				
0[a]	8	8	0[a]	10
1	38	38	0.1	10
10	38	38	1	10
100	38	38	10	10

[a] 溶媒対照群：0.02%ポリソルベート 80 及び 4.7%マンニトールを含む 10 mM クエン酸緩衝液、pH 6.5

TK データは第 2.6.4.3.1 項にて考察した。臨床用量との AUC 比は、1、10 及び 100 mg/kg 群でそれぞれ 20.3、234 及び 1776 倍であった（表 2.6.6-26）。

全例が計画剖検時まで生存した。眼科学的検査及び剖検で毒性学的変化は認められなかった。100 mg/kg 群の少数例で、試験 4 日に円背位が認められた。

10 mg/kg 以上の用量で、試験開始初期（試験 1～4 日）に用量依存的な摂餌量減少及びそれに伴う体重減少が認められ、この期間の体重減少は 100 mg/kg 群で 10%を超えた。試験 4 日以降は多くの個体で体重が増加したが、10 及び 100 mg/kg 群の体重及び摂餌量は試験期間を通して溶媒対照群よりも低く、試験終了時の体重は 100 mg/kg 群の雄で 12%、雌で 16%、10 mg/kg 群の雄で 8%、雌で 13%、溶媒投与群と比較して低下した。

デュラグルチド投与群では、試験 33 日に赤血球関連パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン濃度又はヘマトクリット値）の軽微な低下が認められた。100 mg/kg 群において、雌における赤血球関連パラメータの変化は雄よりもわずかであった。10 mg/kg 以上の群の雌では平均赤血球容積及び絶対網状赤血球数の軽微な減少が認められ、1 mg/kg 以上の群の雄では絶対網状赤血球数の顕著な減少が認められた。赤血球関連パラメータの変化は摂餌量減少に伴う栄養状態の低下に関連した変化と考えられ、毒性と判断しなかった。

溶媒対照群と比較して、10 及び 100 mg/kg 群の雌雄で統計学的に有意な肝臓重量（実重量又は体重比相対重量）の減少が認められたほか、100 mg/kg 群の雌で子宮重量（実重量）の減少が認められた。器官重量の減少に関連する病理組織学的所見として、肝細胞の空胞化の減少（グリコーゲン量の減少に一致）及び子宮の萎縮が認められた。10 及び 100 mg/kg 群の雄では、膵臓のチモーゲン顆粒の減少も認められた。これらの病理組織学的所見は摂餌量減少及び体重低下に伴う変化であり、デュラグルチドの直接的な影響ではないと考えられた。いずれの群でも、デュラグルチド投与による投与部位の病理組織学的変化は認められなかった。

以上、当試験では薬理作用に関連した用量依存的な摂餌量減少及びそれに伴う体重減少が認められた。また、100 m/kg 群の少数例で試験 4 日に円背位が認められた。標的器

官毒性は認められなかった。器官重量の減少及び赤血球関連パラメータの変化は摂餌量減少及び体重低下に伴う変化と考えられ、毒性と判断しなかった。当試験の無毒性量（NOAEL）は 100 mg/kg と判断した［AUC に基づくと臨床用量の 1776 倍（表 2.6.6-26）］。

2.6.6.3.2 ラットを用いた 1 ヵ月間反復投与毒性試験

（添付資料 4.2.3.2.2、R00359 試験、表 2.6.7.7B）

雌雄 Fischer 344 ラット（10～11 週齢）にデュラグルチドを週 2 回、約 5 週間（計 10 回）反復皮下投与し、毒性及び TK を評価した。

用量設定は、Fischer 344 ラット（5 例/性/群）にデュラグルチドを 0、2、6 及び 20 mg/kg の用量で週 2 回、2 週間反復皮下投与した予備試験成績に基づく（R00163 試験、表 2.6.7.6）。この予備試験で認められた重要な所見は、GLP-1 受容体を介した薬理作用に関連した摂餌量減少及び体重低下のみであったことから、1 ヵ月間反復投与毒性試験でも同じ用量を設定した。

試験デザインを表 2.6.6-2 に示す。毒性評価項目は死亡、一般状態、体重、体重増加量、摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、器官重量、剖検及び病理組織学的検査とした。

表 2.6.6-2 ラット 1 ヵ月間毒性試験の試験デザイン

用量 (mg/kg)	例数		投与液濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)
	雄	雌		
毒性評価群				
0[a]	10	10	0[a]	3.93
2	10	10	5.1	0.40
6	10	10	5.1	1.18
20	10	10	5.1	3.93
トキシコキネティクス評価群				
2	11	11	5.1	0.40
6	11	11	5.1	1.18
20	11	11	5.1	3.93

[a] 溶媒対照群：0.02%ポリソルベート 80 及び 150 mM 塩化ナトリウムを含む 10 mM クエン酸緩衝液、pH 6.5

TK データは第 2.6.4.3.2 項にて考察した。臨床用量との AUC 比は、2、6 及び 20 mg/kg 群でそれぞれ 48.4、151 及び 352 倍であった（表 2.6.6-26）。

デュラグルチド投与による死亡は認められなかった。20 mg/kg 群（毒性評価群）の雄 1 例は試験 2 日に死亡発見されたが、十二指腸及び胃の潰瘍が死因であり投与との関連はないと判断した。他の個体は計画剖検時まで生存した。一般状態観察において、デュラグルチド投与による毒性は認められなかった。

デュラグルチドを投与した全用量群で、試験初期（試験 0～3 日）に用量依存的な摂餌量減少及びそれに伴う体重減少が認められた。この期間の摂餌量は溶媒対照群と比較して 59%～92%減少し、体重は試験 0 日と比較して 6%～17%減少した。摂餌量は試験 10 又は 14 日までに溶媒対照群と同程度に回復した。体重増加量は試験 3 日以降に溶媒対照

群と同程度にまで回復したが、体重は試験終了時まで溶媒対照群よりも低いまま推移した。

眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査において、デュラグルチド投与による変化は認められなかった。標的器官毒性は認められなかった。20 mg/kg 群の雄（2/10 例）において、デュラグルチド投与による投与部位の慢性炎症及び出血が認められたが、溶媒対照群で認められた投与部位の変化と比較してその重症度の上昇はわずかであった。また、摂餌量減少及び体重低下に関連すると考えられる軽度の病理組織学的変化として、精細管萎縮、両側精巣上体の内腔細胞残屑、精子減少、並びに前立腺及び精嚢の分泌減少が 20 mg/kg 群の雄に、発情間期 II にある雌の例数の増加が 20 mg/kg 群に、胸腺萎縮が 6 mg/kg 以上の群の雄に、それぞれ認められた。

以上、当試験ではデュラグルチドを投与した全用量群で摂餌量及び体重の一過性の減少が認められたほか、摂餌量減少及び体重低下に関連した軽度の病理組織学的変化が認められた。これらは GLP-1 受容体を介した薬理作用に関連した変化と考えられ、また動物の健康状態に悪影響を及ぼすものではなかった。標的器官毒性は認められず、当試験の NOAEL は 20 mg/kg と判断した［AUC に基づくと臨床用量の 352 倍（表 2.6.6-26）］。

2.6.6.3.3　ラットを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験

（添付資料 4.2.3.2.3、7608-191 試験、表 2.6.7.7C）

雌雄 Sprague Dawley ラット（6～7 週齢）にデュラグルチドを週 2 回、13 週間（計 27 回）反復皮下投与し、毒性及び TK を評価した。

用量は、ラットを用いた 1 ヵ月間反復投与毒性試験（R00359 試験）と同じく 0、2、6 及び 20 mg/kg に設定した。しかし、分析に用いたデュラグルチドの吸光係数が最終報告書の作成後に更新され、実際に投与した用量は 0、1.63、4.89 及び 16.29 mg/kg に変更された。

試験デザインを表 2.6.6-3 に示す。毒性評価項目は死亡、一般状態、体重、体重増加量、摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、器官重量、剖検及び病理組織学的検査とした。

表 2.6.6-3　ラット 3 ヵ月間毒性試験の試験デザイン

用量（mg/kg）	例数		投与液濃度（mg/mL）	投与容量（mL/kg）
	雄	雌		
毒性評価群				
0[a]	10	10	0[a]	1
1.63	10	10	1.63	1
4.89	10	10	4.89	1
16.29	10	10	16.29	1
トキシコキネティクス評価群				
0[a]	5	5	0[a]	1
1.63	11	11	1.63	1
4.89	11	11	4.89	1
16.29	11	11	16.29	1

[a]　溶媒対照群：0.02%ポリソルベート 80 及び 150 mM 塩化ナトリウムを含む 10 mM クエン酸緩衝液、pH 6.5

TK データは第 2.6.4.3.2 項にて考察した。臨床用量との AUC 比は、1.63、4.89 及び 16.29 mg/kg 群でそれぞれ 25.3、56.6 及び 241 倍であった（表 2.6.6-26）。

デュラグルチド投与による死亡は認められなかった。16.29 mg/kg 群（毒性評価群）の雌 2 例は試験 4 週に死亡したが、その死因は臨床検査のための採血操作であった。一般状態観察において、デュラグルチド投与による毒性は認められなかった。

デュラグルチドを投与した全用量群で、摂餌量減少及び体重低下が認められた。これらの変化は試験 1 週に最も顕著であり、投与の継続により回復傾向を示した。

眼科学的検査でデュラグルチド投与による変化は認められなかった。臨床検査値の異常、投与部位反応及び標的器官毒性は認められなかった。

以上、当試験ではデュラグルチドを投与した全用量群で薬理作用に関連した摂餌量減少及びそれに伴う体重低下が認められたが、動物の健康状態に悪影響を及ぼすものではなかった。標的器官毒性は認められず、当試験の NOAEL は 16.29 mg/kg と判断した［AUC に基づくと臨床用量の 241 倍（表 2.6.6-26）］。

2.6.6.3.4　ラットを用いた 6 ヵ月間反復投与毒性試験及び 1 ヵ月間回復性試験

（添付資料 4.2.3.2.4、7608-236 試験、表 2.6.7.7D）

雌雄 Sprague Dawley ラット（6～8 週齢）にデュラグルチドを週 2 回、約 6 ヵ月間（計 53 回）反復皮下投与し、その後 1 ヵ月間の回復期間を設けたときの毒性及び TK を評価した。

用量は、ラットを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験（7608-191 試験）と同じく 0、1.63、4.89 及び 16.29 mg/kg に設定した。

試験デザインを表 2.6.6-4 に示す。毒性評価項目は死亡、一般状態、体重、体重増加量、摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、尿生化学的検査、器官重量、剖検及び病理組織学的検査とした。

表 2.6.6-4　ラット 6 ヵ月間毒性試験及び 1 ヵ月間回復性試験の試験デザイン

用量 (mg/kg)	例数		投与液濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)
	雄	雌		
毒性評価群				
0[b]	25[a]	25[a]	0[b]	1
1.63	15	15	1.63	1
4.89	15	15	4.89	1
16.29	25[a]	25[a]	16.29	1
トキシコキネティクス評価群				
0[b]	6	6	0[a]	1
1.63	12	12	1.63	1
4.89	12	12	4.89	1
16.29	12	12	16.29	1

[a] 0 及び 16.29 mg/kg 群の雌雄各 10 例を回復試験群とし、溶媒又はデュラグルチドを約 6 ヵ月間反復投与した後、1 ヵ月間の回復期間を設けて毒性変化の回復性、持続性又は遅延毒性の有無を評価した。
[b] 溶媒対照群：0.02%ポリソルベート 80 及び 150 mM 塩化ナトリウムを含む 10 mM クエン酸緩衝液、pH 6.5

TK データは第 2.6.4.3.2 項にて考察した。臨床用量との AUC 比は、1.63、4.89 及び 16.29 mg/kg 群でそれぞれ 24.7、60.7 及び 264 倍であった（表 2.6.6-26）。

デュラグルチド投与による死亡は認められなかった。4.89 mg/kg 群（毒性評価群）の雌 1 例は瀕死のため試験 78 日に安楽殺したが、死因は尿路炎症、尿結石及び腎盂腎炎によるもので、投与との関連はないと判断した。1.63 mg/kg 群（TK 評価群）の雄 1 例は試験 96 日に死亡発見されたが、16.29 mg/kg 群で死亡が認められなかったことから投与との関連はないと判断した。一般状態観察において、デュラグルチド投与による毒性は認められなかった。16.29 mg/kg 群の雄及び 4.89 mg/kg 以上の群の雌において、糞排泄量減少及び削痩が認められた。これらの変化は主に試験初期の 8 週間に認められ、それ以降はほとんど認められなかった。糞排泄量減少及び削痩は GLP-1 受容体を介した薬理作用に関連した変化であり、デュラグルチドの直接的な毒性ではないと考えられた。また、全投与群で粗毛の頻度がわずかに上昇した。回復期間中は、デュラグルチド投与による一般状態の変化は認められなかった。

デュラグルチドを投与した全用量群で、摂餌量減少及び体重低下が認められた。摂餌量減少は試験 1 週に特に顕著であり、16.29 mg/kg 群の試験 1～3 日の摂餌量は溶媒対照群と比較して雄で 70%、雌で 66%減少した。摂餌量減少は試験期間を通して認められたが、投与の継続により回復傾向を示した。16.29 mg/kg 群の投与期間終了時の体重は溶媒対照群と比較して雄で 18%、雌で 19%低下した。1 ヵ月間の回復期間を設けた 16.29 mg/kg 群では、休薬開始から 13 日まで摂餌量及び体重増加量は溶媒対照群よりも高く、回復期間後の体重は雌では溶媒対照群と同程度まで回復し、雄では溶媒対照群よりもやや低かった。

眼科学的検査でデュラグルチド投与による変化は認められなかった。臨床検査値の異常、投与部位反応を含む剖検所見及び病理組織学的所見は認められなかった。

以上、当試験ではデュラグルチドを投与した全用量群で薬理作用に関連した摂餌量減少及びそれに伴う体重低下が認められたが、動物の健康状態に悪影響を及ぼすものではなかった。標的器官毒性は認められず、当試験の NOAEL は 16.29 mg/kg と判断した［AUC に基づくと臨床用量の 264 倍（表 2.6.6-26）］。

2.6.6.3.5 サルを用いた 1 ヵ月間反復投与毒性試験

（添付資料 4.2.3.2.5、P00054 試験、表 2.6.7.7E）

雌雄カニクイザル（24～44 週齢）にデュラグルチドを週 2 回、4 週間（計 9 回）反復皮下投与し、安全性薬理パラメータ、毒性、免疫原性及び TK を評価した。

用量設定は、カニクイザルを用いた用量漸増予備試験（P00028 試験、表 2.6.7.6）の成績に基づく。この予備試験では 2 群を設定し、各群（1 例/性/群）に 0.3 又は 1 mg/kg のデュラグルチドを 4 日間隔で 2 回皮下投与した後、10 日間の回復期間を設け、3 又は 10 mg/kg に漸増して 4 日間隔で 2 回皮下投与した。その結果、薬理作用に関連した摂餌量及び糞排泄量の減少のみが認められ、用量制限毒性は認められなかったことから、1 ヵ月間反復投与毒性試験では 0、1、3 及び 10 mg/kg を選択した。

試験デザインを表 2.6.6-5 に示す。毒性評価項目は死亡、一般状態、体重、体重増加量、摂餌量（定性的）、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、免疫原性、器官重量、剖検及び病理組織学的検査とした。

表 2.6.6-5 サル 1 ヵ月間毒性試験の試験デザイン

用量 (mg/kg)	例数		投与液濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)
	雄	雌		
0[a]	3	3	0[a]	0.25
1	3	3	5.1	0.20
3	3	3	40.6	0.075
10	3	3	40.6	0.25

[a] 溶媒対照群：0.02%ポリソルベート 80 及び 150 mM 塩化ナトリウムを含む 10 mM クエン酸緩衝液、pH 6.5

心血管系、中枢神経系及び呼吸器系に関する安全性薬理評価の成績は第 2.6.2.4 項に示す。TK データは第 2.6.4.3.4 項にて考察した。臨床用量との AUC 比は、1、3 及び 10 mg/kg 群でそれぞれ 73.5、219 及び 801 倍であった（表 2.6.6-26）。

全例が計画剖検時まで生存した。デュラグルチド投与により嘔吐の発現頻度がわずかに上昇し、これは薬理作用に関連した変化と考えられた。

試験初期の 2 週間において、デュラグルチドを投与した全用量群で体重減少が認められた。この期間の体重減少は 1 mg/kg 群の雄で軽微、3 及び 10 mg/kg 群で軽度であり、それ以降体重はほぼ一定で推移した。また、デュラグルチドを投与した全用量群において、主に試験 1 週に用量依存的な摂餌量減少が認められた。

眼科学的検査、臨床検査、剖検及び病理組織学的検査において、デュラグルチド投与による重要な変化は認められなかった。デュラグルチド投与群の一部の雌雄で軽微～軽度の投与部位の慢性炎症が認められたが（溶媒対照群、1、3 及び 10 mg/kg 群でそれぞれ 0、3、4 及び 3 例）、関連する肉眼所見は認められなかった。

1 ヵ月間反復投与毒性試験の試験 32 日（最終投与 96 時間後）の血漿中デュラグルチド濃度がデュラグルチド反応性抗体の検出を妨害する濃度より高かったため、デュラグルチドの免疫原性が正確に評価できなかった。

補体分解産物 C3a 及び Bb に対するデュラグルチド投与の影響は認められなかった。

以上、当試験ではデュラグルチドを投与した全用量群で薬理作用に関連した摂餌量減少及びそれに伴う体重減少が認められたが、動物の健康状態に悪影響を及ぼすものではなかった。当試験の標的器官毒性に関する NOAEL は 10 mg/kg と判断した［AUC に基づくと臨床用量の 801 倍（表 2.6.6-26）］。

2.6.6.3.6 サルを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験及び 1 ヵ月間回復性試験

（添付資料 4.2.3.2.6、7608-192 試験、表 2.6.7.7F）

雌雄カニクイザル（2～4 年齢）にデュラグルチドを週 2 回、13 週間（計 27 回）反復皮下投与し、その後 1 ヵ月間の回復期間を設けたときの安全性薬理パラメータ、毒性、免疫原性及び TK を評価した。

用量は、サルを用いた 1 ヵ月間反復投与毒性試験（P00054 試験）と同じく 0、1、3 及び 10 mg/kg に設定した。しかし、分析に用いたデュラグルチドの吸光係数が最終報告書の作成後に更新され、実際に投与した用量は 0、0.41、1.63 及び 8.15 mg/kg に変更された。

試験デザインを表 2.6.6-6 に示す。毒性評価項目は死亡、一般状態、体重、体重増加量、摂餌量（定性的）、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、免疫原性、器官重量、剖検及び病理組織学的検査とした。

表 2.6.6-6　サル 3 ヵ月間毒性試験及び 1 ヵ月間回復性試験の試験デザイン

用量 (mg/kg)	例数 [a]		投与液濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)
	雄	雌		
0[b]	6	6	0[b]	1
0.41	6	6	0.41	1
1.63	6	6	1.63	1
8.15	6	6	8.15	1

[a] 各群の雌雄各 3 例を回復試験群とし、溶媒又はデュラグルチドを約 3 ヵ月間反復投与した後、1 ヵ月間の回復期間を設けた。
[b] 溶媒対照群：0.02%ポリソルベート 80 及び 150 mM 塩化ナトリウムを含む 10 mM クエン酸緩衝液、pH 6.5

心血管系に関する安全性薬理評価の成績は第 2.6.2.4 項に示す。TK データは第 2.6.4.3.4 項にて考察した。臨床用量との AUC 比は、0.41、1.63 及び 8.15 mg/kg 群でそれぞれ 31.7、139 及び 620 倍であった（表 2.6.6-26）。

全例が計画剖検時まで生存した。試験 1 週に脱水症状を呈した 8.15 mg/kg 群の雌 1 例に対して輸液の皮下投与を行った。脱水症状はデュラグルチド投与によると考えられたが、一過性で回復したため計画されたすべての投与を実施した。

デュラグルチド投与群では、試験初期の 2 週間に摂餌量減少及び嘔吐が用量依存的に認められた。摂餌量減少に関連して、1.63 mg/kg 以上の群の雄で軽微な体重減少が用量依存的に認められた。摂餌量及び体重の減少は一過性であり、摂餌量は投与の継続により増加し、体重は 1 ヵ月間の回復期間後に溶媒対照群と同程度に回復した。

神経学的検査、眼科学的検査、臨床検査、剖検及び病理組織学的検査において、デュラグルチド投与による重要な変化は認められなかった。投与部位の病理組織学的変化として、亜急性～慢性炎症、筋肉変性又は色素含有マクロファージがデュラグルチド投与群と溶媒対照群の両群で認められた（発現例数は溶媒対照群、0.41、1.63 及び 8.15 mg/kg 群でそれぞれ 2、2、0 及び 4 例）。抗デュラグルチド抗体は検出されなかった。

以上、当試験では薬理作用に関連した摂餌量及び体重の一過性の減少が認められたが、概して動物の健康状態に悪影響を及ぼすものではなかった。標的器官毒性は認められず、当試験の NOAEL は 8.15 mg/kg と判断した［AUC に基づくと臨床用量の 620 倍（表 2.6.6-26）］。

2.6.6.3.7 サルを用いた 9 ヵ月間反復投与毒性試験及び 2 ヵ月間回復性試験

（添付資料 4.2.3.2.7、7608-235 試験、表 2.6.7.7G）

雌雄カニクイザル（3～5 年齢）にデュラグルチドを週 2 回、約 9 ヵ月間（計 79 回）反復皮下投与し、その後 2 ヵ月間の回復期間を設けたときの安全性薬理パラメータ、毒性、免疫原性及び TK を評価した。

用量は、サルを用いた 3 ヵ月間反復毒性試験（7608-192 試験）と同じ 0、0.41、1.63 及び 8.15 mg/kg に設定した。

試験デザインを表 2.6.6-7 に示す。毒性評価項目は死亡、一般状態、体重、体重増加量、摂餌量（定性的）、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、免疫原性、抗 Keyhole limpet hemocyanin（KLH）免疫グロブリン（Ig）M 及び IgG 抗体産生、イムノフェノタイピング、器官重量、剖検及び病理組織学的検査とした。

表 2.6.6-7 サル 9 ヵ月間毒性試験及び 2 ヵ月間回復性試験の試験デザイン

用量 (mg/kg)	例数 [a]		投与液濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)
	雄	雌		
0[b]	6[a]	6[a]	0[b]	1
0.41	4	4	0.41	1
1.63	4	4	1.63	1
8.15	6[a]	6[a]	8.15	1

[a] 0 及び 8.15 mg/kg 群の雌雄各 2 例を回復試験群とし、溶媒又はデュラグルチドを約 9 ヵ月間反復投与した後、2 ヵ月間の回復期間を設けて毒性変化の回復性、持続性又は遅延毒性の有無を評価した。
[b] 溶媒対照群：0.02%ポリソルベート 80 及び 150 mM 塩化ナトリウムを含む 10 mM クエン酸緩衝液、pH 6.5

心血管系に関する安全性薬理評価の成績は第 2.6.2.4 項に示す。TK データは第 2.6.4.3.4 項にて考察した。臨床用量との AUC 比は、0.41、1.63 及び 8.15 mg/kg 群でそれぞれ 42.0、147 及び 774 倍であった（表 2.6.6-26）。

8.15 mg/kg 群の雌 1 例で、試験 4 日に糞排泄量及び摂餌量の減少を伴う円背位及び脱水症状が認められた。この個体は食欲不振と判断され、試験 5 日に状態が悪化したため輸液及び補給食を与えて投与を中断した。試験 9、10 及び 11 日は摂餌が認められず、投与を再開できず毒性評価が不可能となったため試験 17 日に安楽殺した。

デュラグルチド投与群で一過性の摂餌量減少が用量依存的に認められ、これは試験 2 週に最も顕著であった。また、主に試験 1 週に 0.41 及び 8.15 mg/kg 群で嘔吐が認められた。摂餌量減少に伴って糞排泄量減少が認められたほか、一過性の軽微な体重減少が用量依存的に認められた。投与期間終了時の体重は 1.63 mg/kg 以上の用量でわずかに低下し、その低下は雌でのみ溶媒対照群と比較して統計学的に有意であった。摂餌量は投与の継続により回復し、体重低下は 2 ヵ月間の休薬により回復傾向が認められたことから、これらの変化は毒性と判断しなかった。

抗 KLH IgM 及び IgG 抗体の産生に対するデュラグルチド投与の影響は認められなかった。イムノフェノタイピングにおける末梢血 T 細胞、B 細胞及び NK 細胞の変化は軽微であり、毒性と判断しなかった。抗デュラグルチド抗体は検出されなかった。

眼科学的検査、臨床検査、剖検及び病理組織学的検査において、デュラグルチド投与による重要な変化は認められなかった。病理組織学的検査において、投与部位の炎症性

細胞浸潤、筋肉変性、出血及び線維化を呈する個体が散見されたが、その発現頻度及び重症度に群間又は投与部位間での差は認められなかった。

以上、当試験では薬理作用に関連した摂餌量及び体重の一過性の減少が認められたが、概して動物の健康状態に悪影響を及ぼすものではなかった。また、体重低下は休薬により回復傾向が認められた。標的器官毒性は認められず、当試験の NOAEL は 8.15 mg/kg と判断した［AUC に基づくと臨床用量の 774 倍（表 2.6.6-26）］。

2.6.6.4　遺伝毒性試験

デュラグルチドは天然型アミノ酸で構成されるタンパク質であり、核酸や染色体と直接に相互作用する可能性は低いため、遺伝毒性試験は実施していない。

2.6.6.5　がん原性試験

デュラグルチドのがん原性を評価するため、Sprague Dawley ラットを用いた長期がん原性試験及び 001178-T（ヘミ接合）CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic マウスを用いた短期がん原性試験を実施した。投与経路は、臨床投与経路である皮下を選択した。

2.6.6.5.1　ラットを用いた長期がん原性試験

（添付資料 4.2.3.4.1.1、8203405 試験、表 2.6.7.10A）

雌雄 Sprague Dawley ラット（約 7 週齢）にデュラグルチドを週 2 回、104 週間反復皮下投与したときのがん原性及び TK を評価した。

用量設定は、ラットにデュラグルチドを 0、1.63、4.89 及び 16.29 mg/kg の用量で投与した 6 ヵ月間反復投与毒性試験（7608-236 試験）の成績に基づく。この試験では、用量依存的な摂餌量減少とそれに伴う体重減少が認められ、各用量群の投与期間終了時の体重は溶媒対照群と比較して雄で 7%、14%及び 18%、雌で 16%、16%及び 19%低下した。したがって、10%以上の体重低下を示し、臨床用量との AUC 比が 25 倍以上になると推定される 5 mg/kg を当試験の最高用量に設定した。

試験デザインを表 2.6.6-8 に示す。毒性評価項目は死亡、一般状態、体重、体重増加量、摂餌量及び病理組織学的検査とした。

表 2.6.6-8 ラット長期がん原性試験の試験デザイン

用量（mg/kg）	例数		投与液濃度（mg/mL）	投与容量（mL/kg）
	雄	雌		
毒性評価群				
0[a]	60	60	0[a]	0.5
0.05	60	60	0.1	0.5
0.5	60	60	1	0.5
1.5	60	60	3	0.5
5	60	60	10	0.5
トキシコキネティクス評価群				
0[a]	6	6	0[a]	0.5
0.05	12	12	0.1	0.5
0.5	12	12	1	0.5
1.5	12	12	3	0.5
5	12	12	10	0.5

[a] 溶媒対照群：0.02%ポリソルベート 80 及び 4.7%マンニトールを含む 10 mM クエン酸緩衝液、pH 6.5 ± 0.2

TK データは第 2.6.4.3.2 項にて考察した。臨床用量との AUC 比は、0.05、0.5、1.5 及び 5 mg/kg 群でそれぞれ 0.829、12.2、32.5 及び 95.0 倍であった（表 2.6.6-26）。

当試験では溶媒対照群の死亡率が高く、生存数が 20 例/性/群を下回ったため、米国食品医薬品局（FDA）の Executive Carcinogenicity Assessment Committee と協議の上、当初計画した 104 週より早い 93 週で試験を終了したが、がん原性評価に十分な数の個体が試験 80 週以上まで生存した（表 2.6.6-9）。デュラグルチド投与群では溶媒対照群と比較して生存率が上昇し、0.5 及び 5 mg/kg 群の雄及び 0.05、0.5 及び 1.5 mg/kg 群の雌における生存率の上昇は統計学的に有意であった。生存率の上昇は体重低下に関連する変化と考えられた（Keenan et al. 1997）。デュラグルチド投与群に特異的な死因は認められなかった。

表 2.6.6-9 ラット長期がん原性試験の試験 93 週における生存率

性	雄					雌				
用量（mg/kg）	0	0.05	0.5	1.5	5	0	0.05	0.5	1.5	5
総動物数	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
生存動物数	19	27	29	29	35	20	30	30	28	27
生存率	32	45	48*	48	58**	33	50*	50*	47*	45

* $p \leq 0.05$
** $p \leq 0.01$

デュラグルチド投与群では削痩の発現頻度が上昇した。体重、体重増加量及び摂餌量は概して用量依存的に低下し、5 mg/kg 群で最も顕著であった。また、触知可能な腹部腫瘤の発現頻度がデュラグルチド投与群の雄で低下したが、雌では溶媒対照群との差は認められなかった。これらの変化はわずかであり、用量相関性も明確ではないことから、偶発的で自然発生的な変化であり、デュラグルチド投与との関連性はないと判断した。

投与に関連した剖検所見は認められなかった。

0.5 mg/kg 以上の用量で甲状腺の C 細胞腺腫並びに C 細胞腺腫/癌（合算）の発現頻度が溶媒対照群と比較して統計学的に有意に上昇し、デュラグルチド投与による変化と考えられた（表 2.6.6-10）。また、統計学的有意差はないものの 5 mg/kg 群で C 細胞癌の発

現頻度が数的に上昇した。5 mg/kg 群の雌雄及び 1.5 mg/kg 群の雄では C 細胞のびまん性過形成の発現頻度が統計学的に有意に上昇し、0.5 mg/kg 以上の群の雌で C 細胞の限局性過形成の発現頻度が統計学的に有意に上昇した。雄ラットでは限局性過形成の発現頻度は低下したが、これは腺腫の発現頻度が上昇したことによる相対的な変化と考えられた。甲状腺以外の組織では、デュラグルチド投与による腫瘍は認められなかった。

表 2.6.6-10　ラット長期がん原性試験における甲状腺 C 細胞過形成、腺腫及び癌の発現頻度

性	雄					雌				
用量（mg/kg）	0	0.05	0.5	1.5	5	0	0.05	0.5	1.5	5
評価例数	60	59	60	60	60	60	59	60	60	60
甲状腺 C 細胞　びまん性過形成	9	9	16	19*	28**	7	6	12	11	25**
甲状腺 C 細胞　限局性過形成	39	28†	25‡	25‡	15‡	7	11	20**	20**	20**
甲状腺 C 細胞　腺腫	10	14	25*	24**	31#	7	6	19**	19*	32#
甲状腺 C 細胞　癌	1	0	2	2	4	1	0	1	1	4
甲状腺 C 細胞　腺腫/癌（合算）	11	14	27**	24**	33#	8	6	20*	20*	35#

* p≤0.05（上昇）
** p≤0.01（上昇）
# p≤0.005（傾向検定）又は p≤0.01（高頻度腫瘍について高用量の比較）
† p≤0.05（低下）
‡ p≤0.01（低下）

甲状腺以外の組織における病理組織学的所見として、5 mg/kg 群の雄で投与部位におけるリンパ球/マクロファージ浸潤の発現頻度のわずかな上昇が認められたが、雌では溶媒対照群との差は認められなかった。重症度の上昇はわずかでありデュラグルチド投与との関連が明確でないこと、用量依存性を欠くこと、片性のみの変化であることに加えて、雄の溶媒対照群は生存率が低くデュラグルチド投与群よりも投与回数が少なかったことを考慮し、5 mg/kg 群の雄で認められた投与部位における病理組織学的所見は投与による変化ではないと判断した。膵臓における病理組織学的変化や腫瘍形成は認められなかった。他の非腫瘍性病変として、腎盂における鉱質沈着、炎症/出血及びこれに伴う移行上皮過形成の発現頻度の数的上昇が 1.5 及び 5 mg/kg 群の雄で認められたが、偶発的な背景病変であり、デュラグルチド投与による変化ではないと判断した。

以上、当試験ではデュラグルチド投与による生存率の上昇が認められた。デュラグルチド投与群では削痩の発現頻度が上昇したほか、摂餌量及び体重増加量が用量依存的に低下した。これらの変化は薬理作用に関連した変化と考えられた。また、0.5 mg/kg 以上の用量で C 細胞腺腫並びに C 細胞腺腫/癌（合算）の発現頻度が統計学的に有意に上昇したほか、統計学的有意差はないものの 5 mg/kg 群で C 細胞癌の発現頻度が数的に上昇した。また、5 mg/kg 群の雌雄及び 1.5 mg/kg 群の雄で C 細胞のびまん性過形成の発現頻度が上昇し、0.5 mg/kg 以上の群の雌で C 細胞の限局性過形成の発現頻度が上昇した。腫瘍に関する無影響量（NOEL）は 0.05 mg/kg と判断した［AUC に基づくと臨床用量の 0.829 倍（表 2.6.6-26）］。

2.6.6.5.2 rasH2 トランスジェニックマウスを用いた短期がん原性試験

（添付資料 4.2.3.4.2.1、8224144 試験、表 2.6.7.10B）

雌雄 001178-T（ヘミ接合）CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic マウス（8～9 週齢）にデュラグルチドを週 2 回、26 週間反復皮下投与し、がん原性を評価した。TK 評価には 001178-W（野生型）マウスを用いた。

用量設定は、001178-W（野生型）マウスにデュラグルチドを 0、1、10 及び 100 mg/kg の用量で投与した 1 ヵ月間反復投与毒性試験（8224143 試験）の成績に基づく。この試験では 10 及び 100 mg/kg 群で顕著な体重減少が認められたことから、3 mg/kg を当試験の最高用量に設定した。投与経路、動物種及び用量を含む試験デザインは、FDA の Executive Carcinogecitiy Assessment Committee で審査、承認されている。

試験デザインを表 2.6.6-11 に示す。評価項目は、死亡、一般状態、眼科学的検査、体重、体重増加量、摂餌量、臨床検査、器官重量、剖検及び病理組織学的検査（甲状腺のカルシトニン染色を含む）とした。なお、exendin-4 を投与した非糖尿病ラットで主膵管及び膵管腺の増殖性変化が認められたとの報告を踏まえ（Gier et al. 2012b）、当試験では膵臓全体を縦軸方向に薄切して膵頭部、体部及び尾部を含む広い領域について病理組織学的検査を実施した。

表 2.6.6-11 rasH2 トランスジェニックマウス短期がん原性試験の試験デザイン

用量（mg/kg）	例数		投与液濃度（mg/mL）	投与容量（mL/kg）
	雄	雌		
毒性評価群				
0[a]	25	25	0[a]	3
0.3	25	25	0.1	3
1	25	25	0.33	3
3	25	25	1	3
75[b]	25	25	7.5	10
トキシコキネティクス評価群				
0[a]	12	12	0[a]	3
0.3	42	42	0.1	3
1	42	42	0.33	3
3	42	42	1	3

[a] 溶媒対照群：0.02%ポリソルベート 80 及び 4.7%マンニトールを含む 10 mM クエン酸緩衝液、pH 6.5 ± 0.2
[b] 陽性対照群：*N*-メチル-*N*-ニトロソウレアを試験 1 日に単回腹腔内投与

TK データは第 2.6.4.3.1 項にて考察した。臨床用量との AUC 比は、0.3、1 及び 3 mg/kg 群でそれぞれ 1.76、4.76 及び 7.56 倍であった（表 2.6.6-26）。

デュラグルチド投与による生存率の変化（表 2.6.6-12）、一般状態の変化及び腫瘤の発現頻度の上昇は認められなかった。

表 2.6.6-12 rasH2 トランスジェニックマウス短期がん原性試験における死亡例数

性	雄				雌			
用量（mg/kg）	0	0.3	1	3	0	0.3	1	3
毒性評価群	5	2	2	1	1	0	1	2
トキシコキネティクス評価群	0	1	0	0	0	0	1	0

薬理作用に関連した摂餌量減少及び体重低下は主に雄に認められた。試験終了時の体重及び試験期間を通した体重増加量は、デュラグルチド投与群の雄では溶媒対照群よりも低かったが、雌では溶媒対照群よりも高かった。

白血病を示唆する血液学的パラメータの変化や、毒性学的に重要な臨床検査値の変化は認められなかった。

眼科学的検査でデュラグルチド投与による変化は認められなかった。剖検において、デュラグルチド投与による肉眼所見は認められなかった。器官重量の測定において、雌の全用量群で脾臓重量の増加が認められた。

病理組織学的検査において、がん原性を示唆する所見は認められなかった。デュラグルチドを投与した全用量群で甲状腺 C 細胞の細胞質肥大/カルシトニン染色性の軽微な増加が認められたが（表 2.6.6-13）、過形成及び腫瘍は認められなかった。

甲状腺以外における病理組織学的所見として、3 mg/kg 群の雌雄で投与部位における炎症の発現頻度及び重症度の軽度の上昇が認められた。また、デュラグルチドを投与した雌の全用量群で脾臓における軽微～軽度の髄外造血亢進が認められ（表 2.6.6-13）、脾臓重量の増加に関連すると考えられた。1 mg/kg 以上の群の雌で溶媒対照群と比較して統計学的に有意な赤血球関連パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値）の低下が認められたことから、脾臓における髄外造血亢進は赤血球の減少に対する再生性変化と考えられた。骨髄の再生性変化は認められなかった。雄でも雌と同様に赤血球数の減少が認められたが、髄外造血亢進を示唆する病理組織学的所見は認められなかった。膵臓の壊死、炎症及び増殖性変化は認められなかった。

表 2.6.6-13 rasH2 トランスジェニックマウス短期がん原性試験における甲状腺及び脾臓の非腫瘍性変化の発現頻度

性	雄				雌			
用量（mg/kg）	0	0.3	1	3	0	0.3	1	3
甲状腺								
C 細胞、細胞質肥大/カルシトニン染色性増加	1/20	6/23	10/23	16/23	0/24	3/25	11/24	10/23
脾臓								
髄外造血亢進	3/25	1/25	0/25	3/25	4/25	16/25	24/25	21/25

N-メチル-*N*-ニトロソウレア投与群では、死亡及び腫瘍の発現頻度の上昇が認められた。

以上、当試験では、デュラグルチド投与による死亡、標的器官毒性及び腫瘍の発現頻度の上昇は認められなかった。薬理作用に関連した摂餌量減少及びそれに伴う体重低下が認められたが、動物の健康状態に悪影響を及ぼすものではなかった。腫瘍に関する NOEL は 3 mg/kg と判断した［AUC に基づくと臨床用量の 7.56 倍（表 2.6.6-26）］。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

デュラグルチドの生殖発生毒性を評価するため、以下に示す試験を実施した。試験動物種には生殖発生毒性試験で汎用されており、デュラグルチドの薬理作用が示されている Sprague Dawley ラット及びニュージーランドホワイトウサギを選択した。投与経路は、臨床投与経路である皮下を選択し、3 日に 1 回反復皮下投与した。

・雄ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験
・雌ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験
・ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験
・ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験
・ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

また、GLP-1 受容体作動薬の投与が性成熟や中枢神経系の発達に影響を及ぼす可能性を海外規制当局から指摘されたことを踏まえ、新生児ラットを用いた毒性試験を実施し、ラットの性成熟／生殖機能と中枢神経系の発達に対するデュラグルチドの影響を評価した。

2.6.6.6.1 雄ラットを用いた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 4.2.3.5.1.1、[redacted]-353113 試験、表 2.6.7.12A）

雄 Sprague Dawley ラット（約 8.5 週齢）の交配前及び交配期間中、3 日ごとにデュラグルチドを反復皮下投与し、雄生殖能に対する影響を評価した。

用量は、ラットを用いた 1 ヵ月間反復投与毒性試験（R00359 試験）と同じく 0、2、6 及び 20 mg/kg に設定した。しかし、分析に用いたデュラグルチドの吸光係数が最終報告書の作成後に更新され、実際に投与した用量は 0、1.63、4.89 及び 16.3 mg/kg に変更された。

試験デザインを表 2.6.6-14 に示す。交配前の 4 週間及び交配期間の 2 週間、雄ラットにデュラグルチドを 3 日ごとに投与し、投与期間中の死亡、一般状態、体重、体重増加量及び摂餌量（雄のみ）を評価した。また、最終投与後 3 日以内に安楽殺し、精子検査（12 例/群、運動性及び形態は全群、精巣上体の精子濃度は溶媒対照群及び 16.3 mg/kg 群のみ）、生殖器官の重量測定（全群）及び病理組織学的検査（溶媒対照群及び 16.3 mg/kg 群のみ）を実施した。雌には投与を行わず、妊娠 15 日に雌の子宮を摘出して交配成績を評価した。

表 2.6.6-14 雄ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験の試験デザイン

用量 (mg/kg)	例数	投与液濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)
	雄		
0[a]	20	0[a]	1
1.63	20	1.63	1
4.89	20	4.89	1
16.3	20	16.3	1

[a] 溶媒対照群：0.02%ポリソルベート 80 及び 150 mM 塩化ナトリウムを含む 10 mM クエン酸緩衝液、pH 6.5 ± 0.2

当試験において TK の評価は実施しなかったが、ラットを用いた 6 ヵ月間反復投与毒性試験（7608-236 試験）の TK 評価に基づくと、臨床用量との AUC 比は 1.63、4.89 及び 16.3 mg/kg 群でそれぞれ 24.7、60.7 及び 264 倍と推定された（表 2.6.6-26）。

雄の全例が計画剖検時まで生存した。

4.89 及び 16.3 mg/kg 群の全例で初回投与の 2 日後に糞排泄量の減少が認められたほか、デュラグルチドを投与した全用量群で投与期間を通して鼻周囲の赤色物質の発現頻度が上昇した。デュラグルチドを投与した全用量群で、初回及び 2 回目の投与後に溶媒対照群と比較して統計学的に有意な摂餌量及び体重の減少が認められた。その結果、体重は試験期間を通して溶媒対照群よりも低い値で推移した。2 回目の投与以降、体重増加量に対するデュラグルチド投与の影響は認められなかった。

16.3 mg/kg 群の交尾率［交尾動物数/交配動物数（%）］は 85%であり、溶媒対照群の 100%よりわずかに低かったが、精子検査、剖検及び病理組織学的検査で関連する変化が認められなかったことから、デュラグルチド投与による変化ではないと判断した。雄の受精率［妊娠させた動物数/交配動物数（%）］及び受胎率［妊娠させた動物数/交尾動物数（%）］、雌の受胎率［妊娠動物数/交尾動物数（%）］並びに交配所要日数の変化は認められなかった。

16.3 mg/kg 群では精嚢/凝固腺、前立腺、精巣上体及び精巣の重量（実重量及び相対重量）が減少し、4.89 mg/kg 群では精嚢/凝固腺及び前立腺の重量（実重量及び相対重量）が減少した。Sprague Dawley ラットでは摂餌制限及びそれに伴う体重減少による生殖器官重量の減少が報告されていることから（Chapin et al. 1993; O'Connor et al. 2000）、当試験で認められた器官重量の減少は摂餌量減少及び体重低下に伴う変化と考えられた。関連した病理組織学的変化が認められず、また雄生殖能に対する影響が認められなかったことから、器官重量の減少は毒性と判断しなかった。

胚・胎児の子宮内生存に対するデュラグルチドの影響は認められなかった。

以上、当試験では薬理作用に関連した摂餌量減少及び体重低下並びに生殖器官の重量減少が認められたが、動物の健康状態に悪影響を及ぼすものではないことから毒性と判断しなかった。雄生殖能及び一般毒性に関する NOAEL は 16.3 mg/kg と判断した。いずれの用量においても胚・胎児生存に対する影響は認められず、初期胚発生に関する NOAEL は 16.3 mg/kg と判断した［AUC に基づくと臨床用量のおよそ 264 倍（表 2.6.6-26）］。

2.6.6.6.2 雌ラットを用いた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、[redacted]-353112 試験、表 2.6.7.12B）

雌 Sprague Dawley ラット（約 11 週齢）の交配前及び交配期間中、3 日ごとにデュラグルチドを反復皮下投与し、雌生殖能に対する影響を評価した。

用量は、ラットを用いた 1 ヵ月間反復投与毒性試験（R00359 試験）と同じく 0、2、6 及び 20 mg/kg に設定した。しかし、分析に用いたデュラグルチドの吸光係数が最終報告書の作成後に更新され、実際に投与した用量は 0、1.63、4.89 及び 16.3 mg/kg に変更された。

試験デザインを表 2.6.6-15 に示す。正常な性周期を有することを確認した雌に、交配前の 2 週間から交配期間を通して妊娠 4～6 日（交尾確認日により異なる）まで、3 日ごとにデュラグルチドを投与した。雄には投与を行わなかった。妊娠 15 日に母動物の生殖パラメータ及び胎児の生死を評価した。

表 2.6.6-15 雌ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験の試験デザイン

用量 (mg/kg)	例数 雌	投与液濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)
0[a]	20	0[a]	1
1.63	20	1.63	1
4.89	20	4.89	1
16.3	20	16.3	1

[a] 溶媒対照群：0.02%ポリソルベート 80 及び 150 mM 塩化ナトリウムを含む 10 mM クエン酸緩衝液、pH 6.5 ± 0.2

当試験において TK の評価は実施しなかったが、ラットを用いた 6 ヵ月間反復投与毒性試験（7608-236 試験）の TK 評価に基づくと、臨床用量との AUC 比は 1.63、4.89 及び 16.3 mg/kg 群でそれぞれ 24.7、60.7 及び 264 倍と推定された（表 2.6.6-26）。

4.89 mg/kg 群の雌 1 例は、一般状態の悪化のため試験 3 日に安楽殺した。剖検の結果、尿路結石が原因と考えられ、投与との関連はないと判断した。また、同群の別の 1 例が交尾未確認のまま分娩した。その他の個体は計画剖検時まで生存した。

4.89 及び 16.3 mg/kg 群では、胸腹部の脱毛及び鼻周囲の赤色物質の発現頻度が用量依存的に上昇した。また、16.3 mg/kg 群では主に交配前に糞排泄量減少が認められ、これは摂餌量減少と関連した。

交配前及び妊娠期間を通して、デュラグルチドを投与した全用量群で摂餌量減少及びそれに伴う体重又は体重増加量の低下が認められた。体重増加量の低下は試験 0～3 日（初回投与後）に全用量群で、試験 3～6 日に 16.3 mg/kg 群で、試験 12～14 日（交配前最終日）に全用量群で認められた。体重増加量の低下に伴い、交配前期間の 1.63、4.89 及び 16.3 mg/kg 群の体重は溶媒対照群と比較してそれぞれ最大 4.5%、8.6%及び 12.2%低下した。体重増加量の低下は妊娠 0～6 日にも認められ、この期間の 1.63、4.89 及び 16.3 mg/kg 群の体重は溶媒対照群と比較してそれぞれ最大 7.7%、12.1%及び 13.2%低下した。投与終了後の妊娠 6～15 日には、4.89 及び 16.3 mg/kg 群で代償性に体重増加量の上昇が認められた。

4.89 及び 16.3 mg/kg 群において、5 日間を上回る発情周期又は不完全な発情周期を示す個体が増加し、発情周期に対する軽微な影響（発情休止期の延長）が示唆された。1.63、4.89 及び 16.3 mg/kg 群の発情周期はそれぞれ 4.1、4.6 及び 4.8 日であり（完全な発情周期が 1 回以上認められた個体のデータに基づく）、溶媒対照群（4.0 日）との統計学的な有意差は認められず、また試験実施施設の背景データ（4.5 日）と同程度であった。発情周期に対する影響は摂餌量減少及び体重低下に関連すると考えられた。

交尾率［交尾動物数/交配動物数（%）］、受精率［妊娠動物数/交配動物数（%）］及び受胎率［妊娠動物数/交尾動物数（%）］に対するデュラグルチド投与の影響は認められなかった。摂餌量減少及び体重低下に関連して、デュラグルチドを投与した全用量

群で黄体数が軽度に減少し、これに伴って着床数及び生存胎児数が減少した。これらの変化は 4.89 及び 16.3 mg/kg 群で統計学的に有意であったが、変化の程度は小さく、交尾率、受精率、受胎率及び胚生存率に対する影響が認められなかったことから、毒性学的な重要性は低いと判断した。

以上、当試験では薬理作用に関連した摂餌量減少及び体重低下がデュラグルチドを投与した全用量群で認められ、母動物の一般毒性に関する NOAEL は 1.63 mg/kg 未満と判断した。4.89 及び 16.3 mg/kg 群［AUC に基づくと臨床用量のおよそ 60.7 及び 264 倍（表 2.6.6-26）］で認められた発情周期、黄体数、着床数及び生存胎児数のわずかな変化は摂餌量及び体重の変化に伴うものと考えられ、交尾率、受精率、受胎率及び胚生存率に対する影響が認められなかったことから、毒性学的な重要性は低いと判断した。雌生殖能に関する NOAEL は 1.63 mg/kg と判断した［AUC に基づくと臨床用量のおよそ 24.7 倍（表 2.6.6-26）］

2.6.6.6.3 ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験

（添付資料 4.2.3.5.2.1、[redacted]-353116 試験、表 2.6.7.13A）

雌 Sprague Dawley ラット（約 12 週齢）に胎児の器官形成期にわたってデュラグルチドを反復皮下投与し、母動物に対する影響並びに胚・胎児の生存、成長及び形態に対する影響を評価した。

ラットを用いた 1 ヵ月間反復投与毒性試験（R00359 試験）において 20 mg/kg 群で顕著な摂餌量及び体重の減少が認められたことに基づき、当試験の用量は 0、0.6、2 及び 6 mg/kg に設定した。しかし、分析に用いたデュラグルチドの吸光係数が最終報告書の作成後に更新され、実際に投与した用量は 0、0.49、1.63 及び 4.89 mg/kg に変更された。

試験デザインを表 2.6.6-16 に示す。妊娠 6、9、12 及び 15 日に雌ラットにデュラグルチドを投与し、妊娠 20 日に母動物の生殖パラメータ並びに胎児の生死、体重、性別及び形態を評価した。TK 評価群は同様の投与スケジュールとし、妊娠 15 日に TK 評価を実施した。

表 2.6.6-16 ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験の試験デザイン

用量 (mg/kg)	例数 雌	投与液濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)
毒性評価群			
0[a]	25	0[a]	1
0.49	25	0.49	1
1.63	25	1.63	1
4.89	25	4.89	1
トキシコキネティクス評価群			
0[a]	4	0[a]	1
0.49	8	0.49	1
1.63	8	1.63	1
4.89	8	4.89	1

[a] 溶媒対照群：0.02%ポリソルベート 80 及び 150 mM 塩化ナトリウムを含む 10 mM クエン酸緩衝液、pH 6.5 ± 0.2

TK データは第 2.6.4.3.2 項にて考察した。臨床用量との AUC 比は、0.49、1.63 及び 4.89 mg/kg 群でそれぞれ 7.15、22.5 及び 71.1 倍であった（表 2.6.6-26）。

4.89 mg/kg 群（毒性評価群）で、雌 1 例が妊娠 8 日（初回投与の約 48 時間後）に死亡発見された。この個体は死亡日に円背位、自発運動の低下、身体及び四肢の冷触感、糞排泄量減少並びに眼、鼻、口及び前肢周囲の赤色物質といった一般状態の変化を示した。死因を特定する剖検所見は認められず、病理組織学的検査は実施しなかった。剖検所見が認められなかったこと、1/33 例のみの死亡であったこと並びにより高用量（最高 20 mg/kg）をラットに投与した 1 ヵ月間反復投与毒性試験においてデュラグルチド投与による死亡が認められなかったことを踏まえ、当該死亡は投与による影響ではないと判断した。

デュラグルチド投与による一般状態の変化として、1.63 及び 4.89 mg/kg 群で円背位、胸腹部の脱毛、糞排泄量減少並びに前肢や眼、鼻及び口周囲の赤色物質の発現頻度が上昇した。円背位は妊娠 7 日に顕著であったが、他の一般状態の変化はおおむね試験期間を通して散見された。

デュラグルチドを投与した全用量群の母動物において、試験期間を通して摂餌量減少並びにそれに伴う体重低下、体重増加量の低下又は体重減少が認められた。0.49、1.63 及び 4.89 mg/kg 群における妊娠 6～20 日の体重増加量は、溶媒対照群と比較してそれぞれ 13%、22%及び 41%低下した。

黄体数及び着床数に対するデュラグルチド投与の影響は認められなかった。4.89 mg/kg 群の胎児で生存率がわずかに低下したものの、90%以上であった。1.63 及び 4.89 mg/kg 群の胎児で用量依存的な体重低下が認められたほか、4.89 mg/kg 群の胎児で体重低下に伴う骨化変異（頭蓋骨の骨化度低下、胸骨核分節及び舌骨の未骨化並びに椎弓の骨化度低下）が認められ、発育遅延が示唆された。0.49 mg/kg 群の胎児では、発生に対する影響は認められなかった。いずれの用量においても催奇形性は認められなかった。

以上、当試験ではデュラグルチドを投与した全用量群の母動物において薬理作用に関連した摂餌量減少及びそれに伴う体重低下が認められ、母動物の一般毒性に関する NOAEL は 0.49 mg/kg 未満と判断した。4.89 mg/kg 群で胎児生存率のわずかな低下が認められ、また 1.63 及び 4.89 mg/kg 群で母動物に対する影響に伴う胎児の体重低下が認められたことから、胚・胎児発生に関する NOAEL は 0.49 mg/kg と判断した［AUC に基づくと臨床用量の 7.15 倍（表 2.6.6-26）］。4.89 mg/kg 群の胎児で体重低下に伴う骨化変異が認められたが［AUC に基づくと臨床用量の 71.1 倍（表 2.6.6-26）］、催奇形性は認められなかった。

2.6.6.6.4 ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験

（添付資料 4.2.3.5.2.2、[redacted]-353119 試験、表 2.6.7.13B）

雌ニュージーランドホワイトウサギ（約 5 ヵ月齢）に胎児の器官形成期にわたってデュラグルチドを反復皮下投与し、母動物に対する影響並びに胚・胎児の生存、成長及び形態に対する影響を評価した。

用量設定は、雌ニュージーランドホワイトウサギ（5 例/群）にデュラグルチドを 0、0.08、0.41、1.63 及び 4.07 mg/kg の用量で妊娠 7、10、13、16 及び 19 日に反復皮下投与した予備試験成績に基づく（[redacted]-353111 試験、表 2.6.7.11）。この予備試験では、1.63 mg/kg 以上の群の母動物に顕著な体重減少、食欲不振又は糞排泄量減少が認められたことから最大耐用量を超えると判断し、1.63 及び 4.07 mg/kg 群の全例を妊娠 13 日の投与前に安楽殺した。0.08 及び 0.41 mg/kg 群の母動物では妊娠 7～10 日に摂餌量減少及びそれに伴う体重減少が認められたが、投与期間終了後（妊娠 22～29 日）にはリバウンドによる摂餌量及び体重の増加が認められた。胎児の生存、成長及び外表形態に対する影響は認められなかった。これらの試験成績に基づき、当試験の用量は 0、0.04、0.12 及び 0.41 mg/kg と設定した。

試験デザインを表 2.6.6-17 に示す。妊娠 7、10、13、16 及び 19 日に雌ウサギにデュラグルチドを投与し、妊娠 29 日に母動物の生殖パラメータ並びに胎児の生死、体重、性別及び形態を評価した。TK 評価群は同様の投与スケジュールとし、妊娠 7 及び 19 日に TK 評価を実施した。

表 2.6.6-17　ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験の試験デザイン

用量 (mg/kg)	例数 雌	投与液濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)
毒性評価群			
0[a]	20	0[a]	0.25
0.04	20	0.16	0.25
0.12	20	0.48	0.25
0.41	20	1.64	0.25
トキシコキネティクス評価群			
0[a]	4	0[a]	0.25
0.04	4	0.16	0.25
0.12	4	0.48	0.25
0.41	4	1.64	0.25

[a] 溶媒対照群：0.02%ポリソルベート 80 及び 150 mM 塩化ナトリウムを含む 10 mM クエン酸緩衝液、pH 6.5 ± 0.2

TK データは第 2.6.4.3.3 項にて考察した。臨床用量との AUC 比は、0.04、0.12 及び 0.41 mg/kg 群でそれぞれ 1.92、7.22 及び 21.2 倍であった（表 2.6.6-26）。

妊娠 28 日に分娩した溶媒対照群 1 例を除き、すべての個体が計画剖検時まで生存した。

いずれの群においても、特筆すべき肉眼所見は認められなかった。

デュラグルチドを投与した全用量群の母動物において、試験期間を通して摂餌量減少が認められた。0.12 及び 0.41 mg/kg 群では摂餌量減少に伴う糞排泄量減少の発現頻度の上昇が認められた。また、0.12 及び 0.41 mg/kg 群で初回投与後（妊娠 7～10 日）に顕著な体重減少が認められ（それぞれ 63 g 及び 205 g）、その結果妊娠 10～22 日における体重は溶媒対照群と比較してそれぞれ 4.2%～5.1%及び 6.3%～9.0%低下した。投与期間終了後（妊娠 22～29 日）にはリバウンドによる摂餌量及び体重の増加が認められ、この期間の体重増加量は溶媒対照群と比較してデュラグルチドを投与した全用量群で統計学的に有意に高かった。

胎児の発育及び生存に対するデュラグルチド投与の影響は認められなかった。母動物の摂餌量及び体重の変化に関連して、0.41 mg/kg 群で胎児骨格に対する影響（肋骨異常を伴う又は伴わない椎骨異常、完全な第 13 肋骨、27 前仙椎椎骨、肋骨の骨化度低下など）が認められた。デュラグルチドの催奇形性を示唆する所見は認められなかった。

以上、当試験では 0.12 及び 0.41 mg/kg 群の母動物において薬理作用に関連した摂餌量減少及びそれに伴う体重低下が認められ、母動物の一般毒性に関する NOAEL は 0.04 mg/kg と判断した。母動物に対する影響に関連して、0.41 mg/kg 群の胎児で椎骨及び肋骨に対する影響が認められたが［AUC に基づくと臨床用量の 21.2 倍（表 2.6.6-26）］、催奇形性を示唆する所見は認められなかった。胚・胎児発生に関する NOAEL は 0.12 mg/kg と判断した［AUC に基づくと臨床用量の 7.22 倍（表 2.6.6-26）］。

2.6.6.6.5　ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

（添付資料 4.2.3.5.3.1、[redacted]-353253 試験、表 2.6.7.14）

着床から離乳期の間、雌 Sprague Dawley ラット（約 13 週齢）にデュラグルチドを反復皮下投与し、母動物の妊娠、分娩及び授乳に対する影響並びに F1 児の生存、成長及び発達に対する影響を評価した。また、F1 世代の生殖能及び行動（F2 世代の分娩まで）を評価した。

ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験（[redacted]-353116 試験）において、4.89 mg/kg 群の胎児に体重低下に伴う骨化変異が認められたことから、当試験の用量は 0、0.2、0.49 及び 1.63 mg/kg と設定した。

試験デザインを表 2.6.6-18 に示す。毒性評価群には妊娠 6、9、12、15、18 日及び哺育 1、4、7、10、13、16、19 日にデュラグルチドを投与した。分娩しなかった個体は妊娠 18 日で投与を中止した。TK 評価群には妊娠 6、9、12、15、18 日及び哺育 1、4 日にデュラグルチドを投与し、妊娠 6 日及び哺育 4 日に TK を評価した。F0 雌の全例を分娩させ、哺育 21 日まで F1 児を哺育させた。離乳前後の F1 児の身体及び機能発達に対する影響を検討するため、すべての F1 児について生後 6 日から背地走性を評価した。また、1 腹当たり雌雄各 1 例の F1 児について、一般状態、自発運動量、聴覚性驚愕反応、学習及び記憶、発育指標並びに生殖機能を評価した。F1 児の生殖機能の評価のため、F1 雌の全例を分娩させ、哺育 1 日まで F2 児を哺育させた。F1 雌の剖検の後、F1 雄の精子検査及び器官重量測定を実施した。溶媒対照群及び 1.63 mg/kg 群のすべての F1 雌並びに F1 雄の死亡発見例又は安楽殺例について、病理組織学的検査を実施した。

表 2.6.6-18　ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験の試験デザイン

用量（mg/kg）	例数 雌	投与液濃度（mg/mL）	投与容量（mL/kg）
毒性評価群			
0[a]	25	0[a]	1
0.2	25	0.2	1
0.49	25	0.49	1
1.63	25	1.63	1
トキシコキネティクス評価群			
0[a]	4	0[a]	1
0.2	8	0.2	1
0.49	8	0.49	1
1.63	8	1.63	1

[a]　溶媒対照群：0.02%ポリソルベート 80 及び 4.6%マンニトールを含む 10 mM クエン酸緩衝液、pH 6.5 ± 0.2

TK データは第 2.6.4.3.2 項にて考察した。臨床用量との AUC 比は、0.2、0.49 及び 1.63 mg/kg 群でそれぞれ 3.12、7.29 及び 26.8 倍であった（表 2.6.6-26）。

0.2 mg/kg 群の F0 雌 1 例が妊娠 22 日に死亡発見され、残留胎児が認められたことから分娩に関連した死亡と考えられた。同群の別の 1 例は顕著な体重減少及び一般状態の悪化を呈したため、哺育 13 日に安楽殺した。0.49 及び 1.63 mg/kg 群では F0 雌の死亡は認められなかったことから、0.2 mg/kg 群で認められた死亡は偶発的でデュラグルチド投与に関連しないと考えられた。

F0 雌の一般状態観察及び剖検において、デュラグルチド投与による変化は認められなかった。

0.49 及び 1.63 mg/kg 群の F0 雌で、妊娠期間を通して摂餌量減少並びにそれに伴う体重及び体重増加量の低下が認められた。体重増加量の低下は哺育 1～4 日にも認められたが、それ以降は認められなかった。体重低下は哺育期間を通して認められた。摂餌量減少は 0.49 mg/kg 群では哺育 1～4 日に、1.63 mg/kg 群では哺育期間を通して認められた。妊娠期間を通した摂餌量減少は 0.2 mg/kg 群の F0 雌にも認められたが、体重及び体重増加量の変化を伴わないことから毒性と判断しなかった。哺育期間中の 0.2 mg/kg 群における体重及び体重増加量の低下は一過性であり毒性と判断せず、また摂餌量減少は認められなかった。

F0 雌の妊娠及び分娩に対するデュラグルチド投与の影響は認められなかった。F1 児の出生児数、生後 0 日の生存児数及び離乳前期間の生存率に対するデュラグルチド投与の影響は認められなかった。1.63 mg/kg 群の F1 児で離乳前期間（生後 1～21 日）を通して体重及び体重増加量の低下が認められ、体重低下は離乳後も持続したことから毒性と判断した。0.49 mg/kg 群の F1 児では離乳前期間の後半に体重低下が認められたが、体重増加量は溶媒対照群と同程度であり、また体重低下は一過性で離乳後に回復したことから毒性と判断しなかった。0.2 mg/kg 群の F1 児では、体重及び体重増加量に対するデュラグルチド投与の影響は認められなかった。

F1 児の自発運動量の評価（生後 21 日）において、1.63 mg/kg 群の雌雄で総運動量及び区画移動数が溶媒対照群よりも高値を示した。また、F1 児の聴覚性驚愕反応の評価（生

後 22 日）において、1.63 mg/kg 群の雌は最大反応、最大反応までの潜時並びに平均反応が溶媒対照群よりも低値を示した。自発運動量及び聴覚性驚愕反応の変化は、F1 児の発育遅延（体重低下）に起因すると考えられた。生後 61 又は 62 日に実施した自発運動量及び聴覚性驚愕反応の評価では、いずれの用量においてもデュラグルチド投与の影響は認められなかった。また、驚愕反応への順化に対するデュラグルチド投与の影響は認められなかった。

Biel 型水迷路を用いて F1 児（生後 70 日）の学習・記憶評価を実施した。一定の学習評価期間を経た後に実施した記憶評価において、試行 2 回目にのみ 1.63 mg/kg 群の F1 雌で溶媒対照群と比較して統計学的に有意な平均回避時間の延長及び平均エラー数の増加が認められた（表 2.6.6-19）。同群の 10/25 例で溶媒対照群と比較して回避時間が 20%以上、エラー数が 30%以上増加したほか、10/25 例で試行 2 回目における回避時間が試行 1 回目よりも延長した。記憶評価の試行 1 回目には、投与による影響は認められなかった。1.63 mg/kg 群の F1 雄及びその他の用量では、デュラグルチド投与による記憶障害は認められなかった。記憶に対する影響はデュラグルチド投与による変化と考えられ、毒性と判断した。

表 2.6.6-19　デュラグルチドを投与した F0 雌ラットから得た F1 児（生後 70 日）について実施した Biel 型水迷路試験による記憶評価

用量（mg/kg）	0[a]		0.2		0.49		1.63	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
平均回避時間（秒）[b]								
試行 1 回目	76.8	86.6	76.7 (−0.13)	71.8 (−17.09)	65.4 (−14.84)	71.3 (−17.67)	69.7 (−9.24)	73.9 (−14.67)
試行 2 回目	32.3	31.9	43.7 (35.29)	39.9 (25.08)	33.0 (2.17)	45.7 (43.26)	26.7 (−17.34)	62.6* (96.24)
全体	54.6	59.3	60.2	55.8	49.2	58.5	48.2	68.3
平均エラー数 [b]								
試行 1 回目	8	8	7 (−12.5)	7 (−12.5)	6 (−25.0)	8 (0.0)	6 (−25.0)	7 (−12.5)
試行 2 回目	3	3	4 (33.3)	3 (0.0)	3 (0.0)	5 (66.7)	3 (0.0)	6** (100.0)
全体	5	5	6	5	5	6	5	7

[a] 溶媒対照群
[b] 括弧内の数値は溶媒対照群との差（%）
* p = 0.008（Linear trend test）
** p = 0.003（Linear trend test）

F1 世代では、低体重を示した F1 雄 2 例（0.2 及び 1.63 mg/kg 群の各 1 例）が生後 25 日に死亡発見された。また、0.49 mg/kg 群の F1 雄 1 例が生後 89 日に死亡発見され、もう 1 例が切歯不整配列のため生後 115 日に安楽殺された。1.63 mg/kg 群の F1 雌 1 例は、一般状態の悪化により妊娠 20 日に安楽殺された。これらの死亡又は安楽殺例はデュラグルチド投与に関連しないと考えられた。1.63 mg/kg 群の F1 児で認められた体重低下は離

乳後も持続した。0.2 及び 0.49 mg/kg 群の F1 児では体重低下は認められなかった。いずれの用量においても、F1 世代の妊娠中の摂餌量に対するデュラグルチド投与の影響は認められなかった。

いずれの用量においても、F1 世代の雌雄の生殖能並びに精子の濃度、運動性及び形態に対するデュラグルチド投与の影響は認められなかった。F1 世代の妊娠期間、着床数及び黄体数並びに F2 児の出生児数に対する影響は認められなかった。F2 児の出生時の体重及び出生後の生存率に対する影響は認められなかった。

F1 世代の剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査において、デュラグルチド投与の影響は認められなかった。

以上、当試験では 0.49 及び 1.63 mg/kg 群の F0 雌で妊娠及び哺育期間中に摂餌量減少及びそれに伴う体重及び体重増加量の低下が認められたことから、F0 母動物の一般毒性に関する NOAEL は 0.2 mg/kg［AUC に基づくと臨床用量の 3.12 倍（表 2.6.6-26）］と判断した。1.63 mg/kg 群の F1 世代では、離乳前後を通して体重及び体重増加量に対する影響が認められたことから、F1 児及び F1 世代の一般毒性に関する NOAEL は 0.49 mg/kg と判断した。1.63 mg/kg 群の F1 雌で生後 70 日に記憶に対する影響が認められたことから、発生神経毒性に関する NOAEL は雌で 0.49 mg/kg、雄で 1.63 mg/kg［AUC に基づくと臨床用量のそれぞれ 7.29 及び 26.8 倍（表 2.6.6-26）］と判断した。F1 世代の生殖パラメータに対する毒性学的影響は認められず、F1 世代の生殖毒性に関する NOAEL は 1.63 mg/kg［AUC に基づくと臨床用量の 26.8 倍（表 2.6.6-26）］と判断した。

2.6.6.6.6 新生児ラットを用いた毒性試験

（添付資料 4.2.3.5.4.1、[redacted]-353304 試験、表 2.6.7.15B）

雌雄 Sprague Dawley ラットに生後 7 日から最長で生後 91 日までの期間、デュラグルチドを反復皮下投与し、成長及び発達に対する本薬の毒性を評価した。本試験のプロトコルは FDA と合意されている。

用量設定は、ラットにデュラグルチドを生後 7 日から反復皮下投与した 2 つの予備試験成績（GLP 非適用）に基づく。最初に実施した予備試験（[redacted]-353303 試験、表 2.6.7.15A）では、ラットにデュラグルチドを 0、0.2、0.5 及び 1.6 mg/kg の用量［[redacted]-353253 試験（4.2.3.5.3.1）とほぼ同じ用量］で生後 7 日から、3 日に 1 回反復皮下投与し、溶媒対照群の 20%に亀頭包皮の分離（雄）又は最初の発情（雌）が認められるまで投与を継続した。しかしながら、当試験では試験終了時（雄：生後 43 日、雌：生後 31 日）までデュラグルチド投与による摂餌量及び体重の変化が認められなかった。そこで、用量を 0、3、7 及び 16 mg/kg に変更して追加の予備試験（[redacted]-353306 試験、表 2.6.7.15A）を実施した。デュラグルチド投与による摂餌量及び体重の変化が性成熟に及ぼす影響を排除するため、溶媒対照群、3 及び 7 mg/kg 群の摂餌量は 16 mg/kg 群の平均摂餌量に調整した（Pair Fed）。その結果、全用量群において成熟ラットと同程度の血中曝露が得られ、離乳前期間に溶媒対照群と比較して統計学的に有意な体重低下が認められた。16 mg/kg 群との Pair Fed を実施したため、溶媒対照群、3 及び 7 mg/kg 群の離乳後の体重は 16 mg/kg 群と同様に推移した。施設背景値と比較して、Pair Fed した溶媒対照群の膣

開口時期は約 5 日遅延し、亀頭包皮の分離時期は約 3 日遅延した。デュラグルチド投与群の雌雄の性成熟時期は、Pair Fed した溶媒対照群と同程度であった。全用量群で精巣重量のわずかな低下（10%～12%）が認められたが、デュラグルチド投与との関連性は不明であった。これらの試験成績に基づき、摂餌量及び体重に影響が生じると考えられる 7 mg/kg を当試験の最高用量と設定した。

試験デザインを表 2.6.6-20 に示す。無処置妊娠ラットから得た雌雄の出生児にデュラグルチドを生後 7 日から、3 日に 1 回反復皮下投与した。主試験群の投与期間は生後 91 日まで、性成熟評価群の投与期間は雄で生後 47 日、雌で生後 39 日までとした。TK 評価群の投与スケジュールは主試験群と同じとし、生後 7 日及び 91 日に TK 評価を実施した。

デュラグルチド投与による摂餌量及び体重の変化が性成熟に及ぼす影響を排除するため、生後 21 日から溶媒対照群、0.5 及び 2 mg/kg 群の給餌量を 7 mg/kg 群の平均摂餌量となるように雌雄ごとに調整した（Pair Fed；最低給餌量は 8 g/日）。主試験群は生後 98 日まで Pair Fed を実施し、以降は自由摂餌とした。性成熟評価群は計画剖検時まで Pair Fed を実施した。

出生から試験終了時点まで、生死、一般状態、体重及び摂餌量を評価した（主試験群及び性成熟評価群）。身体発育分化に関する検査として、生後 7 日から背地走性を評価したほか（主試験群）、膣開口（雌）及び亀頭包皮の分離（雄）時期を評価した（主試験群及び性成熟評価群）。また、膣垢検査で発情期が最初に認められた日（春機発動）を同定した（性成熟評価群の雌）。さらに、生後 11、20 及び 60 日に詳細な一般状態観察を実施したほか、生後 21 及び 61 日に自発運動量、生後 22 及び 62 日に聴覚性驚愕反応、生後 70 日に Biel 型水迷路を用いて学習及び記憶の評価を実施した（主試験群）。

性成熟評価群の雄は生後 48 日に、雌は生後 40 日に計画剖検を行い、器官重量及び血中ホルモン濃度の測定を実施した。主試験群のすべての生存例は投与終了後（生後 98 日以降）に交配させ、雌は妊娠 15 日に帝王切開及び器官重量の測定を実施し、雄は雌の計画剖検後に剖検して精子検査及び器官重量の測定を実施した。主試験群及び性成熟評価群の全例について、選択した器官（生殖器官、下垂体及び甲状腺を含む）の病理組織学的検査を実施した。

表 2.6.6-20　　新生児ラット毒性試験の試験デザイン

用量（mg/kg）	例数		投与液濃度（mg/mL）	投与容量（mL/kg）
	雄	雌		
主試験群				
0[a]	25	25	0[a]	1.0
0.5	25	25	0.5	1.0
2	25	25	2.0	1.0
7	25	25	7.0	1.0
性成熟評価群				
0[a]	20	20	0[a]	1.0
0.5	20	20	0.5	1.0
2	20	20	2.0	1.0
7	20	20	7.0	1.0
トキシコキネティクス評価群				
0[a]	45	45	0[a]	1.0
0.5	45	45	0.5	1.0
2	45	45	2.0	1.0
7	45	45	7.0	1.0

[a]　溶媒対照群：0.02%ポリソルベート 80 及び 4.6%マンニトールを含む 10 mM クエン酸緩衝液、pH 6.5 ± 0.2

TK データは第 2.6.4.3.2 項にて考察した。臨床用量との AUC 比は、0.5、2 及び 7 mg/kg 群でそれぞれ 9.53、34.9 及び 149 倍であった（表 2.6.6-26）。

生存率に対するデュラグルチド投与の影響は認められなかった。溶媒対照群並びに 0.5、2 及び 7 mg/kg 群における死亡例数は、主試験群で 3、1、3 及び 2 例（計 9 例）、性成熟評価群で 4、0、0 及び 1 例（計 5 例）、TK 群で 2、2、3 及び 1 例（計 8 例）であった。死亡率に用量依存性は認められず、偶発的な所見と判断した。その他の個体は計画剖検時まで生存した。

一般状態観察において、デュラグルチド投与の影響は認められなかった。

初回投与後（生後 7～8 日）に、2 及び 7 mg/kg 群において体重増加量の低下が認められた。生後 19～20 日以降から投与終了までの期間、全用量群において体重増加量はデュラグルチド投与に応じて低下と上昇を繰り返した。すなわち、投与日には溶媒対照群と比較して体重増加量は一過性に低下したが、その後 2 日間の体重増加量は溶媒対照群と同程度又は高い値を示した。投与を終了した交配前期間（生後 92～98 日）の体重増加量は、主試験群の全用量群で上昇し、体重のリバウンドが認められた。性成熟評価群の全投与期間（雄は生後 7～47 日、雌は生後 7～39 日）の体重増加量は、7 mg/kg 群で溶媒対照群よりも高かった。

試験初期に体重増加量の低下が認められた 7 mg/kg 群において、離乳前期間（生後 7～19 日）の体重は溶媒対照群よりも低かったが、Pair Fed を開始した離乳後の体重は溶媒対照群と同程度もしくは高い値を示した。0.5 及び 2 mg/kg 群の体重は、投与期間を通して溶媒対照群とほぼ同程度であった。体重増加量の低下は一過性であり、体重の低下は試験の継続により消失したことから、デュラグルチド投与により認められたこれらの変化は毒性と判断しなかった。

投与を終了して自由摂餌とした生後 98 日以降、7 mg/kg 群の雄の体重増加量及び摂餌量は溶媒対照群と同程度もしくはわずかに高く、0.5 及び 2 mg/kg 群の雄の体重、体重増

加量及び摂餌量は溶媒対照群と同程度であった。妊娠期間中の雌の体重及び摂餌量に毒性学的な影響は認められなかった。

7 mg/kg 群の雌において、膣開口時期の早期化とその時点での体重のわずかな低下が認められたほか（主試験群及び性成熟評価群）、春機発動の早期化が認められ（性成熟評価群）、デュラグルチド投与による毒性と判断した。雄の亀頭包皮の分離時期及びその時点での体重に対するデュラグルチド投与の影響は認められなかった。背地走性に対するデュラグルチド投与の影響は認められなかった。

詳細な一般状態観察において認められた所見は、生後 60 日に 7 mg/kg 群の雄で認められた排尿回数の増加のみであった。GLP-1 受容体作動薬をラットに静脈内投与すると一過性の利尿作用が認められ、投与後数日以内に正常化することが報告されている（Larsen et al. 2001）。したがって、デュラグルチド投与により認められた排尿回数の増加は毒性と判断しなかった。

自発運動量、聴覚性驚愕反応、学習及び記憶に対するデュラグルチド投与の影響は認められなかった。

雌雄の交尾率［交尾動物数/交配動物数（%）］、受精率「妊娠動物数/交配動物数（%）」及び受胎率［妊娠動物数/交尾動物数（%）］に対するデュラグルチド投与の影響は認められなかった。精子検査項目、発情周期及び交尾までに要する期間に対する影響も認められなかった。

7 mg/kg の雄において血清中黄体形成ホルモン濃度の上昇（性成熟個体）及びエストロゲン濃度の上昇（未成熟及び性成熟個体）が認められたほか、全用量群の雌雄において成長ホルモン濃度の上昇（性成熟個体）が認められた。成長ホルモン濃度の上昇は器官重量の変化や病理組織学的所見を伴わず、毒性学的な意義は明らかでなかった。7 mg/kg 群の雌で認められた膣開口時期及び春機発動の早期化は、成長ホルモン濃度の上昇と関連した変化である可能性が考えられた。

デュラグルチド投与による器官重量の変化、剖検所見及び病理組織学的所見は認められなかった。

胚生存率に対するデュラグルチド投与の影響は認められなかった。

以上の結果を踏まえ、雌雄の新生児の一般毒性に関する NOAEL は 7 mg/kg［AUC に基づくと臨床用量の 149 倍（表 2.6.6-26）］と判断した。7 mg/kg 群の雌において、膣開口時期及び春機発動の早期化と成長ホルモン濃度の上昇が認められた。また、7 mg/kg 群の雄において、黄体形成ホルモン及び成長ホルモン濃度の上昇（性成熟個体）並びにエストロゲン濃度の上昇（未成熟及び性成熟個体）が認められた。ホルモン濃度の上昇に関連した器官重量の変化及び病理組織学的所見は認められなかった。これらの結果から、性成熟に関する NOAEL は 2 mg/kg［AUC に基づくと臨床用量の 34.9 倍（表 2.6.6-26）］と判断した。神経行動学的評価項目、生殖行動及び胚生存率に対する毒性学的な影響は認められず、発生神経毒性、生殖毒性及び胚毒性に関する NOAEL は 7 mg/kg と判断した。

2.6.6.7 局所刺激性試験

デュラグルチドの局所刺激性を評価するための独立した試験は実施していない。反復投与毒性試験、がん原性試験及び生殖発生毒性試験の一部として局所刺激性を評価した結果、毒性学的に重要な投与部位反応及び炎症は認められなかった。一部の毒性試験ではデュラグルチド投与による投与部位の炎症又は出血が認められたが、溶媒対照群と比較して重症度の上昇はわずかであった。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 光安全性試験

デュラグルチドは天然型アミノ酸で構成されるタンパク質であり、眼及び皮膚への分布は限られていることから、光安全性試験は実施していない。ペプチド及びタンパク質はクロモフォアとなる芳香族アミノ酸の含量に応じて紫外吸収を示す場合があるが、これは光安全性のリスクを示唆するものではなく、光安全性試験の実施は通常、不要とされている（EMA 2011）。

2.6.6.8.2 免疫原性試験

サブユニット間のジスルフィド結合の切断による半抗体の形成を抑制し、また免疫学的細胞毒性を引き起こす高親和性 Fc 受容体との相互作用を軽減するため、デュラグルチドの IgG4-Fc 領域はアミノ酸配列が改変され、免疫原性が低減されている（Glaesner et al. 2010）。反復投与毒性試験において、顕著な抗デュラグルチド抗体の産生は示唆されなかった。

2.6.6.8.3 免疫毒性試験

ラット及びサルを用いた反復投与毒性試験において免疫系器官の重量及び組織像に対する影響は認められなかったため、独立した免疫毒性試験は実施していない。サルを用いた 9 ヵ月間反復投与毒性試験（7608-235 試験）において免疫毒性を評価した結果、抗 KLH IgM 及び IgG 抗体の産生に対するデュラグルチド投与の影響は認められなかった。イムノフェノタイピングにおける末梢血 T 細胞、B 細胞及び NK 細胞の変化は軽微であり、毒性と判断しなかった。

2.6.6.8.4 補足的毒性試験

甲状腺 C 細胞及び膵臓に対するデュラグルチドの影響を詳細に評価するため、糖尿病を呈さない正常ラット又はサルを用いた 1 年間反復投与毒性試験並びに 2 型糖尿病モデルである ZDF ラットを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験を実施した。投与経路は、臨床投与経路である皮下を選択した。

2.6.6.8.4.1 ラットを用いた 1 年間反復投与毒性試験

（添付資料 4.2.3.7.3.1、8236888 試験、表 2.6.7.17A）

雄 Sprague Dawley ラット（6～7 週齢）にデュラグルチドを週 2 回、52 週間反復皮下投与し、甲状腺 C 細胞量及びカルシウム刺激時の血漿中カルシトニン濃度に対する影響を経時的に評価した。

当試験の用量は、ラットを用いた長期がん原性試験（8203405 試験）で検討した最高用量であり、C 細胞の過形成、腺腫及び癌の発現頻度の上昇が認められた 5 mg/kg を選択した。12～24 ヵ月齢のラットでは C 細胞の自然発生病変が高頻度に認められることから（Martín-Lacave et al. 1999）、これらの影響を除外するため投与期間は 52 週間（標準的な寿命の約 1/2）とした。

試験デザインを表 2.6.6-21 に示す。雄ラットにデュラグルチドを反復皮下投与し、試験 12、24、36 及び 52 週に C 細胞量及び血漿中カルシトニン濃度（ベースライン及び塩化カルシウム刺激時）を評価した（計画屠殺はそれぞれ 94、185、276 及び 374 日に実施）。C 細胞量は甲状腺の病理組織学的検査［ヘマトキシリン・エオジン染色並びにカルシトニン/Ki67（増殖マーカー）共染色］、カルシトニン/Ki67 共染色細胞比率による細胞増殖性の半定量的評価、並びに連続したカルシトニン染色切片の 3 次元画像解析（形態計測学的評価）により定量した C 細胞容積に基づいて評価した。また、死亡、一般状態、体重及び摂餌量の評価、臨床検査、剖検並びに病理組織学的検査（甲状腺/上皮小体、腎臓及び脛骨近位端）を実施した。デュラグルチド無投与群は、試験 1 日に血漿中カルシトニン濃度（ベースライン及び塩化カルシウム刺激時）を評価し、試験 3 日に C 細胞容積を測定した。カルシトニン濃度の測定値の解析並びに甲状腺の形態計測学的評価及びその解析は、GLP 下では実施しなかった。

表 2.6.6-21 ラット 1 年間毒性試験の試験デザイン

用量 (mg/kg)	例数 雄	投与液濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)
0[a]	20	0[a]	0.5
5	20	10	0.5
無投与	20	NA	NA

略号：NA = 該当せず

[a] 溶媒対照群：0.02%ポリソルベート 80 及び 4.7%マンニトールを含む 10 mM クエン酸緩衝液、pH 6.5 ± 0.2

血漿中デュラグルチド濃度データは第 2.6.4.8.1 項にて考察した。ラットを用いた長期がん原性試験（8203405 試験）の TK 評価に基づくと、臨床用量との AUC 比は 5 mg/kg 群で 95.0 倍と推定された（表 2.6.6-26）。以下に示すように、薬理作用に関連した摂餌量減少及び体重低下が認められたこと並びに試験 52 週にデュラグルチド投与による C 細胞の肥大及び過形成が認められたことから、試験期間を通してラットがデュラグルチドに曝露されたことが確認された。

デュラグルチド投与による死亡は認められなかった。試験 52 週（試験 365 又は 372 日）の血漿中カルシトニン濃度の評価において、溶媒対照群の 3 例が塩化カルシウム投与の数分後に死亡した。また、溶媒対照群の別の 3 例及び 5 mg/kg 群の 2 例が、投与期間中の死亡発見又は計画外の安楽殺に至った。剖検及び病理組織学的検査の結果、5 mg/kg 群

の 1 例は造血系腫瘍（リンパ肉腫）による死亡と考えられ、もう 1 例の死因は不明であった。

デュラグルチド投与による一般状態の変化は認められなかった。5 mg/kg 群では、試験期間を通して摂餌量減少及びそれに伴う体重又は体重増加量の低下が認められた。

デュラグルチド投与による血液生化学的検査値の変化は認められなかった。試験 12、24、36 及び 52 週のいずれの時点においても、ベースライン及びカルシウム刺激時の血漿中カルシトニン濃度はデュラグルチド投与によって増加しなかった（試験 52 週は溶媒対照群で塩化カルシウム投与時に予想外の死亡が認められたため、血漿中カルシトニン濃度はベースラインのみ評価可能であった）。溶媒対照群及び 5 mg/kg 群の両群において、ベースライン及びカルシウム刺激時の血漿中カルシトニン濃度は加齢とともに統計学的に有意に上昇し、試験 36 週以降プラトーに達した。

デュラグルチド投与による剖検時の肉眼所見は認められなかった。5 mg/kg 群の複数の評価時点で甲状腺/上皮小体及び腎臓の重量減少（実重量及び相対重量）が認められ、これは体重低下に伴う変化と考えられた。

病理組織学的検査の結果、最終評価時点の試験 52 週にのみ 5 mg/kg 群で C 細胞の限局性/多巣性の肥大/過形成の発現頻度及び重症度の上昇が認められ、デュラグルチド投与による変化と判断した。甲状腺のカルシトニン/Ki67 共染色において、試験 36 及び 52 週に溶媒対照群及び 5 mg/kg 群の両群で C 細胞の軽微なびまん性過形成が認められたが、デュラグルチド投与による発現頻度の上昇は認められなかった。また、試験 52 週に溶媒対照群及び 5 mg/kg 群の両群で C 細胞腫瘍が低頻度に認められたが、デュラグルチド投与との関連はないと判断した。腎臓及び脛骨では、投与に関連した病理組織学的所見は認められなかった。

甲状腺のカルシトニン/Ki67 共染色細胞比率は試験 52 週にのみ 5 mg/kg 群で上昇する傾向が認められ、デュラグルチド投与による C 細胞量の増加が示唆された。一方、試験 12、24 及び 36 週においては、5 mg/kg 群の共染色細胞比率は溶媒対照群よりも低かった。この所見の生物学的意義は明らかでないものの、デュラグルチドの直接的な作用ではなく、体重低下に伴う変化と考えられた。

いずれの評価時点においても、形態計測学的評価により定量した C 細胞容積に対するデュラグルチド投与の影響は認められなかった。溶媒対照群及び 5 mg/kg 群の両群で C 細胞容積は加齢に伴って増加したが、これは予期された変化であった。また、剖検で認められた甲状腺実重量の減少に関連して、5 mg/kg 群で甲状腺総体積の軽度の減少が認められた。甲状腺総体積の減少はデュラグルチドの直接的な作用ではなく、体重低下に伴う変化と考えられた。

溶媒対照群及び 5 mg/kg 群の両群において、加齢に伴う C 細胞容積の増加と血漿中カルシトニン濃度の上昇には統計学的に有意な正の相関が認められた。両パラメータの相関関係に対するデュラグルチド投与の影響は認められなかった。また、C 細胞の過形成又は腫瘍が認められた個体で血漿中カルシトニン濃度が上昇する傾向は認められなかった。

以上、ラットにデュラグルチドを 5 mg/kg［AUC に基づくと臨床用量のおよそ 95.0 倍（表 2.6.6-26）］の用量で 1 年間反復皮下投与した結果、薬理作用に関連した摂餌量減少及びそれに伴う体重低下が認められたほか、試験 52 週にのみ C 細胞の限局性/多巣性の肥大/過形成の発現頻度の上昇が認められた。これらの変化は試験 52 週より早期の評価時点では認められなかった。また、いずれの評価時点においても形態計測学的評価により定量した C 細胞容積に対するデュラグルチド投与の影響は認められなかった。C 細胞容積に対する影響が認められなかったことに一致して、C 細胞のびまん性過形成の発現頻度の上昇や血漿中カルシトニン濃度の上昇は認められなかった。これらの試験成績から、少なくても 52 週間までの反復投与では C 細胞量のびまん性増加は認められないことが示された。

2.6.6.8.4.2 Zucker 糖尿病肥満ラットを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験

（添付資料 4.2.3.7.3.2、504758 試験、表 2.6.7.17B）

雄 ZDF ラット（8 週齢）にデュラグルチドを週 2 回、13 週間反復皮下投与し、膵外分泌腺バイオマーカー及び膵臓の組織像に対する影響を評価した。当試験は、FDA が GLP-1 受容体作動薬を開発するすべての企業に対して、インスリン抵抗性を呈する 2 型糖尿病モデルラットを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験において膵臓の組織像及び機能を評価することを要請したために実施された。

ZDF ラットは 2 型糖尿病のモデル動物であり（Peterson et al. 1990）、3～8 週齢で進行性のインスリン抵抗性及びグルコース不耐性を呈し（前糖尿病状態）、8～10 週齢で糖尿病を発症する。2 型糖尿病の症状は雄に顕著に発現することから、デュラグルチドの評価には雄のみを使用した。

用量設定は、前糖尿病状態を呈する約 8 週齢の雄 ZDF ラット（5 例/群）にデュラグルチドを 0、0.05、0.5、1.5 及び 5 mg/kg の用量で 2 週間反復皮下投与した予備試験成績に基づく（504889 試験、表 2.6.7.6）。この予備試験では、デュラグルチド投与による死亡は認められず、0.5 mg/kg 以上で薬理作用に関連した用量依存的な摂餌量減少及び体重増加量の低下が認められた。0.05 mg/kg 群における摂餌量及び体重増加量の変化は軽微であった。糖尿病の発症による多飲/多尿に関連して、溶媒対照群では摂水量及び尿量がそれぞれ 3 倍及び 8 倍まで試験期間を通して経時的に増加した。溶媒対照群と比較してデュラグルチド投与群における摂水量及び尿量の増加は軽微であり、糖尿病症状の軽減が示された。摂餌量及び体重増加量の変化は動物の健康状態に悪影響を及ぼすものではなかったことから毒性と判断せず、最大耐用量は 5 mg/kg と判断した。この予備試験成績に基づき、3 ヵ月間反復投与毒性試験では 0、0.5、1.5 及び 5 mg/kg の用量を設定した。なお、この用量はラットを用いた長期がん原性試験（8203405 試験）の高用量側の 3 群と同じである。

試験デザインを表 2.6.6-22 に示す。毒性評価項目は死亡、一般状態、体重、摂餌量、血液生化学的検査（膵外分泌腺バイオマーカーを含む）、インスリン濃度（毒性評価群は試験 92 日、TK 評価群は試験 29、60 及び 88 日）、剖検、膵臓の病理組織学的検査とした。膵臓の病理組織学的検査では、頭部から尾部を含む膵臓全体の連続切片について

ヘマトキシリン・エオジン染色（6 枚/例以上）を実施したほか、隣接切片についてサイトケラチン 19（上皮マーカー）/Ki67 共染色並びにサイトケラチン 19/TdT-mediated dUTP nick-end labeling（TUNEL、アポトーシスマーカー）共染色を実施して膵管の細胞増殖性及びアポトーシスを評価した。

表 2.6.6-22　Zucker 糖尿病肥満ラット 3 ヵ月間毒性試験の試験デザイン

用量 （mg/kg）	動物数 雄	投与液濃度 （mg/mL）	投与容量 （mL/kg）
毒性評価群			
0[a]	27	0[a]	0.5
0.5	20	1	0.5
1.5	20	3	0.5
5	20	10	0.5
トキシコキネティクス評価群			
0[a]	16	0[a]	0.5
0.5	12	1	0.5
1.5	12	3	0.5
5	12	10	0.5

[a] 溶媒対照群：0.02%ポリソルベート 80 及び 4.6%マンニトールを含む 10 mM クエン酸緩衝液、pH 6.5 ± 0.2

TK データは第 2.6.4.8.2 項にて考察した。臨床用量との AUC 比は、0.5、1.5 及び 5 mg/kg 群でそれぞれ 4.33、13.4 及び 48.6 倍であった（表 2.6.6-26）。

溶媒対照群では試験期間を通して血糖値、ヘモグロビン A1c（HbA1c）値及びインスリン濃度の上昇が認められ、糖尿病の発症が示唆された。溶媒対照群の体重は試験初期の 4 週に顕著に増加し、それ以降ほぼプラトーに達した。試験期間を通して溶媒対照群の摂餌量は増加したが、糖尿病の発症のため摂餌量と体重増加量の変化は相関しなかった。

デュラグルチドを投与した全用量群で試験期間を通して摂餌量減少が認められたほか、試験 1～4 週に用量依存的な体重減少が認められた。糖尿病を発症する試験 4 週（約 12 週齢）以降は、用量依存的な体重増加及び体重増加量の上昇が認められた。また、デュラグルチドを投与した全用量群で用量依存的な血糖値及び HbA1c 値の低下が認められた。0.5 mg/kg 以上の TK 評価群及び 5.0 mg/kg の毒性評価群では、軽度のインスリン濃度の上昇及び尿素値の減少が認められた。

溶媒対照群の 1 例が試験 49 日に、5 mg/kg 群の 1 例が試験 75 日にそれぞれ死亡発見された。病理組織学的検査で死因は特定できなかったものの、両個体で腎臓の病理組織学的変化が認められ、死亡との関連が示唆された。ZDF ラットにおいて腎臓の障害は一般的であり、デュラグルチド投与との関連はないと考えられた。5 mg/kg 群の死亡例では腎臓の所見に加えて、膵腺房における軽微な好中球性炎症も認められた。本所見は計画剖検例にも認められていることから、デュラグルチド投与と関連すると判断した。

剖検時の肉眼検査及び膵臓重量の測定において、デュラグルチド投与の影響は認められなかった。

デュラグルチドを投与した全用量群で総アミラーゼ活性及び膵アミラーゼ活性の軽度の上昇が認められたが、膵臓の障害により通常認められる変化と比較してその程度は小

さく、またリパーゼ活性の上昇や膵臓の炎症を示唆する病理組織学的所見は認められなかった。膵臓の病理組織学的変化として（表 2.6.6-23）、デュラグルチドを投与した全用量群で総膵管及び関連する腺を含む小葉間膵管における膵管上皮の増加の発現頻度及び重症度の上昇が認められた。しかし、サイトケラチン 19 と Ki67 又は TUNEL との共染色において膵管細胞の増殖やアポトーシスの減少は示唆されなかったことから、膵管上皮の増加は毒性と判断しなかった。膵管上皮の増加が細胞増殖に対する影響を反映するのか、又は細胞の分化過程に対する影響を反映するのかは不明であった。また、5 mg/kg 群で膵腺房の好中球性炎症の発現頻度及び重症度の上昇が認められた。当所見はデュラグルチド投与に関連した毒性と判断したが、局在性であり、他に関連する所見が認められなかったことから膵炎を示唆する変化ではないと考えられた。その他の病理組織学的変化として、腺房萎縮（混合細胞性炎症を伴う/伴わない）の発現頻度及び重症度の上昇並びに島細胞の過形成が認められた。腺房萎縮及び島細胞の過形成は ZDF ラットの自然発生病変として知られており、溶媒対照群にも低頻度に認められたことから、膵外分泌腺の自然発生病変の発現頻度及び重症度がデュラグルチド投与により軽度に上昇したと考えられた。

表 2.6.6-23　Zucker 糖尿病肥満ラット 3 ヵ月間毒性試験における膵臓の病理組織学的変化

組織／所見	性	雄			
	(mg/kg)	0	0.5	1.5	5.0
膵臓	検査例数	27	20	20	20
膵管上皮の増加					
	変化が認められた動物の総数	1	7	11	7
	軽微	1	4	5	3
	軽度	―	3	5	3
	中等度	―	―	1	1
腺房の好中球性炎症					
	変化が認められた動物の総数	1	0	0	5
	軽微	1	―	―	3
	軽度	―	―	―	2
混合細胞性炎症を伴う腺房萎縮					
	変化が認められた動物の総数	2	1	5	8
	軽微	2	―	2	6
	軽度	―	1	3	2
腺房萎縮					
	変化が認められた動物の総数	0	1	3	7
	軽微	―	1	3	6
	軽度	―	―	―	1
島細胞の過形成					
	変化が認められた動物の総数	26	20	20	20
	軽微	12	3	4	―
	軽度	14	17	14	19
	中等度	―	―	2	1
膵管周囲の好中球性炎症					
	変化が認められた動物の総数	9	9	14	7
	軽微	9	8	9	4
	軽度	―	1	5	2
	中等度	―	―	―	1

以上、当試験では 5 mg/kg 群［AUC に基づくと臨床用量の 48.6 倍（表 2.6.6-26）］で膵腺房の好中球性炎症の発現頻度及び重症度の上昇が認められ、毒性と判断した。デュラグルチドを投与した全用量群でアミラーゼ活性の軽度の上昇、膵管上皮の増加、腺房萎縮（混合細胞性炎症を伴う/伴わない）並びに島細胞の過形成が認められた。これらの所見は毒性と判断しなかったが、デュラグルチド投与により膵外分泌腺の自然発生病変の発現頻度及び重症度が軽度に上昇したと考えられた。膵外分泌腺の組織像及び機能に関する NOAEL は 1.5 mg/kg［AUC に基づくと臨床用量の 13.4 倍（表 2.6.6-26）］と判断した。

2.6.6.8.4.3 サルを用いた 1 年間反復投与毒性試験

（添付資料 4.2.3.7.3.3、8252199 試験、表 2.6.7.17C）

雄カニクイザル（2～3 年齢）にデュラグルチドを 52 週間反復皮下投与し、甲状腺 C 細胞量及びカルシウム刺激時の血清中カルシトニン濃度並びに膵外分泌腺バイオマーカー及び膵臓の組織像に対する影響を評価した。

用量は、サルを用いた 9 ヵ月間反復投与毒性試験（7608-235 試験）の最高用量であり、NOAEL である 8.15 mg/kg を選択した。

試験デザインを表 2.6.6-24 に示す。雄サルにデュラグルチドを試験 1 週に 1 回、それ以降は週 2 回反復皮下投与した。毒性評価項目は死亡、一般状態、体重、摂餌量（定性的）、臨床検査、剖検及び病理組織学的検査（甲状腺/上皮小体、膵臓及び腎臓）とした。甲状腺に対する影響を評価するため、試験 12、24、36 及び 52 週に血清中カルシトニン濃度（ベースライン及びグルコン酸カルシウム刺激時）の測定を実施したほか、試験 52 週の計画屠殺時に C 細胞量の評価を実施した。C 細胞量は甲状腺の病理組織学的検査（ヘマトキシリン・エオジン染色及びカルシトニン/Ki67 共染色）、カルシトニン/Ki67 共染色細胞比率に基づく細胞増殖性の評価、並びに連続したカルシトニン染色切片の 3 次元画像解析（形態計測学的評価）により定量した C 細胞容積に基づいて評価した。カルシトニン濃度の測定値の解析並びに甲状腺の形態計測学的評価及びその解析は、GLP 下では実施しなかった。また、膵臓に対する影響を評価するため、試験 52 週にアミラーゼ及びリパーゼ活性の測定並びに体系的かつプロスペクティブな膵臓の病理組織学的検査を実施した。膵臓の病理組織学的検査では、ヘマトキシリン・エオジン染色（膵頭部 3 枚、体部 2 枚及び尾部 1 枚の横断切片）に加えて、Ki67 染色（膵頭部の別の 3 枚の横断切片）を実施して膵管上皮の細胞増殖性を評価した。すべての膵臓切片について、認定獣医病理学者が標準的な病理組織学的検査を実施した後、一次レビュー及びピアレビューに続いて獣医病理学者及び臨床病理学者からなる病理学ワーキンググループによるレビューを実施した。この際、ヒト PanIN に相当する膵管の異形成性又は増殖性病変の有無を詳細に評価した。

表 2.6.6-24 サル 1 年間反復投与毒性試験の試験デザイン

用量 (mg/kg)	例数 雄	投与液濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)
0[a]	20	0[a]	1
8.15	20	8.15	1

[a] 溶媒対照群：0.02%ポリソルベート 80 及び 4.6%マンニトールを含む 10 mM クエン酸緩衝液、pH 6.5 ± 0.2

血漿中デュラグルチド濃度データは第 2.6.4.8.3 項にて考察した。サルを用いた 9 ヵ月間反復投与毒性試験（7608-235 試験）の TK 評価に基づくと、当試験における臨床用量との AUC 比は 8.15 mg/kg 群で 774 倍と推定された（表 2.6.6-26）。以下に示すように、薬理作用に関連した摂餌量減少及び体重低下が認められたことから、試験期間を通してサルがデュラグルチドに曝露されたことが確認された。

8.15 mg/kg 群の 1 例は忍容性が認められず、試験 36 日以降試験から除外した。その他の個体は計画剖検時まで生存した。8.15 mg/kg 群ではデュラグルチド投与による飼料及び補給食の摂取量の減少が認められ、その減少は投与初期の 4 週間に顕著であった。8.15 mg/kg 群では試験期間を通して体重低下及び体重増加量の低下が認められた。摂餌量及び体重の変化は薬理作用に関連した変化と考えられた。重度の変化が認められた数例においては、1～2 日間の輸液投与を実施又はデュラグルチド投与を中断した。また、摂餌量減少に関連して、糞排泄量減少及び無便の発現頻度が上昇した。

デュラグルチド投与による血液生化学的検査値の変化は認められなかった。ベースライン及びカルシウム刺激時の血清中カルシウム濃度に対するデュラグルチドの影響は認められなかった。試験 12、24、36 及び 52 週のいずれの時点においても、ベースライン及びカルシウム刺激時の血清中カルシトニン濃度はデュラグルチド投与によって増加せず、加齢による血清中カルシトニン濃度の変化も認められなかった。

8.15 mg/kg 群では甲状腺/上皮小体（相対重量）及び腎臓（実重量及び相対重量）の重量減少が認められ、これは体重低下に伴う変化と考えられた。

甲状腺/上皮小体及び腎臓のヘマトキシリン・エオジン染色において、デュラグルチド投与の影響は認められなかった。甲状腺のカルシトニン/Ki67 共染色細胞比率及び形態計測学的に定量した C 細胞容積に対するデュラグルチド投与の影響は認められなかった。8.15 mg/kg 群で溶媒対照群と比較して統計学的に有意な総甲状腺容積の減少が認められたが、体重低下に伴う甲状腺/上皮小体の重量減少に関連した変化と考えられた。また、8.15 mg/kg 群の 4/19 例で小葉間膵管における杯細胞数の軽微から中等度の増加が認められた（表 2.6.6-25）。この変化はデュラグルチド投与によると考えられたが、一般状態や血液生化学的検査値の変化、膵臓の炎症性又は増殖性所見、膵管の拡張や閉鎖は認められなかったことから毒性と判断しなかった。膵管内腔上皮細胞及び腺上皮細胞の Ki67 染色細胞比率並びにアミラーゼ及びリパーゼ活性に対するデュラグルチド投与の影響は認められなかった。

表 2.6.6-25 サル 1 年間毒性試験における膵杯細胞数の増加

		デュラグルチド	
性		雄	
用量（mg/kg）		0	8.15
膵臓			
	検査例数	20	19
小葉間導管の杯細胞増加			
	なし	14	12
	軽微	6	3
	軽度	0	2
	中等度	0	2

以上、サルにデュラグルチドを 8.15 mg/kg［AUC に基づくと臨床用量のおよそ 774 倍（表 2.6.6-26）］の用量で 1 年間反復皮下投与した結果、薬理作用に関連した摂餌量減少及びそれに伴う体重低下が認められたが、デュラグルチド投与による血清中カルシトニン濃度の上昇、甲状腺の重量増加及び組織像の変化、C 細胞の増殖性並びに形態計測学的評価により定量した C 細胞容積の変化は認められなかった。当試験では C 細胞のわずかな毒性学的変化を検出するため、一般的なサル毒性試験よりも 1 群の例数を増やし、また C 細胞の機能及び組織像の変化を多角的に評価したが、他の GLP-1 受容体作動薬のサル毒性試験と同様に、C 細胞に対するデュラグルチド投与の影響は認められなかった。また、デュラグルチド投与によるアミラーゼ及びリパーゼ活性の変化、膵臓の炎症、壊死、異形成性の膵管増殖並びにヒト PanIN に相当する病変は認められなかった。デュラグルチド投与による膵臓の病理組織学的変化として、小葉間膵管における杯細胞数の軽微から中等度の増加が認められたが、本所見は毒性と判断しなかった。

2.6.6.9 考察及び結論

デュラグルチドの毒性は、マウス、ラット及びサルを用いた反復投与毒性試験（マウスは 1 ヵ月間、ラットは最長 6 ヵ月間、サルは最長 9 ヵ月間）、ラット及び rasH2 トランスジェニックマウスを用いたがん原性試験、ラット及びウサギを用いた一連の生殖発生毒性試験並びに新生児ラットを用いた毒性試験において評価した。また、GLP-1 受容体作動薬の安全性リスクとして懸念されている甲状腺 C 細胞腫瘍及び膵炎/膵癌の発現に対するデュラグルチドの影響を評価するため、上述の毒性試験に加えて正常動物（ラット及びサル）並びに糖尿病モデルラットを用いた補足的毒性試験を実施した。以下にその試験成績を考察する。

<u>摂餌量及び体重に対する影響</u>

ラットに 20 mg/kg までの用量でデュラグルチドを週 2 回、反復皮下投与した 1 ヵ月間（R00359 試験）、3 ヵ月間（7608-191 試験）及び 6 ヵ月間反復投与毒性試験（7608-236 試験）において、デュラグルチド投与による用量依存的な摂餌量減少及びそれに伴う体重低下が認められた。摂餌量減少は試験 1 週に顕著であり、ラットを用いた 6 ヵ月間反復投与毒性試験では高用量群（16.29 mg/kg）の試験 1～3 日の摂餌量は溶媒対照群と比較しておよそ 70%減少した。摂餌量減少は試験期間を通して認められたが、投与の継続に

より回復傾向を示した。同群の投与期間終了時の体重は、溶媒対照群と比較しておよそ19%低下した。摂餌量及び体重の変化は GLP-1 受容体を介した薬理作用に関連した変化と考えられ（Drucker 1998; Meier and Nauck 2005; Drucker 2006; Rossi and Nicolucci 2009）、また動物の健康状態に悪影響を及ぼすものではなかった。標的器官毒性は認められなかった。1 ヵ月間反復投与毒性試験では摂餌量減少及び体重低下に関連した軽度の病理組織学的変化が認められたが、より長期の試験では認められなかったことから毒性学的な重要性は低いと考えられた。

サルに 10 mg/kg までの用量でデュラグルチドを週 2 回、反復皮下投与した 1 ヵ月間（P00054 試験）、3 ヵ月間（7608-192 試験）及び 9 ヵ月間反復投与毒性試験（7608-235 試験）における主要な変化は、ラットと同様に用量依存的な摂餌量減少及びそれに伴う体重低下であった。高用量群（8.15 mg/kg 以上）の一部の個体で、試験初期に嘔吐又は輸液の投与を必要とする脱水症状が認められた。これらの所見は一過性で試験の継続により回復したが、サルを用いた 9 ヵ月間反復投与毒性試験において 8.15 mg/kg 群の雌 1 例は状態が悪化したため試験 17 日に安楽殺した。したがって、サルにおいて 8.15 mg/kg は最大耐用量に近いと考えられた。嘔吐及び脱水症状は GLP-1 受容体を介した胃内容排出抑制作用に関連すると考えられた（Meier and Nauck 2005）。

以上、ラットを用いた最長 6 ヵ月間及びサルを用いた最長 9 ヵ月間の反復投与毒性試験において、デュラグルチド投与による主要な変化は薬理作用に関連した摂餌量減少及びそれに伴う体重低下であった。標的器官毒性は認められず、ラットを用いた 6 ヵ月間及びサルを用いた 9 ヵ月間反復投与毒性試験における NOAEL はそれぞれ 16.29 mg/kg 及び 8.15 mg/kg と判断した［AUC に基づくとそれぞれ臨床用量の 264 倍及び 774 倍（表 2.6.6-26）］。

甲状腺 C 細胞に対する影響

リラグルチド、エキセナチド週 1 回投与製剤及びリキシセナチドなどの長時間作動型 GLP-1 受容体作動薬を長期投与したげっ歯類において、C 細胞の過形成及び腫瘍が認められている（FDA 2010; Knudsen et al. 2010; Parks and Rosebraugh 2010; EMA 2012; FDA 2012）。GLP-1 受容体作動薬の薬理作用は多岐に渡るが（Drucker 2006）、腫瘍の発生は甲状腺 C 細胞に限定されている。GLP-1 受容体はラット C 細胞株だけでなく、ヒト過形成性 C 細胞病変及びヒト甲状腺髄様癌（C 細胞腫瘍）にも発現が確認されている（Vertongen et al. 1994; Körner et al. 2007; Gier et al. 2012a）。GLP-1 受容体の検出に用いられた抗体の特異性は明らかではなく、結果の解釈には注意が必要であるものの（Panjwani et al. 2013; Pyke and Knudsen 2013）、C 細胞における GLP-1 受容体の発現量はサル及びヒトと比較してげっ歯類で高いことが示唆されている（Körner et al. 2007; Knudsen et al. 2010）。げっ歯類と異なり、サル又はイヌを用いた毒性試験においては GLP-1 受容体作動薬の投与による C 細胞の増殖性変化は認められていない（EMA 2006; FDA 2010; EMA 2012; FDA 2012）。GLP-1 受容体作動薬に対する C 細胞の反応性の動物種差が GLP-1 受容体の発現量の違いによるものなのか、あるいは非げっ歯類において C 細胞のわずかな変化を検出することが困難であるためなのかは明らかでない。GLP-1 受

容体作動薬の C 細胞に対する影響は製造販売承認申請時に各国の規制当局によって注意深く評価され、添付文書に記載されている。

デュラグルチドのラット及びサルを用いた反復投与毒性試験において C 細胞の病理組織学的変化は認められなかったが、これらの試験は GLP-1 受容体作動薬の C 細胞に対する影響が明らかになる以前に実施されたため、甲状腺の機能及び組織像に関する詳細な評価を行わなかった。そこで、ラット及び rasH2 トランスジェニックマウスを用いたがん原性試験の他に、補足的毒性試験として C 細胞量及び血中カルシトニン濃度の測定を組み込んだ 1 年間反復投与毒性試験を実施し、ラット及びサルの C 細胞に対するデュラグルチドの影響を詳細に評価した。

デュラグルチドのラットを用いた長期がん原性試験（8203405 試験）において認められた C 細胞の過形成及び腫瘍の発現頻度の上昇は、他の GLP-1 受容体作動薬で報告されている変化と類似したものであった。デュラグルチドでは腫瘍に関する NOEL を 0.05 mg/kg［AUC に基づくと臨床用量の 0.829 倍（表 2.6.6-26）］と決定することができ、非遺伝毒性的機序による発がん物質に特徴的な閾値の存在が示唆された。本 NOEL では体重低下が認められ、薬理作用を発現する用量と考えられた。C 細胞癌の発現頻度の上昇は 5 mg/kg 群［AUC に基づくと臨床用量の 95.0 倍（表 2.6.6-26）］にのみ認められたが、リラグルチド及びエキセナチド週 1 回投与製剤のラットを用いた 2 年間がん原性試験では臨床用量と同程度の曝露量においても C 細胞癌が認められている（FDA 2010, 2012）。リキシセナチドでは臨床用量のおよそ 900 倍の曝露量で C 細胞癌が認められている（EMA 2012）。

デュラグルチドの rasH2 トランスジェニックマウスを用いた短期がん原性試験（8224144 試験）においては、C 細胞の変化を高感度に検出するため甲状腺のカルシトニン染色を実施した。その結果、デュラグルチドを投与した全用量群で C 細胞の細胞質肥大/カルシトニン染色性の軽微な増加が認められたが、過形成及び腫瘍は認められなかった。

ラット及びサルを用いた 1 年間反復投与毒性試験においては、病理組織学的検査（ヘマトキシリン・エオジン染色並びにカルシトニン/Ki67 共染色）、カルシトニン/Ki67 共染色細胞比率並びに形態計測学的評価により定量した C 細胞容積に基づいて C 細胞量を評価したほか、血中カルシトニン濃度（ベースライン及びカルシウム刺激時）に基づいて C 細胞機能を評価した。ラット及びサルで同様の手法を用いて C 細胞量及び機能を評価したことから、C 細胞の正常な形態を動物種間で比較することが可能であった。すなわち、若齢のラット無処置群及びサル溶媒対照群におけるカルシトニン染色陽性の組織容積はそれぞれ 0.22 mm^3 及び 0.026 mm^3 であり、C 細胞はサル甲状腺よりもラット甲状腺で豊富に存在することが示された。

ラットを用いた 1 年間反復投与毒性試験（8236888 試験）においては、試験 52 週にのみ C 細胞の限局性過形成の発現頻度の上昇が認められたが、C 細胞量のびまん性増加はいずれの評価時点においても認められなかった。したがって、デュラグルチドが C 細胞の GLP-1 受容体を活性化させることで C 細胞量がびまん性に増加し、その後に限局性の過形成及び腫瘍が発生するという仮説は否定された。ラットを用いた長期がん原性試験

で認められた C 細胞腫瘍は自然発生病変の発現頻度の上昇が原因と考えられ、少なくても 52 週間以上の長期投与により起こる変化と考えられた。

サルを用いた 1 年間反復投与毒性試験（8252199 試験）においては、C 細胞のわずかな毒性学的変化を検出するため一般的なサル毒性試験よりも 1 群の例数を増やし、また C 細胞の機能及び組織像の変化を多角的に評価したが、臨床用量のおよそ 774 倍の曝露量（表 2.6.6-26）でも C 細胞に対する影響は認められなかった。したがって、他の GLP-1 受容体作動薬と同様に、デュラグルチドはサルにおいて C 細胞の増殖性変化を引き起こさないと考えられた。

以上、デュラグルチドを投与したラットにおける C 細胞腫瘍の発現頻度の上昇は、臨床用量よりも高い曝露量でのみ認められた。デュラグルチドの毒性試験成績並びに他の GLP-1 受容体作動薬の知見を踏まえると、ラット C 細胞の増殖性変化は非遺伝毒性的機序を介したものと考えられ、またサルと比較してラット C 細胞はデュラグルチドに対する反応性が高いと考えられた。しかしながら、C 細胞の増殖性変化が起こる機序は明らかではなく、ヒトにおける反応性がラットよりもサルに類似するかも明らかでないことから、ヒトにおける安全性の慎重な評価は依然として重要である。したがって、リスク管理計画書に基づき、日常診療下で報告される甲状腺 C 細胞腫瘍を監視するほか、ラットで認められた C 細胞腫瘍を添付文書に記載する予定である。

<u>生殖発生毒性</u>

雄又は雌ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（[redacted]-353113 試験及び [redacted]-353112 試験）において、薬理作用に関連した摂餌量減少及び体重低下が認められた。16.3 mg/kg 群［AUC に基づくと臨床用量のおよそ 264 倍（表 2.6.6-26）］で精子形態、交尾率、受精率、受胎率及び胚生存率に対する影響は認められなかった。雌ラットでは 4.89 mg/kg［AUC に基づくと臨床用量のおよそ 60.7 倍（表 2.6.6-26）］以上の用量において、発情周期の軽微な延長、黄体数の軽度の減少並びにこれに関連した着床数及び生存胎児数の減少が認められた（[redacted]-353112 試験）。これらの所見は摂餌量及び体重の変化に関連すると考えられ、また交尾率、受精率、受胎率及び胚生存率に対する影響が認められなかったことから、毒性学的な重要性は低いと判断した。

ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験（[redacted]-353116 試験）において、母動物の摂餌量減少及び体重低下に関連して、1.63 mg/kg［AUC に基づくと臨床用量の 22.5 倍（表 2.6.6-26）］以上の用量で胎児の体重低下が認められたほか、4.89 mg/kg 群［AUC に基づくと臨床用量の 71.1 倍（表 2.6.6-26）］の胎児で生存率のわずかな低下及び骨化変異が認められた。また、ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験（[redacted]-353119 試験）において、母動物の摂餌量減少及び体重低下に関連して、0.41 mg/kg 群［AUC に基づくと臨床用量の 21.2 倍（表 2.6.6-26）］で胎児骨格に対する影響が認められた。他の GLP-1 受容体作動薬と同様に（EMA 2006; FDA 2010; EMA 2012; FDA 2012）、デュラグルチドのラット及びウサギ胎児骨格に対する影響は母動物の摂餌量減少及び体重低下に関連して認められたことから、胎児発生に対する直接的な作用を示唆する所見ではないと考えられた。

ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（[redacted]-353253 試験）において、Biel 型水迷路を用いた F1 児（生後 70 日）の記憶評価の試行 2 回目に、1.63 mg/kg 群［AUC に基づくと臨床用量の 26.8 倍（表 2.6.6-26）］の F1 雌で溶媒対照群と比較して統計学的に有意な平均回避時間の延長及び平均エラー数の増加が認められた。この所見は、母動物の摂餌量減少及び体重低下が認められた用量で認められた。デュラグルチド投与による記憶障害は記憶評価の試行 1 回目には認められなかったことから、再現性は明らかでない。また、同用量群の F1 雄並びに 0.49 mg/kg 群［AUC に基づくと臨床用量の 7.29 倍（表 2.6.6-26）］の F1 児では記憶障害は認められなかった。

新生児ラットを用いた毒性試験（[redacted]-353304 試験）において、ラットに生後 7 日からデュラグルチドを反復皮下投与し、生後 70 日に Biel 型水迷路を用いて学習・記憶評価を実施したとき、最高用量の 7 mg/kg 群［AUC に基づくと臨床用量の 149 倍（表 2.6.6-26）］の雌雄にデュラグルチド投与の影響は認められなかった。ラットを用いた出生前・出生後試験（[redacted]-353253 試験）において F1 雌に記憶障害が認められたときの母動物の曝露量の約 5.6 倍に相当する用量を新生児ラットに直接投与した場合に記憶障害が認められなかったことを踏まえると、F1 雌に認められた記憶障害の毒性学的な重要性は低いと考えられた。他の GLP-1 受容体作動薬の生殖発生毒性試験においても出生児の記憶に対する影響は評価されているものの、評価手法が異なるためデュラグルチドとの比較はできなかった。また、新生児ラットを用いた毒性試験（[redacted]-353304 試験）では、7 mg/kg 群の雌に膣開口時期及び春機発動の早期化と成長ホルモン濃度の上昇が認められたほか、7 mg/kg 群の雄に黄体形成ホルモン及び成長ホルモン濃度の上昇（性成熟個体）並びにエストロゲン濃度の上昇（未成熟及び性成熟個体）が認められた。しかしながら、これらの変化は 7 mg/kg 群［AUC に基づくと臨床用量の 149 倍（表 2.6.6-26）］においてのみ認められ、関連する器官重量の変化、病理組織学的変化並びに雌雄の生殖機能や胚生存率に対する影響は認められなかったことから、毒性学的な重要性は低いと考えられた。性成熟に関する NOAEL は 2 mg/kg［AUC に基づくと臨床用量の 34.9 倍（表 2.6.6-26）］と判断した。

生殖発生毒性試験及び新生児ラットを用いた毒性試験の主要な結果は添付文書に記載する予定である。

膵臓に対する影響

市販後の自発報告及び文献調査では、GLP-1 受容体作動薬又はジペプチジルペプチダーゼ-4（DPP-4）阻害剤の投与をうけた患者において急性膵炎が報告されている（Ahmad and Swann 2008; Dore et al. 2011）。一部のレトロスペクティブ解析及びメタ解析では薬剤投与と膵炎/膵癌との関連が示唆されている一方（Elashoff et al. 2011; Butler et al. 2013; Singh et al. 2013）、関連を否定する解析結果も報告されており（Garg et al. 2010; Dore et al. 2011）、一貫した結果は得られていない。薬剤投与との関連をレトロスペクティブに解析することの限界に加え、一般集団と比較して 2 型糖尿病患者では膵炎のリスクが高いことが結果の解釈を困難にしている（Keech et al. 2005; Noel et al. 2009; Girman et al. 2010）。

GLP-1 の作用は主に GLP-1 受容体を介して発現すると考えられ、哺乳類において GLP-1 受容体サブタイプは 1 種のみ同定されている。膵臓において GLP-1 受容体は主にβ 細胞に発現している（Hörsch et al. 1997）。一部の研究者は膵管上皮細胞に発現する GLP-1 受容体が長期間、過剰に活性化されることで膵腺癌のリスクが増加する可能性を示唆しているが、GLP-1 受容体が膵管上皮細胞に発現するかは明らかでなく、発現するとしても膵外分泌機能における役割は不明である（Xu et al. 1999, 2006; Gier et al. 2012a; Panjwani et al. 2013; Pyke and Knudsen 2013）。

GLP-1 受容体作動薬の膵外分泌腺に対する影響を明らかにするため、正常動物や糖尿病モデル動物を用いた非臨床試験が複数実施されているが、ヒトと同様に一貫した結果は得られていない。GLP-1 受容体作動薬であるリラグルチド、エキセナチド、リキシセナチド、semaglutide 及び albiglutide 並びに DPP-4 阻害剤であるシタグリプチンを投与したげっ歯類又は非げっ歯類において、膵臓に対する有害な作用は認められていない（EMA 2006; Koehler et al. 2009; FDA 2010; Tatarkiewicz et al. 2010; EMA 2012; FDA 2012; Nyborg et al. 2012; Forest et al. 2013; Mirabile et al. 2013; Gotfredsen et al. 2014）。また、糖尿病を呈さない正常なげっ歯類（15,480 匹）及びサル（2,475 匹）を用いて 50 種のインクレチン関連薬について実施された毒性試験を対象とした FDA によるメタ解析において、膵臓に対する明らかな有害作用は同定されていない（Egan et al. 2014）。一方、Nachnani らは exendin-4 を投与した非糖尿病ラットで膵炎が認められたことを報告している（Nachnani et al. 2010）。Gier らによる同様の試験（非糖尿病ラットに同用量の exendin-4 を投与）では膵炎は認められなかったが、主膵管及び膵管腺の増殖性変化が認められている（Gier et al. 2012b）。また、エキセナチドを投与したラットでは、膵臓の障害を示唆する病理組織学所見が認められている（Yu et al. 2012）。糖尿病モデル動物を用いた試験においても、一貫した結果は得られていない。リラグルチド（Vrang et al. 2012）、エキセナチド（Tatarkiewicz et al. 2013）又はシタグリプチン（Forest et al. 2013）を投与した ZDF ラットにおいて膵炎を示唆する生化学的検査値や組織像の異常は認められていないが、エキセナチドを投与した高脂肪食負荷マウスでは膵臓の障害が増悪することが報告されている（Rouse et al. 2013; Zhang et al. 2013）。動物及びヒトにおけるこれらの知見を踏まえ、GLP-1 受容体作動薬を投与されている患者からの膵炎など膵臓の有害事象報告は注意深く評価する必要があるとされている（EMA 2013; Hummer 2013）。

医薬品製造販売承認申請のために実施されたリラグルチド（FDA 2010; Nyborg et al. 2012）、エキセナチド（EMA 2006; FDA 2012）及びリキシセナチド（EMA 2012）の毒性試験と同様に、デュラグルチドの反復投与毒性試験及びがん原性試験において膵臓の炎症、壊死、過形成及び腫瘍は認められなかった。ZDF ラット及びサルを用いた補足的毒性試験においては、膵外分泌腺バイオマーカーの測定及び膵臓の詳細な病理組織学的検査を実施し、膵臓に対するデュラグルチドの影響を詳細に評価した。その結果、ZDF ラットを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験（504758 試験）において膵外分泌腺の自然発生病変の発現頻度及び重症度の軽度の上昇並びに膵管上皮の増加が認められたほか、サルを用いた 1 年間反復投与毒性試験（8252199 試験）において小葉間膵管における杯細胞数の軽微から中等度の増加が認められた。

試験方法が異なるため結果の解釈には注意が必要であるものの、毒性試験成績を薬剤間で比較することは膵臓に対するデュラグルチドの影響を考察する上で有用である。デュラグルチドを投与した ZDF ラットにおいて認められた膵管上皮の増加は、exendin-4 を投与した非糖尿病ラットで認められた主膵管及び膵管腺の増殖性変化と質的に類似していると考えられた（Gier et al. 2012b）。両試験ともに膵臓の頭部から複数の組織切片を作成して詳細な病理組織学的検査を実施しており、このためにデュラグルチドを含む GLP-1 受容体作動薬の標準的な毒性試験やリラグルチド又はエキセナチドを投与した ZDF ラット（Vrang et al. 2012; Tatarkiewicz et al. 2013）では認められなかった膵管の変化が検出された可能性がある。非糖尿病ラット及び糖尿病モデルラット［ZDF ラット及び human islet amyloid polypeptide（HIP）ラット］では、膵管の正常な形態に大きなばらつきが認められている（Chadwick et al. 2013）。したがって、デュラグルチドを投与した ZDF ラット及び exendin-4 を投与した非糖尿病ラットで認められた膵管の増殖性変化は、生理的な変動の範囲である可能性が考えられた。

ZDF ラットだけでなく非糖尿病ラットにおいても膵管の増殖性変化が報告されていることから、糖尿病モデル動物だけでなく非糖尿病ラットを用いた反復投与毒性試験の成績もデュラグルチドの膵管に対する影響を評価する上で有用と考えられた。デュラグルチドのラットを用いた長期がん原性試験（8203405 試験）において、最高用量の 5 mg/kg［AUC に基づくと臨床用量の 95.0 倍（表 2.6.6-26）］で膵臓の病理組織学的変化は認められなかった。したがって、ZDF ラットで認められた膵管上皮の増加が長期投与により膵管の異形成や膵癌に進行する可能性は低いと考えられた。膵管腺癌は顕著な線維組織（スキラス）反応を伴うことが多く、局所破壊的かつ転移性である。したがって、長期がん原性試験において膵管腺癌が発生した場合には、剖検及び病理組織学的検査で検出することが可能であったと考えられる。

ラットと異なり、デュラグルチドのサルを用いた 1 年間反復投与毒性試験（8252199 試験）においては、8.15 mg/kg［AUC に基づくと臨床用量のおよそ 774 倍（表 2.6.6-26）］で膵管上皮の増加や膵管腺の変化は認められなかった。当試験では 4/19 例で小葉間膵管における杯細胞の軽度から中等度の増加が認められたが、膵外分泌腺バイオマーカーの変化、膵臓の炎症、壊死、異形成性の膵管増殖、ヒト PanIN に相当する病変並びに粘液化生、核の極性消失などの膵癌の徴候を示唆する変化は認められなかった。デュラグルチドのサルを用いた 9 ヵ月間反復投与毒性試験（7608-235 試験）や、リラグルチド（Nyborg et al. 2012）、semaglutide（Gotfredsen et al. 2014）又は albiglutide（Mirabile et al. 2013）を投与したサルでは杯細胞の増加は認められていない。デュラグルチドのサルを用いた 1 年間反復投与毒性試験ではわずかな毒性学的変化を検出するため、一般的なサル毒性試験よりも 1 群の例数を増やし、また膵臓の広範な領域について体系的な病理組織学的評価を実施したため、他の試験では認められなかった変化を検出することができた可能性が考えられた。

以上の毒性試験成績を踏まえると、デュラグルチドはラット及びサルにおいて膵炎/膵癌を誘発しないと考えられた。デュラグルチド投与により、糖尿病モデルラットでは膵

管上皮の増加が、サルでは小葉間膵管における杯細胞の増加が認められたが、長期投与により膵管の異形成や膵癌が発生する可能性は低いと考えられた。

表 2.6.6-26 デュラグルチドの主要な毒性試験で検討した用量と臨床用量との曝露量比

動物種 用量	$AUC_{0-\tau}$、定常状態 (μg·hr/mL)	C_{ave} (μg/mL)	曝露量比 [a]
ヒト			
0.75 mg、週 1 回投与	8.57[b]	0.0510	-
反復投与毒性試験			
マウス 1 ヵ月間（8224143 試験）[c]			
100 mg/kg/週 2 回 [d]	8696	90.6	1776
10 mg/kg/週 2 回	1145	11.9	234
1 mg/kg/週 2 回	99.3	1.03	20.3
ラット 1 ヵ月間（R00359 試験）[e]			
20 mg/kg/週 2 回 [d]	1724	18.0	352
6 mg/kg/週 2 回	739	7.69	151
2 mg/kg/週 2 回	237	2.47	48.4
ラット 3 ヵ月間（7608-191 試験）[f]			
16.29 mg/kg/週 2 回 [d]	1181	12.3	241
4.89 mg/kg/週 2 回	277	2.89	56.6
1.63 mg/kg/週 2 回	124	1.29	25.3
ラット 6 ヵ月間（7608-236 試験）[g]			
16.29 mg/kg/週 2 回 [d]	1295	13.5	264
4.89 mg/kg/週 2 回	297	3.10	60.7
1.63 mg/kg/週 2 回	121	1.26	24.7
サル 1 ヵ月間（P00054 試験）[h]			
10 mg/kg/週 2 回 [d]	3921	40.8	801
3 mg/kg/週 2 回	1072	11.2	219
1 mg/kg/週 2 回	360	3.75	73.5
サル 3 ヵ月間（7608-192 試験）[i]			
8.15 mg/kg/週 2 回 [d]	3034	31.6	620
1.63 mg/kg/週 2 回	682	7.10	139
0.41 mg/kg/週 2 回	155	1.61	31.7
サル 9 ヵ月間（7608-235 試験）[j]			
8.15 mg/kg/週 2 回 [d]	3792	39.5	774
1.63 mg/kg/週 2 回	718.9	7.49	147
0.41 mg/kg/週 2 回	205.5	2.14	42.0
がん原性試験			
ラット長期がん原性（8203405 試験）[k]			
5.0 mg/kg/週 2 回	465	4.84	95.0
1.5 mg/kg/週 2 回	159	1.66	32.5
0.5 mg/kg/週 2 回	59.6	0.621	12.2
0.05 mg/kg/週 2 回 [l]	4.06	0.042	0.829

（続く）

表 2.6.6-26 デュラグルチドの主要な毒性試験で検討した用量と臨床用量との曝露量比（続き）

動物種 用量	$AUC_{0-\tau}$、定常状態 (μg·hr/mL)	C_{ave} (μg/mL)	曝露量比 [a]
rasH2 トランスジェニックマウス短期がん原性（8224144 試験）[m]			
3.0 mg/kg/週 2 回 [l]	37.0	0.385	7.56
1.0 mg/kg/週 2 回	23.3	0.243	4.76
0.3 mg/kg/週 2 回	8.63	0.090	1.76
生殖発生毒性試験			
ラット胚・胎児発生に関する試験（[redacted]-353116 試験）[n]			
4.89 mg/kg/3 日ごと	348.14	3.63	71.1
1.63 mg/kg/3 日ごと	110.06	1.15	22.5
0.49 mg/kg/3 日ごと [o]	35.0	0.365	7.15
ウサギ胚・胎児発生に関する試験（[redacted]-353119 試験）[p]			
0.41 mg/kg/3 日ごと	77.94	1.08	21.2
0.12 mg/kg/3 日ごと [o]	26.52	0.368	7.22
0.04 mg/kg/3 日ごと	7.05	0.0979	1.92
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（[redacted]-353253 試験）[q]			
1.63 mg/kg/3 日ごと	131	1.365	26.8
0.49 mg/kg/3 日ごと [o]	35.7	0.372	7.29
0.2 mg/kg/3 日ごと	15.3	0.159	3.12
新生児ラットを用いた試験（[redacted]-353304 試験）[r]			
7.0 mg/kg/3 日ごと [s]	547	7.60	149
2.0 mg/kg/3 日ごと [t]	128	1.78	34.9
0.5 mg/kg/3 日ごと	35.0	0.486	9.53
補足的毒性試験			
ZDF ラット 3 ヵ月間（504758 試験）[u]			
5.0 mg/kg/週 2 回	238	2.48	48.6
1.5 mg/kg/週 2 回 [d]	65.4	0.681	13.4
0.5 mg/kg/週 2 回	21.2	0.221	4.33

略号：AUC = 血漿中濃度－時間曲線下面積、C_{ave} = 平均血漿中濃度、NOAEL = 無毒性量、NOEL = 無影響量

a 曝露量比 =［（動物における $AUC_{0-\tau}$）／τ 時間］／［（ヒトにおける AUC_{0-168h}）／168 時間］
b 日本人 2 型糖尿病患者にデュラグルチドを 0.75 mg の用量で週 1 回、反復皮下投与したときの AUC_{0-168h} の幾何平均値（H9X-JE-GBDP 試験）
c 試験 29 日の AUC
d 標的器官毒性に関する NOAEL
e 試験 32 日の AUC
f 試験 92 日の AUC
g 試験 183 日の AUC
h 試験 28 日の AUC
i 試験 92 日の AUC
j 試験 274 日の AUC
k 試験 52 週の AUC
l 腫瘍に関する NOEL
m 試験 176 日の AUC
n 妊娠 15 日の AUC
o 胚・胎児発生に関する NOAEL
p 妊娠 19 日の AUC
q 哺育 4 日の AUC
r 生後 91 日の AUC
s 一般毒性、発生神経毒性、生殖毒性及び胚毒性に関する NOAEL
t 性成熟に関する NOAEL
u 試験 88 日の AUC

2.6.6.10 図表

図表は本文中の適切な箇所に記載した。

2.6.6.11 参考文献

Ahmad SR, Swann J. Exenatide and rare adverse events. N Engl J Med. 2008;358:1969-1972.

Butler AE, Campbell-Thompson M, Gurlo T, Dawson DW, Atkinson M, Butler PC. Marked expansion of exocrine and endocrine pancreas with incretin therapy in humans with increased exocrine pancreas dysplasia and the potential for glucagon-producing neuroendocrine tumors. Diabetes. 2013;62:2595-2604.

Chadwick KD, Roy D, Fletcher AM, Parrula C, Bergholm AM, Mangipudy R, et al. 2013. Occurrence of spontaneous pancreatic lesions in normal and diabetic rats may confound the nonclinical assessment of glucagon-like peptide (GLP)-1-elevating therapies. Poster presentation at the NIDDK-NCI Workshop on Pancreatitis, Diabetes, and Pancreatic Cancer, June 12-13, Bethesda, MD, USA.

Chapin RE, Gulati DK, Barnes LH, Teague JL. The effects of feed restriction on reproductive function in Sprague-Dawley rats. Fundam Appl Toxicol. 1993;20:23-29.

Dore DD, Bloomgren GL, Wenten M, Hoffman C, Clifford CR, Quinn SG, et al. A cohort study of acute pancreatitis in relation to exenatide use. Diabetes Obes Metab. 2011;13:559-566.

Drucker DJ. Glucagon-like peptides. Diabetes. 1998;47:159-169.

Drucker DJ. The biology of incretin hormones. Cell Metab. 2006;3:153-165.

Egan AG, Blind E, Dunder K, de Graeff PA, Hummer BT, Bourcier T, et al. Pancreatic safety of incretin-based drugs−FDA and EMA assessment. N Engl J Med. 2014;370:794-797.

Elashoff M, Matveyenko AV, Gier B, Elashoff R, Butler PC. Pancreatitis, pancreatic, and thyroid cancer with glucagon-like peptide-1-based therapies. Gastroenterology. 2011;141:150-156.

[EMA] European Medicines Agency. 2006. Scientific discussion: BYETTA (exenatide). Available at: http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000698/WC500051842.pdf. Accessed August 6, 2013.

[EMA] European Medicines Agency. 2011. Questions and answers on the 'Note for guidance of photosafety testing.' Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Other/2011/04/WC500105109.pdf. Accessed June 5, 2013.

[EMA] European Medicines Agency. 2012. Summary of Product Characteristics: LYXUMIA (lixisenatide). Available at http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002445/WC500140401.pdf . Accessed August 14, 2013.

[EMA] European Medicines Agency. 2013. Investigation into GLP-1 based diabetes therapies concluded. Available at: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/news/2013/07/news_detail_001856.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1. Accessed July 29, 2013.

[FDA] United States Food and Drug Administration. 2010. Summary basis of approval: VICTOZA (liraglutide [rDNA]) injection, NDA 022341, Pharmacology Review, Parts 1-3. Available at: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2010/022341s000TOC.cfm. Accessed August 6, 2013.

[FDA] United States Food and Drug Administration. 2012. Summary basis of approval: BYDUREON (exenatide), extended-release for injectable suspension, NDA 022200,

pharmacology review. Available at: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2012/022200Orig1s000TOC.cfm. Accessed August 6, 2013.

Forest T, Holder D, Smith A, Cunningham C, Dey M, Frederick C, et al. 2013. Characterization of the Exocrine Pancreas in the Zucker Diabetic Fatty Rat Model of Type 2 Diabetes Treated with Sitagliptin, a Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor. Poster presentation at the NIDDK-NCI Workshop on Pancreatitis, Diabetes, and Pancreatic Cancer, June 12-13, Bethesda, MD, USA.

Garg R, Chen W, Pendergrass M. Acute pancreatitis in type 2 diabetes treated with exenatide or sitagliptin: a retrospective observational pharmacy claims analysis. Diabetes Care. 2010;33:2349-2354.

Gier B, Butler PC, Lai CK, Kirakossian D, DeNicola MM, Yeh MW. Glucagon like peptide-1 receptor expression in the human thyroid gland. J Clin Endocrinol Metab. 2012a;97:121-131.

Gier B, Matveyenko AV, Kirakossian D, Dawson D, Dry SM, Butler PC. Chronic GLP-1 receptor activation by exendin-4 induces expansion of pancreatic duct glands in rats and accelerates formation of dysplastic lesions and chronic pancreatitis in the $Kras^{G12D}$ mouse model. Diabetes. 2012b;61:1250-1262.

Girman CJ, Kou TD, Cai B, Alexander CM, O'Neill EA, Williams-Herman DE, et al. Patients with type 2 diabetes mellitus have higher risk for acute pancreatitis compared with those without diabetes. Diabetes Obes Metab. 2010;12:766-771.

Glaesner W, Vick AM, Millican R, Ellis B, Tschang SH, Tian Y, et al. Engineering and characterization of the long-acting glucagon-like peptide-1 analogue LY2189265, an Fc fusion protein. Diabetes Metab Res Rev. 2010;26:287-296.

Gotfredsen CF, Mølck AM, Thorup I, Berg Nyborg NC, Salanti Z, Knudsen LB, et al. The human GLP-1 analogs liraglutide and semaglutide: Absence of histopathological effects on the pancreas in nonhuman primates. Diabetes. 2014;63:2486-2497.

Hörsch D, Göke R, Eissele R, Michel B, Göke B. Reciprocal cellular distribution of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) immunoreactivity and GLP-1 receptor mRNA in pancreatic islets of rat. Pancreas. 1997;14:290-294.

Hummer BT. 2013. FDA surveillance of adverse drug effects. Platform presentation at the NIDDK-NCI Workshop on Pancreatitis, Diabetes, and Pancreatic Cancer, June 12-13, Bethesda, MD, USA.

Keech A, Simes RJ, Barter P, Best J, Scott R, Taskinen MR, Forder P, et al. Effects of long-term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomised controlled trial. Lancet. 2005;366:1849-1861.

Keenan KP, Ballam GC, Dixit R, Soper KA, Laroque P, Mattson BA, et al. The effects of diet, overfeeding and moderate dietary restriction on Sprague-Dawley rat survival, disease and toxicology. J Nutr. 1997;127(5 Suppl):851S-856S.

Knudsen LB, Madsen LW, Andersen S, Almholt K, de Boer AS, Drucker DJ, et al. Glucagon-like Peptide-1 receptor agonists activate rodent thyroid C-cells causing calcitonin release and C-cell proliferation. Endocrinology. 2010;151:1473-1486.

Koehler JA, Baggio LL, Lamont BJ, Ali S, Drucker DJ. Glucagon-like peptide-1 receptor activation modulates pancreatitis-associated gene expression but does not modify the susceptibility to experimental pancreatitis in mice. Diabetes. 2009;58:2148-2161.

Körner M, Stöckli M, Waser B, Reubi JC. GLP-1 receptor expression in human tumors and human normal tissues: potential for in vivo targeting. J Nucl Med. 2007;48:736-743.

Larsen PJ, Fledelius C, Knudsen LB, Tang-Christensen M. Systemic administration of the long-acting GLP-1 derivative NN2211 induces lasting and reversible weight loss in both normal and obese rats. Diabetes. 2001;5:2530-2539.

Martín-Lacave I, Bernabé R, Sampedro C, Conde E, Fernández-Santos JM, San Martín MV, et al. Correlation between gender and spontaneous C-cell tumors in the thyroid gland of the Wistar rat. Cell Tissue Res. 1999;297:451-457.

Meier JJ, Nauck MA. Glucagon-like peptide 1(GLP-1) in biology and pathology. Diabetes Metab Res Rev. 2005;21:91-117.

Mirabile R, Kambara T, Gundersen HJ, Maier C. 2013. Stereologic Methods to Estimate Cell Number and Compartment Volume of Acini, Ducts and Islets in Pancreas of Cynomolgus Monkey Given Albiglutide, a Glucagon like Peptide-1 Receptor Agonist. Poster presentation at the NIDDK-NCI Workshop on Pancreatitis, Diabetes, and Pancreatic Cancer, June 12-13, Bethesda, MD, USA.

Nachnani JS, Bulchandani DG, Nookala A, Herndon B, Molteni A, Pandya P, et al. Biochemical and histological effects of exendin-4 (exenatide) on the rat pancreas. Diabetologia. 2010;53:153-159.

Noel RA, Braun DK, Patterson RE, Bloomgren GL. Increased risk of acute pancreatitis and biliary disease observed in patients with type 2 diabetes: a retrospective cohort study. Diabetes Care. 2009;32:834-838.

Nyborg NCB, Mølck AM, Madsen LW, Knudsen LB. The human GLP-1 analog liraglutide and the pancreas: evidence for the absence of structural pancreatic changes in three species. Diabetes. 2012;61:1243-1249.

O'Connor JC, Davis LG, Frame SR, Cook JC. Evaluation of a Tier 1 screening battery for detecting endocrine-active compounds (EACs) using the positive controls testosterone, coumestrol, progesterone, and RU486. Toxicol Sci. 2000;54:338-354.

Panjwani N, Mulvihill EE, Longuet C, Yusta B, Campbell JE, Brown TJ, et al. GLP-1 receptor activation indirectly reduces hepatic lipid accumulation but does not attenuate development of atherosclerosis in diabetic male *ApoE(-/-)* mice. Endocrinology. 2013;154:127-139.

Parks M, Rosebraugh C. Weighing risks and benefits of liraglutide–the FDA's review of a new antidiabetic therapy. N Engl J Med. 2010;362:774-777.

Peterson RG, Shaw WN, Neel MA, Little LA, Eichberg J. Zucker diabetic fatty rat as a model for non-insulin-dependent diabetes mellitus. ILAR News. 1990;32:16-19.

Pyke C, Knudsen LB. The glucagon-like peptide-1 receptor − or not? Endocrinology. 2013;154:4-8.

Rossi MC, Nicolucci A. Liraglutide in type 2 diabetes: from pharmacological development to clinical practice. Acta Biomed. 2009;80:93-101.

Rouse RL, Stewart SR, Rosenzweig BA, Thompson KL, Shea KI, Goodwin DG, et al. Extended exenatide treatment causes pancreatic stress and injury in a rodent model of insulin resistance. The Toxicologist. 2013;132:156. Abstract 725.

Singh S, Chang HY, Richards TM, Weiner JP, Clark JM, Segal JB. Glucagonlike peptide 1-based therapies and risk of hospitalization for acute pancreatitis in type 2 diabetes mellitus: a population-based matched case-control study. JAMA Intern Med. 2013;173:534-539.

Storer RD, Sistare FD, Reddy MV, DeGeorge JJ. An industry perspective on the utility of short-term carcinogenicity testing in transgenic mice in pharmaceutical development. Toxicol Pathol. 2010;38:51-61.

Tatarkiewicz K, Belanger P, Gu G, Parkes D, Roy D. No evidence of drug-induced pancreatitis in rats treated with exenatide for 13 weeks. Diabetes Obes Metab. 2013;15:417-426.

Tatarkiewicz K, Smith PA, Sablan EJ, Polizzi CJ, Aumann DE, Villescaz C, et al. Exenatide does not evoke pancreatitis and attenuates chemically induced pancreatitis in normal and diabetic rodents. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2010;299:E1076-E1086.

Vertongen P, Ciccarelli E, Woussen-Colle MC, De Neef P, Robberecht P, Cauvin A. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors of types I and II and glucagon-like peptide-I receptors are expressed in the rat medullary carcinoma of the thyroid cell line 6/23. Endocrinology. 1994;135:1537-1542.

Vrang N, Jelsing J, Simonsen L, Jensen AE, Thorup I, Søeborg H, et al. The effects of 13 wk of liraglutide treatment on endocrine and exocrine pancreas in male and female ZDF rats: a quantitative and qualitative analysis revealing no evidence of drug-induced pancreatitis. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2012;303:E253-E264.

Xu G, Kaneto H, Lopez-Avalos MD, Weir GC, Bonner-Weir S. GLP-1/exendin-4 facilitates β-cell neogenesis in rat and human pancreatic ducts. Diabetes Res Clin Pract. 2006;73:107-110.

Xu G, Stoffers DA, Habener JF, Bonner-Weir S. Exendin-4 stimulates both β-cell replication and neogenesis, resulting in increased β-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. Diabetes. 1999;48:2270-2276.

Yu X, Tang H, Huang L, Yang Y, Tian B, Yu C. Exenatide-induced chronic damage of pancreatic tissue in rats. Pancreas. 2012;41:1235-1240.

Zhang J, Stewart S, Xu L, Zhang L, Rosenzweig B, Thompson K, et al. 2013. Extended exenatide treatment causes pancreatic stress and injury in a rodent model of insulin resistance. Poster presentation at the 52nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, March 10-14, San Antonio, TX, USA.

トルリシティ皮下注 0.75 mg アテオス

2.6.7　毒性試験概要表

日本イーライリリー株式会社

目次

2.6.7　毒性試験概要表 1
2.6.7.1　毒性試験：一覧表 1
2.6.7.2　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表 4
2.6.7.3　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス成績の一覧 6
2.6.7.4　毒性試験：被験物質の一覧 9
2.6.7.5　単回投与毒性試験 10
2.6.7.6　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（2 週間投与試験） 11
2.6.7.7A　反復投与毒性試験：重要な試験（マウスを用いた 1 ヵ月間反復投与毒性試験） 13
2.6.7.7B　反復投与毒性試験：重要な試験（ラットを用いた 1 ヵ月間反復投与毒性試験） 15
2.6.7.7C　反復投与毒性試験：重要な試験（ラットを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験） 18
2.6.7.7D　反復投与毒性試験：重要な試験（ラットを用いた 6 ヵ月間反復投与毒性試験及び 1 ヵ月間回復性試験） 20
2.6.7.7E　反復投与毒性試験：重要な試験（サルを用いた 1 ヵ月間反復投与毒性試験） 22
2.6.7.7F　反復投与毒性試験：重要な試験（サルを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験及び 1 ヵ月間回復性試験） 26
2.6.7.7G　反復投与毒性試験：重要な試験（サルを用いた 9 ヵ月間反復投与毒性試験及び 2 ヵ月間回復性試験） 30
2.6.7.8　In Vitro 遺伝毒性試験 35
2.6.7.9　In Vivo 遺伝毒性試験 35
2.6.7.10A　がん原性試験：ラットを用いた長期がん原性試験 36
2.6.7.10B　がん原性試験：rasH2 トランスジェニックマウスを用いた短期がん原性試験 40
2.6.7.11　生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 44
2.6.7.12A　生殖発生毒性試験：雄ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 45
2.6.7.12B　生殖発生毒性試験：雌ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 47
2.6.7.13A　生殖発生毒性試験：ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験 49
2.6.7.13B　生殖発生毒性試験：ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験 52
2.6.7.14　生殖発生毒性試験：ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 56
2.6.7.15A　新生児を用いた試験：重要な試験以外の試験 62
2.6.7.15B　新生児を用いた試験：新生児ラットを用いた毒性試験 63
2.6.7.16　局所刺激性試験 67
2.6.7.17A　その他の毒性試験：補足的毒性試験（ラットを用いた 1 年間反復投与毒性試験） 68
2.6.7.17B　その他の毒性試験：補足的毒性試験（ZDF ラットを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験） 71
2.6.7.17C　その他の毒性試験：補足的毒性試験（サルを用いた 1 年間反復投与毒性試験） 76

2.6.7　毒性試験概要表

2.6.7.1　毒性試験：一覧表

Type of Study	Species	Route	Study Duration	Doses (mg/kg) Frequency	GLP	Testing Facility	Document ID	Location in CTD
Single Dose – Not applicable								
Repeat-Dose Toxicity								
	Mouse	Subcutaneous	1 month	0, 1, 10, 100 Twice weekly	Yes	[redacted]	8224143	4.2.3.2.1
	Rat	Subcutaneous	1 month	0, 2, 6, 20 Twice weekly	Yes	Eli Lilly and Company, Greenfield, Indiana	R00359	4.2.3.2.2
	Rat	Subcutaneous	3 months	0, 1.63, 4.89, 16.29 Twice weekly	Yes	[redacted]	7608-191	4.2.3.2.3
	Rat	Subcutaneous	6 months with 1 month of recovery	0, 1.63, 4.89, 16.29 Twice weekly	Yes	[redacted]	7608-236	4.2.3.2.4
	Monkey	Subcutaneous	1 month	0, 1, 3, 10 Twice weekly	Yes	Eli Lilly and Company, Greenfield, Indiana	P00054	4.2.3.2.5
	Monkey	Subcutaneous	3 months with 1 month of recovery	0, 0.41, 1.63, 8.15 Twice weekly	Yes	[redacted]	7608-192	4.2.3.2.6
	Monkey	Subcutaneous	9 months with 2 months of recovery	0, 0.41, 1.63, 8.15 Twice weekly	Yes	[redacted]	7608-235	4.2.3.2.7

(Continued)

2.6.7.1　毒性試験：一覧表（続き）

Type of Study	Species	Route	Study Duration	Doses (mg/kg) Frequency	GLP	Testing Facility	Document ID	Location in CTD
Carcinogenicity								
	Rat	Subcutaneous	104 weeks	0, 0.05, 0.5, 1.5, 5 Twice weekly	Yes	[redacted]	8203405	4.2.3.4.1.1
	Mouse	Subcutaneous	6 months	0, 0.3, 1, 3 Twice weekly	Yes		8224144	4.2.3.4.2.1
Reproductive and Developmental Toxicity								
Male Fertility	Rat	Subcutaneous	6 weeks	0, 1.63, 4.89, 16.3 Every 3 days	Yes		[redacted]-353113	4.2.3.5.1.1
Female Fertility	Rat	Subcutaneous	Up to 5 weeks	0, 1.63, 4.89, 16.3 Every 3 days	Yes		[redacted]-353112	4.2.3.5.1.2
Embryo-fetal	Rat	Subcutaneous	GD 6, 9, 12 and 15	0, 0.49, 1.63, 4.89 Every 3 days	Yes		[redacted]-353116	4.2.3.5.2.1
Embryo-fetal	Rabbit	Subcutaneous	GD 7, 10, 13, 16 and 19	0, 0.04, 0.12, 0.41 Every 3 days	Yes		[redacted]-353119	4.2.3.5.2.2
Pre/postnatal	Rat	Subcutaneous	GD 6, 9, 12, 15 and 18; LD 1, 4, 7, 10, 13, 16 and 19	0, 0.2, 0.49, 1.63 Every 3 days	Yes		[redacted]-353253	4.2.3.5.3.1
Studies in Juvenile Animals								
Juvenile	Rat	Subcutaneous	PND 7 through 91	0, 0.5, 2, 7 Every 3 days	Yes		[redacted]-353304	4.2.3.5.4.1

(Continued)

2.6.7.1　毒性試験：一覧表（続き）

Type of Study	Species	Route	Duration of Dosing	Doses (mg/kg) Frequency	GLP	Testing Facility	Document ID	Location in CTD
Local Tolerance – Not applicable								
Other Toxicity Studies								
Antigenicity – Not applicable								
Immunotoxicity – Not applicable								
Mechanistic								
	Rat	Subcutaneous	1 year	0, 5 Twice weekly	Yes[a]	[redacted]	8236888	4.2.3.7.3.1
	ZDF Rat	Subcutaneous	3 months	0, 0.5, 1.5, 5 Twice weekly	Yes		504758	4.2.3.7.3.2
	Monkey	Subcutaneous	1 year	0, 8.15 Twice weekly	Yes[a]		8252199	4.2.3.7.3.3
Phototoxicity – Not applicable								
Dependence – Not applicable								
Metabolites – Not applicable								
Impurities – Not applicable								
Ocular irritation – Not applicable								
Dermal irritation – Not applicable								

Abbreviations: GD = gestation day; GLP = Good Laboratory Practice; LD = lactation day; PND = postnatal day, ZDF = Zucker Diabetic Fatty.

[a] Thyroid morphometrics and calcitonin and thyroid morphometric data interpretation were not performed according to Good Laboratory Practice regulations but were conducted according to sound scientific principles.

2.6.7.2　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表

Type of Study	Species	Route	Study Duration	Doses (mg/kg) Frequency	GLP	Testing Facility	Document ID	Location in CTD
Single Dose – Not applicable								
Repeat-Dose Toxicity								
	Mouse	Subcutaneous	1 month	1, 10, 100 Twice weekly	Yes	[redacted]	8224143	4.2.3.2.1
	Rat	Subcutaneous	1 month	2, 6, 20 Twice weekly	Yes	Eli Lilly and Company, Greenfield, Indiana	R00359	4.2.3.2.2
	Rat	Subcutaneous	3 months	1.63, 4.89, 16.29 Twice weekly	Yes	[redacted]	7608-191	4.2.3.2.3
	Rat	Subcutaneous	6 months with 1 month of recovery	1.63, 4.89, 16.29 Twice weekly	Yes	[redacted]	7608-236	4.2.3.2.4
	Monkey	Subcutaneous	1 month	1, 3, 10 Twice weekly	Yes	Eli Lilly and Company, Greenfield, Indiana	P00054	4.2.3.2.5
	Monkey	Subcutaneous	3 months with 1 month of recovery	0.41, 1.63, 8.15 Twice weekly	Yes	[redacted]	7608-192	4.2.3.2.6
	Monkey	Subcutaneous	9 months with 2 months of recovery	0.41, 1.63, 8.15 Twice weekly	Yes	[redacted]	7608-235	4.2.3.2.7
Carcinogenicity								
	Rat	Subcutaneous	2 years	0.05, 0.5, 1.5, 5 Twice weekly	Yes	[redacted]	8203405	4.2.3.4.1.1

(Continued)

2.6.7.2　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表（続き）

Type of Study	Species	Route	Study Duration	Doses (mg/kg) Frequency	GLP	Testing Facility	Document ID	Location in CTD
Carcinogenicity								
	Mouse	Subcutaneous	6 months	0.3, 1, 3 Twice weekly	Yes	[redacted]	8224144	4.2.3.4.2.1
Reproductive and Developmental Toxicity								
Embryo-fetal	Rat	Subcutaneous	GD 6, 9, 12 and 15	0.49, 1.63, 4.89 Every 3 days	Yes	[redacted]	[redacted]-353116	4.2.3.5.2.1
Embryo-fetal	Rabbit	Subcutaneous	GD 7, 10, 13, 16 and 19	0.04, 0.12, 0.41 Every 3 days	Yes	[redacted]	[redacted]-353119	4.2.3.5.2.2
Pre/postnatal	Rat	Subcutaneous	GD 6, 9, 12, 15 and 18; LD 1, 4, 7, 10, 13, 16 and 19	0.2, 0.49, 1.63 Every 3 days	Yes	[redacted]	[redacted]-353253	4.2.3.5.3.1
Studies in Juvenile Animals								
Juvenile	Rat	Subcutaneous	PND 7 through 91	0, 0.5, 2, 7 Every 3 days	Yes	[redacted]	[redacted]-353304	4.2.3.5.4.1
Other Toxicity Studies								
Mechanistic								
	Rat	Subcutaneous	1 year	5 Twice weekly	Yes	[redacted]	8236888	4.2.3.7.3.1
	ZDF Rat	Subcutaneous	3 months	0.5, 1.5, 5 Twice weekly	Yes	[redacted]	504758	4.2.3.7.3.2
	Monkey	Subcutaneous	1 year	8.15 Twice weekly	Yes	[redacted]	8252199	4.2.3.7.3.3

Abbreviations: GD = gestation day; GLP = Good Laboratory Practice; LD = lactation day; PND = postnatal day; ZDF = Zucker Diabetic Fatty.

2.6.7.3　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス成績の一覧

Dose (mg/kg)	Steady State C_{max} (μg/mL) and AUC (μg•hr/mL)													
	Mouse				Rat				Monkey				Rabbit	
	C_{max}		AUC		C_{max}		AUC		C_{max}		AUC		C_{max}	AUC
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	F	F
0.04													0.17[k]	7.05[k]
0.05					0.0914[i]	0.120[i]	4.05[i]	4.07[i]						
0.12													0.56[k]	26.52[k]
0.2						0.497[l]		15.3[l]						
0.3	0.414[h]	0.391[h]	6.76[h]	10.5[h]										
0.41									2.70[e]	2.95[e]	136.67[e]	172.99[e]	1.74[k]	77.94[k]
0.41									3.28[g]	4.33[g]	174.13[g]	236.85[g]		
0.49						0.96[j]		35.00[j]						
0.49						1.04[l]		35.7[l]						
0.5					1.11[i]	1.16[i]	62.4[i]	56.7[i]						
0.5					0.591[m]		21.2[m]							
0.5					1.11[p]	1.20[p]	33.6[p]	36.4[p]						
1	3.25[a]	2.70[a]	118[a]	80.6[a]					8.34[f]	8.59[f]	349.39[f]	370.71[f]		
1	0.645[h]	0.769[h]	24.2[h]	22.4[h]										
1.5					2.88[i]	3.25[i]	162[i]	155[i]						
1.5					1.67[m]		65.4[m]							
1.63					2.92[c]	2.41[c]	114.28[c]	134.00[c]	9.01[e]	13.03[e]	505.93[e]	857.41[e]		
1.63					3.58[d]	2.46[d]	136.90[d]	104.68[d]	10.79[g]	13.94[g]	690.56[g]	747.29[g]		
1.63						2.79[j]		110.06[j]						
1.63						3.95[l]		131[l]						
2					6.30[b]	4.85[b]	237.18[b]	236.54[b]						
2					3.81[p]	3.39[p]	131[p]	124[p]						
3	1.17[h]	1.69[h]	33.1[h]	40.9[h]					25.24[f]	22.26[f]	1137.61[f]	1006.95[f]		

(Continued)

2.6.7.3　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス成績の一覧（続き）

	Steady State C_{max} (μg/mL) and AUC (μg•hr/mL)													
	Mouse				Rat				Monkey				Rabbit	
Dose	C_{max}		AUC		C_{max}		AUC		C_{max}		AUC		C_{max}	AUC
(mg/kg)	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	F	F
4.89					8.10[c]	7.77[c]	299.72[c]	254.54[c]						
4.89					9.76[d]	13.15[d]	301.08[d]	293.70[d]						
4.89						10.31[j]		348.14[j]						
5					10.0[i]	8.46[i]	366[i]	563[i]						
5					7.1[m]		238[m]							
6					15.10[b]	14.23[b]	749.22[b]	728.18[b]						
7					14.6[p]	15.8[p]	512[p]	581[p]						
8.15									55.64[e]	47.58[e]	3019.54[e]	3048.68[e]		
8.15									74.47[g]	72.25[g]	3412.21[g]	4248.58[g]		
10	32.5[a]	21.5[a]	1394[a]	896[a]					93.00[f]	81.81[f]	4624.89[f]	3217.42[f]		
16.29					22.32[c]	30.87[c]	1042.34[c]	1318.94[c]						
16.29					37.55[d]	33.56[d]	1203.26[d]	1386.72[d]						
20					37.81[b]	37.00[b]	1774.14[b]	1673.20[b]						
100	264[a]	193[a]	9292[a]	8100[a]										

2.6.7.3　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス成績の一覧（続き）

Abbreviations: AUC = area under the concentration time curve; C_{max} = maximum observed concentration; F = female; M = male.

[a] C_{max} and $AUC_{0\text{-}96hr}$ at Day 29 (Study 8224143).

[b] C_{max} and $AUC_{0\text{-}last}$ at Day 32 (Study R00359).

[c] C_{max} and $AUC_{0\text{-}last}$ at Day 92 (Study 7608-191).

[d] C_{max} and $AUC_{0\text{-}last}$ on Day 183 (Study 7608-236).

[e] C_{max} and $AUC_{0\text{-}96hr}$ on Day 92 (Study 7608-192).

[f] C_{max} and $AUC_{0\text{-}last}$ on Day 28 (Study P00054).

[g] C_{max} and $AUC_{0\text{-}96hr}$ on Day 274 (Study 7608-235).

[h] C_{max} and $AUC_{0\text{-}96hr}$ on Day 176 (Study 8224144).

[i] C_{max} and $AUC_{0\text{-}96hr}$ on Week 52 (Study 8203405).

[j] C_{max} and $AUC_{0\text{-}96hr}$ on Gestation Day 15 (Study [redacted]-353116).

[k] C_{max} and $AUC_{0\text{-}last}$ on Gestation Day 19 (Study [redacted]-353119); parameters reported exclude animals with likely antibody formation.

[l] C_{max} and $AUC_{0\text{-}last}$ on Lactation Day 4 (Study [redacted]-353253).

[m] C_{max} and $AUC_{0\text{-}96hr}$ at Day 88 (Study 504758).

[p] C_{max} and $AUC_{0\text{-}72hr}$ at Postnatal Day 91 (Study [redacted]-353304).

2.6.7.4　毒性試験：被験物質の一覧

Lot Number	Purity (% LY2189265)	Specified Impurities (%)						Document ID	Location in CTD	Type of Study
		Total aggregates	des H/HG	Total hydroxylated/oxidized GLP Peptide m[21-28]	Linker clipping + DES 1-22/1-25	Serine 46 phosphorylation	Total Impurities			
Specification:	75.0	7.0	8.0	9.0	3.0	–	25.0			
[redacted]	87.7	0.7	1.9	4.7	0.1	0.9	12.3	8224143	4.2.3.2.1	Repeat dose, 1 month, mouse
[redacted]	68.94	ND	ND	ND	ND	ND	31.06	R00359	4.2.3.2.2	Repeat dose, 1 month, rat
	68.94	ND	ND	ND	ND	ND	31.06	P00054	4.2.3.2.5	Repeat dose, 1 month, monkey
	65.9	1.6	4.5	5.1	0.8	3.1	34.1	7608-191	4.2.3.2.3	Repeat dose, 3 month, rat
	65.9	1.6	4.5	5.1	0.8	3.1	34.1	7608-192	4.2.3.2.6	Repeat dose, 3 month, monkey
	65.9	1.6	4.5	5.1	0.8	3.1	34.1	7608-236	4.2.3.2.4	Repeat dose, 6 month, rat
	65.9	1.6	4.5	5.1	0.8	3.1	34.1	7608-235	4.2.3.2.7	Repeat dose, 9 month, monkey
[redacted]	87.7	0.7	1.9	4.7	0.1	0.9	12.3	8203405	4.2.3.4.1.1	Carcinogenicity, rat
	87.7	0.7	1.9	4.7	0.1	0.9	12.3	8224144	4.2.3.4.2.1	Carcinogenicity, mouse
	65.9	1.6	4.5	5.1	0.8	3.1	34.1	[redacted]-353112	4.2.3.5.1.2	Female fertility, rat
	65.9	1.6	4.5	5.1	0.8	3.1	34.1	[redacted]-353113	4.2.3.5.1.1	Male fertility, rat
	65.9	1.6	4.5	5.1	0.8	3.1	34.1	[redacted]-353116	4.2.3.5.2.1	Embryo-fetal, rat
	65.9	1.6	4.5	5.1	0.8	3.1	34.1	[redacted]-353119	4.2.3.5.2.2	Embryo-fetal, rabbit
[redacted]	87.7	0.7	1.9	4.7	0.1	0.9	12.3	[redacted]-353253	4.2.3.5.3.1	Pre/postnatal, rat
	87.7	0.7	1.9	4.7	0.1	0.9	12.3	[redacted]-353304	4.2.3.5.4.1	Juvenile, rat
	87.7	0.7	1.9	4.7	0.1	0.9	12.3	8236888	4.2.3.7.3.1	Investigative thyroid, 1 year, rat
	87.7	0.7	1.9	4.7	0.1	0.9	12.3	504758	4.2.3.7.3.2	Investigative pancreatic, 3 month, ZDF rat
[redacted]	87.7	0.7	1.9	4.7	0.1	0.9	12.3	8252199	4.2.3.7.3.3	Investigative thyroid, 1 year, monkey

Abbreviations: ND = not determined; ZDF = Zucker Diabetic Fatty.

2.6.7.5　単回投与毒性試験

独立した単回投与毒性試験は実施していない。デュラグルチドの急性毒性は、単回投与安全性薬理試験及び反復投与毒性試験の中で評価した。詳細は第 2.6.6.2 項を参照のこと。

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（2 週間投与試験）

Species Strain	Route	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	No./Sex/Group	Noteworthy Findings	GLP	Document ID
Mouse, Crl:CD1 (ICR)	SC	2 weeks	0[a], 1, 10, and 100 Twice weekly	5	One animal given 100 mg/kg was euthanized moribund on Day 7. This animal lost 27% of its Day 1 body weight by Day 4 and was noted with few feces, hunched posture, squinted eyes, hypoactivity, and thin body condition. All other animals survived to termination. Dose dependent body weight loss with correlating decreases in food consumption was noted in all groups during the first 4 days of study. The body weight effects at 100 mg/kg were considered adverse. At the end of 2 weeks of dosing, no difference in body weight or food consumption was observed between control and treated animals. Decreased red cell mass (red blood cell counts, hemoglobin, and hematocrit), was noted at all dose levels. Decreased glucose concentrations occurred in males given ≥10 mg/kg. Minimal microscopic changes were observed in liver, pancreas, and adipose tissue which were considered secondary to body weight and food consumption effects during the first week of study. NOAEL = 10 mg/kg (C_{max} = 18.7 μg/mL, $AUC_{0\text{-}96hr}$ = 561 μg•hr/mL)	No	8216121*
Rat, Fischer 344	SC	2 weeks	0[b], 2, 6, 20 Twice weekly	5	Doses up to 20 mg/kg were well tolerated. No mortality occurred and no compound related clinical signs were noted. Dose dependent decreases in food consumption occurred during the first week of study in all treated groups which was accompanied with decreased body weight relative to control at all dose levels. Non-adverse bone marrow hypocellularity was noted in animals given ≥6 mg/kg. No important changes in hematology, clinical chemistry, or urinalysis occurred. NOAEL = 6 mg/kg (C_{24hr} = 10.5 μg/mL, AUC = not calculated)	No	R00163*

(Continued)

2.6.7.6　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（2 週間投与試験）（続き）

Species/ Strain	Route	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	No./Sex/Group	Noteworthy Findings	GLP	Document ID
Rat/Zucker Diabetic Fatty	SC	2 weeks	0[c], 0.05, 0.5, 1.5, 5 Twice weekly	5 males	Dose related decreases in food consumption and body weight gain were observed at ≥0.5 mg/kg. Water consumption and urine volume progressively increased over the duration of the study in the untreated control (0 mg/kg) animals consistent with the emergence of the diabetic disease state. Minimal changes in water consumption and urine volume were observed in treated animals. No mortality occurred on study. MTD = 5 mg/kg (13.98 μg/mL on Day 11 at 24hr postdose).	No	504889*
Monkey/ Cynomolgus	SC	2 week dose escalation[d]	0.3, 1, 3, 10	1	No mortality occurred. Decreased food consumption and fecal output was noted at all dose levels. No important changes occurred in clinical pathology parameters, organ weights, or histopathology. NOAEL = 10 mg/kg (C_{max} = 65.7 μg/mL, $AUC_{0\text{-}168hr}$ = 3799 μg•hr/mL)	No	P00028*

Abbreviations: C_{24hr} = observed plasma concentration measured approximately 24 hours post dose; AUC = area under the concentration time curve; C_{max} = maximum observed concentration; GLP = Good Laboratory Practice; MTD = maximum tolerated dose; No. = number; NOAEL = no-observed-adverse-effect level; SC = subcutaneous.

* Pilot studies: These reports are not contained in Module 4, but they are available upon request.

[a] Vehicle = 10 mM sodium citrate buffer, pH 6.5 ± 0.2, 4.7% mannitol (w/v), 0.02% polysorbate 80 (w/v)

[b] Vehicle = 10 mM citrate buffer, pH 6.5

[c] Vehicle = 10 mM citrate buffer, pH 6.5, 4.6% mannitol (w/v), 0.02% polysorbate 80 (w/v)

[d] Animals were dosed on Days 0 and 4 for each escalation and observed for 14 days after dosing.

2.6.7.7A　反復投与毒性試験：重要な試験（マウスを用いた１ヵ月間反復投与毒性試験）

Report title: A Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetic Study in 001178-W (wild type) Mice Given LY2189265 Twice Weekly by Subcutaneous Injection for 4 Weeks

Species/strain: Mouse/Model 001178-W (wild type), CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic
Initial age: 7 weeks
Date of first dose: 14 June 20[redacted]
NOAEL: 100 mg/kg

Duration of dosing: 4 weeks, twice weekly
Duration of reversibility: Not applicable
Route: Subcutaneous Injection
Vehicle: 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.5), 4.7% mannitol (w/v), and 0.02% (w/v) polysorbate 80, prepared in sterile water for injection

Document ID: 8224143
Location in CTD: 4.2.3.2.1
GLP compliance: Yes
Test Article: Dulaglutide

Special features: None

Toxicokinetics

Sample: Mouse plasma　Analyte: Dulaglutide　Number of animals: 8-38 sex/group (total = 244)
Feeding condition: Fed　Dose frequency: Twice weekly　Assay/Method: ELISA/09-131 (Location in CTD: 4.2.2.1.1)

Dose (mg/kg)	1		10		100	
Sex	M	F	M	F	M	F
Toxicokinetics						
Day 1						
C_{max} (μg/mL)	2.87	2.87	27.2	24.5	180	170
$AUC_{0\text{-}96hr}$ (μg•hr/mL)	62.0	62.4	724	604	6385	5379
T_{max} (hr)	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
N	2	2	2	2	2	2
Day 29						
C_{max} (μg/mL)	3.25	2.70	32.5	21.5	264	193
$AUC_{0\text{-}96hr}$ (μg•hr/mL)	118	80.6	1394	896	9292	8100
T_{max} (hr)	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
N	2	2	2	2	2	2

(Continued)

2.6.7.7A　反復投与毒性試験：重要な試験（マウスを用いた１ヵ月間反復投与毒性試験）（続き）

Dose (mg/kg)	0 (Control)		1		10		100	
Sex: Number of Animals	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10
Noteworthy Findings								
Body weight (g, % change[a])								
Day 11	25.5	20.8	-	-	↓7*	↓10*	↓10*	↓15*
Day 32	27.8	23.3	-	-	↓8*	↓13*	↓12*	↓16*
Food consumption (g, % change[a])								
Days 1-3	15.9	13.5	↓25*	↓27*	↓43*	↓42*	↓60*	↓55*
Days 29-31	17.2	16.7	↓10	↓7	↓11	↓14	↓16	↓25*

Abbreviations: ↓ = decrease; – = no important findings; $AUC_{0\text{-}96hr}$ = area under the concentration time curve from 0 to 96 hours; C_{max} = maximum observed concentration; ELISA = Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; F = female; M = male; N = number of animals for toxicokinetic analysis (animals/sex/treatment/timepoint), data are from a composite analysis; NOAEL = no-observed-adverse-effect level; T_{max} = time to maximum concentration.

[a] For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance based on actual data (not the percent differences).

* $p \leq 0.05$ (ANOVA, Dunnett's if applicable)

2.6.7.7B　反復投与毒性試験：重要な試験（ラットを用いた１ヵ月間反復投与毒性試験）

Report title: Repeat-Dose Toxicology and Toxicokinetic Studies in Fischer 344 Rats Given LY2189265 Twice Weekly by Subcutaneous Injection for a Total of 10 Doses

Species/strain: Rat/Fischer 344
Initial age: 10 to 11 weeks
Date of first dose: R00359 (Tox) – 10 January 20[redacted]; R00380 (TK) – 13 January 20[redacted]
NOAEL: 20 mg/kg
Special features: None

Duration of dosing: 5 weeks, twice weekly
Duration of reversibility: Not applicable
Route: Subcutaneous Injection
Vehicle: 10 mM citrate buffer (pH 6.5), 0.02% (w/v) polysorbate 80, with 150 mM sodium chloride prepared in Sterile Water for Injection

Document ID: R00359
Location in CTD: 4.2.3.2.2
GLP compliance: Yes
Test Article: Dulaglutide

Toxicokinetics

Sample: Rat Plasma
Analyte: Dulaglutide
Number of animals: 11/sex/group (total = 66)
Feeding condition: Fed
Dose frequency: Twice Weekly
Assay/Method: ELISA/0002294 (Location in CTD: 4.2.2.1.2)

Dose (mg/kg)	2		6		20	
Sex	M	F	M	F	M	F
Toxicokinetics						
Day 0						
C_{max} (µg/mL)	4.84	5.84	12.19	11.60	27.52	34.83
$AUC_{0\text{-}last}$ (µg•hr/mL)	162.28	177.98	441.76	427.34	1043.62	1163.16
T_{max} (hr)	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
N	3	3	3	3	3	3
Day 32						
C_{max} (µg/mL)	6.30	4.85	15.10	14.23	37.81	37.00
$AUC_{0\text{-}last}$ (µg•hr/mL)	237.18	236.54	749.22	728.18	1774.14	1673.20
T_{max} (hr)	12.0	12.0	24.0	4.0	12.0	12.0
N	3	3	3	3	3	3

(Continued)

2.6.7.7B　反復投与毒性試験：重要な試験（ラットを用いた１ヵ月間反復投与毒性試験）（続き）

Dose (mg/kg)	0 (Control)		2		6		20	
Sex: Number of Animals	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10
Noteworthy Findings								
Body weight (g, % change[a])								
Day 10	248.61	161.07	↓11*	↓6*	↓20*	↓14*	↓27*	↓19*
Day 34	295.52	173.80	↓11*	↓3*	↓17*	↓8*	↓20*	↓9*
Food consumption (g/kg/day, % change[a])								
Days 0-3	81.061	74.684	↓64*	↓59*	↓80*	↓75*	↓92*	↓84*
Days 31-34	63.388	75.169	↑1	↓3	↑6	↓3	↑4	↓12*
Histopathology (n[b])								
Injection site								
Hemorrhage minimal ~ slight	0	1	0	0	0	0	2	0
Inflammation; chronic minimal ~ slight	5	6	0	0	2	0	6	6
Testis								
Seminiferous tubule atrophy								
minimal	2	NA	NE	NA	2	NA	2	NA
slight	0	NA	NE	NA	0	NA	5	NA
moderate	1	NA	NE	NA	0	NA	1	NA
Epididymis								
Bilateral epididymal luminal cell debris								
minimal	0	NA	NE	NA	0	NA	2	NA
slight	0	NA	NE	NA	0	NA	6	NA
moderate	0	NA	NE	NA	0	NA	2	NA
Oligospermia								
minimal	0	NA	NE	NA	0	NA	7	NA
Prostate								
Decreased secretion								
minimal	0	NA	NE	NA	0	NA	2	NA
slight	0	NA	NE	NA	0	NA	1	NA

(Continued)

2.6.7.7B　反復投与毒性試験：重要な試験（ラットを用いた１ヵ月間反復投与毒性試験）（続き）

Dose (mg/kg)	0 (Control)		2		6		20	
Sex: Number of Animals	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10
Noteworthy Findings								
Seminal vesicle								
Decreased secretion								
minimal	0	NA	NE	NA	0	NA	2	NA
slight	0	NA	NE	NA	0	NA	1	NA
moderate	0	NA	NE	NA	0	NA	2	NA
Vagina								
Diestrus I	NA	4	NA	2	NA	3	NA	3
Diestrus II	NA	0	NA	0	NA	2	NA	5
Estrus	NA	4	NA	2	NA	2	NA	1
Proestrus	NA	2	NA	6	NA	3	NA	1
Thymus								
Cortex atrophy								
minimal	0	0	0	0	2	0	2	0
moderate	0	0	0	0	0	0	1	0

Abbreviations: ↑ = increase; ↓ = decrease; $AUC_{0\text{-last}}$ = area under the concentration time curve from 0 to last quantifiable timepoint; C_{max} = maximum observed concentration; ELISA = Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; F = female; M = male; N = number of animals for toxicokinetic analysis (animals/sex/treatment/timepoint), data are from a composite analysis; NA = not applicable; NE = not evaluated; NOAEL = no-observed-adverse-effect level; T_{max} = time to maximum concentration.

a For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance based on actual data (not the percent differences).

b Number of animals or tissues.

* $p \leq 0.05$ (linear trend test)

2.6.7.7C　反復投与毒性試験：重要な試験（ラットを用いた３ヵ月間反復投与毒性試験）

Report title: A Repeat-Dose Toxicology and Toxicokinetic Study in Sprague Dawley Rats Given LY2189265 Twice Weekly by Subcutaneous Injection for a Total of 27 Doses

Species/strain: Rat/Crl:CD(SD)
Initial age: 6 to 7 weeks
Date of first dose: 26 June 20[redacted]
NOAEL: 16.29 mg/kg

Duration of dosing: 13 weeks, twice weekly
Duration of reversibility: Not applicable
Route: Subcutaneous Injection
Vehicle: 10 mM citrate buffer (pH 6.5), 0.02% (w/v) polysorbate 80, with 150 mM sodium chloride prepared in Sterile Water for Injection

Document ID: 7608-191
Location in CTD: 4.2.3.2.3
GLP compliance: Yes
Test Article: Dulaglutide

Special features: None

Toxicokinetics

Sample: Rat Plasma　Analyte: Dulaglutide　Number of animals: 5-11/sex/group (total = 76)
Feeding condition: Fed　Dose frequency: Twice Weekly　Assay/Method: ELISA/06-034 (Location in CTD: 4.2.2.1.3)

Dose (mg/kg)	1.63		4.89		16.29	
Sex	M	F	M	F	M	F
Toxicokinetics						
Day 1						
C_{max} (μg/mL)	1.89	1.95	6.45	11.60	45.90	21.58
$AUC_{0\text{-}last}$ (μg•hr/mL)	77.20	88.84	234.66	323.30	943.38	721.24
T_{max} (hr)	24.0	24.0	12.0	12.0	12.0	12.0
N	3	3	3	3	3	3
Day 92						
C_{max} (μg/mL)	2.92	2.41	8.10	7.77	22.32	30.87
$AUC_{0\text{-}last}$ (μg•hr/mL)	114.28	134.00	299.72	254.54	1042.34	1318.94
T_{max} (hr)	24.0	24.0	24.0	24.0	12.0	24.0
N	3	3	3	3	3	3

(Continued)

2.6.7.7C　反復投与毒性試験：重要な試験（ラットを用いた３ヵ月間反復投与毒性試験）（続き）

Test Article: Dose (mg/kg)	0 (Control)		1.63		4.89		16.29	
Sex: Number of Animals	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10
Noteworthy Findings								
Body weight (g, % change[a])								
Day 8	309	207	↓10*	↓5	↓15*	↓9*	↓22*	↓18*
Day 92	614	313	↓15*	↓10*	↓16*	↓8*	↓21*	↓13*
Food consumption (g, % change[a])								
Days 5-7	95	63	↓25*	↓19*	↓37*	↓32*	↓51*	↓52*
Days 92-94	112	67	↓14*	↓7	↓20*	↓7	↓23*	↓18

Abbreviations: ↓ = decrease; $AUC_{0\text{-last}}$ = area under the concentration time curve from 0 to last quantifiable timepoint; C_{max} = maximum observed concentration; ELISA = Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; F = female; M = male; N = number of animals for toxicokinetic analysis (animals/sex/treatment/timepoint), data are from a composite analysis; NOAEL = no-observed-adverse-effect level; T_{max} = time to maximum concentration.

[a] For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance based on actual data (not the percent differences).

* $p \leq 0.05$ (ANOVA, Dunnett's if applicable)

2.6.7.7D　反復投与毒性試験：重要な試験（ラットを用いた６ヵ月間反復投与毒性試験及び１ヵ月間回復性試験）

Report title: A Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetic Study in Rats Given LY2189265 Twice Weekly by Subcutaneous Injection for 6 Months with a 1 Month Recovery

Species/strain: Rat/Crl:CD(SD)
Initial age: 6 to 8 weeks
Date of first dose: 21 August 20[redacted]
NOAEL: 16.29 mg/kg

Duration of dosing: 6 Months, twice weekly
Duration of reversibility: 1 Month
Route: Subcutaneous Injection
Vehicle: 10 mM citrate buffer (pH 6.5), 0.02% (w/v) polysorbate 80, with 150 mM sodium chloride prepared in Sterile Water for Injection, USP

Document ID: 7608-236
Location in CTD: 4.2.3.2.4
GLP compliance: Yes
Test Article: Dulaglutide

Special features: None

Toxicokinetics

Sample: Rat Plasma　Analyte: Dulaglutide　Number of animals: 6-12/sex/group (total = 84)
Feeding condition: Fed　Dose frequency: Twice Weekly　Assay/Method: ELISA/06-034 (Location in CTD: 4.2.2.1.3)

Dose (mg/kg)	1.63		4.89		16.29	
Sex	M	F	M	F	M	F
Toxicokinetics						
Day 1						
C_{max} (μg/mL)	2.72	3.42	6.60	6.89	14.25	20.57
$AUC_{0\text{-}last}$ (μg•hr/mL)	86.42	114.33	199.20	253.37	451.74	646.16
T_{max} (hr)	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
N	3	3	3	3	3	3
Day 183						
C_{max} (μg/mL)	3.58	2.46	9.76	13.15	37.55	33.56
$AUC_{0\text{-}last}$ (μg•hr/mL)	136.90	104.68	301.08	293.70	1203.26	1386.72
T_{max} (hr)	24.0	12.0	24.0	12.0	24.0	24.0
N	3	3	3	3	3	3

(Continued)

2.6.7.7D　反復投与毒性試験：重要な試験（ラットを用いた６ヵ月間反復投与毒性試験及び１ヵ月間回復性試験）（続き）

Test Article: Dose (mg/kg)	0 (Control)		1.63		4.89		16.29	
Sex: Number of Animals	M: 25[a]	F: 25[a]	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 25[a]	F: 25[a]
Noteworthy Findings								
Body weight (g, % change[b])								
Day 8	283	211	↓9*	↓6*	↓15*	↓10*	↓23*	↓17*
Day 183	642	358	↓7*	↓16*	↓14*	↓16*	↓18*	↓19*
Recovery Day 25	649	352	NE	NE	NE	NE	↓10**	↓4
Food consumption (g, % change[b])								
Days 1-3	79	62	↓18*	↓29*	↓46*	↓50*	↓70*	↓66*
Days 183-185	93	65	↓9*	↓15*	↓12*	↓11*	↓19*	↓14*
Recovery Day 25-27	96	71	NE	NE	NE	NE	↑3	↑1

Abbreviations: ↑ = increase; ↓ = decrease; $AUC_{0\text{-last}}$ = area under the concentration time curve from 0 to last quantifiable timepoint; C_{max} = maximum observed concentration; ELISA = Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; F = female; M = male; N = number of animals for toxicokinetic analysis (animals/sex/treatment/timepoint), data are from a composite analysis; NE = not evaluated; NOAEL = no-observed-adverse-effect level; T_{max} = time to maximum concentration.

[a] The last 10 animals/sex were designated as recovery animals and were dosed with test article or control article for at least 26 weeks after which dosing was discontinued and reversibility of any toxicity was assessed after 4 weeks of recovery.

[b] For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance based on actual data (not the percent differences).

* $p \leq 0.05$ (ANOVA, Dunnett's if applicable)

** $p \leq 0.05$ (Two-sample t-test)

2.6.7.7E　反復投与毒性試験：重要な試験（サルを用いた 1 ヵ月間反復投与毒性試験）

Report title: A Repeat-Dose Toxicology Study in Cynomolgus Monkeys Given LY2189265 Twice Weekly by Subcutaneous Injection for a Total of 9 Doses

Species/strain: Monkey/Cynomolgus
Initial age: 24 to 44 months
Date of first dose: 03 February 20[redacted]
NOAEL: Not established

Duration of dosing: 4 Weeks, twice weekly
Duration of reversibility: Not applicable
Route: Subcutaneous Injection
Vehicle: 10 mM citrate buffer (pH 6.5), 0.02% (w/v) polysorbate 80, with 150 mM sodium chloride prepared in Sterile Water for Injection, USP

Document ID: P00054
Location in CTD: 4.2.3.2.5
GLP compliance: Yes
Test Article: Dulaglutide

Special features: None

Toxicokinetics

Sample: Monkey Plasma　Analyte: Dulaglutide　Number of animals: 3/sex/group (total = 24)
Feeding condition: Fed　Dose frequency: Twice Weekly　Assay/Method: ELISA/0002299 (Location in CTD: 4.2.2.1.7)

Dose (mg/kg)	1		3		10	
Sex	M	F	M	F	M	F
Toxicokinetics						
Day 0						
C_{max} (µg/mL)	6.19	4.65	9.44	13.31	48.93	57.00
(SD)	(NC)	(1.00)	(4.22)	(2.91)	(9.05)	(4.53)
$AUC_{0\text{-last}}$ (µg•hr/mL)	226.17	223.23	404.33	402.57	2184.67	1815.13
(SD)	(NC)	(26.06)	(89.98)	(30.18)	(374.58)	(186.37)
T_{max} (hr)	8.00	4.00	13.33	6.67	12.00	9.33
(SD)	(NC)	(0.00)	(10.07)	(4.62)	(0.00)	(4.62)
N	2[a]	3	3	3	3	3

(Continued)

2.6.7.7E　反復投与毒性試験：重要な試験（サルを用いた１ヵ月間反復投与毒性試験）（続き）

Dose (mg/kg)	1		3		10	
Sex	M	F	M	F	M	F
Toxicokinetics						
Day 28						
C_{max} (μg/mL)	8.34	8.59	25.24	22.26	93.00	81.81
(SD)	(1.80)	(1.76)	(5.04)	(3.03)	(14.77)	(27.41)
$AUC_{0\text{-}last}$ (μg•hr/mL)	349.39	370.71	1137.61	1006.95	4624.89	3217.42
(SD)	(95.54)	(24.62)	(192.27)	(72.67)	(299.05)	(1159.21)
T_{max} (hr)	6.67	9.33	9.33	4.00	9.33	12.00
(SD)	(4.62)	(4.62)	(4.62)	(0.00)	(4.62)	(0.00)
N	3	3	3	3	3	3

(Continued)

2.6.7.7E　反復投与毒性試験：重要な試験（サルを用いた１ヵ月間反復投与毒性試験）（続き）

Test Article: Dose (mg/kg)	0 (Control)		1		3		10	
Sex: Number of Animals	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3
Noteworthy Findings								
Body weight (kg, % change[b])								
Day 12/13[c]	2.90	2.40	↓10	↓7	↓7	↓1	↓9*	↓13
Day 25/26[c]	2.87	2.33	↓8	↓4	↓8*	↑3	↓9*	↓7
Clinical observations[d]								
Vomitus	0(0)	1(2)	2(5)	2(2)	2(3)	3(8)	1(3)	3(6)
Qualitative food consumption[d]								
25% of food remaining	1(1)	-	-	2(4)	2(2)	-	3(7)	2(4)
50% of food remaining	-	1(1)	1(5)	2(3)	2(2)	1(5)	1(1)	2(10)
75% of food remaining	-	-	-	-	2(2)	2(4)	2(2)	3(5)
100% of food remaining	-	-	1(1)	1(1)	2(2)	2(2)	2(4)	3(4)
Combined total	1(1)	1(1)	1(6)	2(8)	3(8)	2(11)	3(14)	3(23)
Electrocardiography (msec, % change[b,e])								
QTcL Day 4 (predose)	366.3	390.7	↑15	↑5	↑12	↑8	↑10	↑7
Genders combined	378.5		↑10*		↑9*		↑9*	
QTcL Day 28 (predose)	378.3	384.7	↑5	↑2	↑12	↑10	↑5	↑9
Genders combined	381.5		↑3		↑11*		↑7*	
QTcL Day 28 (2 hours postdose)	366.7	390.7	↑6	↑2	↑12	↑9	↑8	↑15
Genders combined	378.7		↑4		↑10*		↑12*	

(Continued)

2.6.7.7E　反復投与毒性試験：重要な試験（サルを用いた 1 ヵ月間反復投与毒性試験）（続き）

Test Article: Dose (mg/kg)		0 (Control)		1		3		10	
Sex: Number of Animals		M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3
Noteworthy Findings									
Histopathology (n[f])									
Injection site, Upper									
Inflammation; chronic	minimal	0	0	0	0	0	1	0	0
Injection site, Lower									
Inflammation; chronic									
	minimal ~slight	0	0	1	2	2	1	2	1
Hemorrhage	slight	0	0	0	0	0	0	1	0

Abbreviations: ↑ = increase; ↓ = decrease; $AUC_{0\text{-last}}$ = area under the concentration time curve from 0 to last quantifiable timepoint; C_{max} = maximum observed concentration; ELISA = Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; F = female; M = male; N = number of animals for toxicokinetic analysis (animals/sex/treatment); NC = not calculated; NOAEL = no-observed-adverse-effect level; QTcL = rate corrected QT interval; SD = standard deviation; T_{max} = time to maximum concentration.

[a] N = 2 animals/sex/treatment, Animal Number. 100202 not included in calculations of mean or SD due to incomplete dosing.

[b] For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance based on actual data (not the percent differences).

[c] Body weight was collected on Day 12 and 25 for the females and Day 13 and 26 for the males.

[d] Number of animals (total incidence)

[e] Electrocardiography statistics performed on combined gender data only.

[f] Number of animals

[*] p≤0.05 (Linear trend test)

2.6.7.7F　反復投与毒性試験：重要な試験（サルを用いた３ヵ月間反復投与毒性試験及び１ヵ月間回復性試験）

Report title: A Repeat-Dose Toxicology Study in Cynomolgus Monkeys Given LY2189265 Twice Weekly by Subcutaneous Injection for a Total of 27 Doses

Species/strain: Monkey/Cynomolgus
Initial age: 2 to 4 years
Date of first dose: 23 June 20[redacted]
NOAEL: 8.15 mg/kg

Duration of dosing: 13 Weeks, twice weekly
Duration of reversibility: 1 month
Route: Subcutaneous Injection
Vehicle: 10 mM citrate buffer (pH 6.5), 0.02% (w/v) polysorbate 80, with 150 mM sodium chloride prepared in Sterile Water for Injection, USP

Document ID: 7608-192
Location in CTD: 4.2.3.2.6
GLP compliance: Yes
Test Article: Dulaglutide

Special features: None

Toxicokinetics

Sample: Monkey Plasma　Analyte: Dulaglutide　Number of animals: 6/sex/group (total = 48)
Feeding condition: Fed　Dose frequency: Twice Weekly　Assay/Method: ELISA/06-033 (Location in CTD: 4.2.2.1.6)

Dose (mg/kg)	0.41		1.63		8.15	
Sex	M	F	M	F	M	F
Toxicokinetics						
Day 1						
C_{max} (μg/mL)	1.13	1.08	3.96	3.40	31.96	37.26
(SD)	(0.22)	(0.22)	(0.65)	(0.51)	(10.03)	(12.81)
$AUC_{0\text{-}96hr}$ (μg•hr/mL)	71.14	63.91	238.62	201.40	1625.80	1705.95
(SD)	(10.73)	(12.48)	(42.60)	(32.37)	(311.46)	(412.32)
T_{max} (hr)	18.00	20.00	20.00	18.00	12.67	10.67
(SD)	(6.57)	(6.20)	(14.53)	(14.70)	(6.41)	(3.27)
N	6	6	6	6	6	6

(Continued)

2.6.7.7F　反復投与毒性試験：重要な試験（サルを用いた３ヵ月間反復投与毒性試験及び１ヵ月間回復性試験）（続き）

Dose (mg/kg)	0.41		1.63		8.15	
Sex	M	F	M	F	M	F
Toxicokinetics						
Day 92						
C_{max} (μg/mL)	2.70	2.95	9.01	13.03	55.64	47.58
(SD)	(0.43)	(0.51)	(1.20)	(1.42)	(11.24)	(14.01)
$AUC_{0\text{-}96hr}$ (μg•hr/mL)	136.67	172.99	505.93	857.41	3019.54	3048.68
(SD)	(10.22)	(53.49)	(79.40)	(138.79)	(331.34)	(833.72)
$AUC_{0\text{-}672hr}$ (μg•hr/mL)[a]	214.93	281.27	858.53	1235.06	4718.57	3491.02
(SD)[a]	(11.95)	(126.55)	(244.02)	(266.54)	(152.04)	(649.98)
T_{max} (hr)	8.00	11.33	12.00	18.00	14.00	14.00
(SD)	(4.38)	(7.34)	(0.00)	(6.57)	(4.90)	(4.90)
CL/F (mL/hr/kg)[a]	1.88	1.60	1.98	1.35	1.71	2.37
(SD)[a]	(0.12)	(0.61)	(0.60)	(0.30)	(0.06)	(0.42)
Vd/F (mL/kg)[a]	422.41	360.47	363.97	310.21	337.68	410.92
(SD)[a]	(36.48)	(90.92)	(94.09)	(87.65)	(8.05)	(43.95)
$T_{1/2}$ (hr)[a]	156.80	162.70	134.58	158.25	136.86	124.70
(SD)[a]	(22.93)	(27.76)	(46.33)	(14.28)	(1.56)	(37.97)
N	6	6	6	6	6	6

(Continued)

2.6.7.7F　反復投与毒性試験：重要な試験（サルを用いた３ヵ月間反復投与毒性試験及び１ヵ月間回復性試験）（続き）

Test Article: Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.41		1.63		8.15	
Sex: Number of Animals	M: 6[b]	F: 6[b]	M: 6[b]	F: 6[b]	M: 6[b]	F: 6[b]	M: 6[b]	F: 6[b]
Noteworthy Findings								
Body weight (kg, % change[c])								
Day 15	2.7	2.5	↓7	↓8	↓15	↓12	↓19*	↓16*
Day 92	2.9	2.6	↓7	↓8	↓17*	↓8	↓17*	↓15
Qualitative Food Consumption[d]								
Low	6(243)	6(442)	6(450)	6(367)	6(440)	6(458)	6(472)	6(471)
None	4(7)	3(5)	4(6)	2(2)	1(1)	0(0)	4(9)	5(10)
Qualitative Supplement Consumption[d]								
All supplement	6(559)	6(519)	6(530)	6(554)	6(549)	6(552)	6(510)	6(489)
Some supplement	4(9)	4(47)	0(40)	4(14)	5(19)	6(16)	6(52)	6(67)
No supplement	0(0)	2(4)	0(0)	1(1)	2(2)	1(2)	2(5)	4(13)
Clinical observations[d]								
Vomitus (Days 2 to 6)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)	1(1)	3(3)	4(4)
Electrocardiography								
Heart rate[e] (beats/minute, % change[c])								
Day 29 predose	132	-	↑29	-	↑20	-	↑42**	-
Day 89 predose[f]	115	133	↑47	↑20	↑14	↑16	↑38	↑44
Day 89 predose, (combined)[f]	124		↑33		↑15		↑42**	
Day 89, 22 hr[f]	115	114	↑48	↑30	↑14	↑48	↑40	↑50
Day 89, 22 hr (combined)[f]	114		↑39		↑32		↑46**	

(Continued)

2.6.7.7F　反復投与毒性試験：重要な試験（サルを用いた３ヵ月間反復投与毒性試験及び１ヵ月間回復性試験）（続き）

Test Article: Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.41		1.63		8.15	
Sex: Number of Animals	M: 6[b]	F: 6[b]	M: 6[b]	F: 6[b]	M: 6[b]	F: 6[b]	M: 6[b]	F: 6[b]
Noteworthy Findings								
Histopathology (ng)								
Subcutan Site A								
Inflammation, Chronic - Active	1	0	1	0	0	0	0	1
Macrophages, Pigmented	0	0	0	0	0	0	0	1
Degeneration, Skeletal Muscle	1	0	1	0	0	0	0	0
Subcutan Site B								
Inflammation, Chronic - Active	0	0	0	0	0	0	2	1
Degeneration, Skeletal Muscle	0	1	0	0	0	0	0	0
Inflammation, Sabacute, Subepidermal	1	0	0	1	0	0	0	0

Abbreviations: ↑ = increase; ↓ = decrease; – = no important findings; $AUC_{0\text{-}96hr}$ = area under the concentration time curve from 0 to 96 hours; $AUC_{0\text{-}672hr}$ = area under the concentration time curve from 0 to 672 hours; CL/F = plasma clearance as a function of bioavailability; C_{max} = maximum observed concentration; ELISA = Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; F = female; M = male; N = number of animals for toxicokinetic analysis (animals/sex/treatment); NOAEL = no-observed-adverse-effect level; SD = standard deviation; $T_{1/2}$ = elimination half-life; T_{max} = time to maximum concentration; Vd/F = volume of distribution as a function of bioavailability.

[a] N = 3 animals/sex/treatment

[b] The last 3 animals/sex/group were designated as posttreatment animals and were dosed with test article or control article for 27 doses after which dosing was discontinued and immunogenicity was assessed after a 4-week post treatment period.

[c] For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance based on actual data (not the percent differences).

[d] Number of animals (total incidence)

[e] Beats/minute

[f] Statistics performed on combined gender data.

[g] Number of animals

* p≤0.05 (ANOVA, Dunnett's if applicable)

** p≤0.05 (Linearity trend test, two-sided)

2.6.7.7G　反復投与毒性試験：重要な試験（サルを用いた９ヵ月間反復投与毒性試験及び２ヵ月間回復性試験）

Report title: A Repeat-Dose Toxicity, Toxicokinetic and Immunotoxicology Study in Cynomolgus Monkeys Given LY2189265 Twice Weekly by Subcutaneous Injection for 9 Months with a 2 Month Recovery

Species/strain: Monkey/Cynomolgus
Initial age: 3 to 5 years
Date of first dose: 21 August 20[redacted]
NOAEL: 8.15 mg/kg

Duration of dosing: 9 Months, twice weekly
Duration of reversibility: 2 Months
Route: Subcutaneous Injection
Vehicle: 10 mM citrate buffer (pH 6.5), 0.02% (w/v) polysorbate 80, with 150 mM sodium chloride prepared in Sterile Water for Injection, USP

Document ID: 7608-235
Location in CTD: 4.2.3.2.7
GLP compliance: Yes
Test Article: Dulaglutide

Special features: None

Toxicokinetics

Sample: Monkey Plasma　Analyte: Dulaglutide　Number of animals: 4-6/sex/group (total = 40)
Feeding condition: Fed　Dose frequency: Twice Weekly　Assay/Method: ELISA/06-033 (Location in CTD: 4.2.2.1.6)

Dose (mg/kg)	0.41		1.63		8.15	
Sex	M	F	M	F	M	F
Toxicokinetics						
Day 1						
C_{max} (μg/mL)	1.58	1.46	5.39	5.83	22.75	25.26
(SD)	(0.15)	(0.08)	(0.66)	(0.77)	(5.76)	(5.93)
$AUC_{0\text{-}96hr}$ (μg•hr/mL)	79.15	73.61	332.17	321.45	1486.90	1350.99
(SD)	(12.97)	(8.18)	(37.91)	(42.32)	(230.02)	(167.92)
T_{max} (hr)	10.00	12.00	15.00	10.00	12.67	16.00
(SD)	(4.00)	(0.00)	(6.00)	(4.00)	(6.41)	(6.20)
N	4	4	4	4	6	6

(Continued)

2.6.7.7G　反復投与毒性試験：重要な試験（サルを用いた９ヵ月間反復投与毒性試験及び２ヵ月間回復性試験）（続き）

Dose (mg/kg)	0.41		1.63		8.15	
Sex	M	F	M	F	M	F
Toxicokinetics						
Day 274						
C_{max} (μg/mL)	3.28	4.33	10.79	13.94	74.47	72.25
(SD)	(1.51)	(4.40)	(3.09)	(3.68)	(24.38)	(12.47)
$AUC_{0\text{-}96hr}$ (μg•hr/mL)	174.13	236.85	690.56	747.29	3412.21	4248.58
(SD)	(62.05)	(242.18)	(168.14)	(116.2)	(581.11)	(908.27)
$AUC_{0\text{-}672hr}$ (μg•hr/mL)	NA	NA	NA	NA	3996.35[a]	6844.25[a]
(SD)	NA	NA	NA	NA	NC	NC
T_{max} (hr)	16.00	15.00	24.00	21.00	20.67	24.80
(SD)	(9.80)	(11.49)	(16.97)	(6.00)	(8.16)	(15.59)
CL/F (mL/hr/kg)	NA	NA	NA	NA	2.01[a]	1.37[a]
(SD)	NA	NA	NA	NA	NC	NC
Vd/F (mL/kg)	NA	NA	NA	NA	502.09[a]	341.79[a]
(SD)	NA	NA	NA	NA	NC	NC
$T_{1/2}$ (hr)	NA	NA	NA	NA	173.77[a]	173.42[a]
(SD)	NA	NA	NA	NA	NC	NC
N	4	4	4	4	6	5

(Continued)

2.6.7.7G　反復投与毒性試験：重要な試験（サルを用いた９ヵ月間反復投与毒性試験及び２ヵ月間回復性試験）（続き）

Test Article: Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.41		1.63		8.15	
Sex: Number of Animals	M: 6[b]	F: 6[b]	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 6[b]	F: 6[b]
Noteworthy Findings								
Early euthanasia[c]	0	0	0	0	0	0	0	1
Body weight (kg, % change[d])								
Day 15	3.2	2.5	↓3	↓4	↓9	↓12*	↓9	↓12*
Day 274	4.1	3.0	↑12	↓7	↓2	↓10*	↓7	↓7
Recovery Day 53	4.0	2.9	NE	NE	NE	NE	↓5	↑3
Qualitative food consumption[h]								
Low	6	6	4	4	4	4	6	6
None	1	3	2	4	4	2	5	5
Dietary supplement consumption[h]								
All supplement	6	6	4	4	4	4	6	6
Some supplement	2	5	3	4	4	3	6	6
No supplement	1	1	0	2	1	2	1	5
Clinical observations[e]								
Vomitus (Days 1 to 8)	0(0)	0(0)	2(2)	1(1)	0(0)	0(0)	5(5)	1(1)
Electrocardiography								
Heart rate[f] (beats/minute, % change[d])								
Day 274, predose[g]	184	168	↓14	↑4	↓2	↑7	↑3	↑17
Day 274, predose (combined)[g]	176		↓5		↑2		↑10**	

(Continued)

2.6.7.7G　反復投与毒性試験：重要な試験（サルを用いた９ヵ月間反復投与毒性試験及び２ヵ月間回復性試験）（続き）

Test Article: Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.41		1.63		8.15	
Sex: Number of Animals	M: 6[b]	F: 6[b]	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 6[b]	F: 6[b]
Histopathology (n[h])								
Subcutan Site A								
Infiltrate, Lymphocytes/Macrophages	0	0	0	0	0	0	0	1
Infiltrate, Eosinophils	0	0	0	1	0	0	0	0
Inflammation, Chronic	0	0	0	2	0	0	0	1
Degeneration, Muscle	0	0	0	1	0	0	0	0
Subcutan Site B								
Hemorrhage	0	1	0	0	0	1	1	0
Inflammation, Chronic	0	0	1	0	0	1	0	0
Infiltrate, Macrophages	0	1	0	0	0	0	0	0
Degeneration, Muscle	0	0	0	1	0	1	0	0
Inflammation, Chronic - Active	0	0	0	1	0	0	0	0
Subcutan Site C								
Fibrosis, Muscle	0	0	0	0	0	0	0	1
Inflammation, Chronic	0	1	0	0	0	0	0	0
Degeneration, Muscle	0	0	0	0	0	0	0	0
Subcutan Site D								
Fibrosis	0	0	1	0	0	0	1	0
Inflammation, Chronic	0	0	0	0	1	0	1	0
Degeneration, Muscle	0	0	0	1	0	0	0	0
Subcutan Site E								
Atrophy, Adipose Tissue	1	0	0	0	1	2	1	1
Inflammation, Chronic	3	0	0	1	3	4	2	2
Fibrosis	3	0	0	0	2	3	0	2
Infiltrate, Eosinophils	0	0	0	0	0	1	0	1
Inflammation, Chronic - Active	0	0	0	0	0	1	0	1
Degeneration, Muscle	0	0	0	1	0	0	0	0

(Continued)

2.6.7.7G　反復投与毒性試験：重要な試験（サルを用いた９ヵ月間反復投与毒性試験及び２ヵ月間回復性試験）（続き）

Abbreviations: ↑ = increase; ↓ = decrease; $AUC_{0\text{-}96hr}$ = area under the concentration time curve from 0 to 96 hours; $AUC_{0\text{-}672hr}$ = area under the concentration time curve from 0 to 672 hours; CL/F = total body clearance as a function of bioavailability; C_{max} = maximum observed concentration; ELISA = Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; F = female; M = male; N = number of animals for toxicokinetic analysis (animals/sex/treatment); NA = not applicable; NC = not calculated; NE = not evaluated; NOAEL = no-observed-adverse-effect level; SD = standard deviation; $T_{1/2}$ = elimination half-life; T_{max} = time to maximum concentration; Vd/F = volume of distribution as a function of bioavailability.

[a] N = 2 animals/sex/treatment

[b] The last 2 animals/sex were designated as recovery animals and were dosed with control article or test article for at least 39 weeks after which dosing was discontinued and reversibility of any toxicity assessed after an 8 week recovery period.

[c] Animal Number I09184 received only one 8.15-mg/kg dose of the test article prior to being placed on dosing holiday for dehydration and low food consumption. The animal was never redosed due to body weight loss and continued low food consumption. After missing four doses, the animal was euthanized on Day 17.

[d] For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance based on actual data (not the percent differences).

[e] Number of animals (total incidence)

[f] Beats/minute

[g] Statistics performed on combined gender data.

[h] Number of animals

[*] $p \leq 0.05$ (ANOVA, Dunnett's if applicable)

[**] $p \leq 0.05$ (Linearity trend test, two-sided)

2.6.7.8　In Vitro 遺伝毒性試験

デュラグルチドは天然型アミノ酸で構成されるタンパク質であり、核酸や染色体と直接に相互作用する可能性は低いため、遺伝毒性試験は実施していない。

2.6.7.9　In Vivo 遺伝毒性試験

デュラグルチドは天然型アミノ酸で構成されるタンパク質であり、核酸や染色体と直接に相互作用する可能性は低いため、遺伝毒性試験は実施していない。

2.6.7.10A　がん原性試験：ラットを用いた長期がん原性試験

Report title: 104-Week Subcutaneous Injection Carcinogenicity and Toxicokinetic Study with LY2189265 (Compound 2189265) in Rats

Species/strain: Rat/Crl:CD (SD) | Duration of dosing: 93 Weeks, twice weekly | Document ID: 8203405

Initial age: approximately 7 weeks | Route: Subcutaneous Injection | Location in CTD: 4.2.3.4.1.1

Date of first dose: 17 September 20[redacted] (males), 18 September 20[redacted] (females) | Treatment of controls: Vehicle | GLP compliance: Yes | Test Article: Dulaglutide

Vehicle: 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.5 ± 0.2), 74.2 mg/mL mannitol, and 0.02% (w/v) polysorbate 80, prepared in Sterile Water for Injection, USP for Diluent A; 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.5 ± 0.2), 0.02% (w/v) polysorbate 80, prepared in Sterile Water for Injection, USP for Diluent B

Basis for high-dose selection: Based on decreased body weight (≥7%) observed in males and females at the end of the 6-month study as well as exposure multiples of the maximum clinical dose (≥25X)

NOEL for neoplasia: 0.05 mg/kg | Analyte: Dulaglutide | Number of animals: 6-12[a]/sex/group (total =108)

Special features: None | Dose frequency: Twice Weekly | Assay/Method: ELISA/06-034

Sample: Rat Plasma | Feeding condition: Fed | (Location in CTD: 4.2.2.1.3)

Dose (mg/kg)	0.05		0.5		1.5		5	
Sex	M	F	M	F	M	F	M	F
Toxicokinetics								
Day 1								
C_{max} (µg/mL)	0.0751	0.0875	0.765	0.836	2.25	2.75	6.05	6.42
$AUC_{0\text{-}96hr}$ (µg•hr/mL)	2.04	2.31	23.3	27.8	76.6	90.3	208	236
(SEM)	0.278	0.141	1.27	2.16	2.63	4.23	7.88	18.9
T_{max} (hr)	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
N[b]	3	3	3	3	3	3	3	3
Week 52								
C_{max} (µg/mL)	0.0914	0.120	1.11	1.16	2.88	3.25	10.0	8.46
$AUC_{0\text{-}96hr}$ (µg•hr/mL)	4.05	4.07	62.4	56.7	162	155	366	563
(SEM)	0.385	0.414	5.94	7.16	9.91	14.7	55.6	60.4
T_{max} (hr)	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0	12.0	24.0	48.0
N[b]	3	3	3	3	3	3	3	3

(Continued)

2.6.7.10A　がん原性試験：ラットを用いた長期がん原性試験（続き）

Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.05		0.5		1.5		5	
Sex	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Noteworthy Findings										
Number of animals at start	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
Died or euthanized moribund	41	40	33	30*	31*	30*	31	32*	25**	33
Body weight (g, % change[c])										
Day 8	317	209	-	↓2	↓3	-	↓6&	↓2	↓12&	↓5&
Day 645	787	442	↓2	-	↓15&	↓8	↓11&	↓8	↓16&	↓19&
Food consumption (g, % change[c])										
Days 1-7	232	169	↓3	↓5&	↓10&	↓9&	↓22&	↓13&	↓34&	↓25&
Days 638-644	193	184	↓3	↓4	-	-	↓6	↓2	↓7	↓9
Mass observations[d]										
Number of animals in which the palpable abdominal mass disappeared prior to necropsy	4	4	4	3	4	3	3	6	2	2
Number of animals in which a histologic diagnosis was determined	2	13	6	11	2	10	1	7	2	12
Number of animals with palpable abdominal masses	6	17	10	14	6	13	4	13	4	14
Histopathology[d]										
Thyroid, C-cells										
Diffuse hyperplasia	9	7	9	6	16	12	19	11	28	25
Focal hyperplasia	39	7	28	11	25	20	25	20	15	20
Adenoma	10	7	14	6	25	19	24	19	31	32
Carcinoma	1	1	0	0	2	1	2	1	4	4
Adenoma and carcinoma	11	8	14	6	27	20	24	20	33	35

(Continued)

2.6.7.10A　がん原性試験：ラットを用いた長期がん原性試験（続き）

Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.05		0.5		1.5		5	
Sex	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Noteworthy Findings										
Mass-related findings										
Mammary grand										
Fibroadenoma	-	4	1	3	-	4	-	5	-	5
Infiltrate, pigmented macrophages	1	-	1	-	-	-	1	-	1	-
Inflammation	-	5	2	5	-	3	-	2	-	9
Galactocele	1	5	-	4	-	3	-	1	-	7
Carcinoma	-	8	-	5	-	5	-	4	-	9
Adenoma	-	2	-	1	-	2	-	-	-	4
Mineralization	-	1	-	3	-	-	-	-	-	6
Hemorrhage	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
Hyperplasia	-	5	-	2	-	5	-	3	-	6
Hematocyst	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
Skin/Subcutis										
Carcinoma, squamous cell	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Leiomyosarcoma	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
Mammary fibroadenoma	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Abscess	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Hystiocytic sarcoma	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-
Hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
Prepuital Gland										
Inflammation	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
Preputial gland cyst	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-

(Continued)

2.6.7.10A　がん原性試験：ラットを用いた長期がん原性試験（続き）

Abbreviations: ↓ = decrease; $AUC_{0\text{-}96hr}$ = area under the concentration time curve from 0 to 96 hours; C_{max} = maximum observed concentration; ELISA = Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; F = female; M = male; N = number of animals for toxicokinetic analysis (animals/sex/treatment/timepoint), data are from a composite analysis; NOEL = no observed effect level; T_{max} = time to maximum concentration; SEM = standard error the mean; - = no change.

[a] Week 13, Week 26, Visit 540/541 values represent (6/sex/group for timepoints 0 and 24 hour). Visit 649/650/651/652 values represent (3 to 10/sex/group for timepoint 0 hour)

[b] Values used for toxicokinetics parameters represent 3 animals/sex/group/timepoint for day 1 and Week 52

[c] For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance based on actual data (not the percent differences).

[d] Number of animals

* Percent survival statistically significant at the 5% level

** Percent survival statistically significant at the 1% level

& $p \leq 0.05$ (ANOVA, Dunnett's if applicable)

2.6.7.10B　がん原性試験：rasH2 トランスジェニックマウスを用いた短期がん原性試験

Report title: A Carcinogenicity and Toxicokinetic Study in 001178-T (hemizygous) Mice Given LY2189265 Twice Weekly by Subcutaneous Injection for 26 Weeks
Species/strain: Mouse
Carcinogenicity Animals: 001178-T (hemizygous), CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic
Toxicokinetics Animals: 001178-W (wild type), CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic
Duration of dosing: 26 weeks, twice weekly
Document ID: 8224144
Location in CTD: 4.2.3.4.2.1
Initial age: 8 to 9 weeks
Date of first dose: 19 April 20[redacted]
Route: Subcutaneous Injection
Treatment of controls: Vehicle
GLP compliance: Yes
Test Article: Dulaglutide
Vehicle: 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.5 ± 0.2), 74.2 mg/mL mannitol, and 0.02% (w/v) polysorbate 80, prepared in Sterile Water for Injection, USP for Diluent A; 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.5 ± 0.2), 0.02% (w/v) polysorbate 80, prepared in Sterile Water for Injection, USP for Diluent B
Basis for high-dose selection: Excessively reduced body weight gain was observed at doses of 10 and 100 mg/kg following 1 month of dosing in the wild-type mice.
NOEL for neoplasia: 3 mg/kg
Special features: None

Sample: Mouse Plasma
Analyte: Dulaglutide
Number of animals: 12-42/sex/group (total = 276)
Feeding condition: Fed
Dose frequency: Twice Weekly
Assay/Method: ELISA/09-131 (Location in CTD: 4.2.2.1.1)

Dose (mg/kg)	0.3		1		3	
Sex	M	F	M	F	M	F
Toxicokinetics						
Day 1						
C_{max} (μg/mL)	0.860	0.653	2.56	2.23	8.09	8.00
(SD)	0.108	NA[a]	0.457	0.0742	0.341	0.630
$AUC_{0\text{-}96hr}$ (μg•hr/mL)	23.1	19.3	51.2	50.3	201	179
(SEM)	1.48	1.08	7.98	4.86	17.3	15.5
T_{max} (hr)	4.00	4.00	4.00	12.0	12.0	12.0
N[b]	3	3	3	3	3	3

(Continued)

2.6.7.10B　がん原性試験：rasH2 トランスジェニックマウスを用いた短期がん原性試験（続き）

Dose (mg/kg)	0.3		1		3	
Sex	M	F	M	F	M	F
Toxicokinetics						
Day 176						
C_{max} (μg/mL)	0.414	0.391	0.645	0.769	1.17	1.69
(SD)	0.0864	0.0116	0.0324	0.239	0.160	0.627
$AUC_{0\text{-}96hr}$ (μg•hr/mL)	6.76	10.5	24.2	22.4	33.1	40.9
(SEM)	1.55	0.600	2.32	1.59	1.95	5.65
T_{max} (hr)	4.00	4.00	12.0	4.00	12.0	12.0
N[b]	3	3	3	3	3	3

(Continued)

2.6.7.10B　がん原性試験：rasH2 トランスジェニックマウスを用いた短期がん原性試験（続き）

Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.3		1		3	
Sex	M	F	M	F	M	F	M	F
Noteworthy Findings								
Number of animals at start	25	25	25	25	25	25	25	25
Died or euthanized moribund	5	1	2	0	2	1	1	2
Body weight (g, % change[c])								
Day 11	24.5	18.7	↓3	-	↓6*	↓6*	↓11*	↓10*
Day 183	33.7	22.4	↓14*	↑7*	↓15*	↑7*	↓19*	↑4*
Food consumption (g, % change[c])								
Days 1-3	15.0	12.9	↓10*	↓5	↓23*	↓26*	↓30*	↓34*
Days 179-182	19.1	18.1	↑13*	↑7	↑10*	↑4	↓3	↓2
Organ weight[d] (% change[c])								
Spleen	0.2620	0.4240	↑5	↑12	↑10	↑20*	↑5	-
Histopathology[e]								
Thyroid								
C-cell cytoplasmic hypertrophy/increased calcitonin staining	1	0	6	3	10	11	16	10
Spleen								
Increased extramedullary hematopoiesis	3	4	1	16	0	24	3	21

(Continued)

2.6.7.10B　がん原性試験：rasH2 トランスジェニックマウスを用いた短期がん原性試験（続き）

Abbreviations: ↑ = increase; ↓ = decrease; – = no important findings; $AUC_{0\text{-}96hr}$ = area under the concentration time curve from 0 to 96 hours; C_{max} = maximum observed concentration; ELISA = Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; F = female; M = male; N = number of animals for toxicokinetic analysis (animals/sex/treatment/timepoint), data are from a composite analysis; NA = not applicable; NOEL = no observed effect level; SD = standard deviation; SEM = standard error of the mean; T_{max} = time to maximum concentration.

[a] Not applicable; only two animals evaluated at this time point.

[b] Values represent 3 animals/sex/group/timepoint with the following exceptions; Day 1 Group 7 (0.3 mg/kg) females = 2 animals at 4 hours postdose; Day 1 Group 8 (1 mg/kg) females, Day 176 Group 7 (0.3 mg/kg) males, and Day 176 Group 8 (1 mg/kg) females = 1 animal predose.

[c] For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance based on actual data (not the percent differences).

[d] Ratio of spleen weight to terminal body weight (%)

[e] Number of animals

* $p \leq 0.05$ (ANOVA, Dunnett's if applicable)

2.6.7.11　生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

Species/Strain	Route	Dosing Period	Doses (mg/kg)	No./Sex/Group	Noteworthy Findings	GLP	Document ID
Rabbit/NZW	SC	GD 7, 10, 13, 16, and 19	0[a], 0.08, 0.41, 1.63, and 4.07	5F Main 2F TK	Dose levels of 1.63 and 4.07 mg/kg exceeded the MTD; group euthanasia by GD13. Dose dependent reductions in maternal BW and FC occurred at all dose levels. No effect on embryo-fetal survival, growth, or external morphology	No	[redacted]-353111*

Abbreviations: BW = body weight; F = female; FC = food consumption; GD = gestation day; GLP = Good Laboratory Practice; MTD = maximum tolerated dose; No. = number; NZW = New Zealand White; SC = subcutaneous; TK = toxicokinetics.

[a] Vehicle = 10 mM citrate buffer (pH 6.5 ± 0.2), 0.02% polysorbate 80 with 150 mM sodium chloride prepared in sterile water for injection, USP

* Pilot study: The report is not contained in Module 4, but it is available upon request.

2.6.7.12A　生殖発生毒性試験：雄ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

Report title: A Male Fertility Study in Sprague Dawley Rats of LY2189265 Administered Via Subcutaneous Injection Every Third Day

Design similar to ICH4.1.1: Yes
Duration of dosing: Every third day for 4 weeks prior to cohabitation, continuing during the 2-week cohabitation period
Document ID: [redacted]-353113
Location in CTD: 4.2.3.5.1.1
Species/strain: Rat/Crl:CD(SD)
Day of mating: Gestation Day 0
GLP compliance: Yes
Initial age: Approximately 8.5 weeks
Day of C-section: Gestation Day 15
Test Article: Dulaglutide
Date of first dose: 05 September 20[redacted]
Route: Subcutaneous Injection
Special features: None
Vehicle: 10 mM citrate buffer (pH 6.5 ± 0.2), 150 mM sodium chloride, 0.02% polysorbate 80, in sterile water for injection, USP

No-observed-adverse-effect level: F_0 general toxicity: 16.3 mg/kg, F_0 reproductive and fertility: 16.3 mg/kg

Dose (mg/kg)	0 (Control)	1.63	4.89	16.3
Toxicokinetics	NE	NE	NE	NE
No. evaluated	20	20	20	20
No. died or euthanized moribund	0	0	0	0
Clinical observations[a]				
Red material around nose	1	7	12	18
Necropsy observations	-	-	-	-
Body weight gain Days 0-27 (premating) (g, % change[b])	136	↓27**	↓26**	↓49**
Food consumption, cumulative, Days 0-27 (g/day, % change[b])	27	↓15**	↓15**	↓26**
Mean no. of days prior to mating	1.8	2.4	2.1	2.0
No. of males that mated	20	20	20	17
No. of fertile males	19	20	19	17
Male mating index (%)	100	100	100	85
Male fertility index (%)	95.0	100	95.0	85.0
Male copulation index (%)	95.0	100	95.0	100
Female conception index (%)	95.0	100	95.0	100
Sperm motility/count (%)	89	89	87	87

(Continued)

2.6.7.12A　生殖発生毒性試験：雄ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（続き）

Dose (mg/kg)	0 (Control)	1.63	4.89	16.3
Organ weight (g, % change[b])				
Epididymides right	0.65	↓3	↓5	↓8
Epididymides left	0.63	↓3	↓5	↓10**
Seminal vesicles/coagulating gland	1.92	↓6	↓13*	↓18**
Prostate	0.97	↓8	↓15*	↓21**
Testes right	1.74	↓1	↓2	↓5
Testis left	1.73	↓1	↓2	↓3
Mean no. of implantation/dam	16.4	16.0	16.2	16.1
Mean no. of live fetuses/litter	15.6	15.0	15.6	15.5
Total no. early in utero deaths	15	19	10	9
Total no. late in utero deaths	0	0	0	0

Abbreviations: ↓ = decrease; – = no important findings; NE = not evaluated; No. = number.

[a] Number of animals.

[b] For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance based on actual data (not on the percent differences).

* $p \leq 0.05$ (Dunnett's test)

** $p \leq 0.01$ (Dunnett's test)

2.6.7.12B　生殖発生毒性試験：雌ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

Report title: A Female Fertility and Early Embryonic Development Study in Sprague Dawley Rats of LY2189265 Administered Via Subcutaneous Injection Every Third Day

Design similar to ICH4.1.1: Yes
Duration of dosing: Every 3 days for 2 weeks prior to mating, through the 2-week cohabitation period up to and including Gestation Day 4, 5, or 6
Document ID: [redacted]-353112
Location in CTD: 4.2.3.5.1.2
Species/strain: Rat/Crl:CD(SD)
Day of mating: Gestation Day 0
GLP compliance: Yes
Initial age: Approximately 11 weeks
Day of C-section: Gestation Day 15
Test Article: Dulaglutide
Date of first estrous cycle: 15 August 20[redacted]
Route: Subcutaneous Injection
Vehicle: 10 mM citrate buffer (pH 6.5 ± 0.2), 150 mM sodium chloride, 0.02% polysorbate 80, in sterile water for injection, USP

Special features: None
No-observed-adverse-effect level: F_0 general toxicity: <1.63 mg/kg
F_0 fertility: 16.3 mg/kg
F_0 reproductive : 1.63 mg/kg

Dose (mg/kg)	0 (Control)	1.63	4.89	16.3
Toxicokinetics	NE	NE	NE	NE
No. evaluated	20	20	20	20
No. died or euthanized moribund	0	0	1	0
Clinical observations (n[a])				
Hair loss ventral abdomen	0	2	5	7
Red material around nose	6	11	12	16
Decreased defecation	0	0	1	12
Body weight gain (g, % change[b])				
Premating Days 0-14	7	↓129*	↓286**	↓443**
Gestation Days 0-6	29	↓10	↓31**	↓24*
Gestation Days 6-15	46	↑7	↑26**	↑50**
Food consumption (g/day, % change[b])				
Premating Days 0-14	22	↓23**	↓36**	↓41**
Gestation Days 0-6	29	↓14**	↓24**	↓24**
Gestation Days 6-15	29	↓3	-	↑3

(Continued)

2.6.7.12B　生殖発生毒性試験：雌ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（続き）

Dose (mg/kg)	0 (Control)	1.63	4.89	16.3
Necropsy observations	-	-	-	-
No. of females with prolonged diestrus (>5 day cycle length)	3	0	5	7
Estrous cycle length (days)	4.0	4.1	4.6	4.8
Mating index (%)	100	100	100	100
Fertility index (%)	85	95	100	100
Conception index (%)	85	95	100	100
No. of live fetuses/litter	14.5	13.5	12.3*	11.6**
No. early in utero deaths	10	10	13	16
No. late in utero deaths	0	0	0	0
No. early and late in utero deaths	10	10	13	16
Mean no. corpora lutea/dam	16.5	14.8	13.5**	13.5**
Mean no. implantation/dam	15.1	14.0	13.1*	12.4**
Mean preimplantation loss(percent/litter)	8.2	4.6	3.8	7.3
Mean postimplantation loss(percent/litter)	4.2	3.8	4.8	6.5

Abbreviations: ↑ = increase; ↓ = decrease; – = no important findings; NE = not evaluated; No. = number.

[a] Number of animals or tissues.

[b] For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance based on actual data (not on the percent differences).

* $p \leq 0.05$ (Dunnett's test)

** $p \leq 0.01$ (Dunnett's test)

2.6.7.13A　生殖発生毒性試験：ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験

Report title: An Embryo-Fetal Development and Toxicokinetic Study in Sprague Dawley Rats of LY2189265 Administered Via Subcutaneous Injection Every Third Day

Design similar to ICH4.1.3: Yes
Duration of dosing: Gestation Day 6 through Gestation Day 15 (Gestation Days 6, 9, 12, and 15)
Document ID: [redacted]-353116
Location in CTD: 4.2.3.5.2.1
Species/strain: Rat/Crl:CD(SD)
Day of mating: Gestation Day 0
GLP compliance: Yes
Initial age: Approximately 84 days
Day of C-section: Gestation Day 20
Test Article: Dulaglutide
Date of first Gestation Day 0: 12 Sept 20[redacted]
Route: Subcutaneous Injection
Vehicle: 10 mM citrate buffer (pH 6.5 ± 0.2), 0.02% polysorbate 80 with 150 mM sodium chloride prepared in sterile water for injection, USP
Special features: Not applicable
No-observed-adverse-effect level: F_0 general toxicity: <0.49 mg/kg, F_1 survival, development, and morphology: 0.49 mg/kg

Toxicokinetics

Sample: Rat Plasma
Analyte: Dulaglutide
Number of animals: 4-8 females/group (total = 28)
Feeding condition: Fed
Dose frequency: Every Third Day
Assay/Method: ELISA/06-034 (Location in CTD: 4.2.2.1.3)

Dose (mg/kg)	0.49	1.63	4.89
Sex	F	F	F
Toxicokinetics			
Gestation Day 15			
C_{max} (μg/mL)	0.96	2.79	10.31
$AUC_{0\text{-}96hr}$ (μg•hr/mL)	35.00	110.06	348.14
T_{max} (hr)	12.0	12.0	12.0
N	3	3	3

Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.49	1.63	4.89
Dams				
No. pregnant	25	24	25	23
No. died or euthanized moribund	0	0	0	1
No. aborted or with total resorption of litter	0	0	0	0
Clinical observations (n[a])				
Hunched posture	0	0	3	12
Hairloss ventral abdomen	0	2	12	18
Red material around nose	3	4	10	19

(Continued)

2.6.7.13A　生殖発生毒性試験：ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験（続き）

	Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.49	1.63	4.89
	Necropsy observations	-	-	-	-
	Body weight gain (g, % change[b])				
	Gestation Days 6-9	15	↓67**	↓167**	↓280**
	Gestation Days 6-18	92	↓15**	↓33**	↓66**
	Food consumption (g/day, % change[b])				
	Gestation Days 6-9	27	↓30**	↓48**	↓67**
	Gestation Days 6-18	28	↓14**	↓25**	↓39**
	Mean no. corpora lutea/dam	16.4	16.1	16.9	17.3
	Mean no. implantations/dam	16.1	15.6	16.3	16.6
Litters	No. of litters evaluated	25	24	25	23
	Mean no. of in utero deaths/litter (early)	0.6	1.0	0.9	1.5
	Mean no. of in utero deaths/litter (late)	0	0	0	0.2
	No. of live fetuses/litter	15.4	14.6	15.4	15.0
	Fetal weight (g, gender combined)	3.8	3.7	3.5**	2.7**
	Intact uterine weight (g)	89.7	84.4	83.0	68.8**
	Fetal sex ratios (% male)	46.6	52.6	48.6	44.4
	Fetal anomalies (No. of fetuses [litters] examined)	386(25)	350(24)	385(25)	344(23)
	General retardation in ossification:				
	Sternebrae unossified (% per litter)	0	0	0	4.9
	Skull reduced ossification (% per litter)	0	0.3	0.5	5.5
	Hyoid unossified (% per litter)	0	0.7	2.2	3.5
	Reduced ossification of the vertebral arches (% per litter)	0	5.4	0	3.5

(Continued)

2.6.7.13A　生殖発生毒性試験：ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験（続き）

Abbreviations: ↓ = decrease; – = no important findings; $AUC_{0\text{-}96hr}$ = area under the concentration time curve from 0 to 96 hour; C_{max} = maximum observed concentration; ELISA = Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; F = female; N = number of animals for toxicokinetic analysis (rats/treatment/timepoint), data are from a composite analysis; No. = number; T_{max} = time to maximum concentration.

[a] Number of animals or tissues.

[b] For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance based on actual data (not on the percent differences).

** $p \leq 0.01$ (Dunnett's test)

2.6.7.13B 生殖発生毒性試験：ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験

Report title: Embryo-Fetal Development and Toxicokinetic Study in New Zealand White Rabbits of LY2189265 Administered Via Subcutaneous Injection Every Third Day

Design similar to ICH4.1.3: Yes
Duration of dosing: Gestation Day 7 through Gestation Day 19 (Gestation Days 7, 10, 13, 16, and 19)
Document ID: [redacted]-353119
Location in CTD: 4.2.3.5.2.2
Species/strain: Rabbit/New Zealand White
Day of mating: Gestation Day 0
GLP compliance: Yes
Initial age: Approximately 5 months
Day of C-section: Gestation Day 29
Test Article: Dulaglutide
Date of first dose: 20 November 20[redacted]
Route: Subcutaneous Injection
Vehicle: 10 mM citrate buffer (pH 6.5 ± 0.2), 0.02% polysorbate 80 with 150 mM sodium chloride prepared in sterile water for injection, USP
Special features: Not applicable
No-observed-adverse-effect level:
F_0 general toxicity: 0.04 mg/kg, F_1 survival, development:, and morphology: 0.12 mg/kg

Toxicokinetics

Sample: Rabbit Plasma
Analyte: Dulaglutide
Number of animals: 4/group (total = 16)
Feeding condition: Fed
Dose frequency: Every Third Day
Assay/Method: ELISA/06-070 (Location in CTD: 4.2.2.1.5)

Dose (mg/kg)	0.04	0.12	0.41
Sex	F	F	F
Toxicokinetics			
Gestation Day 7			
C_{max} (μg/mL)	0.15	0.45	1.31
(SD)	(0.02)	(0.06)	(0.05)
$AUC_{0\text{-}last}$ (μg•hr/mL)	6.62	22.30	65.38
(SD)	(0.50)	(3.31)	(6.14)
T_{max} (hr)	12.0	20.0	16.0
(SD)	(0.0)	(6.9)	(6.9)
N	3	3	3

(Continued)

2.6.7.13B　生殖発生毒性試験：ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験（続き）

Dose (mg/kg)	0.04	0.12	0.41
Sex	F	F	F
Gestation Day 19			
C_{max} (μg/mL)	0.12	0.51	1.63
(SD)	(0.09)	(0.08)	(0.18)
C_{max} (μg/mL)[a]	0.17	0.56	1.74
(SD)	(NC)	(NC)	(NC)
$AUC_{0\text{-last}}$ (μg•hr/mL)	4.81	21.81	64.59
(SD)	(3.88)	(8.26)	(23.48)
$AUC_{0\text{-last}}$ (μg•hr/mL)[a]	7.05	26.52	77.94
(SD)	(NC)	(NC)	(NC)
T_{max} (hr)	13.3	16.0	20.0
(SD)	(10.1)	(6.9)	(6.9)
T_{max} (hr)[a]	18.0	18.0	24.0
(SD)	(NC)	(NC)	(NC)
N	3	3	3
N[a]	2	2	2

(Continued)

2.6.7.13B　生殖発生毒性試験：ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験（続き）

	Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.04	0.12	0.41
Dams	No. pregnant	19[b]	19	19	20
	No. died or euthanized moribund	0	0	0	0
	No. aborted/delivered early or with total resorption of litter	1	0	0	0
	Clinical observations[c]				
	Decreased defecation	11	9	15	20
	Necropsy observations	-	-	-	-
	Body weight gain (g, % change[d])				
	Gestation Day 7-10	65	↓49	↓197**	↓415**
	Gestation Day 7-22	314	↓22	↓49**	↓75**
	Food consumption (g/day, % change[d])				
	Gestation Days 7-10	175	↓23**	↓58**	↓85**
	Gestation Days 7-22	169	↓20*	↓39**	↓56**
	Mean no. corpora lutea/dam	9.9	9.2	9.3	10.3
	Mean no. implantations/dam	9.7	8.4	8.9	9.6

(Continued)

2.6.7.13B　生殖発生毒性試験：ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験（続き）

	Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.04	0.12	0.41
Litters	No. of litters evaluated	19	19	19	20
	No. of live fetuses/litter	9.3	7.8	8.6	9.3
	Mean no. of early resorptions/litter	0.2	0.4	0.1	0.2
	Mean no. of late resorptions/litter	0.2	0.1	0.2	0.2
	Mean no. of dead fetuses/litter	0	0	0	0.1
	Fetal weight (g, gender combined)	41.3	45.5	44.5	40.8
	Intact uterine weight (g)	533	482	519	518
	Fetal sex ratios (% male)	45.1	54.2	50.0	53.2
	Skeletal anomalies (No. of fetuses [litters] examined)	177(19)	149(19)	164(19)	185(20)
	Costal cartilage anomaly (mean)	0	0	0.6	1.0
	Vertebral anomaly with or without rib anomaly (mean)	0	0	0	2.3
	Skeletal variations (No. of fetuses [litters] examined)	177(19)	149(19)	164(19)	185(20)
	27 presacral vertebrae (mean)	7.2	19.9	23.1	52.5**
	13th full rib (mean)	35.8	52.8	53.5	82.0**
	Reduced ossification of the rib(s) (mean)	0	0	0	1.2

Abbreviations: ↓ = decrease; – = no important findings; $AUC_{0\text{-last}}$ = area under the concentration time curve from 0 to last quantifiable timepoint; C_{max} = maximum observed concentration; ELISA = Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; F = female; N = number of animals for toxicokinetic analysis (rabbits/treatment group); NC = not calculated; No. = number; SD = standard deviation; T_{max} = time to maximum concentration.

a Mean excludes animal data that indicated likely antibody formation

b Excludes one female that delivered on Gestation Day 28.

c Number of animals.

d For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance based on actual data (not on the percent differences).

* $p \leq 0.05$ (Dunnett's test)

** $p \leq 0.01$ (Dunnett's test)

2.6.7.14　生殖発生毒性試験：ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

Report title: A Prenatal and Postnatal Development and Toxicokinetic Study, Including Maternal Function, of LY2189265 Administered via Subcutaneous Injection Every Third Day

Design similar to ICH4.1.2: Yes
Duration of dosing: Gestation Day 6 through Lactation Day 19 (GD 6, 9, 12, 15, and 18; LD 1, 4, 7, 10, 13, 16, and 19)
Document ID: [redacted]-353253
Location in CTD: 4.2.3.5.3.1
Species/strain: Rat/Crl: CD(SD)
Day of mating: Gestation Day 0
GLP compliance: Yes
Initial age: Approximately 13 weeks
Litters culled / not culled: Culled
Test Article: Dulaglutide
Date of animal receipt: 24 May 20[redacted]
Route: Subcutaneous Injection
Special features: Not applicable
Vehicle: 10 mM citrate buffer (pH 6.5 ± 0.2), 4.6% mannitol, and 0.02% polysorbate 80 in sterile water for injection
No-observed-adverse-effect level: F_0 general toxicity and reproduction: 0.2 mg/kg
F_1 growth: 0.49 mg/kg
F_1 behavioral development: F 0.49 mg/kg, M 1.63 mg/kg
F_1 survival, reproductive capacity: 1.63 mg/kg

Toxicokinetics

Sample: Rat Plasma
Analyte: Dulaglutide
Number of animals: 4/timepoint (4-8/group) (total = 28)
Feeding condition: Fed
Dose frequency: Every Third Day
Assay/Method: ELISA/ICD 373.2 (Location in CTD: 4.2.2.1.4)

Dose (mg/kg)	0.2	0.49	1.63
Sex	F	F	F
Toxicokinetics			
Gestation Day 6			
C_{max} (μg/mL)	0.389	1.13	3.65
D.N. C_{max}	1.94	2.31	2.24
$AUC_{0\text{-}last}$ (μg•hr/mL)	10.4	28.5	95.0
(SE)	0.512	1.70	6.66
$AUC_{0\text{-}48hr}$(μg•hr/mL)	10.4	28.5	95.0
D.N. $AUC_{0\text{-}last}$	52.0	58.2	58.3
T_{max} (hr)	12	12	12
N	4	3	4

(Continued)

2.6.7.14　生殖発生毒性試験：ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（続き）

Dose (mg/kg)	0.2	0.49	1.63
Sex	F	F	F
Lactation Day 4			
C_{max} (μg/mL)	0.497	1.04	3.95
D.N. C_{max}	2.49	2.13	2.42
$AUC_{0\text{-}last}$ (μg•hr/mL)	15.3	35.7	131
(SE)	1.28	3.00	7.52
$AUC_{0\text{-}48hr}$(μg•hr/mL)	12.9	29.1	106
D.N. $AUC_{0\text{-}last}$	76.5	72.9	80.4
T_{max} (hr)	12	12	12
Accumulation Ratio	1.2	1.0	1.1
N	4	3	4

(Continued)

2.6.7.14　生殖発生毒性試験：ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（続き）

	Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.2	0.49	1.63
F_0 females	No. pregnant	25	24	24	25
	No. died or euthanized moribund	0	2	0	0
	No. euthanized due to total litter loss	3	2	0	4
	Clinical observations	-	-	-	-
	Necropsy observations (animals with the finding)	-	-	-	-
	Body weight gain (g, % change[a])				
	GD6-9	13	↓23	↓54**	↓192**
	GD6-20	124	↓8	↓27**	↓37**
	LD1-4	14	↓43	↓86**	↓171**
	LD1-21	38	↑11	↑8	↓8
	Food consumption, GD 6-9 (g/day, % change[a])	23	↓17**	↓30**	↓52**
	Food consumption, GD 6-20 (g/day, % change[a])	25	↓8**	↓20**	↓28**
	Food consumption, LD 1-4 (g/day, % change[a])	35	↓11	↓23**	↓40**
	Food consumption, LD 1-13 (g/day, % change[a])	47	↓9	↓11	↓23**
	Mean duration of gestation (days)	21.9	21.8	21.8	22.0
	No. abnormal parturition	0	1	0	0
F_1	No. of litters evaluated	24	23	23	24
Preweaning	Mean no. of implantations	15.8	15.7	16.0	16.3
	Mean no. pups/litter	15.2	14.4	14.5	15.5
	Mean no. liveborn pups/litter	15.2	14.0	14.5	15.4
	Postnatal survival PND 0 relative to number born(% per litter)	99.5	92.3	100	99.4
	Postnatal survival PND 1 to PND 4 (% per litter)	91.5	92.9	93.5	85.5
	Postnatal survival to weaning (after cull, % per litter)	78.0	93.1	95.1	73.0
	No. of total litter losses	3	2	0	4
	No. live newborn pups with external anomalies	-	-	-	-

(Continued)

2.6.7.14　生殖発生毒性試験：ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（続き）

	Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.2	0.49	1.63
	Pup body weight (g, % change[a])				
	PND 1				
	Male	6.9	0	↓2.9	↓8.7*
	Female	6.6	↓1.5	↓4.5	↓12.1**
	PND 21				
	Male	50.8	↓3.0	↓5.3	↓13.6**
	Female	49.1	↓5.1	↓7.3	↓15.9**
	Pup sex ratio at birth (% males)	45.6	52.5	48.9	50.5
	Pup clinical observations	-	-	-	-
F_1	Physical development				
Postweaning	Balanopreputial separation (day of age)	45.6	45.3	45.5	47.0
	Vaginal patency (day of age)	32.6	32.8	32.2	33.0
	Locomotor activity (total count)				
	Male PND 21	3081	2789	3223	3940
	Female PND 21	2896	2469	2880	3183
	Male PND 61	4598	4619	4969	4735
	Female PND 61	4941	5925	5650	5248
	Startle response MAX (overall mean)				
	Male PND 22	1.475	1.795	1.621	1.593
	Female PND 22	1.892	1.982	1.990	1.555
	Male PND 62	1.090	0.911	1.131	1.244
	Female PND 62	1.083	1.275	1.024	0.970

(Continued)

2.6.7.14　生殖発生毒性試験：ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（続き）

	Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.2	0.49	1.63
	Biel Maze PND 70				
	Male Memory trial 12 escape time (seconds)	32.3	43.7	33.0	26.7
	Female Memory trial 12 escape time (seconds)	31.9	39.9	45.7	62.6*
	Male Memory trial 12 number of errors	3	4	3	3
	Female Memory trial 12 number of errors	3	3	5	6*
	Pup necropsy observations	-	-	-	-
F_1	No. died or euthanized moribund				
Postweaning	Males	0	1	2	1
	Females	0	0	0	1
	Premating body weight change males (g, % change[a])	392	↓0.5	↑1.0	↓3.1
	Premating body weight change females (g, % change[a])	207	↓3.9	↓3.9	↓6.8
	Clinical observations (animals with finding)	-	-	-	-
F_1	Gestation body weight change (g, % change[a])	143	↑2.0	↓1.4	↓11.2
Postweaning	Mean pre-coital interval days	3.1	3.1	3.2	2.6
	Male mating index (%)	90.9	100	95.5	100
	Female mating index (%)	100	100	100	100
	Male fertility index (%)	90.9	88.9	90.9	100
	Female fertility index (%)	100	85.0	95.7	100
	Male copulation index (%)	100	88.9	95.2	100
	Female copulation index (%)	100	85.0	95.7	100
	No. of pregnant females	22	17	22	20
	No. aborted	0	0	0	0
	Mean no. of corpora lutea	16.3	15.6	16.5	14.6
	Mean no. of implantations	14.6	15.1	14.4	13.0

(Continued)

2.6.7.14　生殖発生毒性試験：ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（続き）

	Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.2	0.49	1.63
F_2 litters	Mean no. of live pups	13.5	14.1	13.6	12.5
	Total no. of pup deaths	1	2	5	3

Abbreviations: ↑ = increase; ↓ = decrease; – = no important findings; Accumulation ratio = Lactation day 4 $AUC_{0\text{-}48hr}$/Gestation Day 6 $AUC_{0\text{-}48hr}$; $AUC_{0\text{-}last}$ = area under the concentration time curve from 0 to last quantifiable timepoint; $AUC_{0\text{-}48hr}$ = area under the concentration time curve from 0 to 48 hours; C_{max} = maximum observed concentration; Crl: CD(SD) = Charles River Laboratories Sprague Dawley Rat; D.N. = dose normalized; ELISA = Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; F = female; GD = Gestation Day; LD = Lactation Day; N = number of animals for toxicokinetic analysis (rats/treatment), data are from a composite analysis; No. = number; PND = Postnatal Day; SE = Standard Error of the Mean; T_{max} = time to maximum concentration.

[a] For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance based on actual data (not on the percent differences).

* $p \leq 0.05$

** $p \leq 0.01$ (Dunnett's test)

2.6.7.15A　新生児を用いた試験：重要な試験以外の試験

Species/Strain	Route	Dosing Period	Doses (mg/kg)	No./Sex/ Group	Noteworthy Findings	GLP	Document ID
Rat/Crl:CD(SD)	SC	PND 7 through scheduled euthanasia (when 20% of the control group animals by sex reach sexual maturation) Every third day	0[a], 0.2, 0.5, and 1.6	48	One female given 1.6 mg/kg and 1 female given 0.5 mg/kg were found dead on PND 20 and 30, respectively. No reductions in FC and BW occurred from PND 7 through attainment of sexual maturity (males: PND 46; females: PND 34). No differences in the age of sex maturation across groups were noted. No noteworthy macroscopic findings were noted.	No	[redacted]-353303*
Rat/Crl:CD(SD)	SC	PND 7 through scheduled euthanasia (when 20% of the control group animals by sex reach sexual maturation) Every third day	0[a], 3, 7, and 16	48: Main 9 (vehicle) and 12 (others): TK	Two males and 2 females given 16 mg/kg and 1 male given 7 mg/kg in the main phase as well as 1 male given 7 mg/kg in the TK phase were found dead on PND 23 or 24. Lower BWs and BW gains were generally noted in all treated groups during the pre-weaning period (PND 7-PND 20). Because control, 3, and 7 mg/kg groups were pair-fed to FC at 16 mg/kg, BW losses or lower mean BW gains were noted in these groups beginning on PND 21-22, continuing until approximately PND 30. Timing of vaginal patency and first estrus (females) and balanopreputial separation (males) were delayed by approximately 5 and 3 days, respectively, but they were not affected by treatment. Reductions in testicular weights (10% to 12%) were observed in all treated groups. No noteworthy macroscopic findings were noted.	No	[redacted]-353306*

Abbreviations: BW = body weight; F = female; FC = food consumption; GLP = Good Laboratory Practice; No. = number; PND = postnatal day; SC = subcutaneous; TK = toxicokinetics.

[a] Vehicle = 10 mM citrate buffer (pH 6.5 ± 0.2), 4.6% mannitol, 0.02% polysorbate 80 prepared in sterile water for injection

* Pilot studies: These reports are not contained in Module 4, but are available upon request.

2.6.7.15B　新生児を用いた試験：新生児ラットを用いた毒性試験

Report title: A Juvenile Toxicity and Toxicokinetic Study of LY2189265 Administered via Subcutaneous Injection Every Third Day in Sprague-Dawley Rats

Species/strain: Rat/Crl:CD(SD)	Duration of dosing: Main and TK phases: PND 7 to PND 91, Sexual maturation phase: PND 7 through the day prior to euthanasia (PND 47 for males and PND 39 for females), every third day	Document ID: [redacted]-353304
Initial age: PND 7	Duration of reversibility: Not applicable	Location in CTD: 4.2.3.5.4.1
Date of dam receipt: 15 Apr 20[redacted]	Route: Subcutaneous Injection	GLP compliance: Yes
NOAEL: male and female systemic toxicity: 7 mg/kg, developmental toxicity: 2 mg/kg, and developmental neurotoxicity, reproductive toxicity, and embryonic toxicity: 7 mg/kg	Vehicle: 10 mM citrate buffer (pH 6.5 ± 0.2), 4.6% mannitol (w/v), and 0.02% (w/v) polysorbate 80 prepared in sterile water for injection, USP	Test Article: Dulaglutide

Special features: All groups were pair-fed relative to the 7 mg/kg group from PND 21 through PND 98 (main phase) or scheduled euthanasia (sexual maturation phase). Hormone analysis (follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, testosterone, estradiol, and growth hormone) was conducted on the day of euthanasia for males (PND 48) and females (PND 40) in the sexual maturation phase.

(Continued)

2.6.7.15B　新生児を用いた試験：新生児ラットを用いた毒性試験（続き）

Toxicokinetics							
Sample: Rat Plasma	Analyte: Dulaglutide				Number of animals: 45/sex/group		
Feeding condition: Fed	Dose frequency: Every Third Day				Assay/Method: ELISA/ICD 373.2 (Location in CTD: 4.2.2.1.4)		
Dose (mg/kg)	0.5		2		7		
Sex	M	F	M	F	M	F	
Toxicokinetics (Composite Data)							
Day 7							
C_{max} (μg/mL)	0.632	0.518	2.12	1.65	12.3	8.20	
$AUC_{0\text{-}72hr}$ (μg•hr/mL)	10.8	11.4	43.0	44.7	216	186	
T_{max} (hr)	4	12	4	12	12	4	
N (samples/timepoint)	3	3	3	3	3	3	
Day 91							
C_{max} (μg/mL)	1.11	1.20	3.81	3.39	14.6	15.8	
$AUC_{0\text{-}72hr}$ (μg•hr/mL)	33.6	36.4	131	124	512	581	
T_{max} (hr)	12	12	12	12	12	12	
N (samples/timepoint)	3	3	3	3	3	3	

Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.5		2		7	
Sex	M	F	M	F	M	F	M	F
Noteworthy Findings								
Number of animals at start								
Main phase	25	25	25	25	25	25	25	25
Sexual maturation phase	20	20	20	20	20	20	20	20
Died or euthanized moribund								
Main phase	2	1	0	1	1	2	1	1
Sexual maturation phase	2	2	0	0	0	0	0	1
Detailed clinical observations								
Increase urinations (PND 60)	-	-	-	-	-	-	+	-

(Continued)

2.6.7.15B　新生児を用いた試験：新生児ラットを用いた毒性試験（続き）

Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.5		2		7	
Sex	M	F	M	F	M	F	M	F
Body weight (g, % change[a])								
PND 10	24.1	23.4	↑0.8	0.0	↓3.3	↓3.4	↓10.4**	↓10.7**
PND 91	481.8	272.7	↓3.5	↓0.6	↓3.9	↑2.3	↑1.5	↑8.4**
Body weight change (g, % change[a])								
PND 7-8	2.5	2.4	↓12.0	↓16.7	↓52.0**	↓58.3**	↓116.0**	↓129.2**
Food consumption (g/animal/day, % change[a])								
PND 21-22	8	8	0.0	0.0	0.0	0.0	↓12.5*	0.0
PND 91-92	28	21	↓3.6	↓9.5*	↓7.1	↓14.3*	0.0	0.0
Balanopreputial separation (PND, % change[a])								
Main phase	46.4	NA	↑0.9	NA	↑1.7	NA	↓0.9	NA
Sexual maturation phase	45.6	NA	↑0.9	NA	↓0.7	NA	↓2.2	NA
Vaginal patency (PND, % change[a])								
Main phase	NA	36.8	NA	↑1.4	NA	↑4.6	NA	↓9.5**
Sexual maturation phase	NA	36.3	NA	↓1.7	NA	0.0	NA	↓7.4**
Age at first estrus (PND, % change[a])								
Sexual maturation phase	NA	37.3	NA	↓3.5	NA	↓0.8	NA	↓4.0
Neurobehavioral								
Motor activity	-	-	-	-	-	-	-	-
Auditory startle	-	-	-	-	-	-	-	-
Learning and memory	-	-	-	-	-	-	-	-
Mating and fertility	-	-	-	-	-	-	-	-
Sperm assessment	-	NA	-	NA	-	NA	-	NA

(Continued)

2.6.7.15B　新生児を用いた試験：新生児ラットを用いた毒性試験（続き）

Test Article: Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.5		2		7	
Sex	M	F	M	F	M	F	M	F
Hormone levels[b] (ng/mL, % change[a])								
Follicle stimulating hormone	7.94	3.72	↑3.5	↓7.5	↑8.2	↓6.2	↓0.6	↓13.2
Leuteinizing hormone	0.26	0.32	↑61.5	↑56.3	0	↓25.0	↑123.1**	↓6.3
Estrogen	3.34	5.71	↓72.8*	↑21.7	↓87.7*	↓16.5	↑155.7**	↓31.0
Testosterone	0.77	0.00	↓26.0	NA	↓11.7	NA	↑55.8	NA
Growth hormone	39.3	16.5	↑76.1	↑33.3	↑116.5	↑206.1	↑257.0	↑514.5**
Hormone levels[c] (ng/mL, % changea)								
Follicle stimulating hormone	7.76	2.31	↑11.5	↑93.9	↑18.9	↑39.8	↓2.3	↑14.7
Leuteinizing hormone	0.41	0.22	↓19.5	↑222.7	↓4.9	↑918.2	↓9.8	↑1172.7
Estrogen	3.88	1.76	↓10.6	↓22.2	↓42.5	↑56.8	↑132.0*	↑150.6
Testosterone	0.63	0.00	↑74.6	NA	↓34.9	NA	↑14.3	NA
Growth hormone	15.4	4.9	↑276.0	↑108.2	↑167.5	↑608.2	↑578.6	↑4593.9
F_2 intrauterine survival	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ weight	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology	-	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations: ↑ = increase; ↓ = decrease + = increase incidence compared to control; - = no important change; $AUC_{0\text{-}72hr}$ = area under the concentration time curve from 0 to 72 hour; C_{max} = maximum observed concentration; ELISA = Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; M = male; F = female; N = number of animals for toxicokinetic analysis (rats/treatment/timepoint), data are from a composite analysis; NA = not applicable; PND = postnatal day; T_{max} = time to maximum concentration.

[a] For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance based on actual data (not on the percent differences).

[b] Hormone analysis was conducted on the day of euthanasia for sexually mature males (PND 48) and sexually mature females (PND 40) in the sexual maturation phase.

[c] Hormone analysis was conducted on the day of euthanasia for non-sexually mature males (PND 48) and non-sexually mature females (PND 40) in the sexual maturation phase.

* $p \leq 0.05$ (Dunnett's test)

** $p \leq 0.01$ (Dunnett's test)

2.6.7.16　局所刺激性試験

デュラグルチドの局所刺激性を評価するための独立した試験は実施していない。詳細は第 2.6.6.7 項を参照のこと。

2.6.7.17A　その他の毒性試験：補足的毒性試験（ラットを用いた１年間反復投与毒性試験）

Report title: An Investigational Time Course Study of Thyroid C-Cell Mass in Rats Treated with LY2189265 (Compound 2189265) for up to 12 Months

Species/strain: Rat/Crl:CD(SD) | Duration of dosing: 52 weeks, twice weekly | Document ID: 8236888

Initial age: 6 to 7 weeks | Duration of reversibility: Not applicable | Location in CTD: 4.2.3.7.3.1

Date of first dose: 11 April 20[redacted] | Route: Subcutaneous Injection | GLP compliance: Yes[a]

NOAEL: Not applicable | Test Article: Dulaglutide

Vehicle: 10 mM citrate buffer (pH 6.5 ± 0.2), 4.7% (w/v) mannitol, and 0.02% (w/v) polysorbate 80, prepared in Sterile Water for Injection

Special features: A time course study with interim sacrifices at 12, 24, and 36 weeks of dosing and a final sacrifice at 52 weeks. At each sacrifice, thyroid C-cell mass and basal plasma calcitonin concentrations were evaluated. Calcium chloride stimulated calcitonin concentrations were also evaluated at the 12, 24 and 36 week sacrifices.

Toxicokinetics

Sample: Rat Plasma | Analyte: Dulaglutide | Number of animals: 20/sacrifice/group (total = 80)

Feeding condition: Fed | Dose frequency: Twice weekly | Assay/Method: ELISA/ICD 373.2 (Location in CTD: 4.2.2.1.4)

Dose: 5 mg/kg

Sex: M	Day 94	Day 185	Day 276
Mean Plasma Level (μg/mL)	0.0168	0.051	0.00099
Standard Deviation	0.0156	0.1965	0.000559
No. of Animals with Plasma LY2189265 Level Below LLOQ of 0.0008 μg/mL	3	11	15
No. of Animals with Sample Collected	20	19	20

(Continued)

2.6.7.17A　その他の毒性試験：補足的毒性試験（ラットを用いた 1 年間反復投与毒性試験）（続き）

Test Article: Dose (mg/kg)	0 (Control)	5
Sex: Number of Animals	M: 80	M: 80
Noteworthy Findings		
Died or euthanized moribund	6	2
Body weight (g, % change[b])		
Day 11	295	↓14*
Day 92	571	↓14*
Day 183	650	↓16*
Day 274	696	↓16*
Day 365	722	↓20*
Food consumption (g, % change[b])		
Days 1-3	88	↓52*
Days 88-91	125	↓7*
Days 179-182	127	↓9*
Days 270-273	120	↓6
Days 361-364	114	↓14*
Histopathology[c]		
Thyroid (52 week sacrifice)		
C-cell focal/multifocal hypertrophy/hyperplasia		
Minimal	2	6
Slight	0	5
Ki-67-Calcitonin co-labeled cells		
Minimal	15	9
Slight	1	10

(Continued)

2.6.7.17A　その他の毒性試験：補足的毒性試験（ラットを用いた 1 年間反復投与毒性試験）（続き）

Test Article: Dose (mg/kg)	0 (Control)	5
Sex: Number of Animals	M: 80	M: 80
Thyroid Morphometry		
Volume of calcitonin positive tissue [d] (mm^3)		
Day 94	0.72	0.59
Day 185	0.97	0.79
Day 276	1.63	1.32
Day 374	2.49	2.16

Abbreviations: ↓ = decrease; ELISA = Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; LLOQ = lower limit of quantitation; M = male; No. = Number; NOAEL = no-observed-adverse-effect level.

[a] Thyroid morphometrics and calcitonin and thyroid morphometric data interpretation were not performed according to Good Laboratory Practice regulations but were conducted according to sound scientific principles.

[b] For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance based on actual data (not the percent differences).

[c] Number of animals

[d] Volume of calcitonin positive tissue from untreated animals sacrificed on day 3 was 0.22 mm^3 (mean, n=20, 6 to 7-weeks old males)

* $p \leq 0.05$ (Two-sample t-test)

2.6.7.17B　その他の毒性試験：補足的毒性試験（ZDF ラットを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験）

Report title: An Investigative Study of Pancreatic Exocrine Biomarkers, Histology, and Histomorphometry in Male Zucker Diabetic Fatty (ZDF) Rats Given LY2189265 by Subcutaneous Injection Twice Weekly for 13 Weeks

Species/strain: Rat/Zucker Diabetic Fatty
Initial age: 8 weeks
Experimental start date: 05 June 20[redacted]
NOAEL: 1.5 mg/kg
Duration of dosing: 13 weeks, twice weekly
Duration of reversibility: Not applicable
Route: Subcutaneous Injection
Document ID: 504758
Location in CTD: 4.2.3.7.3.2
GLP compliance: Yes
Test Article: Dulaglutide
Vehicle: 10 mM citrate buffer (pH 6.5 ± 0.2), 4.6% mannitol (w/v), 0.02% (w/v) polysorbate 80 in sterile water for Injection, USP
Special features: Pancreatic biomarkers and histomorphometry

Toxicokinetics

Sample: Rat Plasma　Analyte: Dulaglutide　Number of animals: 12-16 males/group (total = 52)
Feeding condition: Fed　Dose frequency: Twice Weekly　Assay/Method: ELISA/ICD 373.2 (Location in CTD: 4.2.2.1.4)

Dose (mg/kg)	0.5	1.5	5.0
Sex	M	M	M
Toxicokinetics			
Day 1			
C_{max} (μg/mL)	0.765	2.330	7.110
(SE)	(0.034)	(0.136)	(1.160)
C_{max}/D (μg/mL/mg/kg/dose)	1.530	1.550	1.420
$AUC_{0\text{-}96hr}$ (μg•hr/mL)	19.40	56.300	174.000
(SE)	(1.10)	(4.360)	(14.200)
$AUC_{0\text{-}96hr}$/D (μg•hr/mL/mg/kg/dose)	38.800	37.500	34.900
T_{max} (hr)	12.0	12.0	12.0
$T_{1/2}$ (hr)	10.7	9.01	9.50
N	3	3	3

(Continued)

2.6.7.17B　その他の毒性試験：補足的毒性試験（ZDF ラットを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験）（続き）

Dose (mg/kg)	0.5	1.5	5.0
Sex	M	M	M
Day 88			
C_{max} (μg/mL)	0.591	1.670	7.100
(SE)	(ID)	(0.163)	(0.336)
C_{max}/D (μg/mL/mg/kg/dose)	1.180	1.110	1.420
$AUC_{0\text{-}96hr}$ (μg•hr/mL)	21.200	65.400	238.000
(SE)	(2.870)	(4.390)	(8.360)
$AUC_{0\text{-}96hr}$/D (μg•hr/mL/mg/kg/dose)	42.300	43.600	47.600
T_{max} (hr)	24.0	24.0	24.7
$T_{1/2}$ (hr)[a]	9.66	10.3	8.47
R_{AUC}	1.09	1.16	1.36
N	3	3	3

Test Article: Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.5	1.5	5
Sex: Number of Animals	M: 27	M: 20	M: 20	M: 20
Noteworthy Findings				
Died or euthanized moribund	1	0	0	1
Body weight (g, % change[b])				
Day 10	312	↓5	↓10*	↓13*
Day 28	375	↑2	↓3	↓5**
Day 56	421	↑9**	↑5	↑4
Day 91	443	↑9	↑8	↑14*
Food consumption (g/day, % change[b])				
Days 7-10	31	↓16***	↓22*	↓24*
Days 24-28	38	↓19***	↓24*	↓21*
Days 52-56	39	↓22***	↓26*	↓29*
Days 87-91	44	↓5	↓14	↓12

(Continued)

2.6.7.17B　その他の毒性試験：補足的毒性試験（ZDF ラットを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験）（続き）

Test Article: Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.5	1.5	5
Sex: Number of Animals	M: 27	M: 20	M: 20	M: 20
Blood chemistry[c] (% change[b])				
Glucose (mg/dL)				
Day 30	302.4	↓38***	↓46**	↓52*
Day 61	367.1	↓22	↓56**	↓60*
Day 89	428.0	↑6	↓39&	↓55#
Day 92[d]	461.2	↓2	↓23&	↓41#
HbA1c (%)				
Day 30	5.0	↓39***	↓54*	↓54*
Day 61	5.6	↓25	↓46**	↓57*
Day 89	6.3	↓11	↓33&	↓48#
Day 92[d]	6.5	↓14	↓29**	↓48*
Insulin (ng/mL)				
Day 30	6.6	↑62@	↑51@	↓8
Day 61	6.8	↑76	↑167#	↑53
Day 89	5.5	↑61	↑167&	↑223#
Day 92[d]	4.5	↓19	↓2	↑75**
Urea (mg/dL)				
Day 30	18.8	↓20***	↓24**	↓35*
Day 61	22.9	↓36	↓50	↓52
Day 89	18.3	↑4	↓24	↓38*
Day 92[d]	18.3	↓10	↓16@	↓20&

(Continued)

2.6.7.17B　その他の毒性試験：補足的毒性試験（ZDF ラットを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験）（続き）

Test Article: Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.5	1.5	5
Sex: Number of Animals	M: 27	M: 20	M: 20	M: 20
Blood chemistry[c], continued				
Total Amylase (U/L)				
Day 30	2961.9	↑25#	↑19#	↑3
Day 61	2745.4	↑25#	↑27#	↑13
Day 89	2562.5	↑16	↑47*	↑23
Day 92[d]	2601.2	↑13	↑22#	↑33#
Pancreatic amylase[d]				
Day 92	2266.2	↑12	↑22#	↑33#
Organ weight, pancreas (g, % change[b])				
Absolute	1.89	↑4	-	↑4
Relative to body weight	0.46	↓4	↓9	↓10
Relative to brain weight	106.21	↑3	↑1	↑4
Histopathology[e]				
Pancreas				
Neutrophilic acinar inflammation				
Minimal	1	0	0	3
Slight	0	0	0	2
Increased ductal epithelium				
Minimal	1	4	5	3
Slight	0	3	5	3
Moderate	0	0	1	1
Atrophy of acinar epithelium				
Minimal	0	1	3	6
Slight	0	0	0	1

(Continued)

2.6.7.17B　その他の毒性試験：補足的毒性試験（ZDF ラットを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験）（続き）

Test Article: Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.5	1.5	5
Sex: Number of Animals	M: 27	M: 20	M: 20	M: 20
(continued)				
Acinar atrophy with mixed cell inflammation				
Minimal	2	0	2	6
Slight	0	1	3	2
Islet cell hyperplasia				
Minimal	12	3	4	0
Slight	14	17	14	19
Moderate	0	0	2	1
Neutrophilic periductal inflammation				
Minimal	9	8	9	4
Slight	0	1	5	2
Moderate	0	0	0	1

Abbreviations: ↑ = increase; ↓ = decrease; – = no important findings; $AUC_{0\text{-}96hr}$ = area under the concentration time curve from 0 to 96 hours; C_{max} = maximum observed concentration; ELISA = Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; HbA1c = hemoglobin A1c, ID = Insufficient Data; M = male; N = number of animals for toxicokinetic analysis (3/timepoint (12/group), data are from a composite analysis; NOAEL = no-observed-adverse-effect level; R_{AUC} = Day 88 $AUC_{(0\text{-}96hr)}$/Day 1 $AUC_{(0\text{-}96\ hr)}$; SE = standard error; $T_{1/2}$ = elimination half-life; T_{max} = time of maximum observed concentration.

[a] The elimination phase was not well defined on Day 88 for the half-life calculation.

[b] For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance based on actual data (not the percent differences).

[c] Data are from toxicokinetic animals unless indicated otherwise. Blood samples were collected for blood chemistry 24 hours following dosing.

[d] Data are from main phase toxicity animals. Blood samples were collected for blood chemistry at termination (96 hours following the last dose).

[e] Number of animals

* p≤0.001 (Dunn's test); ** p≤0.01 (Dunn's test); *** p≤0.05 (Dunn's test); & p≤0.01 (Dunnett's test); # p≤0.001 (Dunnett's test); @ p≤0.05 (Dunnett's test)

2.6.7.17C　その他の毒性試験：補足的毒性試験（サルを用いた 1 年間反復投与毒性試験）

Report title: An Investigational Timecourse Study of Calcitonin Responses and Thyroid C-Cell Mass and Terminal Evaluation of Pancreatic Structure in Male Cynomolgus Monkeys Treated with LY2189265 Twice Weekly by Subcutaneous Injection for 12 Months

Species/strain: Monkey/Cynomolgus
Initial age: 2 to 3 years
Date of first dose: 26 September 20[redacted]
NOAEL: Not applicable

Duration of dosing: 52 weeks, twice weekly
Duration of reversibility: Not applicable
Route: Subcutaneous Injection
Vehicle: 10 mM citrate buffer (pH 6.5 ± 0.2), 4.6% mannitol (w/v), and 0.02% (w/v) polysorbate 80 prepared in sterile water for injection, USP

Document ID: 8252199
Location in CTD: 4.2.3.7.3.3
GLP compliance: Yes[a]
Test Article: Dulaglutide

Special features: Basal and calcium gluconate stimulated serum calcitonin concentration was measured at 3, 6, 9, and 12 months. At termination, thyroid C-cell mass and pancreatic structure was evaluated.

Toxicokinetics

Sample: Monkey Plasma	Analyte: Dulaglutide		Number of animals[b] : 20 males/group (total = 20)	
Feeding condition: Fed	Dose frequency: Twice weekly		Assay/Method: ELISA/MJW4 (Location in CTD: 4.2.2.1.8)	
Dose: 8.15 mg/kg				
Sex: M	Day 88	Day 179	Day 270	Day 365
Mean Plasma Level (μg/mL)	22.833	17.416	19.436	15.150
(SD)	(14.225)	(6.532)	(3.398)	(3.075)
N	19	19	19	19

Test Article: Dose (mg/kg)	0 (Control)	8.15
Sex: Number of Animals	M: 20	M: 19[b]
Noteworthy Findings		
Body weight (kg, % change[c])		
Day 15	3.1	↓16*
Day 92	3.3	↓12*
Day 183	3.8	↓16*
Day 274	4.1	↓17*
Day 365	4.5	↓20*

(Continued)

2.6.7.17C　その他の毒性試験：補足的毒性試験（サルを用いた 1 年間反復投与毒性試験）（続き）

Test Article: Dose (mg/kg)	0 (Control)	8.15
Sex: Number of Animals	M: 20	M: 19[b]
Histopathology[d]		
Pancreas – Increased goblet cells, Interlobular ducts		
Minimal	6	3
Slight	0	2
Moderate	0	2
Thyroid Morphometry		
Volume of calcitonin positive tissue (mm^3)	0.026	0.023

Abbreviations: ↓ = decrease; ELISA = Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; M = male; N = number of animals for toxicokinetic analysis; NOAEL = no-observed-adverse-effect level; SD = standard deviation.

[a] Thyroid morphometrics and calcitonin and thyroid morphometric data interpretation were not performed according to Good Laboratory Practice regulations but were conducted according to sound scientific principles.

[b] One animal given 8.15 mg/kg failed to accommodate to the test article and was removed from study on Day 36 of the dosing phase after receiving only 4 of the intended initial 9 doses.

[c] For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance based on actual data (not the percent differences).

[d] Number of animals affected

* $p \leq 0.05$ (Two-sided test)